



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΠΜΣ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ-ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

*“Ανίχνευση πολυμορφισμών του Dicer σε ανθρώπινο
σπέρμα ”*

ΒΙΡΒΙΛΗ ΜΑΡΙΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

*Επιβλέπων Καθηγητής
Δρακάκης Πέτρος*

ΑΘΗΝΑ 2019

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Με το πέρασμα των χρόνων και την πορεία του Ανθρώπου στην Ιστορία, αποτελεί πλέον βεβαιότητα πως η όλη μοίρα της ανθρώπινης φυλής, μπορεί να καθοριστεί από την εξέλιξη της Επιστήμης. Θεμέλια λίθος της επιστημονικής εξέλιξης αποτελεί η επιστημονική έρευνα, το κυνήγι δηλαδή του αγνώστου και η συστηματική αναζήτηση της αλήθειας. Η επιστημονική έρευνα έγκειται στην απόσπαση των «μυστικών» της πορείας των φαινομένων από εκείνους που τη διακονούν, που δεν είναι άλλοι από τους επιστήμονες. Με την παρούσα διπλωματική εργασία ευελπιστώ να συνεισφέρω έστω και στον ελάχιστο βαθμό στον τομέα των Επιστημών που έχει ως υπέρτατο σκοπό τον Άνθρωπο.

Η συγκεκριμένη εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Ντέπυ Μαυρογιάννη για την πολύτιμη βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και για την καθοδήγησή της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες μου που με στήριξαν με το δικό τους τρόπο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου στην οικογένειά μου, σε εκείνους που είναι δίπλα μου ψυχή και σώματι.

Μαρικαίτη Βιρβίλη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο	Τίτλος Περίληψη
1	Εισαγωγή
1.1	Το Αναπαραγωγικό Σύστημα του Άρρενος
1.2	Η φυσιολογική ανάπτυξη των γονάδων
1.3	Σπερματογένεση
1.4	Αιτιολογία Ανδρικής Υπογονιμότητας
1.5	Ο παράγοντας Dicer
1.6	Σκοπός
2	Υλικά και Μέθοδοι
2.1	Δείγματα
2.2	Απομόνωση DNA από σπέρμα
2.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
2.4	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης
2.5	DNA sequencing
3	Αποτελέσματα
3.1	Αποτελέσματα PCR
3.2	Αποτελέσματα sequencing
4	Συζήτηση Βιβλιογραφία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παράγοντας Dicer είναι μια ενδονουκλεάση που ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών τύπου III και εμπλέκεται στην επεξεργασία των microRNAs (miRNAs) και των small interfering RNAs (siRNAs). Πειράματα σε ζωικά πρότυπα καταδεικνύουν ότι το Dicer παίζει καθοριστικό ρόλο στην αρσενική γονιμότητα καθώς επίσης και στην αναπαραγωγή και ανάπτυξη, μέσω της ρύθμισης των RNA μορίων . Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνάται εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ ενός πολυμορφισμού του γονιδίου Dicer και της ανδρικής υπογονιμότητας.

ABSTRACT

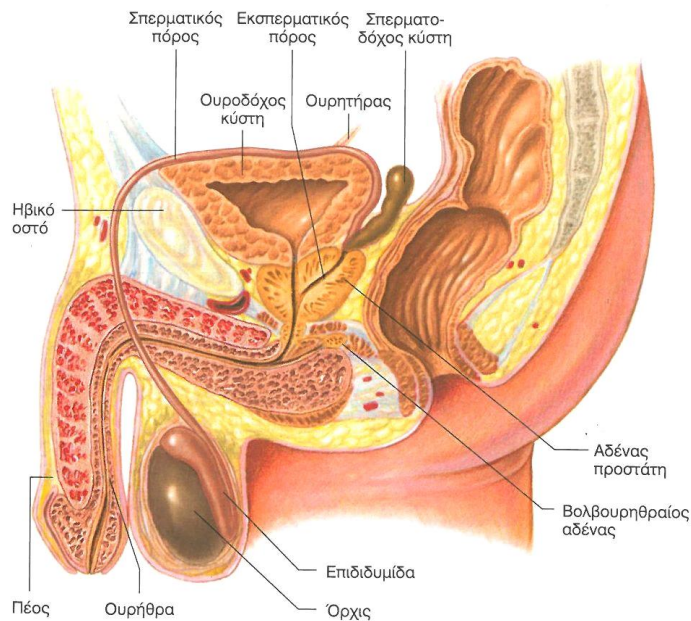
Dicer factor is an endonuclease member of the ribonuclease III family that processes microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs). Many experiments in several animal models demonstrate that Dicer plays a vital role in male fertility, as well as reproduction and development, through the RNA regulation. In this work it is investigated the relationship between male infertility and a Dicer polymorphism.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το Αναπαραγωγικό Σύστημα του Άρρενος

Το αναπαραγωγικό σύστημα αποτελεί ένα από τα βασικότερα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς ευθύνεται για τη δημιουργία της ζωής και συνεπώς για τη διαίονιση του είδους. Ο ρόλος του έγκειται στην παραγωγή των κυττάρων αναπαραγωγής, δηλαδή των γαμετικών κυττάρων, σύμφωνα με μια διαδικασία που ονομάζεται γαμετογένεση και επιτελείται από τις γονάδες. Το κύριο όργανο αναπαραγωγής στον άνδρα που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων καθώς επίσης και των ορμονών του φύλου και συγκεκριμένα της τεστοστερόνης, είναι οι όρχεις. (Vander et al., 2011).

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άρρενος περιλαμβάνει τους δυο όρχεις, τα σπερματικά σωληνάρια όπου αποθηκεύεται το σπέρμα και μεταφέρεται προς το εξωτερικό του σώματος, τους αδένες που εκβάλλουν στα σπερματικά σωληνάρια και το πέος. Οι όρχεις εσωκλείονται από ένα σάκο που ονομάζεται όσχεο και προεξέχει από το κοιλιακό τοίχωμα. Η σπερματογένεση επιτελείται στα σπερματικά σωληνάρια το συνολικό μήκος των οποίων φτάνει τα 250m. Κάθε σπερματικό σωληνάριο οριοθετείται από μια βασική μεμβράνη και ένα στρώμα κυττάρων λείου μυός. Τα σπερματικά σωληνάρια διαφορετικών περιοχών του όρχεως ενοποιούνται και σχηματίζουν ένα πλέγμα που ονομάζεται ορχικό δίκτυο. Η επιδιδυμίδα βρίσκεται χαλαρά προσδεδεμένη στο εξωτερικό μέρος των όρχεων και δημιουργεί τον σπερματικό πόρο, ο οποίος με τη σειρά του δημιουργεί τον εκσπερματικό πόρο. Ο εκσπερματικός πόρος ακολούθως εισέρχεται στον προστάτη, έναν αδένα που σε συνδυασμό με τις σπερματοδόχες κύστεις εκκρίνουν την πλειονότητα του σπερματικού υγρού που υποστηρίζει τα εκσπερματούμενα σπερματοζωάρια. (Vander et al., 2011).

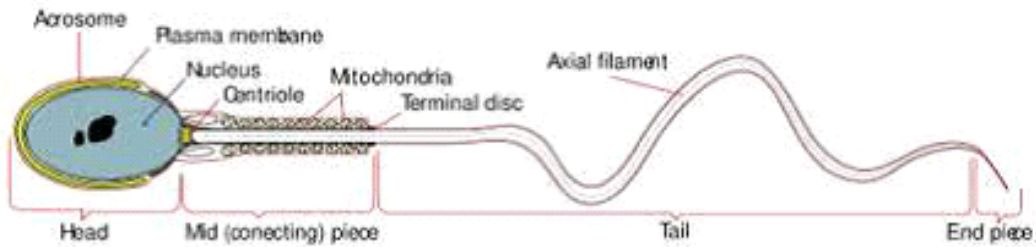


Εικόνα 1.1: Ανατομικό διάγραμμα αναπαραγωγικού συστήματος άρρενος. Προσαρμοσμένη από Vander, 2011

Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της τεστοστερόνης ονομάζονται κύτταρα Leydig και εντοπίζονται διαμέσου των σπερματικών σωληναρίων. Τα κύτταρα Sertoli διαχωρίζουν τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων και επομένως τα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά διαμερίσματα (Διάλεξη σπερματογένεση Μαυρογιάννη Msc, 2016).

Το σπερματοζώαριο αποτελεί τη μονάδα βάσει της οποίας επιτυγχάνεται η γονιμοποίηση και κατ' επέκταση η αναπαραγωγή. Ένα τυπικό σπερματοζώαριο αποτελείται από τρεις μορφολογικά καθορισμένες περιοχές, την κεφαλή, τον αυχένα και την ουρά (Εικόνα 1.2.). Η κεφαλή του σπερματοζωαρίου αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από τον πυρήνα που περιέχει το DNA με όλη τη γενετική πληροφορία. Στην κορυφή της κεφαλής βρίσκεται το ακρόσωμα, ένα κυστίδιο το οποίο περιέχει ένζυμα και ενέχεται στην συνένωση του σπερματοζωαρίου με το ωάριο. Ο αυχένας πληρείται από μιτοχόνδρια τα οποία παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την κίνηση

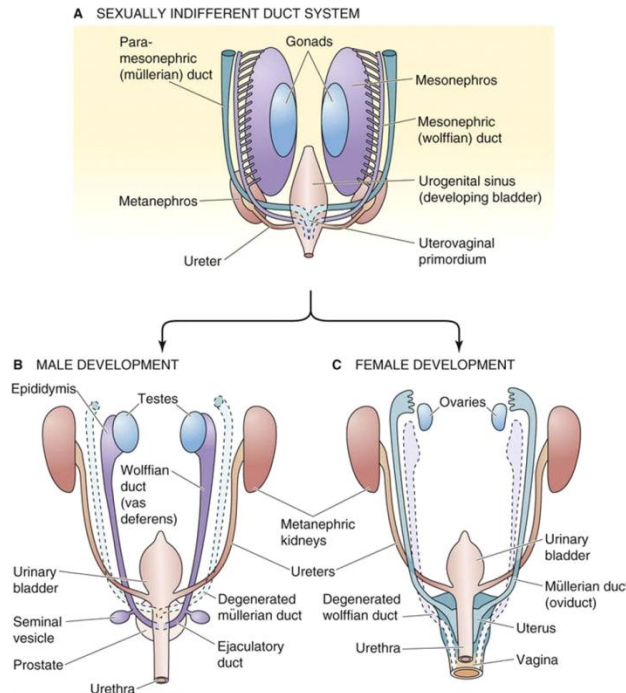
του σπερματοζωαρίου. Τέλος, η ουρά εκλαμβάνεται ως ένα μαστίγιο αποτελούμενο από συσταλά νημάτια, τα οποία παράγουν μια ημιτονοειδή προωθητική κίνηση που προσδίδει στο σπέρμα ταχύτητα από 1-4mm το λεπτό.



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού σπερματοζωαρίου. Προσαρμοσμένη από διάλεξη Σπυροπούλου Msc 2016

1.2 Η φυσιολογική ανάπτυξη των γονάδων

Κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, το γεννητικό σύστημα είναι πανομοιότυπο και στα δυο φύλα. Αν και ήδη από αυτό το στάδιο οι γονάδες υφίστανται ελαφρές κυτταρικές διαφορές, ωστόσο δεν είναι εφικτό να διακριθούν μεταξύ τους ως προς την εμφάνιση. Στο τέλος της αδιαφοροποίητης φάσης της φυλετικής ανάπτυξης η αρχέγονη γεννητική οδός και στα δυο φύλα αποτελείται από τις γονάδες, από τα δυο συστήματα των γεννητικών πόρων (πόροι του Wolff και πόροι του Muller) και από την κοινή έξοδο των πόρων του ουροποιητικού και γεννητικού συστήματος, μέσα από τις γεννητικές πτυχές στο κοιλιακό τοίχωμα. (Διάλεξη Εμβρυολογία Αναπαραγωγικού Συστήματος, Αναγνώστου, Msc 2016)



Εικόνα 1.3: Διαφοροποίηση των γονάδων(<https://doctorlib.info/physiology/medical/294.html>)

Οι γονάδες εμφανίζονται αρχικά με τη μορφή ενός ζεύγους επίμηκων ακρολοφιών που ονομάζονται γεννητικοί ή γοναδικοί κρημνοί. Στη συνέχεια σχηματίζονται με τον πολλαπλασιασμό του βλαστικού επιθηλίου και την πύκνωση του υποκείμενου μεσεγχύματος στη μια και στην άλλη πλευρά του ραχιαίου μεσεντερίου, στην επιφάνεια του μεσόνεφρου και σε στενή σχέση με αυτόν. Η γοναδική καταβολή εμφανίζεται αρχικά σαν πάχυνση του εσωτερικού τοιχώματος του μεσόνεφρου. Καθώς αναπτύσσεται προβάλλει στο σπλαχνικό κοίλωμα και χωρίζεται βαθμιαία από το μεσόνεφρο, με το οποίο παραμένει συνδεδεμένη στην περιοχή της πύλης, με το μεσόρχιο για τον όρχι και το μεσοωθήκιο για την ωθήκη. Στα ανθρώπινα έμβρυα τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται σε ένα πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης ανάμεσα στα ενδοδερμικά κύτταρα στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού κοντά στην αλλαντοΐδα.

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις κατά μήκος του ραχιαίου μεσεντερίου και του οπίσθιου εντέρου, φθάνουν στις αρχέγονες γονάδες στην αρχή της 5ης βδομάδας και εισχωρούν στους γεννητικούς κρημνούς την 6η βδομάδα της ανάπτυξης.

Μετά την 6η βδομάδα λαμβάνει χώρα η διαφοροποίηση σε ανδρική ή γυναικεία γονάδα. Υπό την επίδραση του γονιδίου SRY τα κύτταρα Sertoli παράγουν την αντιμυλλέρια ορμόνη (AMH) που έχει σαν αποτέλεσμα την υποστροφή των πόρων του Muller, ενώ ταυτόχρονα από τα κύτταρα Leydig παράγεται η τεστοστερόνη. Κατά αυτόν τον τρόπο και με τη συμβολή διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων και κυτταροπλασματικών καθοριστών γίνεται η φυλετική διαφοροποίηση του άρρενος (WT1, SF1).

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό και ωθούν στον πολλαπλασιασμό αυτό τα κύτταρα του μεσόνεφρου και του παρακείμενου κοιλωματικού επιθηλίου, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ζεύγους γεννητικών ταινιών σε αμέσως εσωτερική θέση ως προς τους αναπτυσσόμενους μεσόνεφρους.

Υπό την επίδραση του Y χρωμοσώματος το οποίο περιέχει το γονίδιο του ορχεοκαθοριστικού παράγοντα TDF, οι αρχέγονες γεννητικές δοκίδες εισχωρούν βαθιά στο μυελό για να σχηματίσουν τις ορχικές ή μυελώδεις δοκίδες. Προ τις πύλες του αδένου οι ορχικές δοκίδες διασπώνται σε δίκτυο μικρών κυτταρικών χορδών οι οποίες αργότερα δίνουν γένεση στα σωληνάρια του ορχικού δικτύου. Επομένως, ως πρώτη διαφορά αρσενικής και θηλυκής γοναδικής καταβολής θεωρείται η εμφάνιση σπερματικών χορδών μέσα στο γοναδικό βλάστημα, που διαφοροποιείται σε όρχι.

Κατά την περαιτέρω ανάπτυξη οι ορχικές δοκίδες χάνουν την επαφή τους με το βλαστικό επιθήλιο, από το οποίο χωρίζονται με πυκνή στιβάδα ινώδους συνδετικού ιστού, τον ινώδη χιτώνα, ένα χαρακτηριστικό στοιχείο του όρχεος. Τον 4ο μήνα της κύησης οι ορχικές δοκίδες αποκτούν πεταλοειδές σχήμα ενώ τα άκρα τους συνδέονται με το αρχικό δίκτυο. Οι αρχικές δοκίδες αποτελούνται πλέον από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και από στηρικτικά κύτταρα Sertoli, τα οποία προέρχονται από το βλαστικό επιθήλιο του όρχεος.

Τα διάμεσα κύτταρα του Leydig προέρχονται από το αρχικό μεσέγγυμα του γεννητικού κρημονού βρίσκονται ανάμεσα στις ορχικές δοκίδες και αρχίζουν την ανάπτυξή τους λίγο μετά την έναρξη της διαφοροποίησης αυτών των δοκίδων. Την 8η βδομάδα της κύησης αρχίζει η παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα του Leydig και

ως εκ τούτου ο όρχις είναι πλέον ικανός να επηρεάσει τη φυλετική διαφοροποίηση των γεννητικών πόρων και των έξω γεννητικών οργάνων.

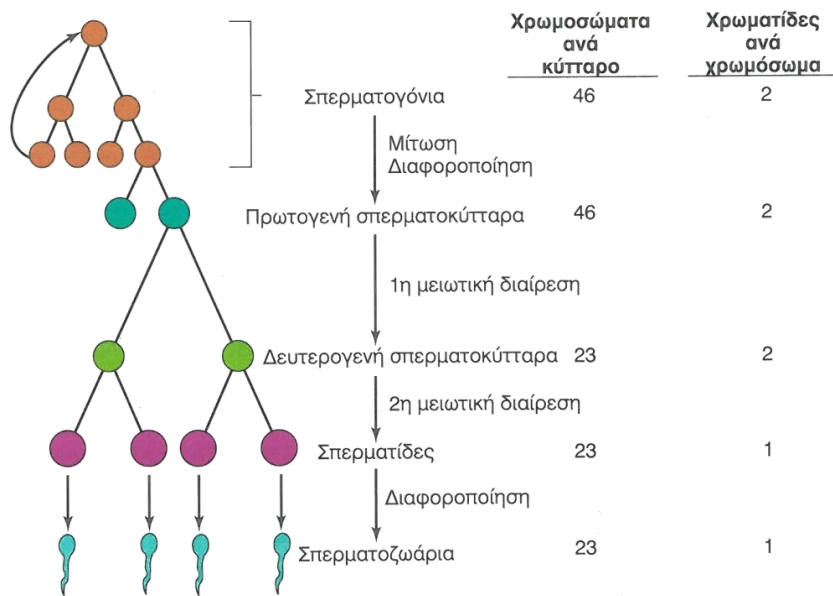
Στην αρχή της διαφοροποίησης εμφανίζονται δυο ζεύγη γεννητικών πόρων οι μεσονεφρικοί ή πόροι του Wolff και οι παραμεσονεφρικοί Muller. Η ορχική διαφοροποίηση του συστήματος των πόρων ξεκινά νωρίς κατά την όψιμη εμβρυική περίοδο και αποδίδεται στην επίδραση των γεννητικών ορμονών. Στο άρρεν οι όρχις του όψιμου εμβρύου παράγουν εκτός από την αρρενοποιητική ορμόνη και έναν παραμεσονεφρικό αναστολέα, με αποτέλεσμα την επικράτηση των μεσονεφρικών πόρων στο άρρεν όψιμο έμβρυο.

Στη συνέχεια της διαφοροποίησης του άρρενος εμβρύου εκφυλίζονται οι πόροι του Muller και από το ανώτερο τμήμα των πόρων του Wolff που συνδέεται με τους όρχις αναπτύσσεται η επιδιδυμίδα, από το κεντρικό τμήμα οι σπερματικοί πόροι και από το τελικό τμήμα οι σπερματοδόχες κύστεις και οι εκσπερματικοί πόροι.

Ο σχηματισμός των έξω γεννητικών οργάνων εξαρτάται από τη δράση της τεστοστερόνης που παράγεται από τους όρχις. Το γεννητικό φύμα επιμηκύνεται και αναπτύσσεται προκειμένου να σχηματίσει το πέος. Οι ουρηθραίες πτυχές μετακινούνται η μια προς την άλλη, σχηματίζοντας το ουρογεννητικό σχίσμα. Η συνένωση των δυο χειλοσχεϊκών πτυχών κατά τη μέση γραμμή οδηγεί στο σχηματισμό του όσχεου και του πέους, το οποίο εσωκλείει τη σπογγώδη ουρήθρα που καταλήγει στη βάλανο του πέους. Τα εξωτερικά γεννητικά όργανα παραμένουν αδιαφοροποίητα έως τη 12η βδομάδα την κύησης.

1.3 Σπερματογένεση

Η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά κατά την εφηβεία με την έναρξη της έκκρισης των γοναδοτροπίνων και περιλαμβάνει την ανάπτυξη ώριμων απλοειδών σπερματοζωαρίων από διπλοειδή σπερματογόνια κύτταρα. (Marilena D. Papaioannou Dr Serge Nef, 2010). Διαρκεί περίπου 74 ημέρες και περιλαμβάνει την ανανέωση των βλαστικών κυττάρων της γαμετικής σειράς (σπερματογόνια) και τη διαφοροποίησή τους σε γαμέτες. Κατά την εφηβεία, τα σπερματογόνια αρχίζουν να διαιρούνται με μίτωση και αυτό επαναλαμβάνεται για ένα συγκεκριμένο αριθμό διαιρετικών κύκλων, έτσι ώστε να δημιουργείται ένας ολόκληρος κλώνος σπερματογονίων από κάθε πρότυπο σπερματογόνο. Στη συνέχεια της μίτωσης επέρχεται η διαφοροποίηση και σχηματίζονται τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο αυξάνει σημαντικά σε μέγεθος και υπόκειται σε μειωτική διαίρεση προκειμένου να σχηματισθούν τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα υπόκεινται σε δεύτερη μειωτική διαίρεση και μετατρέπονται σε σπερματίδες. Η τελική φάση της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των σπερματίδων σε σπερματοζωάρια μέσω κυτταρικής αναδόμησης: σχηματισμός του ακροσωμικού κυστιδίου, συμπύκνωση της χρωματίνης, μετακίνηση του ακροσωμικού κυστιδίου προς τον πυρήνα, μιτοχόνδρια στο μαστίγιο, αναδόμηση του κυτταροπλάσματος. (Marilena D. Papaioannou, Dr Serge Nef, 2010)



Εικόνα 1.4: Σύνοψη σπερματογένεσης. Προσαρμοσμένη από Vander, 2011

Η σπερματογένεση χαρακτηρίζεται από μειωτικές διαιρέσεις και μορφολογικές αλλαγές προκειμένου να παραχθούν σπερματοζώαρια ικανά για κίνηση και γονιμοποίηση. Η διαφοροποίηση των σπερματογόνιων ακολουθεί συγκεκριμένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που ελέγχονται από μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Κύριοι ρυθμιστές των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων είναι τα μικρά, μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs). Ολοένα και περισσότερα δεδομένα καταδεικνύουν τα miRNAs ως κύριους ρυθμιστές στη σπερματογένεση και την ανδρική γονιμότητα. (Ram Prakash Yadav, Noora Kotaja, 2014)

1.4 Αιτιολογία Ανδρικής Υπογονιμότητας

Η ανδρική γονιμότητα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες καθόλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς. Υπογόνιμοι άνδρες χαρακτηρίζονται εκείνοι που έχουν εικόνα αζωοσπερμίας, ολιγοασθενοζωοσπερμίας, τερατοζωοσπερμίας και τέλος ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμίας. Τα κριτήρια αυτά σχετίζονται με συγκεκριμένες τιμές αναφοράς των διαφόρων παραμέτρων αξιολόγησης του σπέρματος (κινητικότητα, αριθμός, μορφολογία) που καθορίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Πίνακας 1.1). Ως αζωοσπερμία ορίζεται η παντελής έλλειψη σπερματοζωαρίων. Χωρίζεται σε μη αποφρακτική που έχει ως αιτιολογία την αδυναμία σπερματογένεσης και σε αποφρακτική, όπου επιτελείται κανονικά η διαδικασία της σπερματογένεσης, ωστόσο υπάρχει δυσλειτουργία σε κάποιο άλλο σημείο της αναπαραγωγικής οδού. Ως ολιγοασθενοζωοσπερμία ορίζεται η παρουσία σπερματοζωαρίων με πολύ χαμηλή έως μηδενική κινητικότητα και σε πολύ χαμηλό αριθμό. Αυτό ουσιαστικά υποδεικνύει πως επιτελείται η σπερματογένεση σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Τέλος, ως τερατοζωοσπερμία ορίζεται η παντελής έλλειψη ομαλώς μορφολογικών σπερματοζωαρίων. Όλες οι αυτές παράμετροι σχετίζονται με τη δυσκολία ή και αδυναμία γονιμοποίησης και κατεπέκταση με την ανδρική υπογονιμότητα. (Ευγενή Λ., Λυμπερόπουλος Γ., 2010)

Όπως προαναφέρθηκε, το σπέρμα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς. Παρακάτω, παρατίθενται ορισμένοι από τους κυριότερους παράγοντες που επιδρούν στην ποιότητα του ανδρικού σπέρματος:

Παράγοντες που επηρεάζουν το σπέρμα

- Φλεγμονές (προστατίτιδα, επιδιδυμίτιδα)
- Παθήσεις
- Εμπύρετη κατάσταση ($>39^{\circ}\text{C}$) κατά το τελευταίο τρίμηνο

- Λήψη φαρμακευτικών ουσιών (πχ ψωρίαση, έλκος) ή αναισθησίας κατά το τελευταίο τρίμηνο
- Επεμβάσεις στο ουρογεννητικό σύστημα
- Τραυματισμός στους όρχεις
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες (Κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ)
- Γενετικοί παράγοντες
- Έκθεση σε τοξικούς παράγοντες: μόλυβδος, κάδμιο, υδράργυρος, οξείδιο του αιθυλενίου, βινυλοχλωρίδιο, ραδιενέργεια, ακτίνες X
- Υψηλές θερμοκρασίες στους όρχεις, πχ αυτοκινητιστές
- Επέμβαση κήλης
- Κρυπορχία, παρωτίτιδα
- Diethylstilbestrol (DES) κατά την εγκυμοσύνη (1940-1971), μη στεροειδές οιστρογόνο ([Tüttelmann](#) et al, 2018)

Πίνακας 1.1

**ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΠΕΡΜΑ
ΚΑΤΑ ΤΟΝ Π.Ο.Υ.**

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΤΑ WHO (2010)	ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΤΑ WHO (1999)
Όγκος σπέρματος:	$\geq 1,5 \text{ ml}$	$\geq 2 \text{ ml}$
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων	$\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$	$\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	$\geq 39 \times 10^6$	$\geq 40 \times 10^6$
Κινητικότητα σπερματοζωαρίων:	$\geq 32\%$ με προωθητική κινητικότητα (κατηγορίες α+β) εντός 60 min από την εκσπερμάτιση	$\geq 25\%$ με ταχεία προωθητική κινητικότητα (κατηγορία α) ή $\geq 50\%$ με προωθητική κινητικότητα (κατηγορίες α+β) εντός 60 min από την εκσπερμάτιση
Ολική κινητικότητα σπερματοζωαρίων:	$\geq 40\%$ με προωθητική και επιτόπια κινητικότητα (κατηγορίες α+β+γ) εντός 60 min από την εκσπερμάτιση	
Μορφολογία σπερματοζωαρίων:	$\geq 4\%$ κατά Tygerberg	$\geq 15\%$ κατά Π.Ο.Υ. ή $\geq 14\%$ κατά Tygerberg και Δείκτης τερατοζωοσπερμίας $\leq 1,6$
Αριθμός Λευκοκυττάρων	$< 1.0 \times 10^6/\text{ml}$	$< 1.0 \times 10^6/\text{ml}$

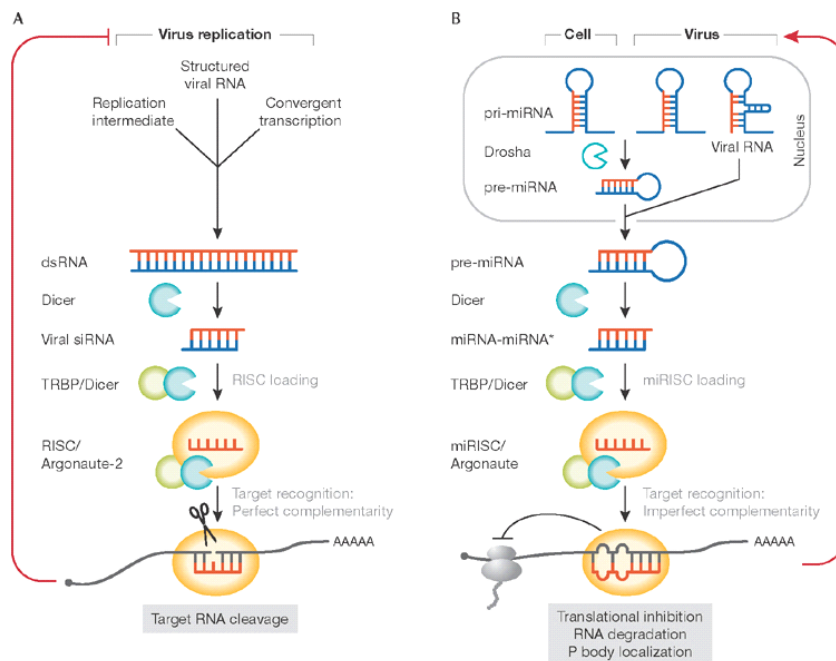
1.5 Ο παράγοντας Dicer

Ο παράγοντας Dicer είναι μια ριβονουκλεάση τύπου III (RNase III) με πολλαπλές επικράτειες και αποτελεί βασικό ρυθμιστή της βιογένεσης microRNAs και siRNAs. Πιο συγκεκριμένα, το Dicer εμπλέκεται στο μονοπάτι RNAi και ευθύνεται για την επεξεργασία του δίκλωνου RNA (dsRNA) σε μικρότερα μόρια RNA, συμπεριλαμβανομένου miRNAs και siRNAs (Min-Sun Song, John J. Rossi, 2017). Τα miRNAs αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μη κωδικών μορίων μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων. Αναδύθηκαν πάνω από 20 χρόνια πριν, ως κύριοι μεταμεταγραφικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να μελετάται ο ρόλος των μορίων αυτών στο ανθρώπινο αναπαραγωγικό σύστημα και έχει βρεθεί ότι τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η ωρίμανση του ωοκυττάρου, η ωοθυλακιογένεση, η λειτουργία του ωχρού σωματίου, η εμφύτευση και η πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη. ([Marilena D. Papaioannou](#), [Dr Serge Nef](#) First 2010).

Κύτταρα της αρσενικής γαμετικής σειράς εκφράζουν διάφορα μικρά RNAs, συμπεριλαμβανομένου Dicer-εξαρτώμενα (miRNAs) και ενδογενή siRNAs. Νέα δεδομένα δείχνουν ότι το Dicer εμπλέκεται επιπλέον στην επεξεργασία ενδογενών και εξογενών υποστρωμάτων καθώς επίσης και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες. Το Dicer, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητά του στο κυτταρόπλασμα μπορεί να εντοπιστεί στον πυρήνα και να αντιδράσει με συστατικά του πυρηνικού πόρου, καθώς επίσης και σε εξοσώματα, μικρά κυστίδια που περιέχουν RNAs και πρωτεΐνες και εκκρίνονται από τα κύτταρα. Επιπλέον, είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του φαγοσώματος όπου λαμβάνει χώρα η αυτοφαγία και εμπλέκεται σε διάφορες αντιικές αποκρίσεις, παράγοντας ιικά μόρια siRNA. (Min-Sun Song, John J. Rossi, 2017).

Στο μονοπάτι RNAi, η βιογένεση των μικρών μορίων RNA συμβαίνει μέσα από έναν καταρράκτη αντιδράσεων στο κυτταρόπλασμα, ο οποίος περιλαμβάνει το ένζυμο Dicer, μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών AGO καθώς επίσης και το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex).

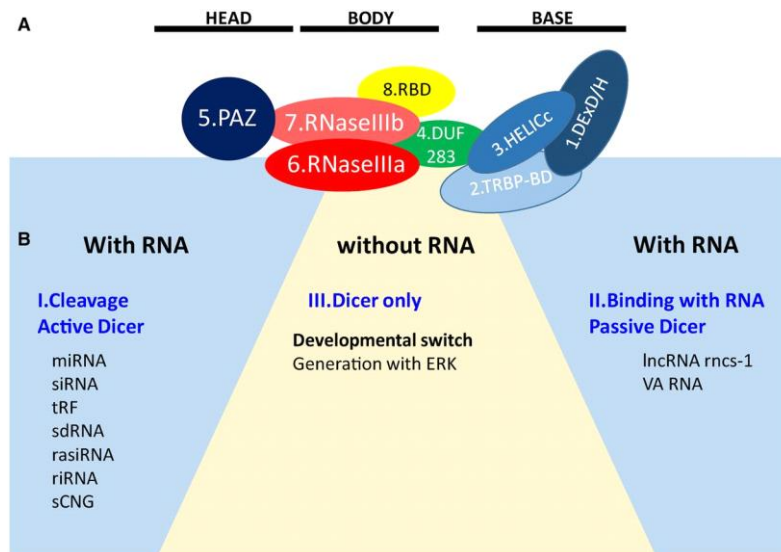
Αρχικά, το RNA σχηματίζει σύμπλοκο με το Dicer με τη βοήθεια επικουρικών πρωτεϊνών τσαπερόνων (Hsc70/Hsp90). Στη συνέχεια το RNA αποκόπτεται από την Dicer και συνδέεται με δυο διαφορετικές πρωτεΐνες που προσδένουν μόρια dsRNA την TRBP (HIV trans-activating response RNA-binding protein) και PACT (protein activator of PKR). Αφού δεσμευτεί το dsRNA, ο ένας από τους δυο κλώνους του ενσωματώνεται σε μια AGO πρωτεΐνη για να σχηματιστεί το RISC. Το δίλωνο RNA ξετυλίγεται και η AGO2 πρωτεΐνη αποδιατάσσει τον άλλο κλώνο. Το ενεργοποιημένο RISC αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο στόχο πάνω στο RNA μέσω του κανόνα της συμπληρωματικότητας. Το αποτέλεσμα της σύνδεσης του RISC με τα miRNAs ή τα siRNAs οδηγεί είτε σε αποικοδόμηση συμπληρωματικών RNAs ή παρεμποδίζει τη μετάφραση μερικών συμπληρωματικών μορίων στόχων mRNA μέσω μεταμεταγραφικής γονιδιακής αποσίωπησης στο κυτταρόπλασμα. (Song MS, Rossi JJ, 2017)



Εικόνα 1.5: Μηχανισμός επεξεργασίας των si-RNAs στα θηλαστικά (<http://embor.embopress.org/content/9/8/725.figures-only>)

Παρόλο που δεν έχει κρυσταλλοποιηθεί ακόμη ολόκληρη η δομή του μορίου Dicer των θηλαστικών, έχουν γίνει πολλές μελέτες για την πρόβλεψη της δομής της και

των επικρατειών της. Οι κύριες επικράτειες που εκτείνονται από το –N έως το –C τελικό άκρο, περιλαμβάνουν μια επικράτεια ελικάσης, μια επικράτεια ενδονουκλεάσης και μία επικράτεια πρόσδεσης του dsRNA (Εικόνα 1.6). Δεδομένα από ανάλυση κρυσταλλογραφίας δείχνουν ότι η δομή του Dicer αναπαριστά το γράμμα L. Στην κεφαλή βρίσκεται η επικράτεια PAZ που περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης για το 3' άκρο του dsRNA υποστρώματος, καθώς επίσης και μια θέση πρόσδεσης για το 5' φωσφορυλιωμένο άκρο των μικρών RNAs. Στο κάτω μισό μέρος του Dicer βρίσκονται οι επικράτειες RNase IIIa και IIIb που αποτελούν τον καταλυτικό πυρήνα του Dicer. Κάθε μια από αυτές τις επικράτειες είναι υπεύθυνη για την αποδιάταξη του ενός κλώνου του dsRNA υποστρώματος. Νέες μελέτες δείχνουν ότι η επικράτεια DUF283 είναι ικανή για την πρόσδεση μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων. (Song MS, Rossi JJ, 2017)



Εικόνα 1.6: (A) Η δομή του Dicer. Ο αριθμός 1 number καταδεικνύει το αμινο-τελικό άκρο. Η αμινοτελική επικράτεια ελικάσης δημιουργεί μια δομή τύπου σφιγκτήρα στη βάση του L σχηματισμού και όπου θεωρείται ότι προσδένεται το dsRNA. (B) Πολλαπλή λειτουργία του Dicer. I. Η ενεργοποιημένη Dicer αναγνωρίζει πολλαπλούς τύπους RNA και μπορεί να αποκόπτει μικρά μόρια RNA. II. Η αδρανής Dicer προσδένεται σε RNA χωρίς ενεργότητα ενδονουκλεάσης. Η Dicer επεξεργάζεται μόρια RNA που έχουν ελεύθερα άκρα. Η Dicer μόνη της μπορεί να λειτουργήσει σαν πρωτεΐνη πρόσδεσης. Για παράδειγμα, μέσω του μονοπατιού

σηματοδότησης Ras/Erk η Dicer ρυθμίζει την ωογένεση και είναι πιθανό υπόστρωμα ERK. ([Song MS, Rossi JJ, 2017](#)).

Για το γονίδιο Dicer έχουν βρεθεί διάφοροι πολυμορφισμοί, με δυο να αποτελούν τους πιο συνήθεις. Ο πρώτος που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική έχει αριθμό αναφοράς rs3742330 και αφορά την αλλαγή από A σε G. Ο δεύτερος έχει αριθμό αναφοράς rs13078 και αφορά την αλλαγή από T σε A. Και οι δυο εντοπίζονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή. (Clague et al, 2010)

1.6 Σκοπός

Στον τομέα της ανδρικής αναπαραγωγής, ζωικά μοντέλα ποντικών δείχνουν ότι το Dicer είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα του σπέρματος και τη μορφολογία. Αδρανοποίηση του Dicer μπορεί να επηρεάσει την ποσότητα και την ποιότητα του σπέρματος. Επομένως, κατανοώντας τη λειτουργία του Dicer στην ανδρική γονιμότητα θα μπορέσουν να μελετηθούν σε βάθος οι παθογενετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την υπογονιμότητα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συλλέχθηκαν 69 τυχαία δείγματα σπέρματος ανδρών και στη συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς τον πολυμορφισμό του γονιδίου με αριθμό αναφοράς rs3742330. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι να μελετηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση της υπογονιμότητας των ανδρών αυτών και του συγκεκριμένου πολυμορφισμού του γονιδίου DICER.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα σπέρματος από 69 άνδρες εύρους ηλικιών από 27-57 ετών και Μ.Ο δειγμάτων 40.9. Οι ασθενείς αντιπροσωπεύουν τυχαίο δείγμα ανδρών στον ελληνικό πληθυσμό ανεξαρτήτως ιστορικού υπογονιμότητας, οι οποίοι προσήλθαν στο Τμήμα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

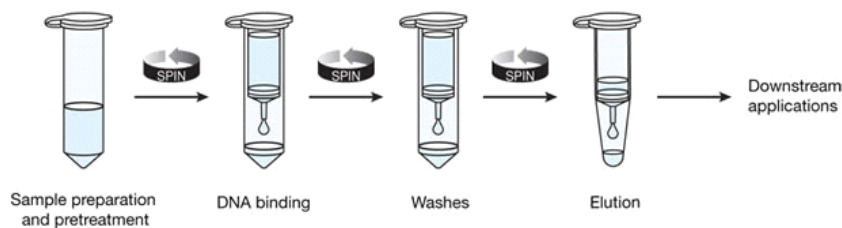
2.2 Απομόνωση DNA από σπέρμα (purification of DNA from Blood or Body Fluids spin protocol)

Το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα PureLink DNA Kits for purification of DNA της invitrogen by life technologies επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του DNA από υγρά του ανθρώπινου οργανισμού. Το απομονωμένο DNA έχει μέγεθος 100-300 kb και είναι κατάλληλο για να ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Η συλλογή του σπέρματος γίνεται σε ειδικό αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη και στη συνέχεια μέρος του δείγματος αποθηκεύεται σε ειδικό erppendorf tube που περιέχει 10% γλυκερόλη και τοποθετείται στους -20⁰C. Η απομόνωση του DNA από το σπέρμα περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων (cell lysis), την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (protein precipitation) και την κατακρήμνιση του DNA (DNA precipitation).

Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης (Eppendorf tube του 1.5 ml) προστίθενται 200 μl σπέρματος μαζί με 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer και 20 μl πρωτεϊνάσης K. Το Lysis Buffer προκαλεί την πλήρη διάρρηξη της

κυτταροπλασματικής μεμβράνης, των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων προκειμένου να απελευθερωθεί στο διάλυμα το DNA που ανευρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων. Η πρωτεΐνάση K αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες που μπορούν να βλάψουν τα κεκαθαρμένα μόρια του DNA.

Το προϊόν της λύσης επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 56° C για 10 λεπτά για να προωθηθεί η λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και η πέψη των πρωτεϊνών. Έπειτα προσθέτουμε 200 μl 100% αιθανόλη για την κατακρήμνιση του DNA και μεταφέρουμε το ομογενοποιημένο διάλυμα σε μια περιστρεφόμενη στήλη όπου μετά από φυγοκέντρηση το DNA που έχει απελευθερωθεί στο διάλυμα δεσμεύεται στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column, ενώ οι πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά υπολείμματα που περιέχονται στο διάλυμα δεν συγκρατούνται στη μεμβράνη, αλλά εκλύονται στο σωλήνα συλλογής, ο οποίος απορρίπτεται. Ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις της περιστρεφόμενης στήλης με δύο ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων που έχουν δεσμευθεί στη μεμβράνη και να βελτιστοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η καθαρότητα του DNA. Το κεκαθαρμένο DNA εκλύεται από τη μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column χρησιμοποιώντας διάλυμα έκλυσης, elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA). Η στήλη απορρίπτεται και το σωληνάριο συλλογής που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθηκεύεται στους -20° C για να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση του DNA και ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια με PCR.



Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA από σπέρμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

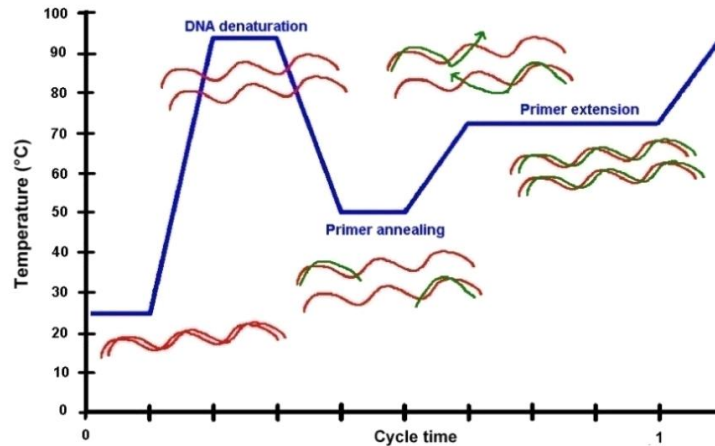
- Προσθέτουμε 200 μl σπέρματος σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης.

- Προσθέτουμε 20 μl πρωτεΐνάσης K.
- (Vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- Προσθέτουμε 200 μl PureLink Lysis Buffer και αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για να αποκτήσουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
- Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 56° C για 10 λεπτά για να προωθήσουμε την πέψη των πρωτεϊνών.
- Προσθέτουμε 200 μl 100% αιθανόλη.
- Αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για 5 δευτερόλεπτα για να παραχθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
- Μεταφέρουμε το διάλυμα (~640 μl) στην περιστρεφόμενη στήλη PureLink Spin Column.
- Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 12.000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
- Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1 στη στήλη.
- Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 12.000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
- Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 2 στη στήλη.
- Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα σε 14.000 rpm για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης του 1,5 ml.
- Προσθέτουμε 50 μl PureLink Elution Buffer απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
- Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα σε 14.000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορρίπτουμε τη στήλη και πωματίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml.

- Αποθηκεύουμε το σωλήνα φυγοκέντρησης του 1,5 ml που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα στους -20°C .

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία επαναστατική μέθοδος της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η ταχύτητα, η ευκολία, η ευαισθησία, η ειδικότητα και η αυτοματοποίηση της μεθόδου έχει συμβάλλει σημαντικά στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας και στην ευρεία εφαρμογή της στην ιατρική έρευνα και τη διάγνωση ασθενειών. Ο επιστήμονας που την επινόησε, Kary Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Η τεχνική του Mullis και των συνεργατών του ήταν αργή, δύσκολη και ανακριβής και το μεγαλύτερο μειονέκτημα ήταν ότι σε κάθε νέο κύκλο πολλαπλασιασμού ήταν απαραίτητη η εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης, καθώς με την άνοδο της θερμοκρασίας κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το ένζυμο αποδιατασσόταν με αποτέλεσμα να χάνει τη λειτουργικότητά του. Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε χάρη στην απομόνωση της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, η οποία παραμένει αναλλοίωτη κατά την αποδιάταξη στους 95°C και έχει τη βέλτιστη δυνατότητα πολυμερισμού στους 72°C , κάτι το οποίο οδήγησε στην αυτοματοποίηση της μεθόδου.



Εικόνα 2.1.: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι η *in vitro* ενζυμική σύνθεση αντιγράφων ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας βάσεων και περιλαμβάνει επαναλήψεις κύκλων αντιγραφής καθένας εκ των οποίων αποτελείται από τρία στάδια: (1) την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, DNA denaturation, στους 95°C, (2) την αναδιάταξη των εκκινητών, primer annealing, στη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και (3) την επιμήκυνση των εκκινητών, primer extension, στους 72°C.

Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο *in vitro* πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ενός DNA ή cDNA δείγματος με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με λογαριθμική αύξηση. Βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων του DNA να αποχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία και να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να αντιγράφονται. Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA που επιθυμείται να ενισχυθεί.

Η PCR βασίζεται στη χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών για να πραγματοποιηθούν τα τρία βήματα της αποδιάταξης του DNA, του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης των εκκινητών. Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονται στους 95°C για 15 min για να ενεργοποιηθεί η HotStarTaq DNA

πολυμεράση (1^{ος} κύκλος). Με τον τρόπο αυτόν μειώνεται σημαντικά η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων πολλαπλασιασμού (non specific amplification), εφόσον ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επέκτασης των μη ειδικά συνδεδεμένων εκκινητών, καθώς και των διμερών τους. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται θερμαίνοντάς το στους 95°C για να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Έπειτα η θερμοκρασία ελαττώνεται για να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA. Η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές.

Για να ενισχύσουμε το δείγμα του DNA είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο κύκλος εναλλαγής θερμοκρασίας 25-40 φορές, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη αποδοτικότητα χρησιμοποιώντας έναν θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler), ο οποίος είναι προγραμματισμένος να εναλλάσσει τη θερμοκρασία στιγμιαία και ικανό να διατηρεί τα δείγματα στην επιθυμητή θερμοκρασία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.



Εικόνα 2.2.: Ο αυτοματοποιημένος θερμοκυκλοποιητής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία.

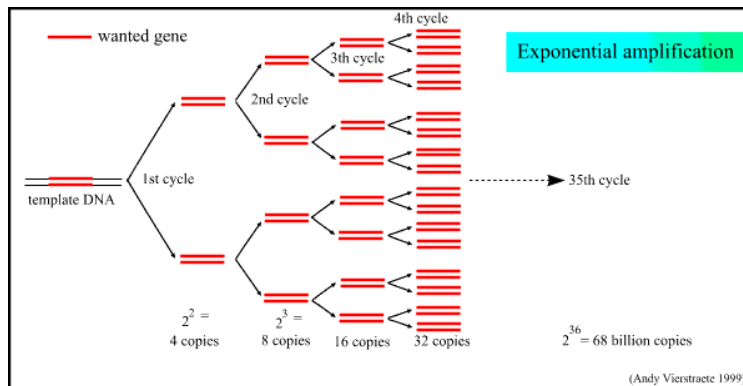
Για την εκτέλεση της αντίδρασης είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια (reagents):

- **το μόριο DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα αντιγραφής (template DNA)** για να ενισχυθεί και να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Στην παρούσα εργασία ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το DNA που απομονώθηκε από το σπέρμα. Η ποιότητα της μήτρας του DNA που αντιπροσωπεύει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του μορίου του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί είναι καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας της αντίδρασης. Επιπλέον να σημειωθεί ότι συνήθως απαιτείται ποσότητα DNA που κυμαίνεται από 0,01 μg έως 1 μg.
- **ένα ζεύγος εκκινητών (primers), ένας σημαίων εκκινητής (forward primer) και ένας αντισημαίων εκκινητής (reverse primer)**, τα οποία υβριδίζονται στις 5' και 3' γειτονικές περιοχές του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί για να μπορέσει να προσδεθεί η DNA πολυμεράση και να πολυμερίσει. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων (συνήθως 20 βάσεων) συμπληρωματικά ως προς τα 5' και 3' άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Το περιεχόμενό τους σε ζεύγη βάσεων G/C, δηλαδή η περιεκτικότητά τους σε G/C, κυμαίνεται από 40% έως 60% με αντιπροσωπευτικότερο ποσοστό συνήθως το 50%. Οι εκκινητές δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή ετεροδιμερή λόγω συμπληρωματικότητας και η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα πρέπει να είναι περίπου 50-72° C και τα T_m των δύο εκκινητών να μην διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερους από 5° C. Οι εκκινητές είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως θέσεις πέψης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 10 μM (10 pmol/μl).
- **η θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση** που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1976 από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι σταθερή στις υψηλές τιμές θερμοκρασίας, Η Taq DNA πολυμεράση είναι ένα εμπορικός διαθέσιμο ένζυμο που απομονώνεται από βακτήρια *Escherichia coli*. Αυτό το

ένζυμο έχει τη δραστηριότητα της 5' → 3' πολυμεράσης και τη δραστηριότητα της 5' → 3' εξωνουκλεάσης, αλλά στερείται την 3' → 5' εξωνουκλεολυτική δραστηριότητα με αποτέλεσμα να μην έχει επιδιορθωτική δράση (proofreading activity).

- **τα 5'- τριφωσφορικά 2'- δεοξυριβονουκλεοτίδια (2'-deoxynucleotide 5'-triphosphates, dNTPs, που περιλαμβάνουν την dATP, την dTTP, την dGTP, και την dCTP)** που προσθέτει η DNA πολυμεράση για να δημιουργήσει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα. Τα dNTPs σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg^{2+} . Στην περίπτωση που μεταβληθεί η συγκέντρωσή τους πρέπει να προσαρμόζεται και η συγκέντρωση του $MgCl_2$.
- **το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)** που διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα και δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες pH και αλατότητας για τη δράση της πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3 στους 20 °C), $MgCl_2$, KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη και
- **τα ιόντα μαγνησίου Mg^{2+} με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου $MgCl_2$** που είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$ προσδιορίζεται εμπειρικά και συνήθως κυμαίνεται από 1mM έως 5mM. Είναι συμπαράγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία της ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις την πιστότητά της. Σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA αυξάνοντας την T_m και τελικά την ειδικότητα των εκκινητών. Σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,5 mM έως 2,5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει τη συγκέντρωση του μαγνησίου.

Το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετείται εντός του θερμοκυκλοποιητή ο οποίος διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι για να επιτυγχάνεται ομοιογενής θερμοκρασία στο εσωτερικό του μηχανήματος και μετά τη λήξη του προγράμματος τα προϊόντα της αντίδρασης οπτικοποιούνται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%.



Εικόνα 2.3. Η συγκέντρωση του δείγματος του DNA είναι αρχικά πολύ χαμηλή αλλά η συγκέντρωσή του αυξάνεται εκθετικά, καθώς η αντίδραση προχωράει και τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου γίνονται οι μήτρες του επόμενου κύκλου.

Στην παρούσα μελέτη ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (oligonucleotide primers) έγινε με τη βοήθεια της εταιρείας Eurofins Genomics. Οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των εκκινητών (melting temperature, T_m) από τις οποίες εξαρτάται ο προγραμματισμός μιας PCR δεν πρέπει να διαφέρουν σημαντικά για τους δύο εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν. Ως θερμοκρασία αποδιάταξης ενός εκκινητή (melting temperature, T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία ένας εκκινητής αδυνατεί πλέον να σχηματίσει σταθερά δίκλιωνα μόρια με την συμπληρωματική του αλληλουχία στόχο. Η θερμοκρασία τήξης T_m εξαρτάται από το μέγεθος του εκκινητή καθώς και από το ποσοστό του σε δεοξυριβονουκλεοτίδια γουανίνης G και κυτοσίνης C, τα οποία συγκριτικά με αυτά της αδενίνης A ή της θυμίνης T αυξάνουν την T_m . Κατά τον σχεδιασμό της αλληλουχίας των εκκινητών πρέπει να αποφεύγεται η παρουσία ανεπιθύμητων, θερμοδυναμικά ευνοϊκών δομών, που μειώνουν την απόδοση των εκκινητών στην αντίδραση π.χ. δομές φουρκέτας και ομοδιμερή ή ετεροδιμερή των εκκινητών, καθώς και η παρουσία νουκλεοτιδικών επαναλήψεων που μπορούν να

οδηγήσουν σε ολίσθηση του εκκινητή πάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο και τελικά σε σφάλμα στο προϊόν της PCR.

Για την ανίχνευση του Dicer1 A/G πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών.

			Tm
rs3742330 F	GCTTCAATCTTGTGTAAAGGGATTCG	F	61,6°C
rs3742330 R	GCACTGCAGAGGATCACTGGAA	R	62,1°C

Το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του Dicer 1 περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης του 0,5 mL προσθέτουμε 2,5μl 10X PCR Buffer minus Mg²⁺, 1μl 10 mM dNTP mixture, 1,5 μl 50 mM MgCl₂, 1μl Primer Sense mix, 1μl Primer Antisense mix, 2 μl Template DNA, 0,5 μl *Taq* DNA polymerase, 15,5 μl απεσταγμένο νερό.
- Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου επωάζουμε στους 95°C για 15 λεπτά.
- Εκτελούμε τα ακόλουθα βήματα για 29 κύκλους: 95°C για 1 λεπτό, 57°C για 1 λεπτό και 72°C για 1 λεπτό.
- Επωάζουμε τα σωληνάρια στους 72°C για 10 λεπτά και διατηρούμε την αντίδραση στους 4°C.
- Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για να αξιολογήσουμε την επιτυχία της συμβατικής PCR πρέπει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με post-PCR analysis όπως ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία δίνει τη

δυνατότητα για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από κάποια είδη θαλάσσιων φυκών και έχει την ιδιότητα να ρευστοποιείται στους 100°C και να στερεοποιείται στους 45°C σχηματίζοντας ένα αδρανές πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων του υλικού αυτού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει το μέγεθος των μορίων του DNA που θα το διαπεράσουν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 3% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων εφαρμόζεται για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR. Η πηκτή αγαρόζης που χρησιμοποιείται στο πείραμα έχει περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστίθενται 5 μL βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/mL, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από υπεριώδες φως.

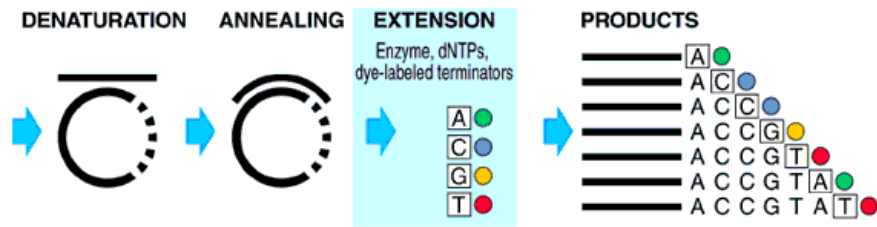
Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές εσοχές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5 V/ cm. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, όταν βρεθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή του. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε τη γενική πορεία της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της

ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet, UV, radiation). Τα διάφορα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες, ενώ ο μάρτυρας των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τους.

2.5 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων του DNA (DNA sequencing)

Η τεχνική που ακολουθείται για την ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA βασίζεται στη μέθοδο του Sanger, όπου η μία αλυσίδα του DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με τη χρήση κατάλληλου εκκινητή. Στο μίγμα της αντίδρασης εκτός από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) προστίθενται και τα διδεοξανάλογά τους (τριφωσφορικά 2', 3' διδεοξυνουκλεοτίδια, dideoxynucleotide triphosphates, ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), στα οποία δεν υπάρχει το 3' υδροξυλικό άκρο 3'-OH άκρο και είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, καθεμιά από τις οποίες εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

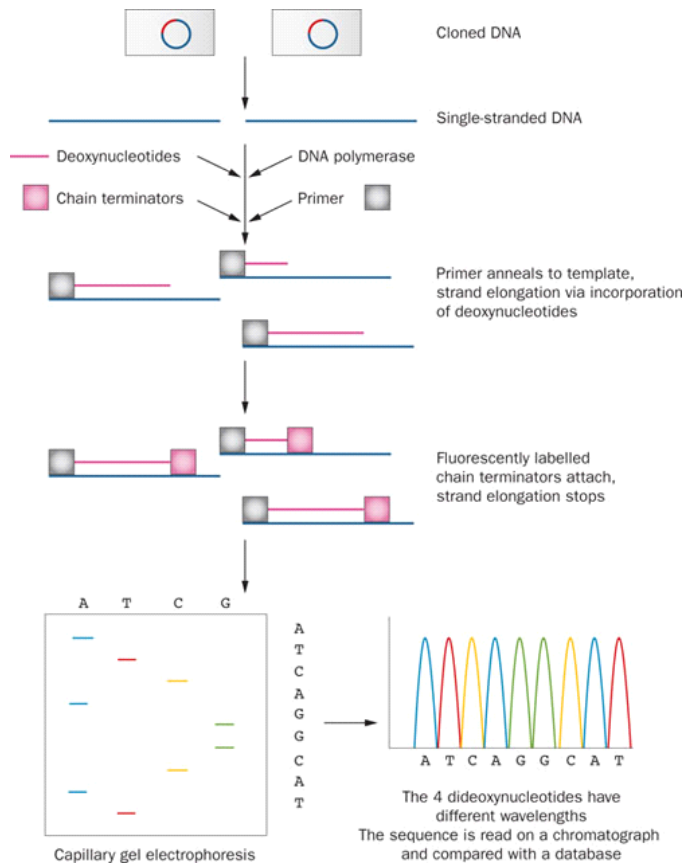
Η σύνθεση της αλυσίδας του DNA γίνεται με τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην περίπτωση που κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου μορίου DNA η *Taq* πολυμεράση εισάγει ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, τότε εξαιτίας της έλλειψης ελεύθερης 3' υδροξυλομάδας, τερματίζεται πρόωρα η επιμήκυνσή του. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο, ενώ το τελευταίο νουκλεοτίδιο είναι επισημασμένο με μία από τις τέσσερις φθορίζουσες ουσίες. Γι' αυτό η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger ονομάζεται εναλλακτικά μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method).



Εικόνα 2.4.: Όταν κατά τον πολυμερισμό της νουκλεοτιδικής αλυσίδας η DNA πολυμεράση αντί να προσθέσει ένα από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) προσθέτει ένα από τα διδεοξυανάλογά τους (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP), τότε η επιμήκυνση τερματίζεται, επειδή τα ddNTPs δεν φέρουν 3'-OH άκρο και η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με άλλο νουκλεοτίδιο. Κάθε ένα από τα τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια είναι σημασμένα με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική (dye-labeled terminators).

Για την αντίδραση της ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA απαιτούνται 50 ng καθαρισμένου προϊόντος της PCR, τα οποία αναμειγνύονται με έτοιμο μίγμα αντίδρασης Big Dye Termination Ready Reaction Mix (RoRo Mix), version 3.1 (Applied Biosystems, USA), το οποίο περιέχει *Taq* πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος αλληλούχισης (sequencing buffer: Tris-HCl 200 Mm, MgCl₂ 10 mM, pH 9) με την προσθήκη του εκκινητή (primer) που έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη και γουανίνη. Η αντίδραση επιμήκυνσης των εκκινητών πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και γίνεται κατά τρόπο παρόμοιο με αυτό της PCR, δηλαδή χρησιμοποιούνται εναλλασσόμενα στάδια θερμικής αποδιάταξης στους 94° C, υβριδισμού του εκκινητή στους 55° C και επέκτασης ή διδεοξυτερματισμού στους 72° C.

Στη συνέχεια, το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης υπόκειται σε καθαρισμό με στήλη Sephadex G-50, με σκοπό την απομάκρυνση των σημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την αντίδραση, καθώς και ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους έως και 20 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 2.5.: Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας από την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος έως την αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με την ανάγνωση του χρωματογραφήματος που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα.

Τα σημασμένα τμήματα DNA που παράγονται τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (POP-7 Polymer, Applied Biosystems) και ανιχνεύονται από διάταξη laser αισθητήρων και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Με την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μορίων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος ακόμα και κατά ένα νουκλεοτίδιο. Τα μόρια κατά την έξοδό τους από το τριχοειδές διέρχονται από δέσμη laser, ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες και το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική καταγραφική συσκευή

(CCD camera). Κάθε φθορίζουσα ουσία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου του κάθε μορίου.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα (Sequencing Analysis v 5.2), είναι δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ηλεκτροφερογράφημα (electropherogram), μια αλληλουχία κορυφών (peaks) τεσσάρων διαφορετικών χρωμάτων που αντιπροσωπεύουν τις τέσσερις βάσεις του DNA.



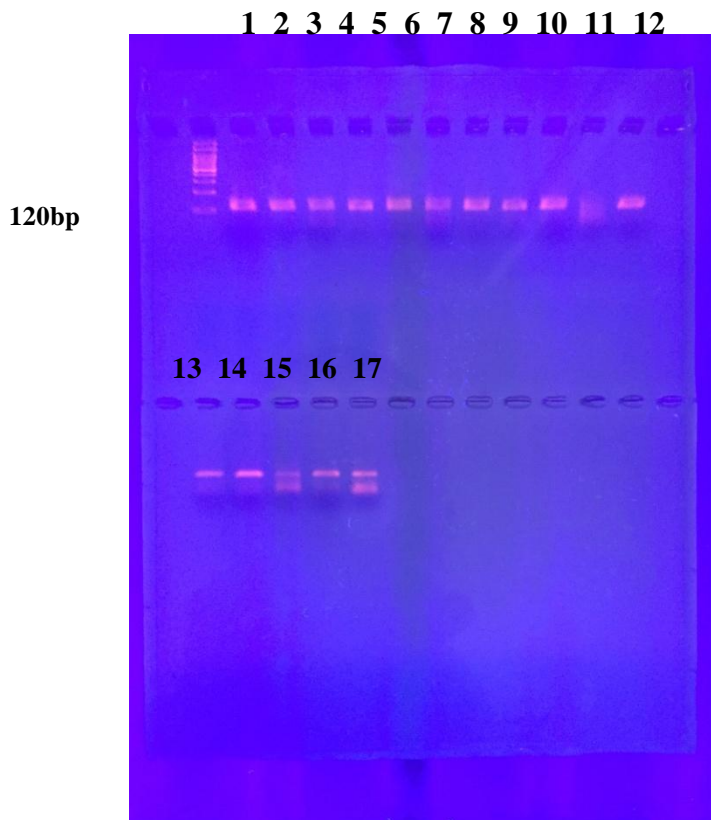
Εικόνα 2.6.: Ο αυτόματος αναλυτής ABI Prism 3130 Genetic Analyzer της Applied Biosystems που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

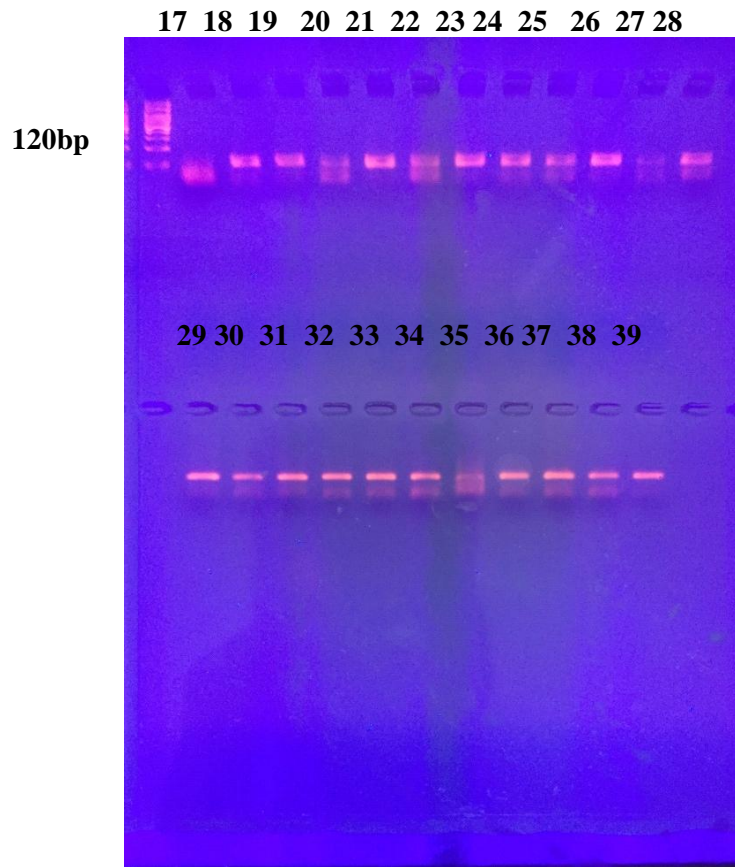
3.1 Αποτελέσματα PCR

Αφού απομονώθηκε DNA σπέρματος από 69 δείγματα, στη συνέχεια ενισχύθηκε το γονίδιο του Dicer με PCR. Τα δείγματα προέρχονται από άνδρες ηλικίας 27-57 ετών, με όγκο από 0,5ml-10ml, συγκέντρωση σπερματοζωαρίων 540.000/ml-193.000.000/ml και ποσοστό φυσιολογικών δειγμάτων επί του συνόλου 83%.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Παρατηρήθηκε, η απομόνωση και ενίσχυση τμημάτων μήκους 120bp, γεγονός σύμφωνο με το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Το ίδιο πρότυπο απομόνωσης παρατηρήθηκε και στον υπόλοιπο αριθμό δειγμάτων.

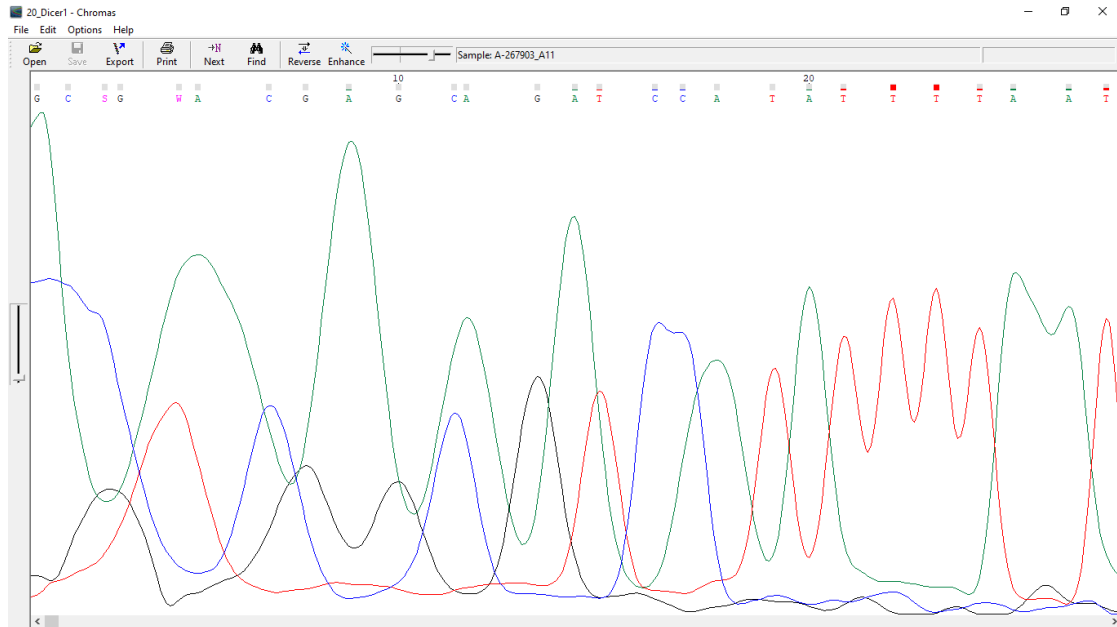


Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων pcr

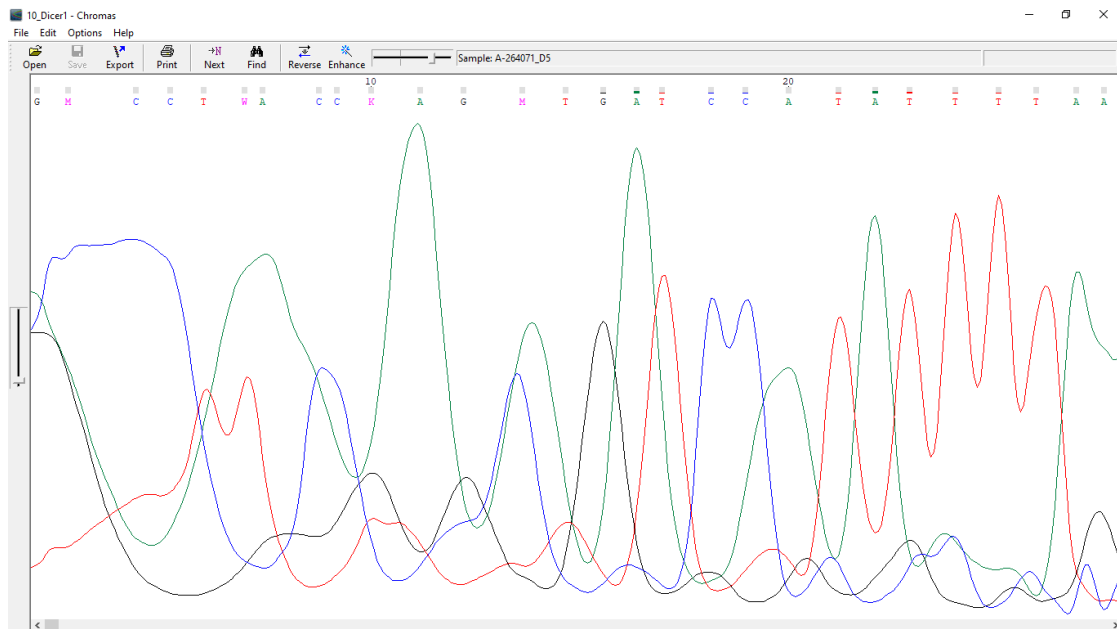


Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων pcr

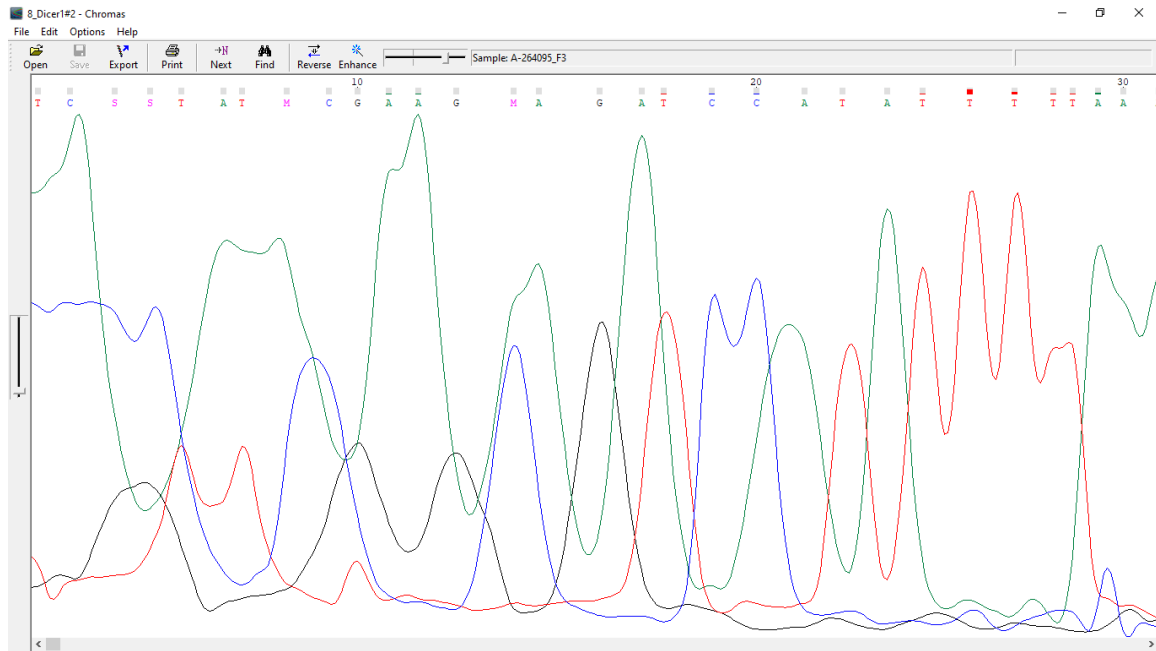
3.2 Αποτελέσματα sequencing



Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα sequencing



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα sequencing



Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα sequencing

A adenosine	C cytidine	G guanine
T thymidine	N A/G/C/T (any)	U uridine
K G/T (keto)	S G/C (strong)	Y T/C (pyrimidine)
M A/C(amino)	W A/T (weak)	R G/A (purine)
B G/T/C	D G/A/T	H A/C/T
V G/C/A	- gap of indeterminate length	

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=BlastHelp

Η ανίχνευση πολυμορφισμών αφορά τα δείγματα που κρίνονται υπογόνιμα με βάση τα αυστηρά κριτήρια αξιολόγησης της μορφολογίας κατά τη μέθοδο Tygerberg του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ). Δείγματα με ποσοστό μορφολογίας κάτω από 4% κατά Tygerberg, έχουν μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα. Με βάση τα αποτελέσματα του sequencing, οι πιο συχνές αλλαγές παρατηρούνται στα νουκλεοτίδια **27, 32, 50, 51, 68**.

	Change1	Change2	Change3	Change4	Change5
SP3 #2	11: A> -	16: A> -	23: A> -	27: T>W	
SP8	19: A> -	27: A> -	28: A>C	32: A> -	
SP10	20: A> -	36: G>R	45: - >G	56: - >G	89: T>W
SP20	12: A> -	19: A> -	27: A> -	44: - >G	
SP23 #2	10: A> -	17: A> -	25: A> -		
SP24	No significant similarity found		24#2	100% identity	
SP35	100% identity				
SP49	72: T>G				
SP53	50: - >W	51: T>G	68: T>G	88: - >M	
SP54	50: - >W	51: T>G	68: T>G		
SP58	32: - >C	33: T>W	38: T>Y	71: T>G	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο Dicer κωδικοποιεί για μια ενδονουκλεάση που ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών τύπου III και εμπλέκεται στο μονοπάτι επεξεργασίας των siRNAs και miRNAs. Ο ρόλος του Dicer1 στην ανδρική αναπαραγωγική οδό έχει μελετηθεί εκτενώς. Μοντέλα Dicer knock-out ποντικών καταδεικνύουν τη σημασία του στην ανδρική γονιμότητα. Εξάλειψη του γονιδίου από τη σωματική ή τη γαμετική σειρά προκαλεί υπογονιμότητα. Ειδικότερα, έλειψη του Dicer1 στην επιδιδυμίδα και τον προστάτη οδηγεί σε ανδρική υπογονιμότητα μέσω αποδιαφοροποίησης και υποτροφίας του επιθηλίου. ([Björkgren I, Sipilä P, 2015](#)).

Επιπλέον, πρόσφατα έχουν γίνει μελέτες σε ποντίκια που αποδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο του Dicer1 στη λειτουργία των κυττάρων Sertoli τα οποία εμπλέκονται στη σπερματογένεση. Αποδεικνύεται ότι έλειψη του [Dicer](#) στα κύτταρα Sertoli οδηγεί σε παντελή απουσία σπερματοζωαρίων και σταδιακή ορχική δυσλειτουργία με μείωση του μεγέθους των όρχεων και υπογονιμότητα. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την παρουσία μετα-μεταγραφικού ελέγχου στα κύτταρα Sertoli και την αναγκαιότητα του Dicer όσον αφορά την ωρίμανση τους, τη λειτουργία τους, την επιβίωσή τους και την ικανότητά τους να υποστηρίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων της γαμετικής σειράς. ([Papaioannou MD et al, 2009](#)).

Είναι πλέον γνωστό ότι συνολική απώλεια των miRNAs, είτε στα στηρικτικά κύτταρα είτε στα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς των όρχεων, έχει δραματικές επιπτώσεις στην ανδρική γονιμότητα και συνεπώς θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν όσον αφορά τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. Μικρά μη κωδικά μόρια RNA, όπως τα ενδογενή siRNAs και τα miRNAs εντοπίζονται στα κύτταρα της γαμετικής σειράς και παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων σε μεταμεταφραστικό επίπεδο. Προκειμένου να εκτιμηθεί το πώς εμπλέκονται τα siRNAs και τα miRNAs στις φασεις της σπερματογένεσης μελετήθηκαν οι φαινότυποι των μεταλλαγμένων GC-Dcr1 and GC-Dger8 ποντικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν υπογονιμότητα καθώς επίσης και διαταραχές στη διαδικασία της σπερματογένεσης με συνέπεια ολιγο-ασθενο και τερατοζωοσπερμία. Επιπρόσθετα, βρέθηκε μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας

(sequencing) απομονωμένου RNA σπερματοκυττάρων ότι η αδρανοποίηση του γονιδίου Dicer1 και η επακόλουθη απουσία miRNAs επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση οδηγώντας στη δημιουργία ανώμαλων σπερματοζωαρίων. Αδρανοποίηση είτε του Dicer1 ή του Dgcr8 είχε ως συνέπεια στειρότητα. Αυτό δηλώνει ότι ο ρόλος των miRNAs είναι καθοριστικός στη διαφοροποίηση των κυττάρων της γαμετικής σειράς και τη σπερματογένεση ([Zimmermann C et al, 2014](#)).

Το Dicer και άλλα miRNAs και ενδογενή siRNAs, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκονται παρόντα στην γαμετική σειρά και εκφράζονται στους όρχεις, υποδεικνύοντας ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης και στη δημιουργία σπερματοζωαρίων ικανών για γονιμοποίηση. Μοντέλα ποντικών στα οποία έχει γίνει knockout του Dicer1 στη γαμετική σειρά, είχαν ως συνέπεια όρχεις με μειωμένο μέγεθος. Knockout του Dicer1 στην επιδιδυμίδα, είχε ως αποτέλεσμα πολύ μικρό αριθμό ώριμων σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες. Η διαφοροποίηση ωστόσο των σπερματογονίων παρέμεινε ανεπηρέαστη, παρόλο που μειώθηκε ο αριθμός των σπερματοκυττάρων, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε ο ρυθμός απόπτωσής τους. Καταδεικνύεται συνεπώς ότι το Dicer και τα μικρά RNAs είναι βασικοί ρυθμιστές της διαφοροποίησης των σπερματίδων και απαραίτητα για την ανδρική γονιμότητα. ([Korhonen HM et al, 2011](#)).

Έχουν πραγματοποιηθεί πρόσθετες μελέτες που αξιολογούν την πιθανή επίδραση διαφόρων πολυμορφισμών γονιδίων microRNA στην ποιότητα του σπέρματος και την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα. Λαμβάνοντας υπόψιν τη λειτουργία των DICER1 και DROSHA στην βιογένεση των microRNA και τη σπερματογένεση, μπορεί να υποτεθεί ότι πολυμορφισμοί σε αυτά τα γονίδια, είναι ικανοί να προκαλέσουν ανδρική υπογονιμότητα. (Gottwein et al., 2006). Ο Hayashi με την ομάδα του, (Hayashi et al., 2008) ανέφερε ότι knockout του DICER1 σε κύτταρα της γαμετικής σειράς (PGC) προκαλούν ανωμαλίες στη σπερματογένεση.

Έχουν μελετηθεί τρεις διαφορετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου Dicer1 (rs13078, rs1057035 και rs12323635). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί rs12323635T>C σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα σε Κινέζους ([Qin Y et al, 2012](#)). Σε άλλες μελέτες το αλληλόμορφο του Dicer rs3742330 έχει συσχετιστεί με

αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προκαρκινικών βλαβών του στόματος καθώς και με την ογκογενετική ικανότητα άλλων τύπων καρκίνου ([Clague J et al, 2010](#)).

Αντικείμενο άλλης μελέτης είναι η εξακρίβωση της συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων DICER and DROSHA και αζωοσπερμίας. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 330 ασθενείς με πρωτογενή αζωοσπερμία και 282 γόνιμοι άνδρες ως θετικοί μάρτυρες ως προς τους πολυμορφισμούς ενός νουλεοτιδίου (SNPs) των γονιδίων DICER και DROSHA (DICER rs3742330 και DROSHA rs10719), με τη μέθοδο περιορισμού τμήματος μήκους (RFLP). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για τον rs3742330 πολυμορφισμό, η συχνότητα του αλληλόμορφου A ήταν μεγαλύτερη στους αζωοσπερμικούς άνδρες σε σχέση με το control (72.0% vs.64.4%, $P=0.004$) και επομένως και η συχνότητα του γονότυπου AA (53.0% vs. 41.8%, $P=0.027$, OR=1.829, 95%CI: 1.071-3.124). Από την άλλη πλευρά, η συχνότητα του αλληλομόρφου και του γονότυπου όσον αφορά τον rs10719 πολυμορφισμό, δε διέφερε ανάμεσα στις δυο ομάδες ($P > 0.05$). Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός rs3742330 του DICER και συγκεκριμένα ο AA γονότυπος, μπορεί να συνδέεται με την αζωοσπερμία. (Fu M1 et al, 2016)

Όσον αφορά αυτή τη μελέτη, μετά την απομόνωση DNA από σπέρμα ανδρών, βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών (SNP) στο γονίδιο Dicer1 και υπογονιμότητας. Ειδικότερα, τα δείγματα 3, 8, 10, 20, 23, 24, 35, 47, 49, 53, 54, 58 με μορφολογία κάτω του ορίου αναφοράς σύμφωνα με τα αυστηρά κριτήρια αξιολόγησης κατά Tygerberg, φαίνεται να φέρουν αλλαγή σε μια βάση εντός του συγκεκριμένου γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση με sequencing έδειξε ότι οι πιο συχνές αλλαγές εντοπίζονται στα νουκλεοτίδια 27, 32, 50, 51, 68.

Παρόλο που πιστεύεται ότι το σπέρμα των θηλαστικών φέρει μη κωδικά RNAs (sncRNAs) στα ωοκύτταρα κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης, παραμένει άγνωστο εάν αυτά τα μόρια έχουν στην πραγματικότητα κάποια λειτουργία κατά τη γονιμοποίηση και προεμφυτευτική εμβρυική ανάπτυξη. Γαμετικές σειρές Knockout ποντικών των γονιδίων *Dicer* και *Drosha*, έχουν ως αποτέλεσμα να παράγονται γαμέτες (σπέρμα και ωοκύτταρα) με μερική έλλειψη miRNAs ή/και endo-siRNAs, δίνοντας έτσι την ευκαιρία να εξεταστεί αν το φυσιολογικό σε miRNA και endo-siRNA σπέρμα, πατρικό ή μητρικό, παίζει ρόλο στην γονιμοποίηση και την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Χρησιμοποιώντας το

αποτέλεσμα της ICSI βρέθηκε ότι σπέρμα με διαφορετικό προφίλ miRNA και endo-siRNA, μπορεί να γονιμοποιήσει ωοκύτταρα αγρίου τύπου, αλλά έμβρυα που προέρχονται από αυτό έχουν μια σημαντική μείωση στην ικανότητα ανάπτυξης, που μπορεί να μεταβληθεί εγχύοντας σπέρμα αγρίου τύπου ή μικρά RNAs σε εμβρύα των ICSI. Διακοπή στην μητρική μεταγραφική έναρξη και αδυναμία ενεργοποίησης γονιδίων στα πρώιμα στάδια του ζυγωτού, φαίνεται να συσχετίζονται με μη φυσιολογικά προφίλ miRNA σε σπερματοζώαρια με *Dicer* και *Drosha* cKOs. Συνολικά, τα δεδομένα υποστηρίζουν μια κρίσιμη λειτουργία των πατρικών miRNAs ή/και endo-siRNAs στον έλεγχο των επιπέδων και της ισορροπίας του μεταγραφώματος, σε γονιμοποιημένα ωάρια, ζυγωτά και σε έμβρυα σταδίου 2 κυττάρων. Με δεδομένο ότι ο εμπλουτισμός του σπέρματος με RNAs ενισχύει τόσο την αναπτυξιακή ικανότητα των εμβρύων σε προεμφυτευτικό στάδιο, αλλά και το ποσοστό των ζώντων εμβρύων, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο μέσο για την αύξηση των ποσοστών επιτυχίας των τεχνολογιών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στις κλινικές γονιμότητας. (Shuiqiao Y, et al 2016.)

Έχει γίνει σαφές ότι τα miRNAs συμβάλλουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη σπερματογένεση. Η ιδέα αυτή ενισχύεται από την ταυτοποίηση των διαφόρων miRNAs όσον αφορά τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και το φαινότυπο υπογονιμότητας των knockout αρσενικών ποντικών όπου έχει διαταραχθεί αυτή η διαδικασία. Εφόσον τα miRNAs στοχεύουν τα περισσότερα κυτταρικά mRNAs, η εξάλειψη του γονιδίου *Dicer1* ή του *Drosha* στη γαμετική σειρά, έχει ένα εύρος επιδράσεων στο μεταγράφομα των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, άλλες λειτουργίες που εξαρτώνται από το miRNA έχουν ταυτοποιηθεί και για τις δυο ενδονουκλεάσες, με την ανάλυση μοντέλων-ποντικών. Επομένως, επιπλέον μοντέλα χρειάζονται σε μελλοντικές μελέτες. Ο χαρακτηρισμός της λειτουργίας και του ακριβούς ρόλου των miRNAs έχει ήδη ξεκινήσει, αλλά πολλά μόρια miRNA που συνδέονται με την έκφραση στους όρχεις παραμένουν αδιευκρίνιστα. Θα ήταν επίσης σημαντικό να συνδεθούν τα πρότυπα έκφρασης των mRNA και miRNA καθώς και οι λειτουργικές σχέσεις μεταξύ τους, για να ενσωματωθούν miRNA-mRNA δίκτυα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους στους όρχεις.

Βασική έρευνα στην έκφραση και λειτουργία των miRNAs στη σπερματογένεση μας βοηθά να δημιουργήσουμε μια εικόνα όσον αφορά τις απαιτήσεις της ανδρικής γονιμότητας. Αυτή η πληροφορία είναι απαραίτητη εφόσον αυξάνεται ραγδαία η ανδρική υπογονιμότητα και η ανάγκη για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός καινούριων μορίων και μονοπατιών που εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης, μπορεί να αποτελέσουν πιθανά εργαλεία για την έρευνα και διάγνωση του ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας και την επιλογή κατάλληλης μεθόδου θεραπείας της υπογονιμότητας. Επειδή τα miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί στα ώριμα σπερματοζώρια και στο σπερματικό υγρό και το πρότυπο έκφρασής τους φαίνεται να μεταβάλλεται σε ασθενείς με προβλήματα στη σπερματογένεση, τα miRNAs αναδεικνύονται ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση και ταξινόμηση της ανδρικής υπογονιμότητας, συνεπώς χρήζουν μεγάλης διερεύνησης (Noora Kotaja, 2014).

Αδιαμφισβήτητα, απαιτούνται επιπρόσθετες και πιο λεπτομερείς μελέτες σε μοριακό επίπεδο σχετικά με τη λειτουργία των πολυμορφισμών του DICER, προκειμένου κατανοηθεί πλήρως ο ρόλος του ενζύμου στην αναπαραγωγή και η συχέτισή του με την υπογονιμότητα. Η ανάγκη συνεπώς για περισσότερες μελέτες που αφορούν τη λειτουργία του γονιδίου και των miRNAs μορίων κρίνεται επιτακτική για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε σε βάθος πώς ελέγχεται η διαδικασία της σπερματογένεσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[Björkgren I](#), [Sipilä P](#) (2015) The role of Dicer1 in the male reproductive tract. Asian Journal Of Andrology 17(5):737-41.

[Clague J](#), [Lippman SM](#), [Yang H](#), [Hildebrandt MA](#), [Ye Y](#), [Lee JJ](#), [Wu X](#) (2010) Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. PMC [49\(2\): 183–189](#).

[Frank Tüttelmann](#), MD, [Christian Ruckert](#), and [Albrecht Röpke](#) (2018) Disorders of Spermatogenesis. Medizinische Genetik 30(1): 12–20.

Fu M1, Xu K, Ye J, Xu W, SCU-HKCU Joint Laboratory of Reproductive Medicine, Key Laboratory for Birth Defects and Related Maternal and Childhood Diseases of the Ministry of Education, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China.

[Korhonen HM](#), [Meikar O](#), [Yadav RP](#), [Papaioannou MD](#), [Romero Y](#), [Da Ros M](#), [Herrera PL](#), [Toppari J](#), [Nef S](#), [Kotaja N](#) (2011) Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. PLoS One. 6(9):e24821

Lewin B, Genes, εκδόσεις Μπάσδρα, Αλεξανδρούπολη 2004.

[Liu D](#), [Li L](#), [Fu H](#), [Li S](#), [Li J](#) (2012) Inactivation of Dicer1 has a severe cumulative impact on the formation of mature germ cells in mouse testes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 422(1):114-20.

Noora Kotaja, (2014) MicroRNAs and spermatogenesis, PlumX Metrics, Department of Physiology, Institute of Biomedicine, University of Turku, Turku, Finland

Papaoiannou M.D, Dr Nef S (2010) microRNAs in the Testis: Building Up Male Fertility. *Journal of Andrology*. 31(1):26-33.

[Papaoiannou MD](#), [Pitetti JL](#), [Ro S](#), [Park C](#), [Aubry F](#), [Schaad O](#), [Vejnar CE](#), [Kühne F](#), [Descombes P](#), [Zdobnov EM](#), [McManus MT](#), [Guillou F](#), [Harfe BD](#), [Yan W](#), [Jégou B](#), [Nef S](#). (2009) Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Developmental Biology* 326(1):250-9

[Qin Y](#), [Xia Y](#), [Wu W](#), [Han X](#), [Lu C](#), [Ji G](#), [Chen D](#), [Wang H](#), [Song L](#), [Wang S](#), [Wang X](#). (2012) Genetic variants in microRNA biogenesis pathway genes are associated with semen quality in a Han-Chinese population. *Reproductive Biomedicine Online* 24(4):454-61

Shuiqiao Yuan, Andrew Schuster, Chong Tang, Tian Yu, Nicole Ortogero, Jianqiang Bao, Huili Zheng, and Wei Yan (2016) Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development* 143(4): 635–647.

Slack J.M.W. Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, εκδόσεις Μπάσδρα, Αλεξανδρούπολη 2007.

[Song MS](#), [Rossi JJ](#) (2017) Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochemical Journal* 474(10):1603-1618

Vander A, Sherman J, Luciano D, Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του ανθρώπου, εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2011.

Watson J.D, Caudy A.A, Myers R.M, Witkowski J.A, Ανασυνδυσασμένο DNA, εκδόσεις Μπάσδρα, Αλεξανδρούπολη 2007.

[Yadav RP, Kotaja N](#) (2014) Small RNAs in spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382(1):498-508

Zhonghua Yi, Xue Yi, Chuan Xue, Za Zhi .(2016) Association of polymorphisms of miRNA biogenesis related genes DICER and DROSHA with azoospermia 33(3):365-8. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.03.020.

[Zimmermann C, Romero Y, Warnefors M, Bilican A, Borel C, Smith LB, Kotaja N, Kaessmann H, Nef S](#) (2014) Germ cell-specific targeting of DICER or DGCR8 reveals a novel role for endo-siRNAs in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility. *Plos One* 9(9):e107023.

Ευγενή Λίνα, Λυμπερόπουλος Γεώργιος. Η λειτουργία του ανδρικού σπέρματος. Ιατρικές εκδόσεις ΒΗΤΑ ΜΕΠΕ, Αθήνα 2010

Ιστοθέση <https://doctorlib.info/physiology/medical/294.html>

Ιστοθέση <http://embor.embopress.org/content/9/8/725.figures-only>

Ιστοθέση https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=BlastHelp

