



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΓΟΥΡΓΙΩΤΗ ΑΡΤΕΜΙΣ

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

**SCREENING ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ  
ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ  
ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ**

**SCREENING OF GENES AND POLYMORPHISMS  
AND INVESTIGATION OF THEIR CORRELATION  
WITH MALE INFERTILITY**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ** – Πρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ** - Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ** - Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την περίοδο 2018-2019 με επιβλέποντα τον Καθηγητή, κύριο Μαμούρη Ζήση.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον ίδιο τον κύριο Μαμούρη για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κυρία Σαραφίδου Θεολογία και κύριο Γιακουντή Αντώνιο για την υποστήριξή τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Μαρκαντώνη Μαρία για την άψογη συνεργασία και επικοινωνία που υπήρξε μεταξύ μας καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και όσους στάθηκαν δίπλα μου και βοήθησαν να φέρω εις πέρας τη διπλωματική μου εργασία.

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
Ανδρική υπογονιμότητα.....	9
Αιτιοπαθολογία.....	10
Γενετικά αίτια.....	11
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	11
Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	14
B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	21
Πληθυσμός μελέτης.....	21
Απομόνωση - Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης γενωμικού DNA.....	21
PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	21
Αντιδραστήρια PCR.....	22
DNA πολυμεράση.....	22
Εκκινητές.....	22
Αλληλουχία στόχος.....	22
Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg <sup>2+</sup> .....	23
Νουκλεοτίδια.....	23
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
Βιοπληροφορική ανάλυση.....	24
Plink και SNP nexus.....	24
Εύρεση γονότυπου.....	25
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
PCR.....	26
Βιοπληροφορική ανάλυση.....	27
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	29
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1 Αμινοξικές αλλαγές εξαιτίας μετάλλαξης c.144delC (p.L49Wfs22) (προσαρμοσμένο σύμφωνα με Fellmeth et al., 2016).....	15
Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου AURKC και εντοπισμός των μεταλλάξεών του. Οι μπλε περιοχές αναπαριστούν τα εξώνια, οι γκρί περιοχές τις αμετάφραστες περιοχές (προσαρμοσμένο σύμφωνα με Ben Khelifa et al., 2012). ...	15
Εικόνα 3 Εντοπισμός έκφρασης του CATSPER1(Avenarius et al., 2009).....	16
Εικόνα 4 Κινητικότητα φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και σπερματοζωαρίων με απουσία CatSper1 (Hildebrand et al., 2010).....	17
Εικόνα 5 Μεταλλάξεις του γονιδίου AR που σχετίζονται με AIS (Gottlieb et al., 2012) .....	19
Εικόνα 6 Τα στάδια της αντίδρασης PCR.....	22
Εικόνα 7 Έλεγχος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο AURKC σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. .....	26
Εικόνα 8 Έλεγχος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο AR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.....	26
Εικόνα 9 Έλεγχος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο CATSPER1 σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. .....	27

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1 Ονοματολογία παθολογικών ευρημάτων.....	9
Πίνακας 2 Φαινότυποι και συχνότητα κοινών γενετικών ανωμαλιών σχετικών με ανδρική υπογονιμότητα (προσαρμοσμένο σύμφωνα με O'Brien et al., 2010).....	14
Πίνακας 3 Τα ζεύγη εκκινήτων του χρησιμοποιήθηκαν.....	23
Πίνακας 4 Οι συνθήκες της pcr που ακολουθήθηκαν.....	23
Πίνακας 5 Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR .....	24
Πίνακας 6 Οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στα υπό μελέτη γονίδια με χρήση του Plink 1.07.....	27

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπογονιμότητα έχει οριστεί ως η αδυναμία σύλληψης μετά από ένα χρόνο μη προστατευμένης συνουσίας και έχει αναγνωριστεί ως ζήτημα δημόσιας υγείας με παγκόσμιο αντίκτυπο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), καθώς ο παγκόσμιος επιπολασμός της εκτιμάται ότι είναι 9%. Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί το 30–40% όλων των περιπτώσεων υπογονιμότητας, ενώ εκτιμάται ότι ένας στους είκοσι άνδρες παρουσιάζουν κάποιο είδος υπογονιμότητας. Εκτός από τις χρωμοσωμικές, οι γονιδιακές μεταλλάξεις αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στα γονίδια AURKC, CATSPER1 και AR, καθώς η εμπλοκή αυτών των γονιδίων με την ανδρική υπογονιμότητα είναι προφανής. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν το σκανάρισμα των γονιδίων AURKC, CATSPER1 και AR σε 159 δείγματα του ελληνικού πληθυσμού για εντοπισμό πολυμορφισμών που σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα.

Για το σκοπό αυτό αρχικά έγινε ενίσχυση των επιθυμητών περιοχών στο ενδεικτικό υποσύνολο 32 δειγμάτων, ήδη γονοτυπημένων με το Infinium Global Screening Array της Illumina, ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη των επιθυμητών προϊόντων. Για την εύρεση των σχετικών με ανδρική υπογονιμότητα πολυμορφισμών που υπάρχουν στα γονίδια AURKC, CATSPER1 και AR, η ανάλυση επεκτάθηκε στα 159 γονοτυπημένα δείγματα και ακολουθήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση και οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν κι έχουν συσχετιστεί με ανδρική υπογονιμότητα είναι οι: rs1337080 και rs5919411 για το γονίδιο AR. Παρατηρήθηκε πως και για του δυο πολυμορφισμούς του γονιδίου AR εντοπίστηκε μεταλλαγμένος γονότυπος σε ποσοστό 6,3% και πως το 70% των δειγμάτων που εμφάνισαν το μεταλλαγμένο γονότυπο για τους δυο πολυμορφισμούς παρουσιάζουν φυσιολογικό φαινότυπο, σύμφωνα με την εξέταση σπερμοδιαγράμματος που είχε διεξαχθεί.

Τέλος, για τη διεξαγωγή ενός σαφούς και ασφαλούς συμπεράσματος είναι σημαντικό να διεξαχθούν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας και αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος, που να συμπεριλαμβάνουν την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, εθνικών παραγόντων καθώς και επιγενετικών παραγόντων, που τείνουν να συσσωρεύονται με την ηλικία καθώς και μελέτες όπου ο πληθυσμός μελέτης θα περιλαμβάνει άτομα μιας συγκεκριμένης κατηγορίας υπογονιμότητας.

## ABSTRACT

Infertility is defined as the inability to conceive after a year of unprotected intercourse and has been recognized as a public health issue with a global impact by the World Health Organization (WHO), as its global prevalence is estimated to be 9%. Male infertility is 30-40% of all cases of infertility, while one in twenty men is estimated to have some kind of infertility. In addition to chromosomal aberrations, gene mutations are an important factor in the appearance of male infertility. The present study focuses on the AURKC, CATSPER1 and AR genes, as the involvement of these genes with male infertility is evident. The purpose of this study was to scan the AURKC, CATSPER1 and AR genes in 159 samples of the Greek population to detect polymorphisms related to male infertility.

For this purpose, the desired areas were initially amplified in the indicative subset of 32 samples, already genotyped with Illumina's Infinium Global Screening Array to check the existence of the desired products. In order to find the male infertility-related polymorphisms present in the AURKC, CATSPER1 and AR genes, the analysis was extended to 159 genotyped samples and bioinformatics analysis was performed and the polymorphisms found and correlated with male infertility were rs1337080 and rs5919411 for the AR gene. It was observed that for both polymorphisms of the AR gene, a mutant genotype was found at 6.3%, and that 70% of the mutant genotype samples for the two polymorphisms showed a normal phenotype, according to the spermogram.

Finally, in order to make a clear and safe conclusion, it is important to carry out larger-scale sequencing studies of the entire genome, including the influence of environmental factors, national factors and epigenetic factors that tend to accumulate with age, and studies where the population examined will include individuals of a particular infertility class.

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ανδρική υπογονιμότητα

Η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία σύλληψης μετά από ένα χρόνο μη προστατευμένης συνουσίας (Inati et al., 2012) και έχει αναγνωριστεί ως ζήτημα δημόσιας υγείας με παγκόσμιο αντίκτυπο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) (Boivin et al., 2007), καθώς ο παγκόσμιος επιπολασμός της εκτιμάται ότι είναι 9% (Inati et al., 2012). Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες προκύπτει ότι σε παγκόσμιο επίπεδο παρατηρείται μια εξασθένηση του σπέρματος της τάξης του 1,5-3,1 % ετησίως ενώ στην Ευρώπη περίπου ένα στα επτά ζευγάρια αντιμετωπίζουν διαταραχές της αναπαραγωγικής υγείας με αποτέλεσμα την υπογονιμότητα (Krausz, 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι για υγιή νεαρά ζευγάρια, η πιθανότητα εγκυμοσύνης ανά αναπαραγωγικό κύκλο κυμαίνεται σε ποσοστά 20%-25% ενώ ανέρχεται σε ποσοστό 60% εντός των πρώτων 6 μηνών προσπαθειών και στο 84% εντός του πρώτου έτους (Kamel, 2010).

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί το 30–40% όλων των περιπτώσεων υπογονιμότητας (Zeigraj et al., 2018), ενώ εκτιμάται ότι ένας στους είκοσι άνδρες παρουσιάζουν κάποιο είδος υπογονιμότητας (<https://andrologyaustralia.org>). Χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθής (ποσοστό εμφάνισης 67-71%) όταν δεν έχει επιτευχθεί σύλληψη ποτέ, τόσο με ίδια όσο και με διαφορετική σύντροφο, και ως δευτεροπαθής (ποσοστό εμφάνισης 29-33%) όταν έχει επιτευχθεί τουλάχιστον μια σύλληψη στο παρελθόν (Ramgir et al., 2015, <http://www.who.int/reproductivehealth>). Η διάγνωση της υπογονιμότητας όσον αφορά στον άνδρα πρέπει να περιλαμβάνει τη λήψη ολοκληρωμένου ιατρικού και αναπαραγωγικού ιστορικού, φυσική εξέταση, με έμφαση τόσο στα γεννητικά όργανα όσο και στα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου, και ανάλυση σπέρματος. Η ανάλυση του σπέρματος πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με το εγχειρίδιο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας με τυποποιημένο τρόπο. Αυτή η ανάλυση παρέχει την πυκνότητα του σπέρματος, τον συνολικό αριθμό, την κινητικότητα, τη μορφολογία και παραμέτρους του σπέρματος όπως ο όγκος, το pH, το ιξώδες. Η ονοματολογία που χρησιμοποιείται σε περίπτωση παθολογικού ευρήματος φαίνεται στον πίνακα 1 (WHO, 2010).

#### Πίνακας 1 Ονοματολογία παθολογικών ευρημάτων

Παθολογικό εύρημα	Χαρακτηριστικά
<u>Ολιγοζωοσπερμία</u>	Συγκέντρωση σπέρματος <15x 10 <sup>6</sup> /ml Αριθμός σπερματοζωαρίων <39x10 <sup>6</sup> /ml
<u>Ασθενοζωοσπερμία</u>	<32% κινητικά σπερματοζωάρια
<u>Τερατοζωοσπερμία</u>	<4% μορφολογικά φυσιολογικά σπερματοζωάρια
<u>Ολιγο-ασθενο-τερατοζωοσπερμία</u>	Συνδιασμός των 3 παραγόντων
<u>Αζωοσπερμία</u>	Ανυπαρξία σπερματοζωαρίων στην

	εκσπερμάτιση
<u>Ασπερμία</u>	Μη εκσπερμάτιση
<u>Λευκοσπερμία</u>	>1x10 <sup>6</sup> ml λευκοκύτταρα

## Αιτιοπαθολογία

Η ανδρική υπογονιμότητα οφείλεται σε ετερογενείς διαταραχές ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις η αιτιολογία είναι άγνωστη, οπότε και ονομάζεται ιδιοπαθής. Σχεδόν το ένα τρίτο του πληθυσμού των υπογόνιμων ανδρών έχουν πρόβλημα με την παραγωγή σπέρματος στους όρχεις, είτε παράγονται λιγότερα σπερματοζωάρια από το φυσιολογικό είτε τα σπερματοζωάρια που παράγονται δεν έχουν φυσιολογική μορφολογία ενώ σε έναν στους πέντε υπογόνιμους άνδρες υπάρχει πρόβλημα στη μεταφορά των σπερματοζωαρίων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει και σε πλήρη έλλειψη σπερματοζωαρίων στο σπέρμα κατά την εκσπερμάτιση (Ramgir et al., 2015, Seshagiri, 2001). Έχει παρατηρηθεί ότι η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε προ-ορχικούς παράγοντες σε ποσοστό 1-2%, σε ορχικούς σε ποσοστό 30-40% και σε μετα-ορχικούς παράγοντες σε ποσοστό 10-20% (Jungwirth et al., 2012).

Οι προορχικές αιτίες περιλαμβάνουν κυρίως διαταραχές στον υποθάλαμο ή την υπόφυση, όπου η ανεπάρκεια παραγωγής γοναδοτροπινών μπορεί να οδηγήσει σε ορχική ανεπάρκεια (υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός). Επίσης, αφορούν αντίσταση στη δράση των ανδρογόνων και διαταραχές του θυροειδούς αδένος και των επινεφριδίων, όπως επινεφριδιακή ανεπάρκεια και συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων. Τέλος, οι προ-ορχικές αιτίες σπάνια μπορεί να αφορούν και συναισθηματικές διαταραχές προκαλώντας για παράδειγμα στυτική δυσλειτουργία ή διαταραχές εκσπερμάτωσης (Krausz, 2011, McPhee, Μουτσόπουλος 2009).

Στις μεταορχικές αιτίες περιλαμβάνονται όλες τις αποφρακτικές αλλοιώσεις της σπερματικής οδού, λοιμώξεις και φλεγμονώδεις ασθένειες των βοηθητικών αδένων καθώς και υπογονιμότητα λόγω της αυθόρμητης εμφάνισης αντισωμάτων έναντι αντιγόνων των σπερματοζωαρίων, η οποία μπορεί να εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Σε περίπτωση αμφίπλευρης απόφραξης προκαλείται αζωοσπερμία, δηλαδή ανυπαρξία σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1, ενώ στις άλλες μετα-ορχικές καταστάσεις παρατηρείται διαφορετικός βαθμός εξασθένησης των κύριων παραμέτρων του σπέρματος (αριθμός σπερματοζωαρίων, κινητικότητα και μορφολογία). Ασθένειες που επηρεάζουν τους βοηθητικούς αδένες συνδέονται με χαμηλό όγκο εκσπερμάτωσης λόγω του γεγονότος ότι περίπου το 90% του όγκου προέρχεται από τα σπερματικά κυστίδια και τον προστάτη. Χαμηλός όγκος σπέρματος σε συνδυασμό με υψηλό pH και ιξώδες είναι χαρακτηριστικά για την προστατίτιδα ή την απόφραξη των αεραγωγών λόγω της προστατικής κύστης. Σημαντική μετα-ορχική ασθένεια αποτελεί

η συγγενής απουσία σπερματικού πόρου (CBAVD), η οποία θα αναλυθεί παρακάτω (Krausz, 2011).

Στις ορχικές αιτίες περιλαμβάνονται η ορχίτιδα, τα τραύματα των όρχεων, συστροφές, μερικές συστηματικές ασθένειες και οι γενετικοί παράγοντες όπως οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τα μικροελλείματα του χρωμοσώματος Υ. Επίσης μπορεί να περιλαμβάνει την κισσοκήλη, που είναι η κισσώδης διεύρυνση των φλεβών της σπερματικής χορδής, ωστόσο η συσχέτιση της κισσοκήλης με την υπογονιμότητα δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς μπορεί να παρατηρηθεί και σε περίπου 10% νορμοζωοσπερμικούς άνδρες. Με βάση τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας η κισσοκήλη σχετίζεται με ανωμαλίες σπέρματος, μείωση της λειτουργίας των κυττάρων Leydig και μειωμένο όγκο των όρχεων. Παρόλο που οι όρχεις παράγουν τεστοστερόνη, διαφορές στο μέγεθος των όρχεων πιθανότατα αντανακλούν διαφορές στην παραγωγή σπέρματος περισσότερο από την παραγωγή ορμονών, επειδή οι σπερματοδόχοι σωλήνες αντιπροσωπεύουν το 70-80% του όγκου των όρχεων και ο όγκος των όρχεων συσχετίζεται περισσότερο με το την ποιότητα και ποσότητα του σπέρματος σε σχέση με τα επίπεδα τεστοστερόνης. Ο όγκος όρχεων που θεωρείται φυσιολογικός σε ενήλικα άτομα κυμαίνεται από ~15ml έως ~25ml. Ως εκ τούτου, η κισσοκήλη μπορεί να θεωρηθεί ως ένας συν-παράγοντας μειωμένης παραγωγής σπέρματος (Krausz, 2011, McPhee, Μουτσόπουλος 2009, WHO, 1992). Εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 20% των ενήλικων ανδρών και εφήβων, σε ποσοστό 19% έως 41% των ανδρών με πρωτοπαθή υπογονιμότητα και σε ποσοστό 45% έως 81% των ανδρών με δευτεροπαθή υπογονιμότητα (Kibar et al., 2002).

Τέλος, σπουδαίο ρόλο παίζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι η έκθεση σε εργοστασιακά χημικά, σε βαρέα μέταλλα, ακτίνες Χ, αλκοόλ και κάπνισμα (Ramgir et al., 2015).

## Γενετικά αίτια

### Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αντιπροσωπεύουν περίπου το 5% των περιπτώσεων υπογονιμότητας στους άνδρες και το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 15% στην περίπτωση του πληθυσμού των αζωοσπερμικών ανδρών. Η ανευπλοειδία είναι το πιο συχνό σφάλμα που προκαλεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε υπογόνιμους άνδρες. Ιδιαίτερα οι άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία έχουν πολύ υψηλή συχνότητα ανευπλοειδίας ειδικά στα φυλατικά χρωμοσώματα (O'Brien et al., 2010). Το 7-10% των κλινικά αναγνωρισμένων κυήσεων παρουσιάζουν ανευπλοειδία, γεγονός συνήθως ασυμβίβαστο με τη ζωή. Η ανευπλοειδία είναι αποτέλεσμα σφαλμάτων στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, συχνά κατά τη διάρκεια της μείωσης I (MI) όπου γίνεται ο διαχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων (Fellmeth et al., 2016). Όλες οι μελέτες που διερευνούν τα επίπεδα

ανευπλοειδίας σπέρματος σε υπογόνιμους άντρες καταδεικνύουν μια τριπλάσια αύξηση των επιπέδων ανευπλοειδίας σε σύγκριση με γόνιμους άντρες. Αυξήσεις των περιστατικών με ανευπλοειδία στο σπέρμα έχουν αναφερθεί σε όλους τους φαινοτύπους υπογονιμότητας, συμπεριλαμβανομένης της ολιγοζωοσπερμίας, της ασθενοζωοσπερμίας και της τερατοζωοσπερμίας (Ramgir et al., 2015).

### **Σύνδρομο Klinefelter**

Το σύνδρομο Klinefelter είναι η πιο κοινή χρωμοσωματική ανωμαλία και ανιχνεύεται σε ποσοστό έως 14% σε υπογόνιμους ασθενείς με αζωοσπερμία και σε ποσοστό 5% σε ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες (Walsh et al., 2009, O'Brien et al., 2010). Οι πάσχοντες εμφανίζουν εκφυλισμό των γεννητικών κυττάρων, ενώ τα επίπεδα των ορμονών στον ορό είναι μη φυσιολογικά, παρουσιάζοντας μια μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης και αύξηση των ορμονών FSH και LH. Το σύνδρομο προκύπτει από ανευπλοειδία του X χρωμοσώματος, κατά την οποία το 90% των ανδρών έχει ένα χρωμόσωμα X παραπάνω (47,XXY) και ένα 10% είναι μωσαϊκό παρουσιάζοντας το συνδυασμό χρωμοσωμάτων XXY/XY (Zorilla et al., 2013).

### **Σύνδρομο 47, XXY**

Το σύνδρομο αυτό παρουσιάζεται με συχνότητα 1:1000 γεννήσεις, ωστόσο εμφανίζεται αρκετά συχνά σε υπογόνιμους άνδρες. Ανάλυση του σπέρματος σε πάσχοντες δείχνει σοβαρή ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία, ενώ τα επίπεδα των ορμονών δείχνουν αυξημένη FSH, και φυσιολογικές την τεστοστερόνη και την LH. Όπως έχει δείχτεί, τα γεννητικά κύτταρα που έχουν ένα παραπάνω χρωμόσωμα Y με καρυότυπο 47,XYX εμφανίζουν μη φυσιολογική μείωση με επακόλουθο την απόπτωση σπερματοζωαρίων και άρα ολιγοζωοσπερμία και υπογονιμότητα (Zorilla et al., 2013, O'Brien et al., 2010).

### **Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες**

Περιλαμβάνουν ελλείματα, διπλασιασμούς, αναστροφές και μετατοπίσεις χρωμοσωμάτων και παρατηρούνται στο 5% των υπογόνιμων ανδρών (ποσοστό 0,5% του γενικού πληθυσμού), κυρίως σε άνδρες με ολιγοζωοσπερμία και αζωοσπερμία (Zorilla et al., 2013). Μετατοπίσεις σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα συμβαίνουν 4-10 φορές συχνότερα σε υπογόνιμους άνδρες σε σχέση με φυσιολογικούς (O'Brien et al., 2010).

Οι μεταθέσεις κατά Robertson είναι οι πιο κοινές χρωμοσωμικές μεταθέσεις που επηρεάζουν τη γονιμότητα. Συμβαίνουν όταν δύο ακροκεντρικά χρωμοσώματα (χρωμοσώματα 13,14,15,21,22) ενώνονται μεταξύ τους. Το προκύπτον χρωμόσωμα περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος των μεγάλων βραχιόνων των αρχικών δυο χρωμοσωμάτων, παρουσιάζουν όμως απώλεια των μικρών τους βραχιόνων. Η συχνότητα των μεταθέσεων αυτών είναι περίπου 1 στους 1000 άνδρες. Οι πιο συχνοί συνδυασμοί είναι μεταξύ των χρωμοσωμάτων 13 και 14 και μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 21, με συχνότητα εμφάνισης 1:1000 και 1:5000, αντίστοιχα

(Roux et al., 2005, Engels et al., 2008, O'Brien et al., 2010, Walsh et al., 2009, Ferlin, 2008). Εμφανίζονται κυρίως σε ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες σε ποσοστό 1,6% και σε αζωοσπερμικούς σε ποσοστό 0,09%, όπως φαίνεται και στο πίνακα 2 (O'Brien et al., 2010). Συνήθως, οι φορείς μεταθέσεων κατά Robertson έχουν φυσιολογικούς φαινότυπους. Ωστόσο, η μετάθεση μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα ή την έκβαση της εγκυμοσύνης λόγω μειωμένου ποσοστού λειτουργικής γαμετογένεσης ή παραγωγής γαμετών με μη ισορροπημένο συνδυασμό του τυχαίου ανασυνδυασμού των χρωμοσωμάτων των γονέων. Σε πληθυσμούς υπογόνιμων ανδρών παρατηρούνται τέτοιες μεταθέσεις σε ποσοστό μέχρι και εννέα φορές υψηλότερο από ό, τι στο γενικό πληθυσμό (Ferlin, 2007).

### **Μικροελλείματα στο χρωμόσωμα Y**

Στον άνθρωπο, το χρωμόσωμα Y είναι σημαντικό για τη διαφοροποίηση των όρχεων και τη σπερματογένεση. Τα μικροελλείματα στο μεγάλο βραχίονα του Y χρωμοσώματος εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε υπογόνιμους άνδρες (σε ποσοστό 15%) απ' ό,τι σε γόνιμους, ιδιαίτερα σε αζωοσπερμικούς άνδρες σε ποσοστό έως 15% και σε σοβαρά ολιγοζωοσπερμικούς σε ποσοστό 1-7%. Μελέτες έχουν δείξει ότι μικροελλείματα στην περιοχή Yq11 είναι πολύ συχνά σε υπογόνιμους άνδρες, συγκεκριμένα σε ποσοστό 10-15% σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς αζωοσπερμίας και 5-10% σε περιπτώσεις σοβαρής ολιγοζωοσπερμίας (Ramgir et al., 2015), όπως φαίνεται και στον πίνακα 2. Περιοχή μεγάλου ενδιαφέροντος στον μεγάλο βραχίονα του Y χρωμοσώματος είναι η περιοχή AZF (azoospermia factor region), που περιέχει γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του σπέρματος. Η περιοχή αυτή περιέχει 3 υποπεριοχές: τις AZFa, AZFb και AZFc, με τις πιο συχνά πολλαπλά ελλείματα να παρατηρούνται στις δυο τελευταίες, έχοντας ως αποτέλεσμα φαινότυπους υπογονιμότητας. Σε αυτές τις υποπεριοχές υπάρχουν υποψήφια γονίδια που είναι υπεύθυνα για ανδρική υπογονιμότητα (O'Brien et al., 2010).

Για την AZFa είναι τα DBY, που εμπλέκεται στην ανάπτυξη προμειωτικών γεννητικών κυττάρων, το USP9Y, που εμπλέκεται επίσης στη σπερματογένεση ενώ ελλείματά του σχετίζονται με αζωοσπερμία, ολιγοζωοσπερμία και ολιγοασθενοζωοσπερμία, και το γονίδιο UTY (Ramgir et al., 2015).

Στην AZFb υποπεριοχή, το γονίδιο RBMY έχει 6 αντίγραφα εκ των οποίων το RBMY1 κωδικοποιεί έναν παράγοντα ματίσματος που εκφράζεται στον πυρήνα πρώιμων σπερματοζωαρίων και έχει βρεθεί πως υποεκφράζεται σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας. Το γονίδιο PRY εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης, διεργασία απαραίτητη ειδικά για να την απομάκρυνση μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Όπως έχει βρεθεί, έλλειψη των δυο αυτών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της σπερματογένεσης (Ramgir et al., 2015)..

Ελλείματα στην υποπεριοχή AZFc εμφανίζονται περίπου στο 12% αζωοσπερμικών ανδρών και στο 6% των ανδρών με σοβαρή ολιγοζωοσπερμία. Περιέχει 5 αντίγραφα (b1, b2, b3, b4, gr), τοποθετημένα σε αντίθετες κατευθύνσεις και προδιαθέτουν για ελλείματα. Απώλεια των γονιδίων BPY2, PRY2, DAZ, και CDY1 έχει συσχετιστεί με

με ελλείμματα ολόκληρης της υποπεριοχής AZFc (Reijo et al., 1996, Reijo et al., 1995, Kawaguchi et al., 2001). Απώλεια των γονιδίων DAZ (Deleted in Azoospermia) επηρεάζει τη μετάφραση στα γεννητικά κύτταρα και τερματίζει τη μείωση, προκαλώντας ολιγοζωοσπερμία. οι πιο σημαντικές ελλείψεις είναι οι gr/gr και σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση προβλημάτων στο σπέρμα. Τα περισσότερα ελλείμματα στην AZFc συμβαίνουν de novo, ενώ οι gr/gr μπορούν να περάσουν από πατέρα σε γιό. Έχει δειχτεί πως κληρονομημένες μερικές gr/gr ελλείψεις αυξάνουν τον κίνδυνο για έλλειψη ολόκληρης της AZFc στον απόγονο (Zorilla et al., 2013, Kawaguchi et al., 2001).

## Πίνακας 2 Φαινότυποι και συχνότητα κοινών γενετικών ανωμαλιών σχετικών με ανδρική υπογονιμότητα (προσαρμοσμένο σύμφωνα με O'Brien et al., 2010)

Γενετική ανωμαλία	Φαινότυπος	Συχνότητα (%)
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	Αζωοσπερμία, νορμοζωοσπερμία	5% συνολικός υπογόνιμος πληθυσμός 15% αζωοσπερμικοί
Σύνδρομο Klinefelter	Αζωοσπερμία, σοβαρή ολιγοζωοσπερμία	5% σοβαρή ολιγοζωοσπερμία 10% αζωοσπερμία
Μετατοπίσεις κατά Robertson	Αζωοσπερμία, νορμοζωοσπερμία	0,8% συνολικός υπογόνιμος πληθυσμός 1,6% ολιγοζωοσπερμία 0,09 αζωοσπερμία
Μικροελλείματα Y χρωμοσώματος	Αζωοσπερμία, ολιγοζωοσπερμία	10-15% αζωοσπερμία 5-10% ολιγοζωοσπερμία

## Γονιδιακές μεταλλάξεις

Υπάρχουν αρκετά γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την ανθρώπινη ανδρική υπογονιμότητα όπως είναι τα CFTR, AR, SPATA16, AURKC, CATSPER1, GNRHR, MTHFR, SYCP3, SOX9, WT1.

Παρακάτω, στην εργασία αναλύονται τα AURKC, CATSPER1 και AR.

### Γονίδιο AURKC

Το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 12, στη θέση 13.43 (περιοχή 19q13.43) και κωδικοποιεί ένα μέλος της υποοικογένειας Aurora των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης, την κινάση Aurora-C. Η πρωτεϊνική αυτή κινάση βρίσκεται σε αφθονία μόνο σε γεννητικά κύτταρα και επομένως καθώς το γονίδιο εκφράζεται επιλεκτικά στους ανδρικούς όρχεις, σε αντίθεση με τις κινάσες Aurora-B και Aurora-A που είναι πανταχού παρούσες σε σωματικά κύτταρα (<https://ghr.nlm.nih.gov/>, Yang et al. 2015). Αποτελεί μία χρωμοσωμική πρωτεΐνη-επιβάτη (passenger protein), πρωτεΐνη δηλαδή που εντοπίζεται στο κεντρομερές κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων του κυτταρικού κύκλου, που παίζει σημαντικό ρόλο σε γεγονότα της μίτωσης, συμπεριλαμβανομένων της συμπύκνωσης

των χρωμοσωμάτων, της λειτουργίας της μιτωτικής ατράκτου και της κυτοκίνησης καθώς σχηματίζει σύμπλοκα με κινάσες Aurora-B και εσωτερικές πρωτεΐνες του κεντρομερούς συμμετέχοντας στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου και διατηρώντας τελικά το σωστό αριθμό χρωμοσωμάτων του κυττάρου (Eloualid et al., 2014, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Είναι ενδιαφέρον ότι το γονίδιο AURKC εκφράζεται επίσης σε υψηλά επίπεδα σε πρώιμα στάδια εμβρυογένεσης κατά την προ-εμφυτευτική περίοδο, δηλαδή τις 6 πρώτες μέρες μετά τη γονιμοποίηση ενώ επίσης το AURKC πιθανότατα εμπλέκεται στον διαχωρισμό χρωμοσωμάτων στις πρώτες εμβρυϊκές κυτταρικές διαιρέσεις, οδηγώντας στην εικασία ότι μπορεί να σχετίζεται με το υψηλό ποσοστό ανευπλοειδίας που παρατηρείται στα έμβρυα κατά την προ-εμφυτευτική περίοδο (Ben Khelifa et al., 2012).

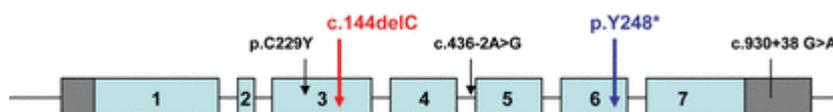
Μεταλλάξεις στο γονίδιο AURKC σχετίζονται με το φαινότυπο της μακροζωοσπερμίας, που εκδηλώνεται με σπερματοζωάρια 100% τετραπλοειδή με πολλαπλά μαστίγια (Fellmeth et al., 2016).

Η πιο ευρέως εμφανιζόμενη μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο είναι η c.144delC (AURKC p.L49Wfs22) και αποτελεί την πιο συχνή (1 στους 10.000 άνδρες) γνωστή γενετική αιτία για μακροζωοσπερμία (Ounis et al., 2015). Πρόκειται για μια ομόζυγη διαγραφή κυτοσίνης στο εξώνιο 3 του γονιδίου (Dieterich et al., 2007, Miyamoto et al., 2015). Αυτή η διαγραφή δημιουργεί μια μετατόπιση πλαισίου με αποτέλεσμα την αλλαγή κωδικονίου από λευκίνη σε τρυπτοφάνη στο αμινοξύ 49, ενώ λίγο μετά το πλαίσιο αυτό υπάρχει κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης οδηγώντας σε πρόωρα κομμένη πρωτεΐνη. Δεδομένου ότι η καταλυτική επικράτεια του AURKC ξεκινά στη θέση 42 (εικόνα 1), γίνεται αντιληπτό πως η μετάλλαξη οδηγεί σε σχεδόν ολοκληρωτική απώλεια της περιοχής κινάσης, επομένως πρόκειται για μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (Fellmeth et al., 2016).

```
AURKC WT      1-41 DFEIGRPLGK GKFGNVYLAR LKESHFIVAL 72-221 LWCIGVLCYE LLVGYPFFES ASHSETYRRI
AURKC p.L49Wfs22 1-41 DFEIGRPWAR GNLGMCTWLG SRKAISLWPX
```

**Εικόνα 1** Αμινοξικές αλλαγές εξαιτίας μετάλλαξης c.144delC (p.L49Wfs22) (προσαρμοσμένο σύμφωνα με Fellmeth et al., 2016)

Άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί c.686G>A (AURKC p.C229Y) και c.744C>G (AURKC p.Y248\*) που εντοπίζονται σε κωδική περιοχή και συγκεκριμένα στα εξώνια 3 και 6 αντίστοιχα (εικόνα 2).



**Εικόνα 2** Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου AURKC και εντοπισμός των μεταλλάξεών του. Οι μπλε περιοχές αναπαριστούν τα εξώνια, οι γκρι περιοχές τις αμετάφραστες περιοχές (προσαρμοσμένο σύμφωνα με Ben Khelifa et al., 2012).

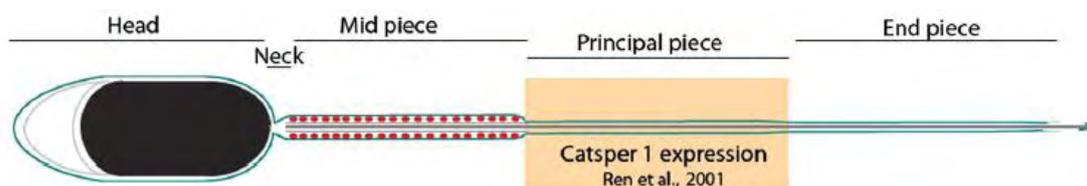
Όσον αφορά τη μετάλλαξη p.C229Y, πρόκειται για μια αντικατάσταση στη θέση 686, οδηγώντας σε αμινοξική αλλαγή από κυστεΐνη σε τυροσίνη στο αμινοξύ 229, που βρίσκεται μέσα στην περιοχή κινάσης και είναι πολύ συντηρημένη, με μεγάλη σημασία στην καταλυτική λειτουργία. Δεδομένης αυτής της υψηλής συντήρησης και της φαινοτυπικής ομοιότητας αυτής της μετάλλαξης με την c.144delC, θεωρείται πως και αυτή είναι μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (Fellmeth et al., 2016, Ben Khelifa et al., 2012).

Τέλος, όσον αφορά τον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό p.Y248\*, πρόκειται για αντικατάσταση ενός ζεύγους βάσεων στη θέση 744 (C/A) που έχει ως αποτέλεσμα κωδικόνιο τερματισμού στη θέση 248. Αυτός ο πολυμορφισμός συναντάται πάντα με τον πολυμορφισμό c.930+38G>A στην αμετάφραστη περιοχή 3'-UTR του γονιδίου, η οποία φαίνεται στην εικόνα 2. Το πρωτεϊνικό προϊόν της μετάλλαξης p.Y248\* διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής επικράτειας, ωστόσο, σε συνδυασμό με τους φαινότυπους μακροζωοσπερμίας και πολυπλοειδεΐας στους άνδρες που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη, η μετάλλαξη p.Y248\* θεωρείται και αυτή μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (Fellmeth et al., 2016, Ben Khelifa et al., 2012).

### Γονίδιο CATSPER1

Το γονίδιο CATSPER1 εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 στη θέση 13.1. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CATSPER που ανήκει σε μια οικογένεια τεσσάρων διαύλων κατιόντων (CATSPER1,2,3,4) που είναι ειδικοί για τα σπερματοζωάρια, εμφανίζουν υψηλή συντήρηση σε ανθρώπους και ποντίκια και εντοπίζονται στο μαστίγιο των σπερματοζωαρίων. Οι πρωτεΐνες CATSPER αποτελούνται από μια μόνο επανάληψη με έξι διαμεμβρανικά τμήματα και μία προβλεπόμενη περιοχή πόρων επιλεκτικών για το ασβέστιο (<https://ghr.nlm.nih.gov/>, Avenarius et al., 2009).

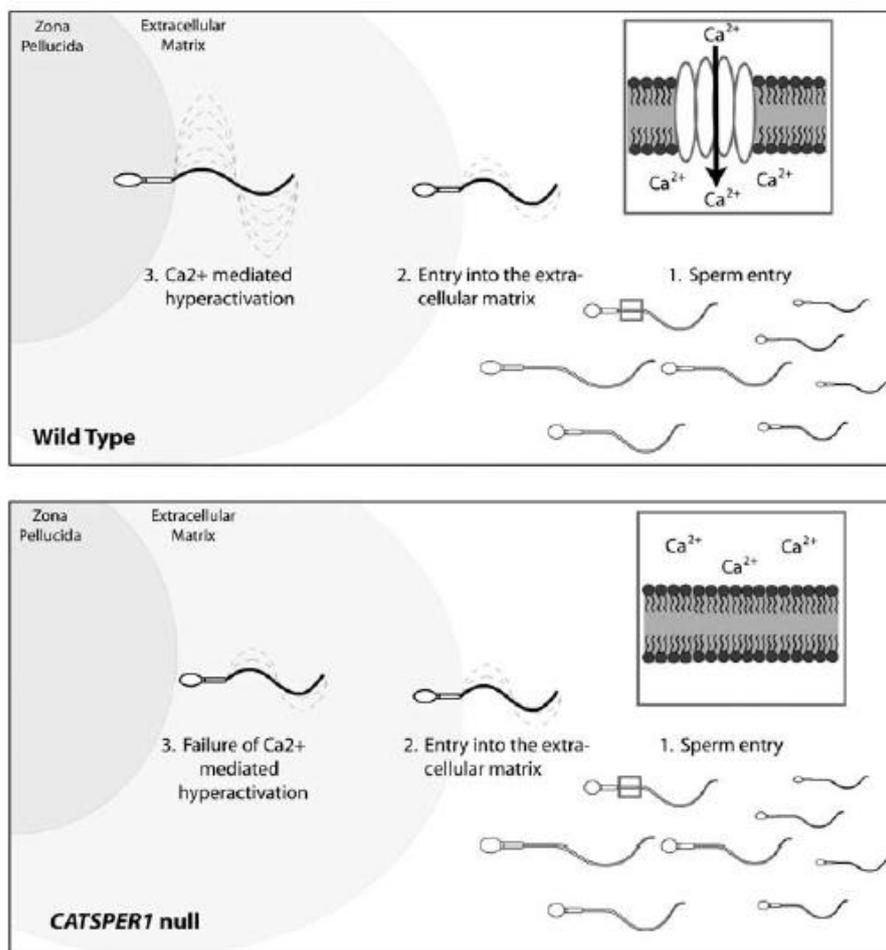
Η έκφραση του CatSper1 περιορίζεται στην πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων πάνω από το ινώδες περίβλημα στο κύριο μέρος του μαστιγίου (εικόνα 3) και είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθεί η είσοδος  $Ca^{2+}$  στο μαστίγιο και επομένως η κινητικότητα του σπερματοζωαρίου με σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από  $Ca^{2+}$  (Hildebrand et al., 2010).



### Εικόνα 3 Εντοπισμός έκφρασης του CATSPER1(Avenarius et al., 2009)

Μόλις το σπερματοζωάριο εισέλθει στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό, συμβαίνουν διαδοχικά η αρχική δραστηριοποίηση, η υπερδραστηριοποίηση της κινητικότητας και η δέσμευση ενός καταρράκτη πρωτεϊνικών κινασών, γεγονότα που διαμεσολαβούνται από  $Ca^{2+}$ . Η υπερδραστηριοποιημένη κινητικότητα συμβαίνει στη γονιμοποίηση για

να διευκολύνει τη διείσδυση στο ωάριο, γεγονός που εμποδίζεται όταν απουσιάζει το CatSper, και χαρακτηρίζεται από δημιουργία κυμάτων μεγάλου πλάτους, όπως φαίνεται στην εικόνα 4 (Avenarius et al., 2009).



**Εικόνα 4 Κινητικότητα φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και σπερματοζωαρίων με απουσία CatSper1 (Hildebrand et al., 2010)**

Ο ρόλος του διαύλου CatSper1 στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων αναγνωρίστηκε το 2001 στη μελέτη των Ren et al. ενώ ο ρόλος του στη μεταφορά Ca<sup>2+</sup> επιβεβαιώθηκε αργότερα (Kirichok et al., 2006).

Ωστόσο, η εμπλοκή του στην ανθρώπινη ανδρική γονιμότητα έγινε με τον εντοπισμό σε δυο συγγενικές οικογένειες, δυο μεταλλάξεων ένθεσης στο εξώνιο 1, τις c. 539-540insT και c. 948-949insATGGC. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου και εμφάνιση πρόωρων κωδικονίων τερματισμού. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη c. 539-540insT, γίνεται εισαγωγή μιας θυμίνης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται 8 νέα αμινοξέα και πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού. Αντίστοιχα, στην c. 948-949insATGGC, γίνεται εισαγωγή των 5 νουκλεοτιδίων ATGGC που οδηγεί και αυτή σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης. Και στις δυο περιπτώσεις από την παραγόμενη πρωτεΐνη λείπουν και οι 6 διαμεμβρανικές επικράτειες, καταστρέφοντας τη λειτουργία του CatSper1 ως διαύλου. Ανάλυση σπέρματος και στις δυο οικογένειες έδειξε μη κινητικό σπέρμα ή κινητικότητα κάτω της φυσιολογικής τιμής, μειωμένο όγκο σπέρματος, μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων

και μη φυσιολογική μορφολογία σπερματοζωαρίων, υποδεικνύοντας ασθενοσπερμία (Avenarius et al., 2009, Inati et al., 2012).

Επίσης, ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs1893916 που εντοπίζεται στο εξώνιο 1 του γονιδίου CATSPER1 και προκαλεί αλλαγή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ενδεχομένως καταστρέφοντας θέσεις πρόσδεσης ρυθμιστών κι επομένως επηρεάζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου, έχει συσχετιστεί με κίνδυνο εμφάνισης ιδιοπαθούς ασθενοσπερμίας (Shu et al., 2015).

## Γονίδιο AR

Το γονίδιο του υποδοχέα ανδρογόνων βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος X στη θέση 12, διαθέτει 8 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που διαθέτει 3 κύριες λειτουργικές περιοχές: την N-τερματική περιοχή που κωδικοποιείται από το εξώνιο 1, την περιοχή σύνδεσης με το DNA (DBD) που κωδικοποιείται από τα εξώνια 2 και 3 και την περιοχή δέσμευσης ανδρογόνων (LBD) που κωδικοποιείται από τα εξώνια 4,5,6,7 και 8. Λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται με δέσμευση στεροειδών ορμονών. Με τη δέσμευση της ορμόνης, ο υποδοχέας αλλάζει διαμόρφωση με αποτέλεσμα να εκτίθενται στην DBD δυο δακτύλιοι ψευδαργύρου. Στη συνέχεια μετακινείται στον πυρήνα όπου ομοδιμερίζεται και δεσμεύεται στις περιοχές ARE ορισμένων γονιδίων ώστε να ρυθμίσει τη μεταγραφή τους (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Gottlieb et al., 2005).

Ο υποδοχέας είναι απαραίτητος για τη δράση των ανδρογόνων, τόσο της τεστοστερόνης όσο και του ανηγμένου παραγώγου 5α-διυδροτεστοστερόνη και επομένως είναι απαραίτητος τόσο για την αρρενοποίηση πριν τη γέννηση όσο και για τη σωστή ανάπτυξη των δευτερογενών αρσενικών χαρακτηριστικών κατά την εφηβεία (Gottlieb et al., 2012).

Παρόλο που κάποιες μεταλλάξεις στο γονίδιο AR σχετίζονται με μη ορχικούς φαινοτύπους, όπως είναι ο καρκίνος του προστάτη, περίπου το 90% των μεταλλάξεων καταλήγουν σε androgen insensitivity syndrome (AIS). Πρόκειται για ένα σύνδρομο με διαταραχές αρρενοποίησης σε άτομα XY που μπορεί να παρουσιαστεί με 3 φαινοτύπους: το πλήρες σύνδρομο CAIS όπου το άτομο έχει εντελώς θηλυκό εξωτερικό φαινότυπο, η μερική μορφή του συνδρόμου PAIS όπου ο αρσενικός φαινότυπος είναι υποβαθμισμένος και η ήπια μορφή όπου το άτομο διαθέτει φυσιολογικά γεννητικά όργανα αλλά είναι υπογόνιμο. Η θέση και ο τύπος της μετάλλαξης σχετίζονται με τη σοβαρότητα του AIS. Οι περισσότερες μεταλλάξεις πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα CAIS ενώ αντικαταστάσεις μιας βάσης μπορούν να δώσουν όλες τις μορφές AIS, ανάλογα με την επίδραση στην αμινοξική αλληλουχία και την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης (O'Hara, Smith, 2015).

Στη μελέτη των Ferlin et al. το 2006, σε μια προσπάθεια σκαναρίσματος μεταλλάξεων το γονιδίου AR σε δείγματα υπογόνιμων ανδρών ανιχνεύθηκαν οι παρακάτω μεταλλάξεις που σχετίζονται με κάποιας μορφής AIS: P390S, L547F, Y571H, R607Q, R615H, A645D, D695N, M780I, Q798E, L821V, R855H, V866M, P340L, L270F, E353Q, A474V, G506D, S650G, F747I και insL57, από τις οποίες 7 βρέθηκαν στη N' τερματική περιοχή, 4 στην DBD και 7 στην LBD (Ferlin et al., 2006).

Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται άλλες μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με μορφές AIS.

	DNA Change	Exon	Predicted protein	Phenotype
1	c.521T>G	1	p.(Leu174*)	CAIS and PAIS
2	c.646G>A	1	p.(Gly216Arg)	PAIS, MAIS, and normal
3*	c.1174C>T	1	p.(Pro392Ser)	CAIS, PAIS, MAIS, and testicular cancer
4	c.1644G>T	2	p.(Leu548Phe)	PAIS and MAIS
5	c.1714T>C	2	p.(Tyr572His)	PAIS and MAIS
6*	c.1742A>G	2	p.(Lys581Arg)	PAIS and CaP
7	c.1792C>A	3	p.(Ser598Arg)	PAIS and normal
8	c.1822G>A	3	p.(Arg608Gln)	PAIS and MAIS
9	c.1847G>A	3	p.(Arg616His)	CAIS, PAIS, and MAIS
10	c.1847G>C	3	p.(Arg616Pro)	CAIS and PAIS
11	c.1937C>A	4	p.(Ala646Asp)	CAIS, PAIS, MAIS, and normal
12	c.2077_2079delA	4	p.(Asn693del)	CAIS and PAIS (male and female)
13	c.2086G>A	4	p.(Asp696Asn)	CAIS, PAIS, and MAIS
14	c.2110A>G	4	p.(Ser704Gly)	CAIS and PAIS
15	c.2117A>G	4	p.(Asn706Ser)	CAIS and PAIS
16*	c.2169G>T	4	p.(Leu723Phe)	CAIS and CaP
17*	c.2180G>T	5	p.(Arg727Leu)	Normal and CaP
18*	c.2224G>T	5	p.(Trp742Cys)	PAIS and CaP
19	c.2231G>T	5	p.(Gly744Val)	CAIS and PAIS
20*	c.2233C>T	5	p.(Leu745Phe)	CAIS and CaP
21	c.2238T>C	5	p.(Met746Thr)	CAIS and PAIS
22	c.2250A>G	5	p.(Met750Val)	CAIS and PAIS
23*	c.2256G>A	5	p.(Trp752*)	CAIS, PAIS, and CaP
24	c.2249A>G	5	p.(Asn757Ser)	PAIS and MAIS
25*	c.2291A>G	5	p.(Tyr764Cys)	PAIS and CaP
26	c.2296G>A	5	p.(Ala766Thr)	CAIS and PAIS
27	c.2299C>T	5	p.(Pro767Ser)	CAIS and PAIS
28	c.2324G>A	6	p.(Arg775His)	CAIS and PAIS
29	c.2343G>A	6	p.(Met781Ile)	CAIS, PAIS, and MAIS
30*	c.2359C>T	6	p.(Arg787*)	CAIS and CaP
31	c.2367G>T	6	p.(Arg789Ser)	PAIS and MAIS
32	c.2382G>C	6	p.(Glu794Asp)	MAIS and normal
33*	c.2395C>G	6	p.(Gln799Glu)	PAIS, MAIS, and CaP
34	c.2402C>T	6	p.(Thr801Ile)	PAIS and MAIS
35	c.2444G>A	6	p.(Ser815Asn)	PAIS and MAIS
36	c.2464C>G	7	p.(Leu822Val)	PAIS and MAIS
37*	c.2517C>T	7	p.(Leu839)	PAIS and CaP
38	c.2521G>T	7	p.(Arg841Cys)	PAIS (male and female)
39	c.2522G>A	7	p.(Arg841His)	CAIS and PAIS (male and female)
40	c.2528T>C	7	p.(Ile843Thr)	CAIS and PAIS
41	c.2567G>A	7	p.(Arg856His)	CAIS, PAIS, and MAIS
42*	c.2599G>A	7	p.(Val867Met)	CAIS, PAIS, and CaP
43	c.2612C>G	8	p.(Ala871Gly)	PAIS and MAIS
44*	c.2659A>G	8	p.(Met887Val)	MAIS and liver cancer
45	c.2668G>A	8	p.(Val890Met)	CAIS and PAIS

**Εικόνα 5 Μεταλλάξεις του γονιδίου AR που σχετίζονται με AIS (Gottlieb et al., 2012)**

Επίσης, στη Ν τερματική περιοχή στο εξώνιο 1 υπάρχουν επαναλήψεις πολυγλουταμίνης (CAG) και πολυγλικίνης (GGC) που έχουν μελετηθεί για πιθανό συσχετισμό με τη λειτουργία του AR και ανδρική υπογονιμότητα. Σε γόνιμους άνδρες οι φυσιολογικοί αριθμοί επαναλήψεων για τις CAG και GGC θεωρείται πως είναι 10 έως 35 και 4 έως 24 αντίστοιχα (Ferlin et al., 2007). Όσον αφορά τις CAG που έχουν μελετηθεί περισσότερο, μεγαλύτερες επαναλήψεις σχετίζονται με μειωμένη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου σε υπογόνιμους άνδρες ενώ αντίθετα μικρότερες επαναλήψεις έχει παρατηρηθεί να συνδέονται με καλύτερη ποιότητα σπέρματος και

αυξημένα επίπεδα σπερματογένεσης (O'Brien et al., 2010). Ωστόσο, πολλές μελέτες αναφορικά με αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι αντικρουόμενοι. Είναι πιθανό τα αποτελέσματα να είναι επηρεάζονται ανάλογα με τον πληθυσμό μελέτης καθώς ενώ στην Ευρώπη δε φαίνεται να υπάρχει συσχετισμός CAG με ανδρική υπογονιμότητα, μελέτες σε Ασία και Αυστραλία δείχνουν το αντίθετο (Rajpert et al., 2002, Yong et al., 2003).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι το σκανάρισμα των γονιδίων AURKC, CATSPER1 και AR, που όπως είδαμε έχουν συσχετιστεί με ανδρική υπογονιμότητα και χρησιμοποιούνται σε διαγνωστικά τεστ, με στόχο την εύρεση των πολυμορφισμών που περιέχουν σε δείγματα του ελληνικού πληθυσμού.

## B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

### Πληθυσμός μελέτης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 159 δείγματα σπέρματος και αίματος ατόμων από τον ελληνικό πληθυσμό. Γραπτή συναίνεση ελήφθη από όλα τα άτομα που πήραν μέρος στη μελέτη. Τα δείγματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν μέσω σπερμοδιαγράμματος από την μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής Embryolab, στη Θεσσαλονίκη.

### Απομόνωση - Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης γενωμικού DNA

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA γίνεται φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητά του και να υπολογιστεί η συγκέντρωσή του ώστε να χρησιμοποιηθεί στις κατάλληλες συγκεντρώσεις στις αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν. Συγκεκριμένα μετράται η οπτική πυκνότητα του αραιωμένου DNA σε μήκος κύματος 260nm, 280nm και 230nm.

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο 260/280. Η απορρόφηση στα 260 αντιστοιχεί στο νουκλεικό οξύ, στα 280 στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις και στα 230 στο άλας. Τιμές του λόγου 260/280 ~ 1,8 είναι αποδεκτές και υποδηλώνουν παρουσία καθαρού DNA. Τιμές μεγαλύτερες υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA ενώ τιμές μικρότερες πρόσμιξη με πρωτεΐνες, φαινόλη, ρυπαντικές ουσίες. Χαμηλός λόγος 260/280 παρατηρείται και σε δείγματα με πολύ χαμηλή συγκέντρωση DNA (<10 ng/μl).

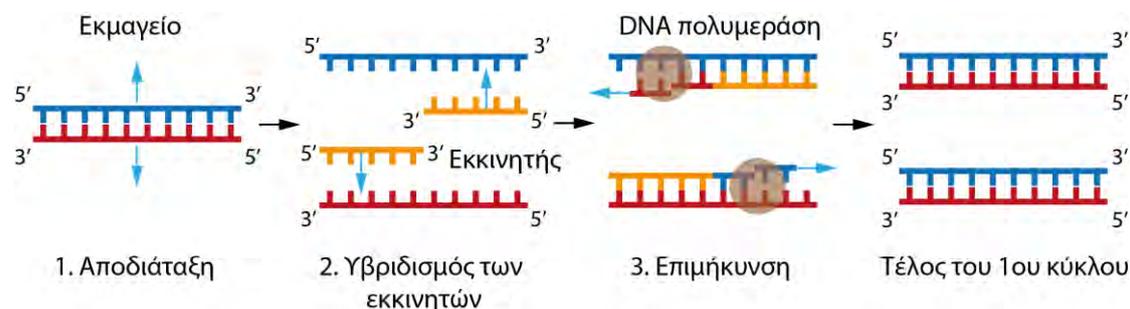
### PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο της Μοριακής Βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ειδικής ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού in vitro με αποτέλεσμα την απόκτηση πολλών αντιγράφων τους.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τρία στάδια (εικόνα 6): την αποδιάταξη των αλυσίδων, τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνσή τους.

Κατά την αποδιάταξη των αλυσίδων, το DNA - στόχος αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατά τον υβριδισμό, με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA. Τέλος, κατά την επιμήκυνση, αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης, η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται διαδοχικά για 25-40 κύκλους.



**Εικόνα 6 Τα στάδια της αντίδρασης PCR**

## Αντιδραστήρια PCR

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

1. DNA πολυμεράση
2. Ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητές
3. Αλληλουχία στόχος
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και  $Mg^{2+}$
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

### DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και η κύρια λειτουργία της είναι η σύνθεση DNA από τα δομικά του στοιχεία, τα νουκλεοτίδια. Συγκεκριμένα, δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστήρια σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι  $72^{\circ} C$ , ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους  $95^{\circ} C$  για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

### Εκκινητές

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και ο σωστός σχεδιασμός τους αποτελεί βασικό στοιχείο της αποτελεσματικότητας της PCR.

### Αλληλουχία στόχος

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Για τη βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης επαρκούν μικρές ποσότητες DNA.

### Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg<sup>2+</sup>

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> είναι απαραίτητος συμπαραγόντας της DNA πολυμεράσης και σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια Mg<sup>2+</sup> οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση και μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Αντίθετα, χαμηλές συγκεντρώσεις Mg<sup>2+</sup> οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος.

### Νουκλεοτίδια

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM.

Στην παρούσα εργασία αρχικά έγινε ενίσχυση των επιθυμητών περιοχών στο ενδεικτικό υποσύνολο 32 δειγμάτων, ήδη γονοτυπημένων με το Infinium Global Screening Array της Illumina, με σκοπό τον έλεγχο της ύπαρξης προϊόντων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών που φαίνονται στον πίνακα 3, σύμφωνα με Ferlin et al., 2006, Eloualid et al, 2014 και Avenarius et al., 2009.

### Πίνακας 3 Τα ζεύγη εκκινητών του χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδιο	Ευθύς εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
AURKC	5'GACTTTCCCTCCGCCTACC CTAC 3'	5'CTTTGACGTCTGAGCCCAGC 3'
CATSPER 1	5'TACCATGATGAGCTCCAAC GTG 3'	5'GTGGTACTCACTGGGGTTCGT 3'
AR	5'CCGTAGCCTTCTGGAAAAC ATC 3'	5'GTCACAATTTTACTTAAAAATG CGC 3'

Οι συνθήκες της αντίδρασης που εφαρμόστηκαν για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε φαίνονται στον πίνακα 4.

### Πίνακας 4 Οι συνθήκες της pcr που ακολουθήθηκαν

	AURKC	AR	CATSPER1
1. Αρχική αποδιάταξη	94°C για 5 min	94°C για 5 min	94°C για 1 min
2. Αποδιάταξη	94° για 30 sec	94° για 30 sec	94° για 10 sec
3. Υβριδοποίηση	64 °C για 30 sec	55 °C για 30 sec	59 °C για 20 sec
4. Επιμήκυνση	72°C για 30 sec	72°C για 30 sec	72°C για 30 sec
5. Τελική επιμήκυνση	72°C για 5 min	72°C για 5 min	72°C για 10 min
4°C forever			

Τα στάδια 2-4 επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, με τελικό όγκο αντίδρασης τα 50μl φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 5.

**Πίνακας 5 Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR**

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητες AURKC	Ποσότητες CATSPER1	Ποσότητες AR
Forward primer	1 pmol/μl	1μl	1,5μl	1μl
Reverse primer	1 pmol/μl	1μl	1,5μl	1μl
dNTPs	0.2 mM	1μl	2μl	1μl
Taq polymerase buffer	1X	5μl	5μl	5μl
Taq polymerase DNA	1u/αντίδραση	0,2μl	0,2μl	0,2μl
Mg <sup>2+</sup>	0,5mM	1μl	0,5μl	1,5μl
DNA (50ng/μl)		1μl	1μl	1,5μl
dd H2O		39.8μl	38.3μl	39.3μl

### Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το προϊόν της pcr, χρωστική που χρησιμοποιείται ώστε το δείγμα να μπορεί να πιο εύκολα να φορτωθεί στην πηκτή και ο μάρτυρας μοριακού βάρους(ladder)

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τον έλεγχο επιτυχίας της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 5μl προϊόν της pcr και 3μl χρωστικής ενώ η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100 Volt για 20 λεπτά.

### Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την εύρεση των σχετικών με ανδρική υπογονιμότητα πολυμορφισμών που υπάρχουν στα γονίδια AURKC, CATSPER1 και AR η ανάλυση επεκτάθηκε στα 159 γονοτυπημένα δείγματα και ακολουθήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση.

### Plink και SNP nexus

Αρχικά, για την εύρεση όλων των πολυμορφισμών που υπάρχουν στα τρία αυτά γονίδια των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Plink 1.07. Με το Plink, είναι δυνατή η ταυτόχρονη, γρήγορη και εξολοκλήρου διαχείριση και ανάλυση τεραστίων συνόλων δεδομένων που περιέχουν εκατοντάδες χιλιάδες δείκτες γονοτυπημένους για

χιλιάδες άτομα ενώ χρησιμοποιείται για μελέτες συσχέτισμού ολόκληρου γονιδιώματος (GWAS).

Το plink χρησιμοποιεί αρχεία map και ped που περιέχουν στοιχεία για όλους τους πολυμορφισμούς που υπάρχουν, όπως θέση στο χρωμόσωμα, και το γονότυπο αντίστοιχα.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των πολυμορφισμών στα υπο εξέταση γονίδια και η ομαδοποίησή του σε ένα ξεχωριστό αρχείο ήταν η: `plink --file [.ped/.map filename prefix] --chr 6 --from-bp 47477745 --to-bp 47627262 --write-snp-list --out [output filename prefix]`, η οποία προσαρμόστηκε με τη βοήθεια των δεδομένων της ensembl (GRCh37) ανάλογα με τα στοιχεία του κάθε γονιδίου στις εντολές:

```
plink --file GSA3ultimate --chr X --from-bp 66764465 --to-bp 66950461 --write-snp-list --out ARsnp για το γονίδιο AR,
```

```
plink --file GSA3ultimate --chr 19 --from-bp 57742377 --to-bp 57746916 --write-snp-list --out AURKCsnp για το γονίδιο AURKC και
```

```
plink --file GSA3ultimate --chr 11 --from-bp 65784223 --to-bp 65793988 --write-snp-list --out CATSPER1snp για το γονίδιο CATSPER1
```

Για έλεγχο της ποιότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως thresholds το `mind > 0.1`, προκειμένου να αποκλειστούν άτομα για τα οποία λείπουν πολλά δεδομένα για τη γονοτύπηση, το `maf > 0.05` ώστε να συμπεριληφθούν άτομα με συχνότητα του λιγότερο συχνού αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 0.05 και το `geno > 0.1`, ώστε να αποκλειστούν κάποια SNPs στο πλαίσιο της αναλογία γονοτύπων ανα marker.

Στη συνέχεια, για την επιλογή των πολυμορφισμών του κάθε γονιδίου που σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα χρησιμοποιήθηκε το SNP nexus (GRCh37/hg19) και η επιλογή για τη γενετική συσχέτιση πολύπλοκων ασθενειών GAD.

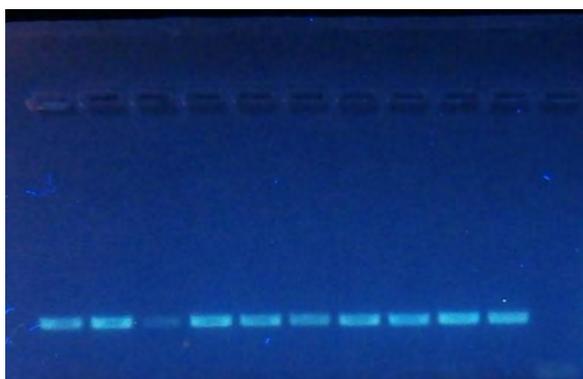
### Εύρεση γονότυπου

Η εύρεση του γονότυπου των 159 δειγμάτων έγινε επίσης με τη βοήθεια του Plink 1.07. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η εντολή `plink --file GSAultimate --extract ar.txt --tab --recode --out ARsnps` και έγινε σύγκριση των γονοτύπων που προέκυψαν με το φυσιολογικό για κάθε πολυμορφισμό αλληλόμορφο με τη βοήθεια της ensembl (GRCh37). Τέλος, τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τους φαινότυπους των δειγμάτων.

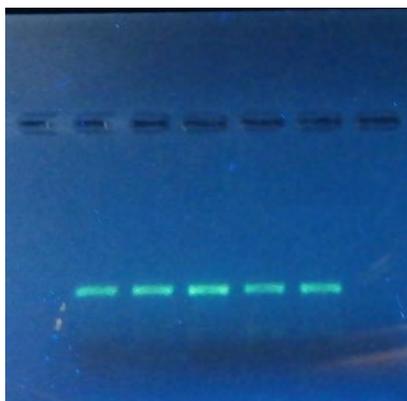
## Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### PCR

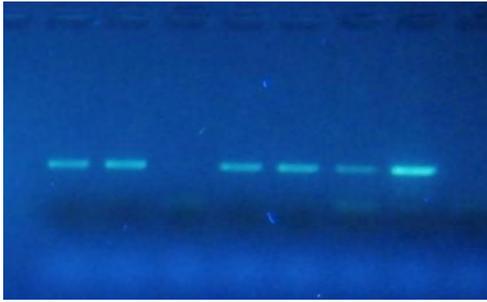
Αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA, στη συνέχεια οι περιοχές των γονιδίων AURKC, CATSPER1 και AR ενισχύθηκαν με PCR. Η επιτυχία της ενίσχυσης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά από μια φωτογραφία για κάθε γονίδιο ύστερα από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR.



Εικόνα 7 Έλεγχος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο AURKC σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Εικόνα 8 Έλεγχος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο AR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Εικόνα 9 Έλεγχος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο CATSPER1 σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

### Βιοπληροφορική ανάλυση

Για την εύρεση των πολυμορφισμών που υπάρχουν στα γονίδια AURKC, CATSPER1 και AR των 159 γονοτυπημένων δειγμάτων ακολουθήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση. Με τη χρήση του Plink 1.07 βρέθηκαν οι πολυμορφισμοί που φαίνονται παρακάτω στον πίνακα 6.

Χρησιμοποιήθηκαν οι εντολές "plink --file [.ped/.map filename prefix] --chr --from-bp --to-bp --write-snpList --out [output filename prefix]" για την ανάκτηση των SNPs σε κάθε γονίδιο ξεχωριστά, ανάλογα με το χρωμόσωμα και τις γενωμικές συντεταγμένες στις οποίες εδράζονται.

Πίνακας 6 Οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στα υπό μελέτη γονίδια με χρήση του Plink 1.07

AURKC	CATSPER1	AR
GSA-rs4141255	rs3829937	rs1337080
rs10426183	GSA-rs1203998	rs5919411
		exm2268593

Για την επιλογή των πολυμορφισμών του κάθε γονιδίου που σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα χρησιμοποιήθηκε το SNP nexus (GRCh37/hg19). Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν κι έχουν συσχετιστεί με ανδρική υπογονιμότητα είναι οι: rs1337080 και rs5919411 για το γονίδιο AR. Για τα υπόλοιπα γονίδια οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν δε φαίνεται να έχουν συσχετιστεί με ανδρική υπογονιμότητα.

Η εύρεση του γονότυπου των 159 δειγμάτων για τους δυο πολυμορφισμούς του γονιδίου AR έγινε επίσης με τη βοήθεια του Plink 1.07 κι έγινε σύγκριση των γονότυπων που προέκυψαν με το φυσιολογικό, για καθένα από τους δυο πολυμορφισμούς, αλληλόμορφο με τη βοήθεια της ensembl (GRCh37). Το ancestral αλληλόμορφο σύμφωνα με τη βάση δεδομένων για τον πολυμορφισμό rs1337080 είναι το A, ενώ για τον rs5919411 είναι το G.

Προέκυψε πως, από τα 159 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 149 παρουσίαζαν το φυσιολογικό γονότυπο και για τους δυο πολυμορφισμούς: AA για τον rs1337080 και GG για τον rs5919411, ενώ τα υπόλοιπα 10 εμφάνιζαν μεταλλαγμένο γονότυπο.

Επομένως, και για του δυο πολυμορφισμούς του γονιδίου AR εντοπίστηκε μεταλλαγμένος γονότυπος σε ποσοστό 6,3%.

Τέλος, παρατηρήθηκε πως το 70% των δειγμάτων που εμφάνισαν το μεταλλαγμένο γονότυπο για τους δυο πολυμορφισμούς παρουσιάζουν φυσιολογικό φαινότυπο, σύμφωνα με την εξέταση σπερμοδιαγράμματος που είχε διεξαχθεί.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προέκυψε πως στα δείγματα μελέτης υπάρχουν δυο πολυμορφισμοί που έχουν συσχετιστεί από προηγούμενες μελέτες με ανδρική υπογονιμότητα και οι οποίοι εντοπίζονται στο γονίδιο AR. Το ότι οι δυο αυτοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί εντοπίζονται και οι δυο στα ίδια δείγματα ενισχύει το ότι οι δυο αυτοί γενετικοί τύποι βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης καθώς είναι συνδεδεμένοι και συγκληρονομούνται. Για περαιτέρω διερεύνηση, θα ήταν σκόπιμο να γίνει μελέτη των πολυμορφισμών αυτών, αφενός σε μεγαλύτερο πληθυσμό μελέτης, τόσο φυσιολογικών όσο και υπογόνιμων ανδρών, και αφετέρου σε οικογένειες ατόμων με σκοπό την παρακολούθηση ολόκληρου του γενεαλογικού δέντρου για την πιθανή συγκληρονόμηση. Επίσης, περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται και σε πληθυσμό μελέτης διαφορετικής εθνικότητας καθώς, όπως έχει δείχθει, τα γενετικά δεδομένα μπορεί να επηρεάζονται από την καταγωγή των υπό εξέταση δειγμάτων λόγω διαφορών στη γονιδιακή δεξαμενή.

Το ποσοστό της εμφάνισης μεταλλαγμένου γονότυπου μεταξύ των δειγμάτων ήταν 6,3%. Έπειτα από σύγκριση και με το φαινότυπο προέκυψε ότι το 70% των δειγμάτων με μεταλλαγμένο γονότυπο παρουσίαζε φυσιολογικό φαινότυπο, επομένως, παρά την ύπαρξη φυσιολογικού φαινότυπου, το γενετικό υπόβαθρο για εμφάνιση υπογονιμότητας υπάρχει. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως σε κάποια περίπτωση, για παράδειγμα με την ύπαρξη κατάλληλων περιβαλλοντικών παραγόντων ή ακόμη και με την ύπαρξη άλλων μεταλλάξεων που επηρεάζουν ή και δρουν συνεργιστικά με τους παραπάνω πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν, θα ήταν δυνατό να εμφανιστούν συμπτώματα υπογονιμότητας. Είναι πιθανό σπάνιοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP) καθώς και οι παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs), αν και είναι σπάνιες σε ατομική βάση, να συνεισφέρουν συνολικά στην εξήγηση της υπογονιμότητας ενός μεγάλου αριθμού ανδρών που χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής.

Συμπερασματικά, είναι σημαντικό να διεξαχθούν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας και αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος, που να συμπεριλαμβάνουν την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, εθνικών παραγόντων καθώς και επιγενετικών παραγόντων, που τείνουν να συσσωρεύονται με την ηλικία. Τέλος, για τη διεξαγωγή πιο ασφαλών και ξεκάθαρων αποτελεσμάτων θα ήταν σκόπιμο να διεξαχθούν και μελέτες όπου ο πληθυσμός μελέτης θα περιλαμβάνει άτομα μιας συγκεκριμένης κατηγορίας υπογονιμότητας.

## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπογονιμότητα έχει οριστεί ως η αδυναμία σύλληψης μετά από ένα χρόνο μη προστατευμένης συνουσίας και έχει αναγνωριστεί ως ζήτημα δημόσιας υγείας με παγκόσμιο αντίκτυπο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), καθώς ο παγκόσμιος επιπολασμός της εκτιμάται ότι είναι 9%. Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί το 30–40% όλων των περιπτώσεων υπογονιμότητας, ενώ εκτιμάται ότι ένας στους είκοσι άνδρες παρουσιάζουν κάποιο είδος υπογονιμότητας.

Εκτός από τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες (σύνδρομο Klinefelter, σύνδρομο 47, XXY, δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μικροελλείματα στο χρωμόσωμα Y), οι γονιδιακές μεταλλάξεις αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στα γονίδια AURKC, CATSPER1 και AR, καθώς η εμπλοκή αυτών των γονιδίων με την ανδρική υπογονιμότητα είναι προφανής.

Το γονίδιο AURKC εκφράζεται επιλεκτικά στους ανδρικούς όρχεις και κωδικοποιεί πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο κεντρομερές κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων του κυτταρικού κύκλου και παίζει σημαντικό ρόλο σε γεγονότα της μίτωσης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο AURKC έχουν συσχετιστεί με μακροζωοσπερμία, φαινότυπο που εκδηλώνεται με σπερματοζωάρια 100% τετραπλοειδή με πολλαπλά μαστίγια.

Επίσης, το γονίδιο CATSPER1 και επομένως η πρωτεΐνη που αυτό κωδικοποιεί είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθεί η είσοδος  $Ca^{2+}$  στο μαστίγιο του σπερματοζωαρίου και επομένως να γίνει αποτελεσματικά η κινητικότητα του σπερματοζωαρίου. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο έχουν συσχετιστεί με ασθenoσπερμία.

Τέλος, το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ο οποίος είναι απαραίτητος τόσο για την αρρενοποίηση πριν τη γέννηση όσο και για τη σωστή ανάπτυξη των δευτερογενών αρσενικών χαρακτηριστικών κατά την εφηβεία. Περίπου το 90% των μεταλλάξεων στο γονίδιο AR καταλήγουν σε διαταραχές αρρενοποίησης σε άτομα XY (androgen insensitivity syndrome), ενώ επίσης οι επαναλήψεις πολυγλουταμίνης (CAG) και πολυγλικίνης (GGC) στο εξώνιο 1 έχουν μελετηθεί για πιθανό συσχετισμό με τη λειτουργία του AR και την ανδρική υπογονιμότητα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν το σκανάρισμα των γονιδίων AURKC, CATSPER1 και AR σε δείγματα του ελληνικού πληθυσμού για εντοπισμό πολυμορφισμών που σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα. Παρόλο που υπάρχουν παρόμοιες μελέτες, τα αποτελέσματα επηρεάζονται από τον πληθυσμό μελέτης και τους παράγοντες των διαφορετικών εθνικοτήτων. Για το λόγο αυτό διεξήχθη ενίσχυση των υπο μελέτη γονιδίων με αντίδραση PCR και εύρεση πολυμορφισμών και γονοτύπων που έχουν συσχετιστεί με ανδρική υπογονιμότητα με τη βοήθεια που προγράμματος Plink 1.07. Προέκυψαν δυο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο AR που σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα, με το ποσοστό του μεταλλαγμένου γονότυπου, ανάμεσα στα δείγματα που εξετάστηκαν, να είναι στο 6,3% και με το 70% των δειγμάτων με μεταλλαγμένο γονότυπο να εμφανίζουν

φυσιολογικό φαινότυπο σύμφωνα με την εξέταση σπερμοδιαγράμματος που έχει διεξαχθεί.

Έπειτα από εξέταση και σχολιασμό των αποτελεσμάτων κρίνεται σημαντικό να διεξαχθούν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας και αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος, που να συμπεριλαμβάνουν την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, εθνικών παραγόντων καθώς και επιγενετικών παραγόντων, που τείνουν να συσσωρεύονται με την ηλικία. Τέλος, για τη διεξαγωγή πιο ασφαλών και ξεκάθαρων αποτελεσμάτων θα ήταν σκόπιμο να διεξαχθούν και μελέτες όπου ο πληθυσμός μελέτης θα περιλαμβάνει άτομα μιας συγκεκριμένης κατηγορίας υπογονιμότητας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Avenarius, Matthew R. et al. "Human Male Infertility Caused By Mutations In The CATSPER1 Channel Protein." *The American Journal of Human Genetics* 84.4 (2009): 505-510.
2. Ben Khelifa, M. et al. "Identification Of A New Recurrent Aurora Kinase C Mutation In Both European And African Men With Macrozoospermia." *Human Reproduction* 27.11 (2012): 3337-3346.
3. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, (2007). 22(6), 1506–1512.
4. Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A. K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nature Genetics*, 39(5), 661–665.
5. El Inati, Elias, Jean Muller, and Stéphane Viville. "Autosomal Mutations And Human Spermatogenic Failure." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822.12 (2012): 1873-1879.
6. Eloualid, A., Rouba, H., Rhaissi, H., Barakat, A., Louanjli, N., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2014). Prevalence of the Aurora kinase C c.144delC mutation in infertile Moroccan men. *Fertility and Sterility*, 101(4), 1086–1090
7. Engels, H., Eggermann, T., Caliebe, A., Jelska, A., Schubert, R., Schüler, H. M., ... Midro, A. T. (2008). Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): Frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146A(20), 2611–2616.
8. Fellmeth JE, et al. "Characterization Of Macrozoospermia-Associated AURKC Mutations In A Mammalian Meiotic System. (2016), 25(13):2698-2711
9. Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., & Foresta, C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 734–745.
10. Ferlin, A., Vinanzi, C., Garolla, A., Selice, R., Zuccarello, D., Cazzadore, C., & Foresta, C. (2006). Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clinical Endocrinology*, 65(5), 606–610.
11. Gottlieb, B., Beitel, L. K., Nadarajah, A., Paliouras, M., & Trifiro, M. (2012). The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human Mutation*, 33(5), 887–894
12. Gottlieb, B., Lombroso, R., Beitel, L. K., & Trifiro, M. A. (2005). Molecular pathology of the androgen receptor in male (in)fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(1), 42–48.
13. Hildebrand, M. S., Avenarius, M. R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N. C., Auer, J Smith, R. J. H. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *European Journal of Human Genetics*, 18(11), 1178–1184.
14. <https://andrologyaustralia.org/your-health/male-infertility/>
15. <https://ghr.nlm.nih.gov/>
16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
17. <https://www.who.int/reproductivehealth/>
18. Jungwirth A, et al. "European Association Of Urology Guidelines On Male Infertility: The 2012 Update.
19. Kamel, Remah M. "Management Of The Infertile Couple: An Evidence-Based Protocol." *Reproductive Biology and Endocrinology* 8.1 (2010): 21.
20. Katherine L. O'Flynn O'Brien, Alex C. Varghese, and Ashok Agarwal, *The genetic causes of male factor infertility: A review*, *Fertility and Sterility* Vol. 93 (2010)

21. Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*, 439(7077), 737–740.
22. Krausz, C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, (2011). 25(2), 271–285.
23. Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics*, 29(3), 279–286.
24. Michelle Zorrilla and Alexander N Yatsenko, *The Genetics of Infertility: Current Status of the Field*, (2013)
25. Miyamoto, Toshinobu et al. "Human Male Infertility And Its Genetic Causes." *Reproductive Medicine and Biology* 16.2 (2017): 81-88.
26. O'Hara, L., & Smith, L. B. (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(4), 595–605.
27. Ounis, PierreF et al. "Mutations Of The Aurora Kinase C Gene Causing Macrozoospermia Are The Most Frequent Genetic Cause Of Male Infertility In Algerian Men." *Asian Journal of Andrology* 17.1 (2015): 68
28. Rajpert, Leffers, H., Petersen, J. H., Andersen, A.-G., Carlsen, E., Jørgensen, N., & Skakkebæk, N. E. (2002). CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *The Lancet*, 359(9300), 44–46.
29. Reijo, R. et al. "Severe Oligozoospermia Resulting From Deletions Of Azoospermia Factor Gene On Y Chromosome." *The Lancet* 347.9011 (1996): 1290-1293.
30. Reijo, R., Lee, T.-Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., (1996). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Human Reproduction*, 11(suppl 4), 27–54.
31. Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q. Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603–609.
32. Roux, C., Tripogney, C., Morel, F., Joanne, C., Fellmann, F., Clavequin, M. C., & Bresson, J. L. (2005). Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenetic and Genome Research*, 111(3-4), 291–296.
33. Seshagiri, P. B. Molecular insights into the causes of male infertility. *Journal of Biosciences*, (2001) 26(4), 429–435.
34. Shu, F., Zhou, X., Li, F., Lu, D., Lei, B., Li, Q Mao, X. (2015). Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic asthenospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(11), 1643–1649
35. Stephen McPhee Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, Διαταραχές του Αναπαραγωγικού Συστήματος του Άρρενος, ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ, MD Stephen J. McPhee, Editor 2009, ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΛΙΤΣΑΣ: ΑΘΗΝΑ.
36. Vg, Abilash, and Shalaka Ramgir. "GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS INVOLVED IN HUMAN MALE INFERTILITY: A REVIEW." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8.6 (2015): 34-43.
37. Walsh, T., Pera, R., & Turek, P. *The Genetics of Male Infertility*. *Seminars in Reproductive Medicine*, (2009). 27(02), 124–136.
38. Yang, Kuo-Tai, Chieh-Ju C. Tang, and Tang K. Tang. "Possible Role Of Aurora-C In Meiosis." *Frontiers in Oncology* 5 (2015): n. pag. Web. 13 Jan. 2019.

39. "The Influence Of Varicocele On Parameters Of Fertility In A Large Group Of Men Presenting To Infertility Clinics." *Fertility and Sterility* 57.6 (WHO 1992): 1289-1293.
40. "WHO Laboratory Manual For The Examination And Processing Of Human Semen." World Health Organization Press 2010
41. Yong, E. L. (2003). Androgen receptor gene and male infertility. *Human Reproduction Update*, 9(1), 1–7.
42. Yusuf Kibar, Bedrettin Seckin, Dogan Erduran, The effects of subinguinal varicoelectomy on kruger morphology and semen parameters, *THE JOURNAL OF UROLOGY*, (2002), 1071–1074
43. Zeqiraj, A., Beadini, S., Beadini, N., Aliu, H., Gashi, Z., & Elezaj, S. et al. (2018). Male Infertility and Sperm DNA Fragmentation. *Macedonian Journal Of Medical Sciences*, 6