



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**“ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΧΕΤΙΣΘΕΙ  
ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ”**

**ΝΙΚΟΛΕΤΑ ΙΩΣΗΦΙΔΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2020**

**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**

**ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ - Διδάκτωρ Γενετικής, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π), τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ :**

**“Διερεύνηση πολυμορφισμών γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με ανδρική υπογονιμότητα”**

**THESIS TITLE :**

**“Investigation of genes’ polymorphisms associated with male infertility”**

## **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 Καθηγητή, τον 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 Σταμάτη Κωνσταντίνο 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.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	σελ. 4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ. 6
ABSTRACT.....	σελ. 7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ. 8
Ανδρική υπογονιμότητα.....	σελ. 8
Κατηγορίες ανδρικής υπογονιμότητας.....	σελ. 9
Διάγνωση.....	σελ. 9
Ανάλυση σπέρματος.....	σελ. 10
Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας.....	σελ. 11
Προ-ορχικά αίτια.....	σελ. 11
Ορχικά αίτια.....	σελ. 13
Μετά-ορχικά αίτια.....	σελ. 16
Γονίδιο CFTR.....	σελ. 19
Δομή καναλιού CFTR.....	σελ. 20
Λειτουργίες πρωτεΐνης CFTR.....	σελ. 21
Κατηγορίες μεταλλάξεων του CFTR.....	σελ. 22
Κυστική ίνωση (CF).....	σελ. 23
Διαταραχές που σχετίζονται με το γονίδιο CFTR και την ανδρική υπογονιμότητα.....	σελ. 26
Γονίδιο ADGRG2.....	σελ. 28
Δομή υποδοχέα ADGRG2.....	σελ. 28
Λειτουργίες υποδοχέα ADGRG2.....	σελ. 29
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ. 31
Συλλογή δειγμάτων.....	σελ. 31
Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων.....	σελ. 33
<i>Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....</i>	<i>σελ. 33</i>
<i>Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη.....</i>	<i>σελ. 34</i>
<i>Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA.....</i>	<i>σελ. 35</i>
Γονοτύπηση δειγμάτων DNA.....	σελ. 38
Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK.....	σελ. 39
Δημιουργία αρχείου ανάλυσης και ένωση αρχείων αλληλούχισης.....	σελ. 40
Quality control.....	σελ. 41
Βάσεις δεδομένων.....	σελ. 43
Εξαγωγή SNPs.....	σελ. 45
Εύρεση γονότυπου.....	σελ. 48
Υπολογισμός ποσοστών.....	σελ. 49
Συζήτηση.....	σελ. 62
Βιβλιογραφία.....	σελ. 65

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) ορίζει την υπογονιμότητα ως την ανικανότητα ενός σεξουαλικά ενεργού ζευγαριού να επιτύχει εγκυμοσύνη, έπειτα από ένα έτος μη προστατευμένης συνουσίας. Η υπογονιμότητα επηρεάζει 70 εκατομμύρια ανθρώπους καθώς και το 9% των ζευγαριών παγκοσμίως ενώ στο 50% των άτεκνων ζευγαριών, συναντάται ένας παράγοντας που συνδέεται με τη ανδρική υπογονιμότητα μαζί με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος. Σημαντικός παράγοντα εμφάνισης της υπογονιμότητας στους άνδρες, μεταξύ άλλων, αποτελούν οι γονιδιακές μεταλλάξεις.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στα γονίδια CFTR και ADGRG2 και στην εμπλοκή αυτών με την ανδρική υπογονιμότητα. Ο τελικός σκοπός είναι η εύρεση των συχνοτήτων των μεταλλαγμένων γονοτύπων, στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν, και στην συνέχεια η σύγκριση των μεταλλαγμένων γονοτύπων που ευρέθησαν, με τον φαινότυπο που παρουσιάζουν, αναφορικά με την εξέταση σπερμοδιαγράμματος που είχε διεξαχθεί. Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των παραπάνω δεδομένων με δεδομένα άλλων πληθυσμών.

Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν και γονοτυπήθηκαν με το Infinium Global Screening Array της Illumina, 248 δείγματα του ελληνικού πληθυσμού. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση με χρήση του προγράμματος PLINK και των βάσεων δεδομένων Ensembl και SNP nexus και στην συνέχεια ο υπολογισμός του συνόλου των μεταλλαγμένων συχνοτήτων των πολυμορφισμών που επιλέχθηκαν, στο σύνολο των δειγμάτων. Για το γονίδιο ADGRG2 δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις. Από την ανάλυση του γονιδίου CFTR προέκυψαν οι εξής πολυμορφισμοί : rs756665, rs213950, rs17450482, rs2299445, rs73215927, rs213987, rs11764070, rs17452984, rs4730797 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ποσοτήτων SNPs του γονιδίου CFTR στα controls και Cases και σύγκριση των συνολικών συχνοτήτων μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR στα δείγματα του εργαστήριου (δείγματα ελληνικού πληθυσμού) με τις συχνότητες μετάλλαξης σε άλλους πληθυσμούς.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι, για την διατύπωση ενός ασφαλούς και σαφούς συμπεράσματος, θα πρέπει να διεξαχθούν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας που να συμπεριλαμβάνουν και την επίδραση άλλων παραγόντων όπως είναι οι περιβαλλοντικοί, οι εθνικοί και οι επιγενετικοί παράγοντες, που τείνουν να συσσωρεύονται με την ηλικία, όπως επίσης και μελέτες όπου ο πληθυσμός θα περιλαμβάνει άτομα μιας συγκεκριμένης κατηγορίας υπογονιμότητας.

# ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) defines infertility as the inability of a sexually active couple to achieve pregnancy after a year of unprotected intercourse. Infertility affects 70 million people as well as 9% of couples worldwide while in 50% of unmarried couples, there is a factor associated with male infertility along with abnormal sperm parameters. An important factor in the appearance of infertility in men, among others, are gene mutations.

The present work focused on CFTR and ADGRG2 genes and their involvement in male infertility. The ultimate goal is to find the frequencies of the mutated genotypes in all the examined samples, and then to compare the mutated genotypes found, with the phenotype they present, with regard to the sperm count examination. Finally, the above data were compared with those of other populations.

For this purpose, 248 samples of the Greek population, were collected and genotyped using Illumina's Infinium Global Screening Array. Bioinformatics analysis was performed using the PLINK program and Ensembl and SNP nexus databases and then the total mutant frequencies of selected polymorphisms of all samples were calculated. No mutations were detected for the ADGRG2 gene. Analysis of the CFTR gene resulted in the following polymorphisms: rs756665, rs213950, rs17450482, rs2299445, rs73215927, rs213987, rs11764070, rs11764070, rs17452984, rFT17452984, rs4730797 and then performed two comparisons. The first comparison was between the SNPs amount between controls and cases population and the second one was between the mutation frequencies in CFTR gene in laboratory samples (Greek population samples) and other populations.

Finally, it should be noted that in order to draw a safe and clear conclusion, larger-scale studies should be carried out including the impact of other factors such as environmental, national and epigenetic factors, which tend to accumulate with age, as well as studies where the population will include individuals of a particular category of infertility.

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **Ανδρική υπογονιμότητα**

Ως υπογονιμότητα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ορίζεται η ανικανότητα ενός σεξουαλικά ενεργού ζευγαριού να επιτύχει εγκυμοσύνη, έπειτα από ένα έτος μη προστατευμένης συνουσίας (Jungwirth *et al.*, 2018).

Για κάθε 100 ζευγάρια που προσπαθούν να συλλάβουν φυσιολογικά, 82 θα συλλάβουν μέσα σε ένα χρόνο από την έναρξη της προσπάθειας, 92 θα συλλάβουν εντός 2 ετών και 93 εντός 3 ετών. Εάν η σύλληψη έπειτα από 3 χρόνια παραμένει είναι ανεπιτυχής τότε η πιθανότητα εγκυμοσύνης εντός του επόμενου έτους είναι 25% ή λιγότερο (Leaver RB,2016).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά επίσης πως η υπογονιμότητα επηρεάζει 70 εκατομμύρια ανθρώπους καθώς και το 9% των ζευγαριών παγκοσμίως (Fainberg & Kashanian ,2019). Προβλήματα υπογονιμότητας αντιμετωπίζουν τόσο οι άνδρες όσο και οι γυναίκες καθώς υπάρχουν πολλά αίτια τα οποία δεν αφορούν μόνο το ένα άτομο μέσα στο ζευγάρι. Εκτιμάται ότι το 35% των περιπτώσεων υπογονιμότητας οφείλεται σε θηλυκούς παράγοντες, το 20% οφείλεται και στους 2 συντρόφους, ενώ το 30% οφείλεται σε προβλήματα που αντιμετωπίζει το αρσενικό άτομο, αφήνοντας περίπου ένα 15% των περιπτώσεων στις οποίες η υπογονιμότητα δεν μπορεί να εξηγηθεί. (Faraj *et al.*, 2016)

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής αναφέρεται στην ανεπιτυχή σύλληψη με τον ίδιο η διαφορετικό σύντροφο ενώ η δευτεροπαθής χαρακτηρίζει την κατάσταση στην οποία ενώ έχει υπάρξει σύλληψη στο παρελθόν, υπάρχει αδυναμία να επιτευχθεί ξανά. (Leaver RB,2016). Η υπογονιμότητα επηρεάζει τόσο τους άνδρες όσο και τις γυναίκες. Στο 50% των άτεκνων ζευγαριών, συναντάται ένας παράγοντας που συνδέεται με τη ανδρική υπογονιμότητα μαζί με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος. Ένας γόνιμος σύντροφος μπορεί να αντισταθμίσει την υπογονιμότητα του έτερου συντρόφου και κατά συνέπεια η στειρότητα συνήθως εκδηλώνεται εάν και οι δυο σύντροφοι έχουν μειωμένη γονιμότητα (Jungwirth *et al.*, 2018).



## Κατηγορίες Υπογονιμότητας

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να ταξινομηθεί στις ακόλουθες κατηγορίες :

**1. Αζωοσπερμία :** Αναφέρεται στην απουσία σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση και ταξινομείται σε αποφρακτική αζωοσπερμία όπου έχουμε έλλειψη σπέρματος ως αποτέλεσμα απόφραξης της εκφορητικής οδού του σπέρματος και στη μη αποφρακτική αζωοσπερμία όπου υπάρχει έλλειψη σπέρματος λόγω βλάβης κατά την παραγωγή του στους όρχεις. Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία αποτελεί το 60% όλων των περιπτώσεων αζωοσπερμίας (Colaco & Deepak, 2018).

**2. Ολιγοζωοσπερμία :** Αναφέρεται στο χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων ανά ml και πιο συγκεκριμένα χαρακτηρίζει την ύπαρξη λιγότερων από  $15-20 \times 10^6$  σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση (Colaco & Deepak, 2018).

**3. Σοβαρή ολιγοζωοσπερμία :** Λιγότερα από  $5 \times 10^6$  σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτιση

**4. Νορμοζωοσπερμία :** Φυσιολογικά επίπεδα σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση. Σε αυτή την περίπτωση η υπογονιμότητα είναι ιδιοπαθής (Hadjer et al., 2016).

**5. Ασθενοζωοσπερμία :** Αναφέρεται στα χαμηλά επίπεδα κινητικότητας σε ποσοστό μικρότερο από το 50% των σπερματοζωαρίων (Colaco & Deepak, 2018).

**6. Τερατοσπερμία:** Αναφέρεται στην κατάσταση όπου λιγότερο από το 30% των σπερματοζωαρίων έχουν φυσιολογική μορφολογία (Colaco & Deepak, 2018).

**7. Ασπερμία :** Αδυναμία εκσπερμάτισης (Colaco & Deepak, 2018).

**8. Λευκοσπερμία :**  $> 1 \times 10^6$  λευκοκύτταρα (Krausz et al., 2011).

## Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Η αρχική διαγνωστική εξέταση του αρσενικού συντρόφου πραγματοποιείται λόγω απουσίας εγκυμοσύνης έπειτα από το πέρας ενός έτους μη προστατευμένης συνουσίας (Jarow et al., 2011) και αυτή η εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη λήψη ιατρικού ιστορικού, την κλινική εξέταση, ένα υπερηχογράφημα του οσχέου καθώς και τουλάχιστον δυο αναλύσεις σπέρματος (Jungwirth et al., 2016). Περαιτέρω αξιολόγηση πραγματοποιείται όταν η αρχική αξιολόγηση επιδεικνύει ένα μη φυσιολογικό ιστορικό ανδρικής αναπαραγωγής ή μια ανώμαλη ανάλυση σπέρματος, καθώς και σε ζευγάρια με ανεξήγητη στειρότητα όπως και σε ζευγάρια στα οποία υπάρχει κάποιος θηλυκός παράγοντας υπό θεραπεία και επίμονη στειρότητα (Jarow et al., 2011).

## Ανάλυση σπέρματος

Η πρότυπη ανάλυση σπέρματος αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας και αναπαραγωγικής αδυναμίας (Jarow et al.,2011). Η ανάλυση σπέρματος είναι μια ομάδα δοκιμών που εξετάζει παραμέτρους που σχετίζονται με την εύρυθμη λειτουργία πολλών ανδρικών αναπαραγωγικών οργάνων και αδένων. Αποτελεί το αρχικό βήμα κατά την αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας αλλά δεν αποτελεί τεστ γονιμότητας καθώς δεν παρέχει πληροφορίες για το γονιμοποιητικό δυναμικό ενός σπερματοζωαρίου. Αντιθέτως τα όρια και οι τιμές που περιλαμβάνει αντανακλούν τις πιθανότητες υπογονιμότητας βάσει των αποτελεσμάτων ενός γονίμου πληθυσμού. Οι ασυνήθιστες τιμές σπέρματος υποδηλώνουν πιθανή ανδρική υπογονιμότητα που απαιτεί περαιτέρω κλινική ή/και εργαστηριακή αξιολόγηση του ασθενούς. Οι τιμές αναφοράς των παραμέτρων σπέρματος δεν είναι οι ακριβείς τιμές για την διάγνωση υπογονιμότητας καθώς άτομα με τιμές εκτός αυτών των ορίων μπορούν να είναι γόνιμα (Sikka & Hellstrom, 2016).

Η αρχική ανάλυση σπέρματος περιλαμβάνει εξέταση των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών παραμέτρων. Άρα μακροσκοπικά εξετάζεται το χρώμα, η θολερότητα, ο όγκος, το pH, η σύσταση, η οσμή κ.α. ενώ μικροσκοπικά εξετάζεται η συγκέντρωση σπέρματος , ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων, η μορφολογία και η ζωτικότητα τους, η παρουσία βακτηριακών και ιικών μολύνσεων , η παρουσία λευκοκυττάρων στο σπέρμα, η ρευστοποίηση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (WHO,2010).

Εκτός από την συμβατική εξέταση ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συμπεριλαμβάνει στο εγχειρίδιο του και μια σειρά άλλων προαιρετικών και ερευνητικών ελέγχων όπως ο έλεγχος των βιοχημικών δεικτών και το τεστ ανίχνευσης αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) αντίστοιχα (WHO,2010).

Παράμετρος	Τιμές αναφοράς κατά Π.Ο.Υ. (με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%)
Όγκος σπέρματος (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων ( $10^6/ml$ )	15 (12-16)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ( $10^6/εκσπερμάτιση$ )	39 (33-46)
Προοδευτική κινητικότητα σπερματοζωαρίων(%)	32 (31-34)
Ολική κινητικότητα σπερματοζωαρίων (προοδευτική και επιτόπια, %)	40 (38-42)
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3.0-4.0)
Ζωτικότητα σπερματοζωαρίων (ζώντα, %)	58 (55-63)

Πίνακας 1 : Παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες τιμές αναφοράς ανάλυσης σπέρματος κατά Π.Ο.Υ. (WHO, 2010)

## Αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας μπορούν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες : τα προ-ορχικά, τα ορχικά και τα μετά-ορχικά αίτια (Dimitriadis et al., 2017).

### *Προ-ορχικά αίτια*

**Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός** που ορίζεται από την ανεπαρκή έκκριση των γοναδοτροπινών (FSH και LH). Η λειτουργία των όρχεων περιλαμβάνει την έκκριση τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig των όρχεων και την σπερματογένεση και αυτή η λειτουργία ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG). Η έκκριση τεστοστερόνης μειώνεται απουσία των LH και FSH με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σπερματογένεση. Η ορμόνη GnRH απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο και διεγείρει την απελευθέρωση της FSH και της LH από την πρόσθια υπόφυση. Άρα λοιπόν, η χορήγηση της GnRH είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για την αποκατάσταση της έλλειψης της, σε στείρους άντρες με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό (HH) λόγω έλλειψης έκκρισης από τον υποθάλαμο (Dimitriadis et al., 2017, Dabaja & Schlegel, 2013).

**Συγγενής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός (CHH)** ο οποίος είναι μια πολύ σπάνια γενετική διαταραχή που προκύπτει από την ανεπαρκή έκκριση ή δράση της GnRH και έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία εφηβείας και την παρουσία στειρότητας (Krausz , 2011). Η κλινική εικόνα εξαρτάται από το βαθμό ανεπάρκειας GnRH. Οι πιο σοβαρές μορφές παρουσιάζουν κρυπτορχιδισμό και μικροπενία κατά τη γέννηση και πλήρη απουσία εφηβικής εξέλιξης αργότερα. Σε λιγότερο σοβαρές μορφές υπάρχει κάποιος βαθμός ανάπτυξης των όρχεων (Dimitriadis et al.,2017).

**Σύνδρομο Kallmann** που προκαλείται από μεμονωμένη ανεπάρκεια έκκρισης της υποθαλαμικής ορμόνης GnRH και μεταλλάξεις των γονιδίων KAL-1 (Dimitriadis et al.,2017) και χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη εμφάνιση της ήβης, ευνουχοειδή εμφάνιση με γυναικομαστία, μαλακούς όρχεις και αζωοσπερμία (Μελέκος , 2005)

**Μεμονωμένη ανεπάρκεια LH ή FSH** ή αλλιώς σύνδρομο γόνιμου ευνούχου και είναι μια σπάνια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από φυσιολογική έκκριση FSH που διεγείρει τη σπερματογένεση αλλά η ανεπάρκεια τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig των όρχεων οδηγεί τελικά σε διαταραχή της αρρενοποίησης (Ma et al., 2004). Η μεμονωμένη ανεπάρκεια FSH είναι εξαιρετικά σπάνια και χαρακτηρίζεται από φυσιολογική αρρενοποίηση δεδομένου ενός φυσιολογικού άξονα LH / τεστοστερόνης (Dimitriadis et al.,2017).

**Κρανοφαρυγγίωμα** που είναι ένας καλοήθης όγκος που οδηγεί στην καταστολή έκκρισης των υποφυσιακών ορμονών και τη συμπίεση του οπτικού χιάσματος. Οι ασθενείς μεταξύ άλλων αντιμετωπίζουν εξασθενημένη σπερματογένεση και ανικανότητα (Dimitriadis et al., 2017).

**Όγκοι της υπόφυσης.** Οι όγκοι που παράγουν προλακτίνη είναι οι συνηθέστεροι όγκοι της υπόφυσης. Η έκκριση της γοναδοτροπίνης διαταράσσεται από τη συμπίεση της υπόφυσης και οι ασθενείς εμφανίζουν συχνά ανικανότητα. Οι όγκοι που παράγουν FSH προκαλούν βαθμιαία όραση, ολιγοσπερμία και ανικανότητα. (Sokol , 2009).

Τέλος στα προ-ορχικά αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας συγκαταλέγονται διάφοροι κρανιακοί και εγκεφαλικοί τραυματισμοί καθώς και διάφορες σοβαρές και χρόνιες ασθένειες όπως σοβαρά

εγκαύματα, έμφραγμα του μυοκαρδίου, σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο και σακχαρώδης διαβήτης.

Διάφοροι ψυχολογικοί και συναισθηματικοί λόγοι μπορεί να προκαλέσουν επίσης σεξουαλική δυσλειτουργία με διαταραχές στύσης και εκσπερμάτισης που όμως είναι σπανιότερα αίτια ανδρικής υπογονιμότητας (Dimitriadis et al., 2017).

### ***Ορχικά αίτια***

**Κιρσοκήλη**, η οποία είναι η παθολογική κιρσοειδής ανεύρυνση του οσχείκου τμήματος των φλεβών του σπερματικού τόνου και οφείλεται σε παλινδρόμηση του αίματος στην έσω σπερματική φλέβα (Μελέκος, 2005). Θεωρείται ότι προκαλείται εξαιτίας της αύξησης της θερμοκρασίας στους όρχεις, της ανώμαλης ροής των νεφρικών και επινεφριδιακών μεταβολιτών στον αριστερό όρχι, των αλλαγών λειτουργίας του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων, των μεταβολικών δυσλειτουργιών στους όρχεις (Dimitriadis et al., 2017) και της δράσης ενεργών μορφών οξυγόνου στο σπερματικό επιθήλιο. Η κιρσοκήλη σχετίζεται με την ατροφία των όρχεων και προκαλεί μείωση του αριθμού, της κινητικότητας και του ποσοστού φυσιολογικών μορφών των σπερματοζωαρίων (Ιωαννίδης & Χατζημουρατίδης, 2010).

**Κρυπτορχιδισμός**, ο οποίος ορίζεται ως η απουσία ενός ή και των δύο όρχεων από το όσχεο και θεωρείται ότι αποτελεί μέρος του συνδρόμου ορχικής δυσγενεσίας (Fawzy et al., 2015) με συχνότητα εμφάνισης σχεδόν 1% στο τέλος της βρεφικής ηλικίας. Αν και η φυσιολογική κάθοδος των όρχεων αποτελεί μια πολύπλοκη βαθμιδωτή διαδικασία που εμπλέκει ανατομικούς, γονιδιακούς, ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, η ακριβής αιτιολογία του κρυπτορχιδισμού παραμένει άγνωστη (Dimitriadis et al., 2017).

**Σύνδρομο Noonan**, του οποίου ο καρυότυπος είναι είτε φυσιολογικού άρρενος (46,XY) είτε μωσαϊκός (X/XY) (Ιωαννίδης & Χατζημουρατίδης, 2010) και ο ασθενής φέρει χαρακτηριστικά όπως βραχύ λαιμό, χαμηλό ανάστημα, καρδιακές ανωμαλίες, κρυσορχία, αζωοσπερμία, και υπεργοναδοτροπικό υπογοναδισμό, στον οποίο υπάρχει αύξηση των γοναδοτροπινών και μείωση της τεστοστερόνης (Μελέκος, 2005).

**Σύνδρομο των εξαφανισμένων όρχεων** που αποδίδεται σε μια επακόλουθη εξαφάνιση / ατροφία στην μήτρα ενός αρχικά φυσιολογικού όρχεως (Dimitriadis et al., 2017).

**Μυοτονική δυστροφία.** Έχει δύο κύριους τύπους: τύπου 1 (DM1) ή ασθένεια Steinert και τύπου 2 (DM2) ή εγγύς μυοτονική μυοπάθεια. Οι αναπαραγωγικές ανωμαλίες είναι καλά αναγνωρισμένες και στους δύο τύπους με σημαντικότερο εύρημα την προοδευτική ατροφία των όρχεων. Επίσης παρατηρούνται ιστολογικές ανωμαλίες όπως ατροφία και υαλίνωση, ολιγοσπερμία και αζωοσπερμία στο 73% των ασθενών με DM1. Η πιο σημαντική φυσική εκδήλωση γοναδικής δυσγενεσίας είναι οι μικροί όρχεις (Dimitriadis et al., 2017).

**Χρωμοσωμικές** στις οποίες συγκαταλέγονται οι παρακάτω :

-Σύνδρομο αναστροφής του φύλου (46, XX) στο οποίο οι ασθενείς έχουν καρυότυπο 46,XX και αρσενικά εξωτερικά γεννητικά όργανα που κυμαίνονται από φυσιολογικά έως διαφορούμενα, δύο όρχεις, αζωοσπερμία και την απουσία δομών του πόρου του Müller. Περίπου το 85% των ατόμων, εμφανίζονται μετά την εφηβεία με κανονικές ηβικές τρίχες και κανονικό μέγεθος πέους, αλλά μικρούς όρχεις, γυναικομαστία και στειρότητα που προκύπτουν από την αζωοσπερμία (Dimitriadis et al., 2017). Πιθανόν γίνεται μετατόπιση του γονιδίου SRY που είναι υπεύθυνο για την δημιουργία των όρχεων, από το χρωμόσωμα Y στο χρωμόσωμα X (Ιωαννίδης & Χατζημουρατίδης, 2010).

-Σύνδρομο 47,XXY όπου ο καρυότυπος των ασθενών έχει ένα επιπλέον αντίγραφο του χρωμοσώματος Y. Επηρεάζεται έτσι τόσο ο αριθμός όσο και η ωρίμανση του σπέρματος με αποτέλεσμα πιθανώς μειωμένη γονιμότητα (Dimitriadis et al., 2017).

-Σύνδρομο Klinefelter (47, XXY) το οποίο είναι η πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία που ανιχνεύεται στα νεογέννητα αρσενικά (0,1-0,2%). Ο επιπολασμός του συνδρόμου μεταξύ των υπογόνιμων ανδρών είναι πολύ υψηλός (έως 5% σε σοβαρή ολιγοζωοσπερμία και 10% σε αζωοσπερμία). Οφείλεται σε αποτυχία διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων X στην πρώτη η δεύτερη μειωτική διαίρεση. Επιπλέον αντίγραφα γονιδίων στο χρωμόσωμα X σε αυτούς τους ασθενείς, παρεμβαίνουν στην αρσενική σεξουαλική ανάπτυξη και εμποδίζουν τους όρχεις να λειτουργούν κανονικά και συνεπώς μειώνονται τα επίπεδα της τεστοστερόνης με συνέπεια την εξασθενημένη σπερματογένεση. Αν και οι περισσότεροι ασθενείς είναι στείροι, υπάρχουν άλλοι, συνήθως σε περιπτώσεις μωσαϊκών (46, XY / 47,XXY), οι οποίοι έχουν συλλάβει κανονικά χωρίς τη βοήθεια ιατρικής τεχνολογίας (Tahmasbpour et. al, 2014)

-Μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y. Αντιπροσωπεύουν την δεύτερη πιο συνηθισμένη γενετική αιτία υπογονιμότητας μετά από το σύνδρομο Klinefelter. Το χρωμόσωμα Y περιέχει γονίδια που

είναι κρίσιμα για την ανάπτυξη των αρσενικών γονάδων και της σπερματογένεσης. Η απώλεια γονιδίων από τις περιοχές AZFa, AZFb, AZFc, AZFd που εκτείνονται πάνω στο χρωμόσωμα Y και ρυθμίζουν την ανάπτυξη των σπερματοκυττάρων έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοζωοσπερμία (Tahmasbrou et. al, 2014).

**Συστηματικές ασθένειες** όπως χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική ανεπάρκεια, αλκοολισμός, συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων, πυρετός, ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, ορχίτιδα, παχυσαρκία, ογκολογικές παθήσεις αιματολογικές ασθένειες (δρεπανοκυτταρική αναιμία και β-θαλασσαιμία), χρόνιες γαστρεντερικές παθήσεις (Dimitriadis et al., 2017).

**Γοναδοτοξικοί παράγοντες** που αναφέρονται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η ακτινοβολία, τα φάρμακα, το κάπνισμα, τα φυτοφάρμακα και διάφορες γοναδοτοξικές ενώσεις (όπως ο υδράργυρος) επιδρούν αρνητικά στην ανδρική αναπαραγωγική ικανότητα, επηρεάζοντας τη σπερματογένεση (Dimitriadis et al., 2017).

**Απλασία του σπερματικού επιθηλίου (Sertoli-cell-only-syndrome).** Το χαρακτηριστικό ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου είναι η απουσία γεννητικών κυττάρων. Πολλοί από αυτούς τους ασθενείς έχουν φυσιολογικό καρυότυπο και φυσιολογικά δευτερεύοντα αρσενικά σεξουαλικά χαρακτηριστικά, αλλά είναι στείροι και αζωοσπερμικοί ή σοβαρά ολιγοζωοσπερμικοί (Hanmayyagari et al., 2015).

Συνηθισμένοι λόγοι πλήρους απώλειας των γεννητικών κυττάρων είναι οι αντινεοπλασματικές θεραπείες, η παρωτίτιδα, η ορχίτιδα και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Dimitriadis et al., 2017).

**Τραυματισμός των όρχεων** που περιλαμβάνει ορχική στρέψη και τραύμα. Η στρέψη των όρχεων αποτελεί επείγουσα ιατρική κατάσταση απαιτεί άμεση χειρουργική προσέγγιση, αλλά η υπογονιμότητα παραμένει ένα από τα κύρια δυνητικά επακόλουθα (Dimitriadis et al., 2017). Το τραύμα στον όρχι μπορεί να προκαλέσει μη φυσιολογική ανοσολογική απόκριση που μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα. Τα μικρά τραύματα είναι συνηθισμένα αλλά συνήθως χωρίς καμία επίπτωση στη γονιμότητα. Η επίδραση του τραυματισμού των όρχεων στα χαρακτηριστικά του σπέρματος είναι μεταβλητή και εξαρτάται από την έκταση και τον τύπο του τραύματος των όρχεων (Dimitriadis et al., 2017)

**Ιδιοπαθής υπογονιμότητα.** Χαρακτηρίζεται από ολιγοσπερμία ή/και ασθενοσπερμία ή/και τερατοσπερμία χωρίς παρατηρήσιμη αιτία και ισχύει περίπου για το 30% των τείρων ανδρών (Dimitriadis et al., 2017). Η «αρσενική ιδιοπαθής στειρότητα» δεν συνεπάγεται απόλυτη στειρότητα, εκτός αν βρεθεί αζωοσπερμία. Ασθενείς με ιδιοπαθή στειρότητα μπορεί να έχουν παιδιά, αλλά η πιθανότητα πατρότητας μειώνεται και ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της εγκυμοσύνης επεκτείνεται. Ο όρος «ιδιοπαθής στειρότητα» προσδιορίζει τη διάγνωση με αποκλεισμό. Μόνο αφού εξαλειφθούν όλες οι πιθανές αιτίες υπογονιμότητας, μπορεί να καθοριστεί η διάγνωση της ιδιοπαθούς στειρότητας (Nieschlag, 2011). Αυτοί οι άνδρες παρουσιάζουν χωρίς προηγούμενο ιστορικό ασθενειών που επηρεάζουν τη γονιμότητα και έχουν φυσιολογικά ευρήματα στη φυσική εξέταση και ενδοκρινικές, γενετικές και βιοχημικές εργαστηριακές δοκιμές (Jungwirth et al., 2018).

## ***Μέτα-ορχικά αίτια***

### **Διαταραχές της λειτουργίας και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων**

-Πρωτοπαθής δυσκινησία των κροσσών που περιγράφει ανωμαλίες στη δομή ή τη λειτουργία των κροσσών και των μαστιγίων που προκαλούν συγγενή διαταραχή στη βλεννοκροσωτή κάθαρση, την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και τη θέση των οργάνων του σώματος. Η πλήρης αναστροφή των σπλάχνων, οι βρογχεκτασίες και είτε οι ρινικοί πολύποδες ή η υποτροπιάζουσα παραρρινοκολπίτιδα είναι γνωστή ως σύνδρομο Kartagener. Περίπου οι μισοί ασθενείς είναι στείροι εξαιτίας της μειωμένης κινητικότητας των ζωντανών σπερματοζωαρίων παρά τον τυπικά φυσιολογικό αριθμό τους (Παππάς et al., 2011).

-Ελαττώματα κατά την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. Η διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων απαιτεί την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες που συντίθενται και εκκρίνονται από την επιδιδυμίδα. Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών του σπέρματος, κατά τη διάρκεια διέλευσης τους από την επιδιδυμίδα, όπως η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη ώριμων σπερματοζωαρίων και την ικανότητα γονιμοποίησης. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), των οποίων η υπερπαραγωγή οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων της μεμβράνης του σπέρματος, των πρωτεϊνών του σπέρματος και του DNA που έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη



κινητικότητα, κατεστραμμένες ακροσωμικές μεμβράνες, και έτσι ανικανότητα του σπερματοζωαρίου να γονιμοποιήσει το ωκύτταρο. Το αδύναμο σπέρμα και η μειωμένη κινητικότητα έχουν συσχετιστεί επίσης και με μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (Dimitriadis et al., 2017).

-Υπογονιμότητα ανοσολογικής αιτιολογίας η οποία αναφέρεται σε αυθόρμητα εμφανιζόμενα αντισώματα που δεσμεύονται σε αντιγόνα των σπερματοζωαρίων. Αποτελεί μία αυτοάνοση διαταραχή και παρατηρείται σε άνδρες με τραυματισμό όρχεων (δηλαδή, στρέψη όρχεων, χειρουργική επέμβαση ή τραύμα). Άλλοι συνηθισμένοι λόγοι περιλαμβάνουν λοιμώξεις και απόφραξη κατά τη μεταφορά σπέρματος όπως σε άνδρες με κυστική ίνωση ή αγενεσία του σπερματικού πόρου. Τα αντισώματα ενδέχεται να επηρεάσουν την κινητικότητα και τη βιωσιμότητα του σπέρματος, την αλληλεπίδραση σπέρματος-ωοκυττάρου, τα πρώιμα εβρυικά αναπτυξιακά στάδια, την ικανότητα εμφύτευσης του εμβρύου, την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ακροσωμική αντίδραση (Dimitriadis et al., 2017).

-Λοιμώξεις. Τα παθογόνα βακτήρια στο πλάσμα του σπέρματος μπορούν να μειώσουν την κινητικότητα του σπέρματος, να προκαλέσουν απόπτωση ή νέκρωση, να μεταβάλλουν τη μορφολογία του σπέρματος και επομένως να επηρεάσουν άμεσα την ποιότητα του σπέρματος (π.χ. Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma spp., Ureaplasma spp. και Treponema pallidum). Άλλες λοιμώξεις μπορεί να είναι εξαιτίας πρωτόζωων (π.χ. Trichomonas vaginalis) ή ιών (π.χ. ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων, ο ιός του απλού έρπητα, η ηπατίτιδα Β και C και ο ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊός. Οι αντικές και αντιρετροϊκές θεραπείες μπορούν επίσης να προκαλέσουν βλάβη στους όρχεις με επιβλαβείς επιδράσεις στην ποιότητα του σπέρματος (Dimitriadis et al., 2017)

### **Διαταραχές της σεξουαλικής επαφής**

Μπορούν να προκληθούν από ανατομικές ανωμαλίες (κρυπτοφαλία, φίμωση, υποσπαδία, μικροφαλία, συγγενής κάμψη του πέους) ή στυτική δυσλειτουργία και παρεμποδίζουν την φυσιολογική εισχώρηση των σπερματοζωαρίων στον τράχηλο της μήτρας (Ιωαννίδης & Χατζημουρατίδης, 2010). Οι διαταραχές κατά την εκσπερμάτιση μπορεί να είναι το αποτέλεσμα λειτουργικών παρεμποδίσεων όπως η λειτουργική απόφραξη των σπερματοδόχων κύστεων, η κάκωση του νωτιαίου μυελού, ο τραυματισμός συμπαθητικών νεύρων ή η λήψη φαρμακευτικής αγωγής (Dimitriadis et al., 2017)

## **Απόφραξη στο αναπαραγωγικό σύστημα**

-Σύνδρομο Young, το οποίο παρουσιάζεται με αποφρακτική αζωοσπερμία, χρόνια παραρρινοκολπίτιδα και βρογχεκτασίες. Μπορεί να προκαλέσει αμφοτερόπλευρη επιδιδυμική απόφραξη που οδηγεί σε αζωοσπερμία (Dimitriadis et al., 2017). Τα άτομα που γεννιούνται με αυτή τη διαταραχή λειτουργούν κανονικά στους πνεύμονες αλλά τείνουν να παράγουν παχύρρευστη βλέννα, η οποία επίσης παγιδεύει σπέρμα στην επιδιδυμίδα επηρεάζοντας την μετακίνησή τους. Η αζωοσπερμία οφείλεται στη λειτουργική απόφραξη της μεταφοράς σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα (Sohaib & Jan, 2019).

-Πολυκυστική νόσος των νεφρών. Η απόφραξη οφείλεται σε πολλαπλές μικρές κύστες, οι οποίες αποφράζουν την επιδιδυμίδα (Ιωαννίδης & Χατζημουρατίδης, 2010).

-Ιδιοπαθής απόφραξη της επιδιδυμίδας που αποτελεί την πιο συχνή αιτία αποφρακτικής αζωοσπερμίας και επηρεάζει το 30-67% των ανδρών με αζωοσπερμία. Εντοπίζεται σε άνδρες χωρίς άλλα εμφανή προβλήματα υγείας ενώ πρόσφατα στοιχεία τη συνέδεσαν με την κυστική ίνωση. Οι αιτίες της μπορεί να σχετίζονται με λοιμώξεις, με ιατρικά τραύματα, με την βασηκτομή ή να είναι ιδιοπαθείς (Dimitriadis et al., 2017).

-Απόφραξη εκσπερματικών πόρων. Μπορεί να οφείλεται σε εξωτερική συμπίεση από νεοπλάσματα ή κύστες, μολυσματικές διαταραχές ή τραύματα. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ανδρών είναι αζωοσπερμία, μικρός όγκος σπέρματος, διαστολή σπερματοδόχων κύστεων, κανονικός όγκος των όρχεων και κανονικό ορμονικό προφίλ (Dimitriadis et al., 2017).

-Επίκτητη απόφραξη της εκφορητικής οδού. Οφείλεται κατά βάση σε φλεγμονές και σε ίνωση της επιδιδυμίδας από βακτηρίδια όπως είναι το E. Coli, ο γονόκοκκος και τα χλαμύδια ή σε τυχαία κάκωση του σπερματικού πόρου μετά την χειρουργική διόρθωση βουβωνοκήλης (Ιωαννίδης & Χατζημουρατίδης, 2010).

-Συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (CBAVD). Η συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (CBAVD) αντιπροσωπεύει το 1 με 2% του πληθυσμού των υπογόνιμων, αλλά κατά τα άλλα υγιών, ατόμων και το 25% αυτών με αποφρακτική αζωοσπερμία (Yu et al., 2011).

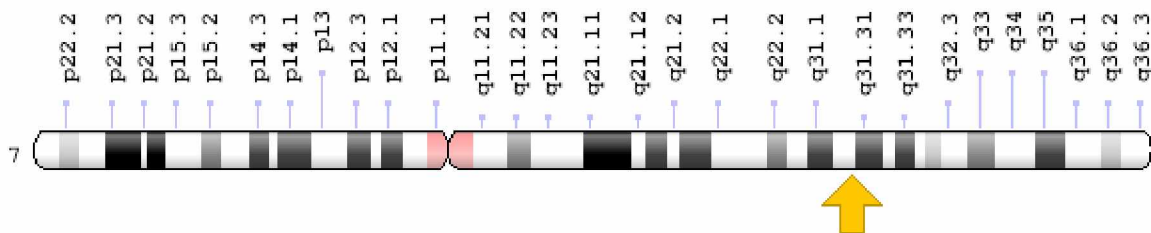
Τα κριτήρια για τη διάγνωση του CBAVD είναι η παρουσία κανονικών-προς μικρό μέγεθος-όρχεων, φυσιολογικά επίπεδα της FSH στο πλάσμα, μειωμένος όγκος σπέρματος και μη

ανιχνεύσιμοι/ανεπαίσθητοι σπερματικοί πόροι. Τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζει το σπέρμα είναι αζωοσπερμία, όξινο pH, ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις ή χαμηλή συγκέντρωση φρουκτόζης, α-γλυκοσιδάση μικρότερη ή ίση με 5 mIU ανά εκσπερμάτιση και καρνιτίνη μικρότερη ή ίση με 40 ηΜ ανά εκσπερμάτιση (de Souza et al., 2017).

Μπορεί να συμβεί είτε ως μεμονωμένη αναπαραγωγική διαταραχή ή άτυπο σύμπτωμα κυστικής ίνωσης (CF). Δεδομένου ότι σχεδόν όλα τα αρσενικά (>95%) με κυστική ίνωση εμφανίζουν επίσης CBAVD και είναι υπογόνιμα λόγω αποφρακτικής αζωοσπερμίας, η CBAVD θεωρείται ότι έχει κοινή γενετική βάση με την κυστική ίνωση, γεγονός που επιβεβαιώνεται καθώς ένα σημαντικό ποσοστό των ανδρών με CBAVD, φέρει την μετάλλαξη ΔF508 στο γονίδιο του ρυθμιστή της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας στην κυστική ίνωση (CFTR), μία από τις συχνότερες μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την κυστική ίνωση. (Yu et al., 2011).

## Γονίδιο CFTR

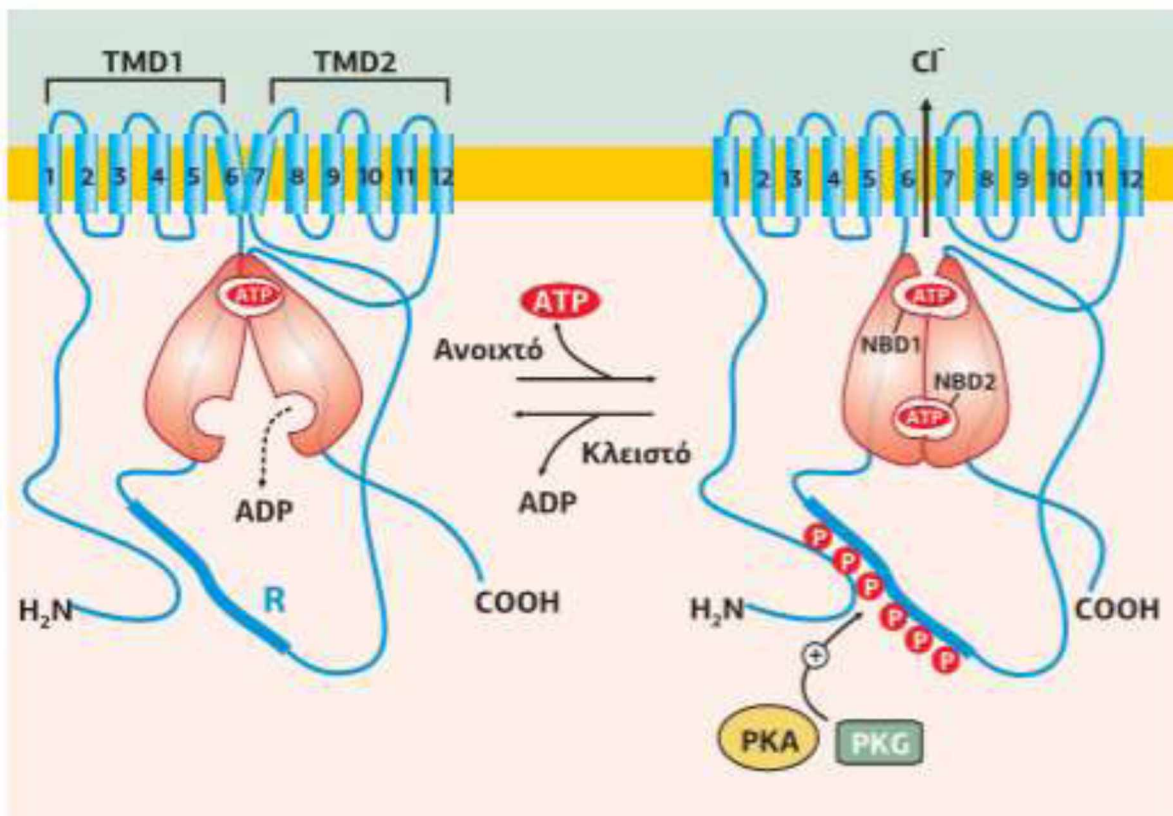
Το γονίδιο CFTR ή αλλιώς το γονίδιο του ρυθμιστή διαμεμβρανικής αγωγιμότητας στην κυστική ίνωση τοποθετείται στη θέση 7q31.2, δηλαδή στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7, στη θέση 31.2. Περιέχει 27 εξόνια και 188.704 bp DNA και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη CFTR, η οποία ανήκει στην οικογένεια των ABC πρωτεϊνών που μεταφέρουν κυρίως οργανικά μόρια και όχι ιόντα. (Jiang et al., 2017, Ζίφα Α., 2016).



Εικόνα 1 : Η θέση του γονιδίου CFTR στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7, στη θέση 31.2 (Genome Decoration Page/NCBI)

## Δομή καναλιού CFTR

Το κανάλι Cl<sup>-</sup> CFTR είναι μια μονομερής πρωτεΐνη που σχηματίζεται από δύο επαναλαμβανόμενα τμήματα 6 διαμεμβρανικών περιοχών (TMD1, TMD2) τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ένα μεγάλο ενδοκυτταρικό βρόχο. Χαρακτηριστικές περιοχές του καναλιού είναι η ρυθμιστική περιοχή (R), η οποία περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης, και οι δύο περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων (NBD1, NBD2). Στην NBD1 το ATP είναι μόνιμα συνδεδεμένο, ενώ η σύνδεση του ATP στη NBD2 αλλάζει τη διαμόρφωση του καναλιού και ανοίγει τον πόρο. Η υδρόλυση του ATP από την NBD2 οδηγεί στο κλείσιμο του καναλιού. Το NH<sub>2</sub><sup>-</sup> και το COO<sup>-</sup> τελικό άκρο βρίσκονται ενδοκυτταρικά και η COOH-τελική περιοχή είναι συνδεδεμένη μέσω PDZ περιοχών με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. (Ζίφα Α.,2016).



Εικόνα 2 : Δομή καναλιού CFTR και ανοιχτή-κλειστή διαμόρφωση (Ζίφα Α.,2016).

## Λειτουργίες της πρωτεΐνης CFTR

Το κανάλι CFTR βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα πολλών οργάνων, όπως οι πνεύμονες, το συκώτι, το πάγκρεας, η πεπτική οδός, η επιδερμίδα, οι σιελογόνοι αδένες και η αναπαραγωγική οδός. Τα κανάλια αυτά, συνήθως, βγάζουν  $\text{Cl}^-$  έξω από τα επιθηλιακά κύτταρα, προς την πλευρά που καλύπτεται με βλέννα. Κατιόντα  $\text{Na}^+$  ακολουθούν τα  $\text{Cl}^-$  ώστε να διατηρηθεί η ηλεκτρική ισορροπία. Αυτό αυξάνει την συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών στην περιοχή της βλέννας, με αποτέλεσμα την έξοδο  $\text{H}_2\text{O}$  μέσω όσμωσης (Guo et al., 2009, Ζίφα Α., 2016).

Η CFTR πρωτεΐνη δρα σαν διάυλος ανιόντων και διαφοροποιείται λειτουργικά από τις υπόλοιπες ABC πρωτεΐνες καθώς επιτρέπει την αμφίδρομη μετακίνηση ανιόντων, αντί για την μονόπλευρη μεταφορά διαλυμένων ουσιών. Τα ανιόντα μετακινούνται σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους βαθμίδωση και άρα η CFTR συμβάλει στην έκκριση ιόντων  $\text{Cl}^-$  και  $\text{HCO}_3^-$  στο εντερικό, αναπνευστικό και παγκρεατικό επιθήλιο. Αντίθετα, στους ιδρωτοποιούς αδένες, συμβάλει στην επαναρρόφηση ιόντων  $\text{Cl}^-$  ενώ τα ιόντα  $\text{Na}^+$  ακολουθούν τα ιόντα  $\text{Cl}^-$  παθητικά, έτσι ώστε να διατηρηθεί η ηλεκτρική ισορροπία. Εκτός από τα παραπάνω, μέσω του συγκεκριμένου καναλιού μεταφέρονται και άλλα ανιόντα, όπως  $\text{I}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$  (Vankeerberghen et al., 2002).

Η CFTR πρωτεΐνη ρυθμίζει την λειτουργία άλλων διαμεμβρανικών διαύλων ιόντων. Έχει ήδη αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη λειτουργία του επιθηλιακού διαύλου ιόντων  $\text{Na}^+$ , ENaC, και έτσι μειώνεται η επαναρρόφηση  $\text{Na}^+$  στο επιθήλιο των αεραγωγών. Άρα λοιπόν η αναποτελεσματική λειτουργία της CFTR πρωτεΐνης οδηγεί στην υπερλειτουργία του διαύλου ENaC και συμβάλλει στην αφυδάτωση του αναπνευστικού επιθηλίου. Επίσης αλληλεπιδρά και με άλλους διαύλους, όπως οι διάυλοι  $\text{K}^+$  (π.χ. ROMK), οι ευαίσθητοι στο  $\text{Ca}^{2+}$  διάυλοι  $\text{Cl}^-$  (π.χ. CaCC), καθώς και άλλοι διάυλοι  $\text{Cl}^-$  (π.χ. ORCC). Ορισμένες αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω του τομέα PDZ, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε, εντοπίζεται στην  $\text{COOH}^-$  τελική περιοχή (π.χ. η ενεργοποίηση της οικογένειας των  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  ιοντοανταλλακτικών πρωτεϊνών SLC26 εξαρτάται από την πρόσδεση του STAS τομέα τους στον PDZ τομέα της CFTR πρωτεΐνης). Άρα λοιπόν η έκκριση  $\text{HCO}_3^-$  ρυθμίζεται και με άμεσο τρόπο μέσω του καναλιού CFTR αλλά και έμμεσα, μέσω της αλληλεπίδρασης του με άλλες πρωτεΐνες (Vankeerberghen et al., 2002).

Επίσης η CFTR πρωτεΐνη δρα σαν ρυθμιστής της ομοιόστασης των πρωτεϊνών. Φαίνεται πως επηρεάζει τη μεταφορά των κυστιδίων, την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και το ενδοκυτταρικό pH. Πιο συγκεκριμένα, στη μεμβράνη του συμπλέγματος Golgi, η CFTR πρωτεΐνη ρυθμίζει το

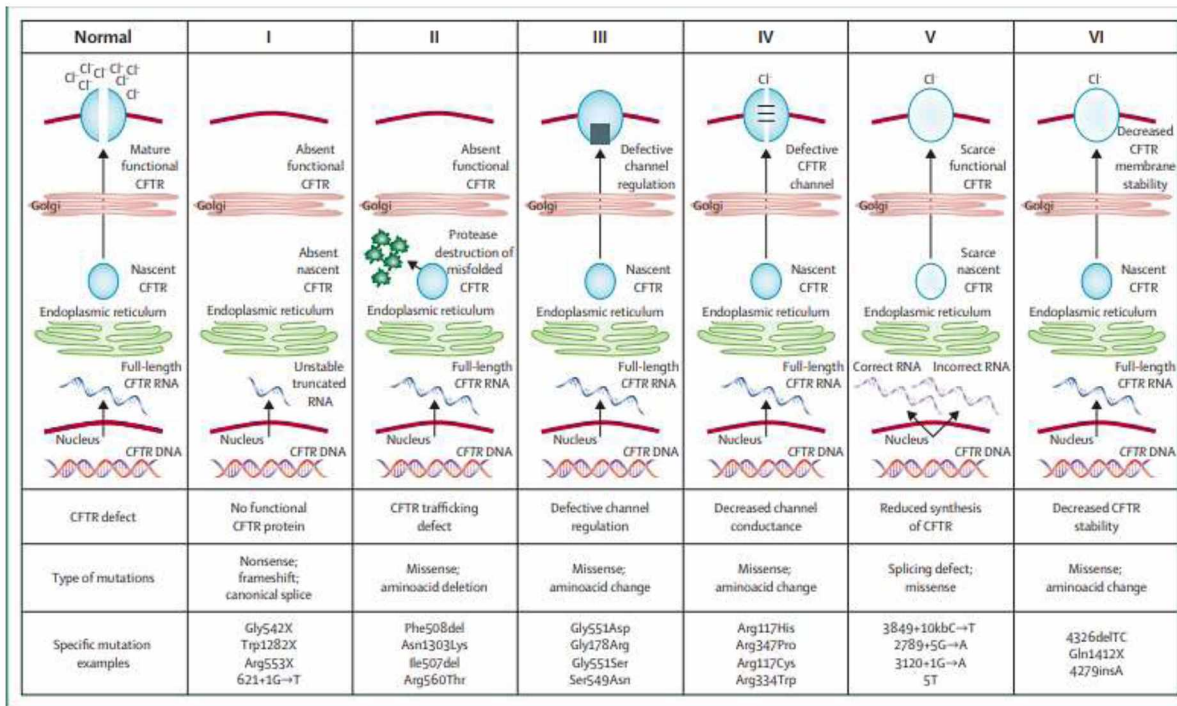
εσωτερικό όξινο pH. Αυτό επιτυγχάνεται διατηρώντας το διάλυο ιόντων  $H^+$  συνεχώς ενεργό, ενώ το άνοιγμα και κλείσιμο του διαύλου CF ρυθμίζει την οξύτητα. Η απουσία ή η αναποτελεσματική λειτουργία του διαύλου CF, που οφείλεται στην άνεπαρκή έκφραση της πρωτεΐνης CFTR, επηρεάζει το εσωτερικό pH του συμπλέγματος Golgi που γίνεται περισσότερο αλκαλικό, με αποτέλεσμα την καταστροφή ενζύμων όπως είναι οι σιαλοτρανσφεράσες. Οι σιαλοτρανσφεράσες είναι υπεύθυνες για την γλυκοζυλίωση των γλυκοπρωτεϊνών και των γλυκολιπιδίων που αποτελούν τους υποδοχείς στην μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Άρα παράγονται μη γλυκοζυλιωμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς, ευαίσθητοι στην πρόσδεση της *Pseudomonas Aeruginosa* (Vankeerberghen et al., 2002).

Η δυσλειτουργία της CFTR μπορεί να επηρεάσει πολλά διαφορετικά όργανα και ειδικότερα εκείνα που εκκρίνουν βλέννη, όπως το ανώτερο και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, το πάγκρεας, το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, τη χολή, το έντερο και τους ιδρωτοποιούς αδένες (Thompson & Thompson, 2011)

### **Κατηγορίες μεταλλάξεων του CFTR**

Οι περισσότερες μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR είναι παρερμηνεύσιμες (missense), όμως έχουν περιγραφεί και μεταλλάξεις που προκαλούν διαταραχή του αναγνωστικού πλαισίου, διαταραχή του ματίσματος (splicing), μη ερμηνεύσιμες (nonsense) καθώς και ελλείμματα ή προσθήκες νουκλεοτιδίων εντός του αναγνωστικού πλαισίου. Περίπου το 15% των μεταλλάξεων που έχουν αναγνωριστεί δεν σχετίζονται με ασθένεια (Elborn J.S., 2016).

Οι μεταλλάξεις CFTR μπορούν να χωριστούν σε έξι κατηγορίες ανάλογα με τις επιδράσεις τους στην πρωτεϊνική λειτουργία (Εικόνα). Οι μεταλλάξεις των κατηγοριών I, II και III οδηγούν σε πλήρη λειτουργική απώλεια της πρωτεΐνης CFTR και οι ασθενείς παρουσιάζουν σοβαρό φαινότυπο, ενώ οι μεταλλάξεις των κατηγοριών IV, V και VI παρέχουν μερική λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR και κατά συνέπεια έναν ηπιότερο φαινότυπο (Yu et al., 2011).



Εικόνα 3 : Κατηγορίες μεταλλάξεων της πρωτεΐνης CFTR. Οι μεταλλάξεις της κατηγορίας I δημιουργούν πρόωρο κωδικόνιο λήξης και άρα αδυναμία μετάφραση της πλήρους πρωτεΐνης. Έτσι, η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι σύντομη και μη λειτουργική. Οι μεταλλάξεις κατηγορίας II έχουν σαν αποτέλεσμα μια πρωτεΐνη με ανώμαλη δομή και λάθος πτύχωση που δεν φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια. Οι μεταλλάξεις κλάσης III προκαλούν μειωμένη ενεργοποίηση καναλιού, επομένως τα κανάλια παραμένουν κλειστά. Οι μεταλλάξεις κλάσης IV προκαλούν μείωση της αγωγιμότητας των ιόντων μέσω του καναλιού. Οι μεταλλάξεις κλάσης V κωδικοποιούν μικρές πρωτεΐνες που καταλήγουν σε μειωμένη ποσότητα CFTR στην κυτταρική επιφάνεια, έτσι ώστε να εμφανίζεται κάποια λειτουργία, αλλά σε μειωμένο επίπεδο. Τέλος, οι μεταλλάξεις κλάσης VI οδηγούν σε βραχύτερη ημιζωή λόγω της αστάθειας της πρωτεΐνης και μπορεί επίσης να βλάψουν τη ρύθμιση των γειτονικών διαύλων CFTR στην κυτταρική επιφάνεια (Elborn J.S. 2016).

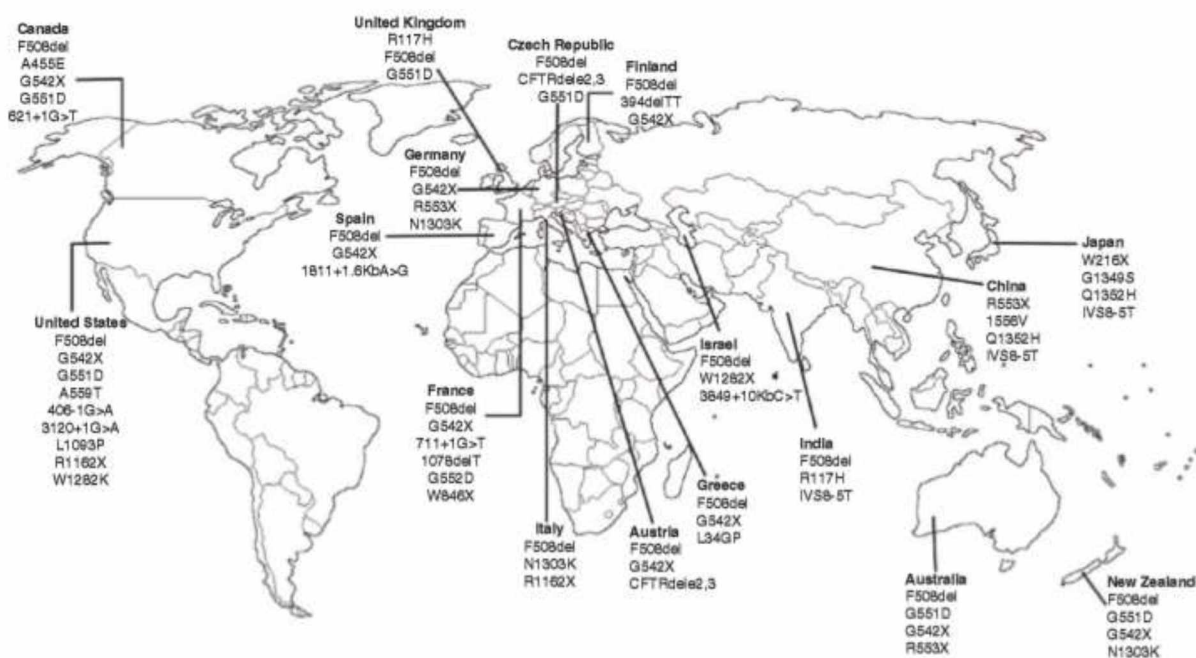
## Κυστική ίνωση (CF)

Η κυστική ίνωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR. Περίπου 2.000 μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα αν και λιγότερες από 150 είναι γνωστό ότι προκαλούν ασθένειες. Ο φαινότυπος της κυστικής ίνωσης χαρακτηρίζεται από προοδευτική πνευμονική ασθένεια, εξωκρινή παγκρεατική ανεπάρκεια που έχει ως αποτέλεσμα κακή γαστρεντερική απορρόφηση, εντερικές ανωμαλίες που προκαλούν υποσιτισμό, μειωμένη ανάπτυξη και μια ποικιλία άλλων εκδηλώσεων, συμπεριλαμβανομένης της παραρρινοκολπίτιδας και τον διαβήτη. Αν και η κυστική ίνωση είναι μια μονογονιδιακή νόσος, η φαινοτυπική της μεταβλητότητα είναι αξιοσημείωτη, καθώς παρατηρείται ευρύ φάσμα σοβαρότητας ακόμα και ανάμεσα σε άτομα με τον ίδιο φαινότυπο. Το

γεγονός αυτό οφείλεται στη διαφορετική σοβαρότητα των μεταλλάξεων που, κατά συνέπεια, επηρεάζουν διαφορετικά τις εκδηλώσεις και τη σοβαρότητα της νόσου. Γενετικοί τροποποιητές και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. (Ratjen et al., 2015).

Η αλλαγή των διαγνωστικών κριτηρίων αλλά και η βελτίωση στην κλινική έκβαση της νόσου, δηλαδή η κάθαρση του αναπνευστικού βλεννογόνου και ο έλεγχος των μολύνσεων του αναπνευστικού συστήματος, έχουν επηρεάσει την επιδημιολογία της κυστικής ίνωσης. Πράγματι, η κυστική ίνωση από μια παιδική ασθένεια, τα τελευταία χρόνια αποτελεί κατά κύριο λόγο μια ασθένεια των ενηλίκων (Elborn J.S., 2016).

Η συχνότητα εμφάνισης είναι περίπου 1 στις 2.000 με 3.000 γεννήσεις στους Καυκάσιους, με αντίστοιχη συχνότητα φορέα 1 σε 22 έως 28 άτομα. Στην Βόρεια Ευρώπη η συχνότητα εμφάνισης είναι 1 στις 3.000 γεννήσεις ατόμων, ενώ η Ιρλανδία έχει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης (1 στις 1.400 γεννήσεις). Η συχνότητα ποικίλλει ανάλογα με την εθνικότητα, καθώς μόνο 1 στους 4.000 με 10.000 Λατινοαμερικάνους και 1 στους 15.000 με 20.000 Αφροαμερικάνους έχουν κυστική ίνωση, ενώ το ποσοστό μικραίνει ακόμα περισσότερο, όταν η καταγωγή του ατόμου είναι Ασιατική. Αυτές οι εκτιμήσεις είναι βάσει πληροφοριών από τις δυτικές χώρες καθώς ελλείπουν επιδημιολογικά δεδομένα για μεγάλες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Μέσης Ανατολής, της Ασίας και της Αφρικής ( Ratjen et al., 2015, Gajbhiye & Gaikwad, 2017).



Εικόνα 4 : Οι πιο κοινές μεταλλάξεις του CFTR σε διάφορες χώρες (Gajbhiye & Gaikwad, 2017).



Οι φαινότυποι της κυστικής ίνωσης ταξινομούνται σε κλασσικούς και μη κλασσικούς ή αλλιώς σε άτυπες και μη τυπικές μορφές (Ratjen et al., 2015).

Σε τυπικές περιπτώσεις κυστικής ίνωσης, οι αφυδατωμένες και κολλώδεις εκκρίσεις στους πνεύμονες των ασθενών με κυστική ίνωση εμποδίζουν την κάθαρση του κροσσώτου επιθηλίου από τις βλέννες, αναστέλλουν τη λειτουργία των φυσιολογικά αναπτυσσόμενων αντιμικροβιακών πεπτιδίων, παρέχουν μέσο για την ανάπτυξη παθογόνων οργανισμών και αποφράσσουν την κυκλοφορία του αέρα. Εντός των πρώτων μηνών της ζωής, αυτές οι εκκρίσεις και τα βακτήρια που τις αποικίζουν ξεκινούν μια φλεγμονώδη αντίδραση. Η απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών, αντιβακτηριακών ενζύμων του ξενιστή και βακτηριακών ενζύμων καταστρέφει τα βροχιόλια. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι λοιμώξεων, φλεγμονής και ιστικής καταστροφής, μειώνουν το ποσό του λειτουργικού πνευμονικού ιστού και οδηγούν τελικά σε πνευμονική ανεπάρκεια. Στον παγκρεατικό αγωγό, η απώλεια μεταφοράς ιόντων  $Cl^-$ , επηρεάζει την ενυδάτωση των εκκρίσεων και οδηγεί στην κατακράτηση των εξωγενών ενζύμων του παγκρέατος που οδηγεί σε καταστροφή του παρεγχύματος και τελικά ίνωση του παγκρέατος. Επίσης, η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης CFTR έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη περιεκτικότητα χλωριούχου νατρίου που αποτελεί και τη βάση για τη διαγνωστική δοκιμασία χλωρίου στον ιδρώτα (Thompson & Thompson, 2011)

Οι μη τυπικές μορφές περιλαμβάνουν χρόνια ιγμορίτιδα, επάρκεια λειτουργίας του παγκρέατος όμως ένα 5-20% αναπτύσσει παγκρεατίτιδα, αποφρακτική πνευμονοπάθεια, συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία σπερματικού πόρου και χαμηλότερες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου στον ιδρώτα σε σχέση με την κλασσική ΚΙ (Ratjen et al., 2015).

Η μη τυπική μορφή κυστικής ίνωσης είναι μια πιο ήπια μορφή της διαταραχής και επίσης, αποτέλεσμα μεταλλάξεων του γονιδίου CFTR. Τα άτομα με μη τυπική κυστική ίνωση, συνήθως έχουν μία σοβαρή μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο και μία λιγότερο συχνή μετάλλαξη ή ανωμαλία των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων στο άλλο CFTR αλληλόμορφο. Άρα λοιπόν, τα άτομα αυτά δεν έχουν τα κλασσικά συμπτώματα κυστικής ίνωσης. Αντί των κλασσικών συμπτωμάτων, τα άτομα αυτά, έχουν δυσλειτουργία μόνο σε ένα σύστημα οργάνων και σε πολύ πιο ήπιο βαθμό. Ως αποτέλεσμα, τα άτομα αυτά, συχνά, έχουν λιγότερες νοσηλείες κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας από τους ασθενείς με την κλασσική μορφή της νόσου και η διαταραχή μπορεί να παραμείνει αδιάγνωστη για χρόνια, συχνά μέχρι και την ενηλικίωση τους (Schram C.A., 2012).

Περίπου το 2-5% των ανδρών με κυστική ίνωση είναι γόνιμοι. Υπάρχει κανονική παραγωγή ανώριμων σπερματοζωαρίων στους όρχεις όμως οι σπερματικοί πόροι είναι είτε ατροφικοί, είτε απουσιάζουν σε περίπου 95% των αρσενικών με κυστική ίνωση. Οι σπερματοδόχες κύστεις είτε δεν αναπτύσσονται καλά είτε είναι απύσες και η φυσιολογική ωρίμανση του σπέρματος εξασθενεί. Ως αποτέλεσμα αυτού, μειώνεται ο σπερματικός όγκος, το σπέρμα δεν ωριμάζει και έχει αρκετά όξινο pH με ελάχιστη η καθόλου παρουσία φρουκτόζης. Υπάρχουν διάφορες διαταραχές που σχετίζονται με το CFTR και την ανδρική υπογονιμότητα. Οι κυριότερες είναι οι παρακάτω. (Gajbhiye & Gaikwad, 2017).

### **1. Συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία σπερματικού πόρου (CBAVD)**

Με τα χρόνια, πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τη γενετική σύνδεση μεταξύ των μεταλλάξεων CFTR και του κινδύνου για CBAVD. Σε ασθενείς με CBAVD, έχει εντοπιστεί ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του CFTR και αυτές οι μεταλλάξεις έδειξαν εξαιρετική ετερογένεια στο φάσμα και τη συχνότητα. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις είναι ΔF508del, 5T (c.1210-12T [5]) και R117H (c.350G.A), ενώ οι εναπομένουσες μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε λίγες περιπτώσεις με πολύ χαμηλή συχνότητα ή αναφέρθηκαν από μία ή δύο μελέτες σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. (Yu et al., 2011).

Αν και ο μοριακός μηχανισμός υποκρύπτεται και η εξέλιξη της CBAVD παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής, προτείνεται ότι, μπορεί να σχετίζεται με ελαττώματα των μεσονεφρικών πόρων που προκλήθηκαν από μεταλλάξεις CFTR (Yu et al., 2011). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR διαταράσσουν τη λειτουργία του διαύλου χλωρίου, εμποδίζοντας τη συνηθισμένη ροή ιόντων χλωρίου και νερού μέσα και έξω από τα κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα της αρσενικής γεννητικής οδού παράγουν βλέννα που είναι αφύσικα παχιά και κολλώδης. Αυτή η βλέννα φράζει τους σπερματικούς πόρους καθώς αυτοί σχηματίζονται, αλλοιώνοντας τους πριν από τη γέννηση. Έτσι το σπέρμα δεν μεταφέρεται μέσω των όρχεων και δεν ενσωματώνεται στο σπερματικό υγρό κατά στην εκσπερμάτιση (Genetics Home Reference/U.S. National Library Of Medicine).

Υπάρχουν περιπτώσεις CBAVD που δεν σχετίζονται με την κυστική ίνωση, ωστόσο, περίπου το 80-97% των ασθενών με CBAVD έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο CFTR. Μεταξύ αυτών, 63-83% φέρουν μεταλλάξεις σε αμφότερα τα αλληλόμορφα (de Souza et al., 2017).

Οι κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι ασθενείς με CBAVD ήταν ετερόζυγοι με δύο διαφορετικά μεταλλαγμένα αλληλόμορφα και ότι σχεδόν όλα τα αρσενικά CBAVD με

ετεροζυγους γονότυπους θα έχουν τουλάχιστον μια ήπια μετάλλαξη. Σε γενικές γραμμές, τα F508del / 5T και F508del /R117H είναι τα δύο πιο συνηθισμένα είδη ένωσης ετεροζυγωτών, σε άνδρες με CBAVD, τα οποία διαφέρουν σαφώς από εκείνα που παρατηρούνται στο τυπικό CF (Yu et al., 2011).

## **2. Συγγενής μονόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (CUAVD)**

Οι περιπτώσεις CUAVD, εντοπίζονται στον ανδρικό πληθυσμό με συχνότητα 0,5-1,0% στους άνδρες και συνήθως ανακαλύπτονται κατά τη διάρκεια εξετάσεων για υπογονιμότητα ή κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης των αρσενικών γεννητικών οργάνων. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης του CUAVD θα μπορούσε να υποτιμηθεί λόγω της πιθανότητας εμφάνισης εγκυμοσύνης, εξαιτίας της κανονικής λειτουργίας του ενός σπερματικού πόρου.

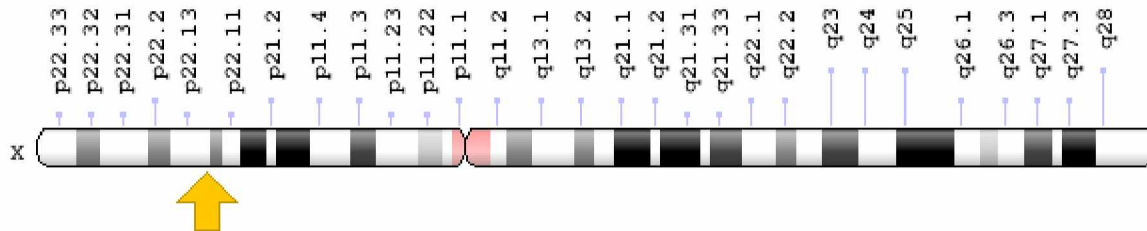
Σε σύγκριση με τους ασθενείς με CBAVD, το προφίλ των πολυμορφισμών, στο γονίδιο CFTR, σε ασθενείς με CUAVD είναι αρκετά διαφορετικό, άλλα παραμένει υψηλή η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR, με συχνότερες τις μεταλλάξεις F508del και 5T.

Οι περισσότεροι ασθενείς με δύο παραλλαγές CFTR διαθέτουν έναν ετερόζυγο γονότυπο, με μία σοβαρή μετάλλαξη που συνυπάρχει με μια ήπια.

Συγκριτικά με τους ασθενείς με CBAVD, παρατηρήθηκαν αρκετά μειωμένες συχνότητες των μεταλλάξεων F508del και 5T και μειωμένες συχνότητες των γονότυπων F508del / 5T και F508del /R117H, γεγονός που υποδηλώνει ότι ενδέχεται να υπάρχει επίδραση γονιδιακής δοσολογίας (gene dosage effect) (Cai et al., 2018).

## Γονίδιο ADGRG2

Το γονίδιο ADGRG2 εντοπίζεται στην περιοχή p22.13, στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος X και κωδικοποιεί για έναν GPCR G2 υποδοχέα, ο οποίος συνδέεται με πρωτεΐνες προσκόλλησης G (Yang et al., 2017)



Εικόνα 5: Η θέση του γονιδίου ADGRG2 στο κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος X, στη θέση 22.13 (Genome Decoration Page/NCBI)

Η οικογένεια των συζευγμένων με G πρωτεΐνη υποδοχέων (GPCRs) έχει πάνω από 800 διαφορετικά μέλη χωρισμένα σε έξι υποοικογένειες (A-F) εκ των οποίων, η οικογένεια A ή αλλιώς η οικογένεια της ροδοψίνης (έχει δομή όμοια με τον υποδοχέα ροδοψίνης) είναι η μεγαλύτερη και η πιο εκτενώς μελετημένη.

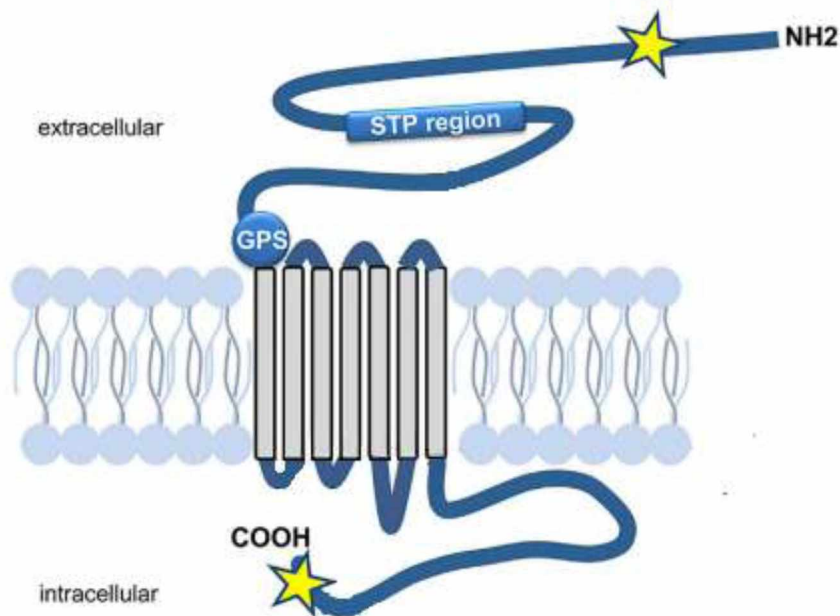
Η οικογένεια B, ή αλλιώς η οικογένεια της σεκρετίνης, μπορεί να ταξινομηθεί σε 2 διαφορετικές υποοικογένειες, τους B1 υποδοχείς ορμονών και τους B2 υποδοχείς προσκόλλησης.

Ο υποδοχέας ADGRG2 (ή αλλιώς GPR64) είναι μέλος της τελευταίας ομάδας (B2) που είναι και η μεγαλύτερη οικογένεια ορφανών υποδοχέων GPCRs, δηλαδή για την πλειονότητα των υποδοχέων αυτών το ενδογενές μόριο τελεστή δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί. (Peeters et al., 2015)

### Δομή του υποδοχέα ADGRG2 (Adhesion G protein-coupled receptor G2)

Οι υποδοχείς GPCRs αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με 3 εξωκυτταρικούς και 3 ενδοκυτταρικούς βρόχους, ένα εξωκυτταρικό NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο και ένα ενδοκυτταρικό COOH-τελικό άκρο. Οι GPCRs της οικογένειας B χαρακτηρίζονται από ένα σχετικά μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, το οποίο περιέχει πολλές καλά συντηρημένες κυστεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν ένα δίκτυο δισουλφιδικών δεσμών. Ανάμεσα στις κυστεΐνες των εξωκυτταρικών βρόχων σχηματίζεται ένας δεσμός θείου (Ζίφα Α, 2016). Ο υποδοχέας ADGRG2

έχει ένα μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνη το οποίο είναι γνωστό ως θέση πρωτεόλυσης υποδοχέα συζευγμένου με πρωτεΐνη G (GPS). Το GPS αποτελεί ένα αναπόσπαστο τμήμα μιας πολύ μεγαλύτερης περιοχής 320 καταλοίπων που ονομάζεται περιοχή GPCR-Autoproteolysis Inducing (GAIN) η οποία και διαχωρίζει την οικογένεια των υποδοχέων προσκόλλησης GPCR από τους υπόλοιπους GPCRs υποδοχείς. Η ρύθμιση της λειτουργίας τους λοιπόν, εξαρτάται από την διάσπαση του αμινοτελικού άκρου τους (Kirchhoff & Cappallo-Obermann, 2016).



Εικόνα 6 : Δομή των υποδοχέων ADGRG2. Διακρίνονται οι 7 διαμεμβρανικές περιοχές και μια καλά συντηρημένη, πλούσια σε κυστεΐνες, περιοχή GAIN που περιέχει το μοτίβο GPS. Το συντηρημένο μοτίβο GPS είναι πλούσιο σε κυστεΐνη και είναι η θέση της αυτοπρωτεολυτικής διάσπασης. Διακρίνεται επίσης μια περιοχή πλούσια σε σερίνες-θρεονίνες-προλίνες (περιοχή STP) (Patat et al., 2016).

### **Ρόλος του υποδοχέα ADGRG2**

Η δομή του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος δυσχεραίνει την πλήρη διαλεύκανση των αιτιών της υπογονιμότητας. Τμήμα αυτού, είναι τα απαγωγά σωληνάρια των όρχεων τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια μεταφοράς και ωρίμανσης του σπέρματος διότι συμβάλλουν στην επαναρρόφηση του υγρού και στην διατήρηση της ομοιόστασης του νερού και του μεταβολισμού των ιόντων. Η δυσλειτουργία της ικανότητας επαναρρόφησης των απαγωγών

σωληναρίων οδηγεί σε απόφραξη της επιδιδυμίδας και ανώμαλη σπερμιόσταση η οποία τελικά οδηγεί σε υπογονιμότητα (Zhang et al., 2018)

Το γονίδιο ADGRG2 κωδικοποιεί για έναν συζευγμένο με G πρωτεΐνη GPCR υποδοχέα ο οποίος θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διάφορα συστήματα οργάνων άλλα οι κυτταρικές λειτουργίες και οι μοριακοί μηχανισμοί σηματοδότησης παραμένουν άγνωστοι. Το γονίδιο ADGRG2 εκφράζεται στα απαγωγά σωληνάκια της επιδιδυμίδας και άρα εμπλέκεται στην επαναρρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του υγρού που περιέχει τα ανώριμα σπερματοζώαρια, όπως προαναφέρθηκε (Patat et al., 2016).

Μεταλλάξεις του γονιδίου ADGRG2 έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με συγγενή αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου καθιστώντας το γονίδιο ADGRG2 ένα νέο, συνδεδεμένο με το X, παθολόγο γονίδιο για το CBAVD δίνοντας έτσι λίγο περισσότερο φώς στην παθογένεση της CBAVD διαταραχής (Patat et al., 2016).

Οι μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί, βρέθηκαν σε αζωοσπερμικούς άνδρες των οποίων ο φαινότυπος δεν από τον φαινότυπο των ασθενών με CBAVD, που έχει προκληθεί από μεταλλάξεις CFTR. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις των δύο αυτών γονιδίων, οδηγούν σε αποφρακτική αζωοσπερμία μέσω παρόμοιου παθοφυσιολογικού μηχανισμού (Patat et al., 2016). Οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο ADGRG2, όπως είναι οι c.2845delT και c.2002\_2006delinsAGA, έχουν σαν αποτέλεσμα εισαγωγή ή απαλειφή νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία με αποτέλεσμα μεταβολές μετατόπισης πλαισίου οι οποίες οδηγούν στον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης της πρωτεΐνης του υποδοχέα και άρα στη διαράξη της επαναρρόφησης των σπερματικών υγρών με αποτέλεσμα την υπογονιμότητα. (Yang et al., 2017).

Το γονίδιο ADGRG2 διερευνήθηκε για μεταλλάξεις στα δείγματα του ελληνικού πληθυσμού άλλα η βιοπληροφορική ανάλυση δεν έδωσε σχετικά αποτελέσματα, άρα δεν συμπεριλαμβάνεται στο παρακάτω πειραματικό μέρος και στα αποτελέσματα που απορρέουν.

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές διεργασίες :

- 1) λήψη δειγμάτων
- 2) απομόνωση DNA από το σπέρμα των δειγμάτων που ελήφθησαν
- 3) αποστολή των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν για αλληλούχιση
- 4) επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης με βιοπληροφορικές μεθόδους σε ότι αφορά :
  - α) την σύγκριση των ποσοτήτων SNPs του γονιδίου CFTR στα controls και Cases και
  - β) την σύγκριση των συνολικών συχνοτήτων μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR στα δείγματα του εργαστήριου (δείγματα ελληνικού πληθυσμού) με τις συχνότητες μετάλλαξης σε άλλους πληθυσμούς.

### **Συλλογή δειγμάτων**

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση, συλλέχθηκαν μέσω του προγράμματος Spermogene το οποίο ένα ερευνητικό πρόγραμμα στο οποίο συνεργάζονται το Embryolab , μια Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής στις Θεσσαλονίκη, με το Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο σκοπός του προγράμματος είναι η μελέτη των γενετικών παραγόντων της ανδρικής υπογονιμότητας και τελικά ο σχεδιασμός εξειδικευμένων διαγνωστικών μέσων .

## **Υλικά**

- Αιθανόλη 70%
- Lysis Buffer: 10Mm Tris-HCl pH 8.0, 100Mm NaCl, 10Mm EDTA, 0,5% SDS
- Triton-X100 (0,5%)
- DTT 0,1M
- Πρωτεΐνάση K 100mg/ml

## **Μεθοδολογία**

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο «Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm» (Weyrich, 2012) με τελικό σκοπό την απομόνωση γενετικού υλικού από ανθρώπινο σπέρμα. Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματοζώαρια και σπερματικό υγρό που ονομάζεται αλλιώς σπερματικό πλάσμα και περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά, όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Για το λόγο αυτό συνίσταται η απομάκρυνση του σπερματικού υγρού με τη χρήση αιθανόλης. Αντίθετα, τα σπερματοζώαρια περιβάλλονται από μια λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς, της οποίας η δομή εμποδίζει τη λύση των κυττάρων και δυσχεραίνει την απομόνωση του γενετικού υλικού. Για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DDT. Ακόμη, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει την ρήξη των κυτταρικών/πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA ενώ το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει επίσης EDTA, έναν χηλικό υποκαταστάτη, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα που αποτελούν συμπαράγοντα για τη δράση των δεοξυριβονουκλεασών. Άρα η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Τέλος, το ρυθμιστικό διάλυμα, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή και το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεΐνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω



εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο, ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής :

1. Πλύση 100 μl σπέρματος με προσθήκη 500 μl αιθανόλης (70%)
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
3. Τα στάδια (1),(2) επαναλαμβάνονται και συλλέγεται το ίζημα.
4. Προσθήκη 500 μl διαλύματος ομογενοποίησης, Lysis Buffer.
5. Προσθήκη 2,5 μl Triton-X100 (0,5%), 200 μl DTT (0,1M) και 40 μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml).
6. Ανάδευση του μίγματος και επώαση για 2-3 ώρες στους 50°C (υπό ανάδευση).
7. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf.

## **Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων**

### **Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο**

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη/χλωροφόρμιο πραγματοποιείται με σκοπό την απομάκρυνση πρωτεϊνών και λιπιδίων και τη διασφάλιση της υψηλής καθαρότητας του DNA. Συγκεκριμένα, για τον διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες χρησιμοποιείται φαινόλη και δημιουργούνται δύο φάσεις : (i) η υδατική φάση όπου βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και η οργανική φάση όπου βρίσκονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η παρουσία του χλωροφορμίου έχει σαν αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων και προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στην οργανική φάση. Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής :

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου και ακολουθεί ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 13,000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να γίνει διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση.
3. Η υδατική φάση, στην οποία βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1 ml), αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 13,000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
4. Στη συνέχεια η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
5. Έπειτα, το DNA επανακάθεται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

### **Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη**

#### **Υλικά**

- CH<sub>3</sub>COONa (3M)
- Αιθανόλη
- TE-buffer

#### **Μεθοδολογία**

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων. Πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων και έχει την ικανότητα να αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα των νουκλεϊκών οξέων και να εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα ιόντα Na<sup>+</sup> που συνδέονται με αυτές. Έτσι οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων μειώνονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η

κατακρήμνιση επιτυγχάνεται μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων, ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων. Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής :

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), όγκου V/10, συγκέντρωσης 3M και αιθανόλη όγκου 2V.
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται  $-80^\circ\text{C}$  για 1-2 ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 20 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ .
3. Στη συνέχεια απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500μl αιθανόλης 75%
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξεραινεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε TE-buffer ή υδατικό διάλυμα.

### **Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA**

#### *i. με χρήση φασματοφωτόμετρου*

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου βασίζεται στο γεγονός ότι, το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260 nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή οπτικής απορρόφησης 1 ( $\text{OD}_{260} = 1$ ) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  δίκλωνου DNA, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  μονόκλωνου DNA ή περίπου 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  για μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια. Επίσης, ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

Για τη φωτομέτρηση των δειγμάτων DNA έγινε αραιώση 2 μl διαλύματος DNA σε 98 μl ddH<sub>2</sub>O και έπειτα, οι τιμές της απορρόφησης στα 260 nm ανάχθηκαν σε συγκέντρωση DNA.

*ii. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης*

**Υλικά**

- TAE 1x
- Agarose Loading buffer
- SERVA DNA Stain

**Μεθοδολογία**

Μία βασική μέθοδος ποσοτικοποίησης δειγμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με κυμαινόμενη συγκέντρωση, ανάλογα με το μέγεθος του ηλεκτροφορούμενου DNA. Είναι μια τεχνική διαχωρισμού φορτισμένων μορίων . Το DNA, όντας αρνητικά φορτισμένο μόριο, κινείται διαμέσου της πηκτής αγαρόζης από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με τη χρωστική SERVA, τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή, κι επομένως η ένταση φθορισμού, είναι ανάλογη της ποσότητας DNA.

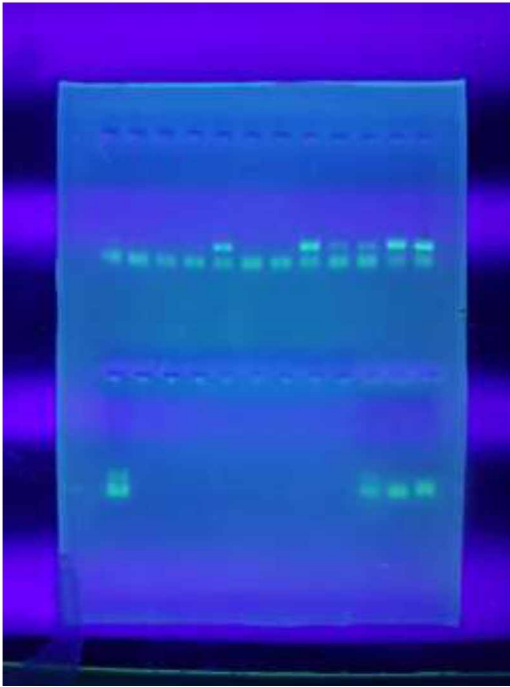
Εκτός από τον ποιοτικό προσδιορισμό του DNA, η μέθοδος αυτή δίνει πληροφορίες και για τη φυσική κατάσταση του DNA και συγκεκριμένα αν είναι ακέραιο (μακρομοριακό) ή κατακερματισμένο. Ενδείκνυται ακόμη σε περιπτώσεις χαμηλής καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Η διακριτική δυνατότητα του πηκτώματος αγαρόζης 1% w/v είναι περίπου 10 ng DNA.

Η αγαρόζη που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία του πηκτώματος είναι ένας ευθύγραμμος πολυσακχαρίτης ο οποίος εκχυλίζεται σε μεγάλες ποσότητες από αρκετά είδη ερυθροφύκων και σχηματίζει πήκτωμα με τη διάμετρο των πόρων του να κυμαίνεται από 100 έως 300 nm. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα και συνεπώς η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το εύρος των τμημάτων DNA που μπορούν να

διαχωριστούν. Τέλος, η χρωστική SERVA αποτελεί μια πιο ασφαλή εναλλακτική έναντι του βρωμιούχου αιθιδίου καθώς προσδένεται στο DNA και το RNA προκαλώντας την εμφάνιση φθορισμού αλλά είναι μη καρκινογόνος και σύμφωνα με το τεστ AMES πολύ λιγότερο μεταλλαξιγόνο.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης 1% w/v:

1. Αναμειγνύεται αγαρόζη σε σκόνη (0,3 γρ.) με 45 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές και να διαλυθεί η αγαρόζη.
2. Προσθήκη 3 ml χρωστικής SERVA και ήπια ανάδευση.
3. Το μίγμα προστίθεται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται ειδικά εξαρτήματα που ονομάζονται «χτενάκια». Το κάθε «χτενάκι» αποτελείται από έναν οριζόντιο άξονα κατά μήκος του οποίου ξεκινούν 12 κάθετοι άξονες -θέσεις και χρησιμοποιείται για την δημιουργία θέσεων («πηγαδάκια») στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα DNA.
4. Το μίγμα αφήνεται να κρυώσει ώστε να δημιουργηθεί το πήκτωμα (πολυμερισμός αγαρόζης).
5. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται σε αυτή TAE buffer 1x.
6. Προκειμένου να είναι εφικτή η παρατήρηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιούνται 3 ml Agarose Loading buffer για κάθε δείγμα DNA (4 μl). Έπειτα, γίνεται προσθήκη των δειγμάτων στις θέσεις («πηγαδάκια») του πηκτώματος.
7. Ακολουθεί εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης και ηλεκτροφόρηση για περίπου 15 λεπτά.
8. Τέλος, το πήκτωμα παρατηρείται κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός (Εικόνα).



Εικόνα 7: Παράδειγμα πηκτώματος αγαρόζης, κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός.

### **Γονοτύπηση δειγμάτων DNA**

Η αλληλούχιση των δειγμάτων DNA, μέσω γονοτύπησης, πραγματοποιήθηκε από το κέντρο HuGeF στην Ολλανδία, με τη χρήση του chip της Illumina, Infinium® Global Screening Array. Το chip αυτό προσφέρει πληροφορίες για 642.824 δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (SNPs), και άρα προσφέρει μια αρκετά μεγάλη κάλυψη του γονιδιώματος και ιδιαίτερα των περιοχών των ιντρονίων, καθώς οι 256.673 δείκτες ανήκουν σε αυτές τις περιοχές. Έτσι, αναδεικνύεται πιο αντιπροσωπευτικά ο πολυμορφισμός των non- coding περιοχών.

Η γονοτύπηση με ένα τέτοιο chips βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων, ειδικών για μια συγκεκριμένη περιοχή, περίπου 50 bp γύρω από τα SNPs. Τα SNPs είναι ακινητοποιημένα πάνω σε μια γυάλινη πλάκα και αρχικά γίνεται πολλαπλασιασμός και προετοιμασία του DNA-στόχου και στη συνέχεια υβριδοποίηση και επιμήκυνση με νουκλεοτιδικές βάσεις, οι οποίες είναι σημασμένες με διαφορετικές φθορίζουσες. Ακολουθούν διαδοχικά στάδια πλύσης και πραγματοποιείται ανίχνευση των φθοριζόντων προϊόντων που προκύπτουν με ειδικό laser. Τα διαφορετικά χρώματα φθορισμού οδηγούν τελικά στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι αρχικά, η συγκέντρωση των δειγμάτων σπέρματος αλλά και η γονοτύπησή τους έγινε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Μαρίας Μαρκαντώνη, η οποία μελετά μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας και συμβάλλουν στην εμφάνιση παθολογικού φαινοτύπου. Επομένως, στη συνέχεια, τα δείγματα που είχαν ήδη συγκεντρωθεί αλλά και τα αποτελέσματα γονοτύπησης που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν και για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας (Μαρία Μαρκαντώνη, διδακτορική διατριβή σε εξέλιξη).

### **Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK**

Για την επεξεργασία και την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PLINK, το οποίο είναι ένα εργαλείο Βιοπληροφορικής που χρησιμοποιείται για αναλύσεις συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος (Purcell et al., 2007). Το πρόγραμμα PLINK μπορεί να εκτελεστεί τόσο σε UNIX όσο και σε Windows λειτουργικά συστήματα και δίνει τη δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων γονοτύπων και φαινοτύπων ώστε να παραχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Το πρόγραμμα διαθέτει γραμμή εντολών και είναι γραμμένο σε C/C++ , άρα όλες οι εντολές θα έχουν την εξής δομή:

plink - - (αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση) - - (μέθοδοι-εντολές που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση)

Το πρόγραμμα PLINK αναγνωρίζει διαφορετικές μορφές αρχείων, καθένα από τα οποία έχει διαφορετικές ιδιότητες αλλά και περιεχόμενο. Οι βασικές μορφές αρχείων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση είναι οι εξής:

1. Αρχείο MAP (\*.map). Είναι ένα αρχείο που περιλαμβάνει μια λίστα των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP) που έχουν αλληλουχηθεί και καταγραφεί (Εικόνα). Κάθε γραμμή του αρχείου αντιστοιχεί σε ένα SNP. Το αρχείο αποτελείται από τουλάχιστον 4 στήλες. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στο χρωμόσωμα που ανήκει το κάθε SNP, η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί στο rs# ή σε κάποιον άλλο κωδικό που αποτελεί το SNP identifier, η τρίτη στήλη αντιστοιχεί στη γενετική απόσταση (μέτρηση σε morgans) και η τέταρτη στήλη αντιστοιχεί στη θέση του ζεύγους βάσεων (μέτρηση σε bp units).

5	GSA-rs30168	31.3992	13719089
5	rs17203442	31.4045	13721378
5	GSA-rs10866502	31.4178	13727017
5	rs10513151	31.4205	13728151
5	GSA-rs115542432	31.4227	13729104
5	rs3734109	31.4387	13735892
5	rs17263496	31.4423	13737444
5	rs7710301	31.4453	13738734
5	rs6554809	31.4506	13740976

Εικόνα 8: Παράδειγμα του αρχείου MAP.

2. Αρχείο PED (\*.ped). Το αρχείο αυτό περιλαμβάνει τους γονοτύπους κάθε ατόμου αλλά και πρόσθετες πληροφορίες. Κάθε γραμμή του αρχείου αντιστοιχεί σε ένα άτομο. Στο αρχείο αυτό συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον 6 στήλες. Η πρώτη στήλη συνήθως είναι ένας κωδικός που αντιστοιχεί στην οικογένεια (Family ID) και η δεύτερη στήλη είναι συνήθως ένας κωδικός που αντιστοιχεί στο άτομο (Individual ID). Η τρίτη στήλη αντιστοιχεί στον κωδικό του πατέρα (Paternal ID) και η τέταρτη στον κωδικό της μητέρας (Maternal ID). Τέλος, η πέμπτη στήλη δείχνει το φύλο του ατόμου και η έκτη στήλη το φαινότυπο (Renteria et al., 2013).

```
CH18526 NA18526 0 0 2 1 A A
CH18524 NA18524 0 0 1 1 A G
CH18529 NA18529 0 0 2 1 A G
```

Εικόνα 9 : Παράδειγμα αρχείου PED.

### Δημιουργία αρχείου ανάλυσης και ένωση αρχείων αλληλούχισης

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση φαινοτύπων και γονοτύπων απαιτείται η δημιουργία ενός αρχείου, από την ένωση των δύο επιμέρους αρχείων που αντιστοιχούν σε αποτελέσματα αλληλούχισης δύο διαφορετικών plates. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση, τόσο αυξάνεται και η στατιστική δύναμη των αποτελεσμάτων, καθώς μελέτες που γίνονται σε μικρό αριθμό δειγμάτων μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα και λανθασμένες συσχετίσεις.

Τα αποτελέσματα από το 1ο plate ονομάζονται gsa1pheno και ουσιαστικά πρόκειται για δύο αρχεία (gsa1pheno.map, gsa1pheno.ped).



Τα αποτελέσματα από το 2ο plate ονομάζονται gsa2pheno και είναι επίσης δύο αρχεία (gsa2pheno.map, gsa2pheno.ped)

Το PLINK δίνει, μέσω μίας σειράς εντολών, τη δυνατότητα χειρισμού γενετικών δεδομένων και κατ'επέκταση την αναδιάταξη, αποκωδικοποίηση και συγχώνευση τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι:

```
plink - - file gsa1pheno - -merge gsa2pheno.ped gsa2pheno.map - - recode - - out merged
```

Με τη συγκεκριμένη εντολή το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα του αρχείου gsa1pheno (.map, .ped) και τα ενώνει (- - merge) με τα δεδομένα των αρχείων gsa2pheno (.map, .ped). Η εντολή - - recode - - out απαιτείται ώστε το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εντολή merge να κωδικοποιηθεί σε ένα νέο αρχείο, το GSA3 (.map, .ped).

## Quality control

Ο στόχος των αναλύσεων συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος, είναι να ταυτοποιηθούν SNPs που εμπλέκονται στην εμφάνιση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου. Ένας καθοριστικός παράγοντας όμως, που μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των αποτελεσμάτων, είναι η ποιότητα των δεδομένων. Για να είναι τα αποτελέσματα αξιόπιστα και να μην προκύψουν ψευδώς θετικές ή ψευδώς αρνητικές συσχετίσεις, πρέπει πριν την ανάλυση να πραγματοποιηθεί το στάδιο του quality control για απομακρυνθούν τα μη αξιόπιστα δείγματα και SNPs. Η κακή ποιότητα των δεδομένων μπορεί να οφείλεται σε κακή ποιότητα δειγμάτων DNA, σε λάθη κατά το χειρισμό των δειγμάτων, σε λάθη κατά την αλληλούχιση και πιθανόν σε λάθη λόγω μη σωστής υβριδοποίησης κ.α. (Marees et al., 2017).

Κατά το πρώτο στάδιο του quality control απομακρύνονται τα SNPs που δεν έχουν αλληλουχηθεί σωστά στα περισσότερα δείγματα, διότι δεν αποτελούν αξιόπιστους δείκτες για την ανάλυση. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα SNPs στην περαιτέρω ανάλυση θα πρέπει να υπάρχουν αποτελέσματα γονοτύπησης για αυτά σε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα. Η εντολή που χρησιμοποιείται σε αυτή την περίπτωση είναι η:

```
plink - - geno 0.01
```

Η συγκεκριμένη εντολή κρατάει μόνο τα SNPs με 99% genotyping rate, δηλαδή αυτά τα οποία έχουν αλληλουχηθεί στο 99% των δειγμάτων. Τα SNPs που δεν πληρούν αυτό το κριτήριο αφαιρούνται. Η μη αλληλούχιση των SNPs μπορεί να οφείλεται σε αστοχία της πλατφόρμας αλληλούχισης, όπως είναι η μη σωστή υβριδοποίηση του DNA ή άλλες βλάβες που σχετίζονται με τον εξοπλισμό. Ο αριθμός 0.01 είναι το threshold.

Στο επόμενο στάδιο του quality control χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - mind 0.01
```

Η συγκεκριμένη εντολή αφαιρεί δείγματα τα οποία εμφανίζουν χαμηλό ποσοστό επιτυχίας της αλληλούχισης. Συγκεκριμένα, αφαιρεί δείγματα για τα οποία λείπει ποσοστό μεγαλύτερο του 1% του συνόλου των SNPs που έχουν αλληλουχηθεί. Η μη αλληλούχιση μπορεί να οφείλεται σε κακή ποιότητα δείγματος DNA ή λάθη κατά το χειρισμό του δείγματος. Ο αριθμός 0.01 είναι επίσης το threshold.

Τέλος, χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - maf 0.05
```

Η συγκεκριμένη εντολή διατηρεί στην ανάλυση μόνο SNPs με minor allele frequency, δηλαδή συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου,  $\geq 0.05$ . Ουσιαστικά με αυτή την εντολή αφαιρούνται τα πολύ σπάνια αλληλόμορφα για τα οποία η στατιστική δύναμη είναι πολύ χαμηλή και απαιτείται τεράστιος αριθμός δειγμάτων για να γίνει σωστή συσχέτισή τους. Επομένως μελέτες με πολύ μεγάλο αριθμό δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιήσουν χαμηλότερο maf threshold. Εφόσον όμως ο αριθμός δειγμάτων στην ανάλυση είναι μικρός, επιλέγεται το τυπικό threshold 0.05. Ακόμη, είναι σημαντικό να αφαιρεθούν τα σπάνια αλληλόμορφα επειδή είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε λάθη αλληλούχισης, ιδιαίτερα αν δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός δειγμάτων ώστε να γίνει επαλήθευση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στα πλαίσια του quality control, μπορεί να πραγματοποιηθεί και ένα ακόμη στάδιο στο οποίο ελέγχεται ότι όλα τα δείγματα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό. Στην περίπτωση που συμπεριληφθούν στην ανάλυση δείγματα που προέρχονται από πολύ διαφορετικούς πληθυσμούς, π.χ. Ευρωπαίοι και Αφρικανοί, θα προκύψουν ψευδείς συσχετίσεις που οφείλονται στη διαφορετική καταγωγή και όχι σε πραγματική συσχέτιση με την ασθένεια (Turner et al., 2011). Στην παρούσα εργασία ωστόσο, το στάδιο αυτό παραλήφθηκε καθώς ήταν γνωστό ότι όλα τα δείγματα προέρχονταν από τον Ελληνικό πληθυσμό.

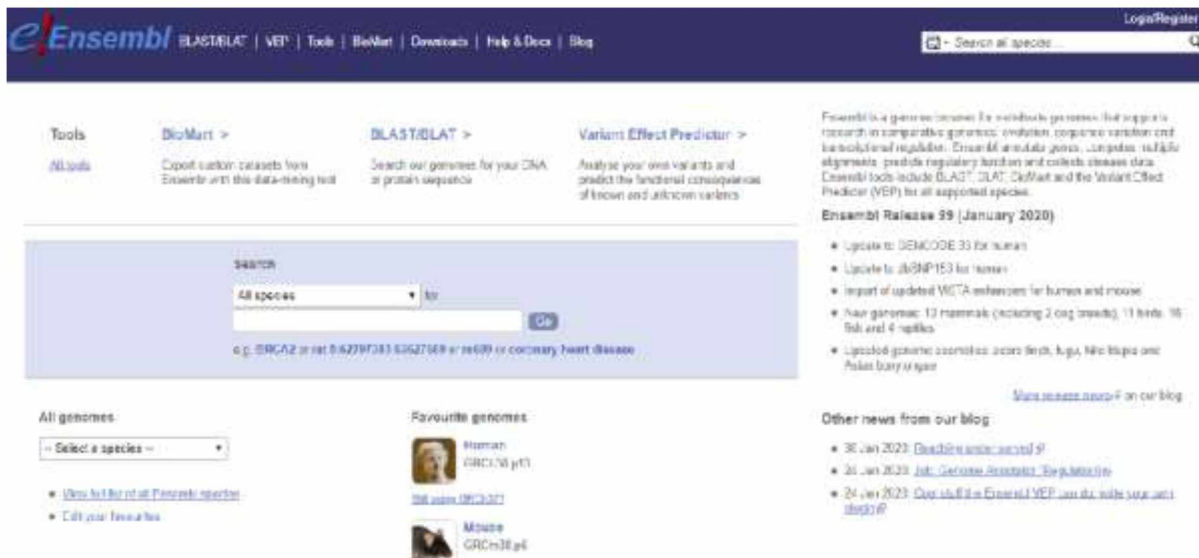
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, προκειμένου να πραγματοποιηθεί quality control στα δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε η εξής εντολή:

```
plink - - file merged - -geno 0.01 - - mind 0.01 - - maf 0.05 - -tab - -recode - -out GSAQC
```

Πρόκειται ουσιαστικά για παράθεση των εντολών που αναφέρθηκαν παραπάνω σε μία και μόνο εντολή για εξοικονόμηση χρόνου και πιο εύκολη διαχείριση των αποτελεσμάτων, ώστε να μην απαιτείται και πάλι ένωση των αρχείων που θα προέκυπταν από κάθε στάδιο του quality control. Ως αρχείο ανάλυσης ορίστηκε το merged και τα αποτελέσματα της ανάλυσης κωδικοποιήθηκαν στο αρχείο GSAQC. Τα thresholds που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις εντολές είναι αρκετά αυστηρά καθώς ο αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλος άρα απαιτείται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αυστηρότητα προκειμένου να μην προκύψουν λανθασμένες συσχετίσεις.

## Βάσεις δεδομένων

Για την επιλογή των κατάλληλων SNPs ,που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα, για την περαιτέρω ανάλυση τους αλλά και για την εύρεση προσθέτων χρήσιμων πληροφοριών, αξιοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Ensembl (Εικόνα) και Snp nexus (Εικόνα).



Εικόνα 10 : Η βάση δεδομένων Ensembl.

Η Ensembl είναι μια βάση δεδομένων για την ανάκτηση γονιδιωματικών πληροφοριών και αποτελεί μια μηχανή αναζήτησης για γονιδιώματα διάφορων οργανισμών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται για την εύρεση πληροφοριών για συγκεκριμένα SNPs, άρα παρέχονται πληροφορίες για τη θέση τους, τους συσχετιζόμενους φαινοτύπους και τα ποσοστά μετάλλαξης τους σε διάφορους πληθυσμούς. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το γονιδίωμα αναφοράς GRCh37.

Εικόνα 11 : Η βάση δεδομένων SNP nexus

Η SNP nexus παρέχει πληροφορίες για SNPs, συνδυάζοντας δεδομένα από διαφορετικές πηγές πραγματοποιώντας μεταξύ άλλων και Annotation. Πιο συγκεκριμένα, η βάση δεδομένων προσφέρει πληροφορίες που αφορούν την επίδραση του SNP σε επίπεδο μεταγράφου ή πρωτεϊνικό επίπεδο, δεδομένα HarMap, βιβλιογραφία που συσχετίζει τους πολυμορφισμούς με συγκεκριμένο φαινότυπο ή ασθένεια, επίπεδα συντήρησης της περιοχής του γονιδιώματος μεταξύ διαφορετικών οργανισμών αλλά και πληροφορίες που αφορούν την πιθανή επίδραση του SNP στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της παροχής δεδομένων που αφορούν ανίχνευση υποκινητών, ενισχυτών και άλλων ρυθμιστικών στοιχείων.

Η ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων είναι <https://snp-nexus.org/> και η αναζήτηση γίνεται από την υποενότητα Query Options επιλέγοντας μεμονωμένη αναζήτηση κάθε SNP (Single Query) ή μαζική (Batch Query). Για να γίνει η αναζήτηση, τα δεδομένα που θα εισαχθούν θα πρέπει να είναι της μορφής dbSNP rs#. Στη συνέχεια, από την υποενότητα Annotation categories επιλέγεται

η έκδοση γονιδιώματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά και ορίζονται οι διάφοροι παράμετροι που θέλει να αναζητήσει ο χρήστης. Για την έναρξη της αναζήτησης χρησιμοποιείται η επιλογή RUN.

Στη συγκεκριμένη ανάλυση επιλέχθηκε η έκδοση GRCh37/hg19 και η παράμετρος Genetic Association of Complex Diseases and Disorders (GAD) από την ενότητα Phenotype and Disease Association. Η συγκεκριμένη έκδοση (GRCh37/hg19) επιλέχθηκε επειδή τα plates γονοτυπήθηκαν σε αυτό το assembly της Ensembl ενώ η υποενότητα Regulatory elements χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστεί αν κάποιο από τα SNPs επιδρά στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων.

Έγινε δηλαδή αναζήτηση ώστε να εντοπιστούν SNPs που βρίσκονται στα γονίδια ενδιαφέροντος αλλά και για την ανάδειξη συσχετίσεων των SNPs με ανδρική υπογονιμότητα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε ξεχωριστή σελίδα χωρισμένα σε υποενότητες ώστε να είναι πιο εύκολη η πλοήγηση σε αυτά.

### **Εξαγωγή SNPs**

Αρχικά έγινε εξαγωγή των SNPs που βρίσκονται στο γονίδιο CFTR. Πιο συγκεκριμένα, αυτό έγινε μέσω αναζήτησης της θέσης του γονιδίου CFTR στην βάση δεδομένων Ensembl και στην συνέχεια εξαγωγή των SNPs που βρίσκονται στη θέση αυτή μέσω του PLINK.

Για το γονίδιο CFTR έγινε αναζήτηση στην Ensembl και το αποτέλεσμα ήταν το εξής

## Gene: CFTR ENSG0000001626

Description	CF transmembrane conductance regulator [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18846]
Gene Synonyms	ABC35, ABCC7, CF, CFTR/MRP, MRP7, TNR-CFTR, dJ750C5.1
Location	<a href="#">Chromosome 7: 117,287,120-117,715,971</a> forward strand GRCh38:CM000669.2
About this gene	This gene has 20 transcripts ( <a href="#">splice variants</a> ), 256 orthologues, 11 paralogues, is a member of 1 <a href="#">Ensembl protein family</a> and is associated with 10 phenotypes
Transcripts	<a href="#">Show transcript table</a>

## Summary ⓘ

Name	<a href="#">CFTR</a> (HGNC Symbol)
CCDS	This gene is a member of the Human CCDS set: <a href="#">CCDS5773.1</a>
UniProtKB	This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: <a href="#">P13559</a>
RefSeq	This Ensembl/Gencode gene contains transcript(s) for which we have <a href="#">selected identical RefSeq transcripts</a> . If there are other RefSeq transcripts available they will be in the <a href="#">External references</a> table
LRG	<a href="#">LRG_653</a> provides a stable genomic reference framework for describing sequence variants for this gene
Ensembl version	ENSG0000001626.16
Other assemblies	This gene maps to <a href="#">116,927,174-117,356,025</a> in GRCh37 coordinates. View this locus in the GRCh37 archive: <a href="#">ENSG0000001626</a>
Gene type	Protein coding

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 και εκτείνεται από τη βάση 116.927.184 μέχρι την βάση 117.356.025. Άρα έχει μήκος 428.871 βάσεις.

Η εξαγωγή των SNPs έγινε με την εξής εντολή :

```
--file GSA3ultimate --chr 3 --from-bp 116927184 --to-bp 117356025 --write-snpList --out CFTR
```

Άρα λοιπόν επιλέχθηκε το αρχείο GSA3ultimate και εξάχθηκαν τα SNPs από την θέση 116.927.184 μέχρι την θέση 117356025 και εισάχθηκαν σε ένα νέο αρχείο Snplist (το οποίο περιέχει μόνο τα rs# των SNPs) με όνομα CFTR.SNPLIST

Τα SNPs του αρχείου αυτού αναλύθηκαν με τη βοήθεια του SNP nexus για την επιλογή των πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα και τα τελικά αποτελέσματα αφορούν τα 9 παρακάτω SNPs :

SNPs
rs756665
rs213950
rs17450482
rs2299445
GSA-rs73215927

rs213987
rs11764070
rs17452984
GSA-rs4730797

Έπειτα συλλέχθηκαν κάποιες επιπλέον πληροφορίες για τα παραπάνω SNPs μέσω της Ensembl, σχετικές με τις πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων του SNP αυτού. Παρακάτω φαίνονται κάποιες επιπλέον πληροφορίες για το SNP rs756665.

### rs756665 SNP

Most severe consequence

**intron variant** [See all predicted consequences](#)

Alleles

A/C | Ancestral: C | MAF: 0.43 (A) | Highest population MAF: 0.50

Change tolerance

CADD: C:1.054 | GERP: -3.87

Το SNP αυτό κατηγοριοποιείται ως ιντρονική μετάλλαξη και η θέση του είναι στο χρωμόσωμα 7 στη θέση 117.488.938.

Αντίστοιχα, τα είδη των μεταλλάξεων με βάση την Ensembl για τα υπόλοιπα SNPs καταγράφονται παρακάτω :

SNPs	Είδος μετάλλαξης
rs756665	Ιντρονική μετάλλαξη
rs213950	Παρανοηματική μετάλλαξη
rs17450482	Ιντρονική μετάλλαξη
rs2299445	Ιντρονική μετάλλαξη
GSA-rs73215927	Ιντρονική μετάλλαξη
rs213987	Ιντρονική μετάλλαξη
rs11764070	Ιντρονική μετάλλαξη
rs17452984	Ιντρονική μετάλλαξη
GSA-rs4730797	Ιντρονική μετάλλαξη

Εικόνα : Κατηγοριοποίηση των σχετιζόμενων με ανδρική υπογονιμότητα SNPs στο γονίδιο CFTR. Οι ιντρονικές μεταλλάξεις ευρίσκονται στα ιντρόνια ενώ ως παρανοηματικές μεταλλάξεις θεωρούνται εκείνες που οδηγούν στην αλλαγή ενός αμινοξέος, χωρίς όμως να αλλάζει το μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας.

## Εύρεση γονότυπου

Για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των συγκεκριμένων SNPs στον φαινότυπο, πρέπει να γίνει εξαγωγή των συγκεκριμένων 9 SNPs από το αρχείο GSA3ultimate, το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες όλων των γονοτυπημένων SNPs για όλα τα άτομα. Αυτό έγινε μέσω του PLINK με την παρακάτω εντολή :

```
--file GSA3ultimate --extract CFTR.txt --tab --recode --out CFTRfinal
```

Με την παραπάνω εντολή, δημιουργείται ένα αρχείο .PED το οποίο περιέχει πληροφορίες για τα άτομα στα οποία έχει γίνει η γονοτύπηση. Οι πληροφορίες που περιέχονται αφορούν το φύλο του ατόμου, το διαχωρισμό σε case ή control και τελικά τον γονότυπο του ατόμου για κάθε ένα από τα 9 SNPs του CFTR που σχετίζονται με ανδρική υπογονιμότητα.

Ακολούθησε ανάλυση των παραπάνω δεδομένων ως προς :

- i) Τα ποσοστά μετάλλαξης του κάθε επιμέρους SNP στα δείγματα που έχουν γονοτυπηθεί και,
- ii) Τα ποσοστά μετάλλαξης των SNPs σε κάθε άτομο

Και για τις δύο προαναφερθείσες αναλύσεις χρειάστηκε πρώτα να προσδιοριστούν τόσο οι γονότυποι αγρίου τύπου όσο και οι μεταλλαγμένοι έτσι ώστε στη συνέχεια να προσδιοριστούν τα ζητούμενα ποσοστά μετάλλαξης. Τα δεδομένα αυτά βρέθηκαν μέσω της Ensembl ως εξής :

### rs756665 SNP

Most severe consequence

**I** intron variant | See all predicted consequences

Alleles

A/C | Ancestral: C | MAF: 0.43 (A) | Highest population MAF: 0.50

Εικόνα : Γονότυπος αγρίου τύπου(ancestral) και οι παραλλαγές για τον πολυμορφισμό rs 756665 όπως καταγράφονται στη βάση δεδομένων Ensembl.

Γίνεται αναζήτηση του SNP μέσω του rs# του στην Ensembl, στην οποία αναγράφεται ο γονότυπος αγρίου τύπου (ancestral) , ο οποίος στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι κυτοσίνη (C)



για το SNP rs756665 και τα πιθανά αλληλόμορφα του, που στην περίπτωση αυτή είναι είτε αδενίνη (A) είτε κυτοσίνη (C).

Στην περίπτωση του rs756665, οι γονότυποι που υπάρχουν στα γονοτυπημένα άτομα σύμφωνα με το αρχείο CFTRfinal είναι CC, AC και AA και άρα ως ομόζυγα για τον γονότυπο αγρίου τύπου θεωρούνται τα άτομα με γονότυπο CC, ως ετερόζυγα για το μεταλλαγμένο γονότυπο θεωρούνται τα άτομα με γονότυπο AC, ενώ ως ομόζυγα για τον μεταλλαγμένο φαινότυπο θεωρούνται τα άτομα με γονότυπο.

Ομοίως γίνεται αναζήτηση στην Ensembl και για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς, εύρεση του γονότυπου αγρίου τύπου όπως και των μεταλλαγμένων και στη συνέχεια διαχωρισμός των ατόμων σε εκείνα που είναι ομόζυγα για τον γονότυπο αγρίου τύπου και σε εκείνα που είναι ομόζυγα ή ετερόζυγα για τον μεταλλαγμένο γονότυπο.

### **Υπολογισμός ποσοστών**

Για τον υπολογισμό των ποσοστών των μεταλλάξεων των SNPs σε όλα τα γονοτυπημένα άτομα έγινε μέτρηση των τριών πιθανών γονότυπων και κατηγοριοποίηση τους σε

A) γονότυπους ομόζυγους για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και

B) γονότυπους ομόζυγους ή ετερόζυγους για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο

Οι ποσότητες αυτές διαιρέθηκαν με το 248, καθώς αυτός είναι ο αριθμός των ατόμων, και τα αποτελέσματα των διαιρέσεων αυτών πολλαπλασιάστηκαν με το 100 για να βρεθεί το τελικό ποσοστό επί τις εκατό.

Για τον πολυμορφισμό rs4730797 οι ποσότητες διαιρέθηκαν με το 247, καθώς δεν συμπεριλήφθηκε ο γονότυπος ενός ατόμου λόγω αδυναμία εύρεσης (ανεπαρκής αποτελεσματικότητα αλληλούχισης) και στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των διαιρέσεων πολλαπλασιάστηκαν με το 100 για να βρεθεί το ποσοστό επί τις 100.

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα :

	rs756665	rs213950	rs17450482	rs2299445	rs73215927
ancestral genotype frequency	17%	17%	81%	85%	89%
total mutation frequency	83%	83%	19%	15%	11%
heterozygous mutation frequency	52%	51%	17%	15%	11%
homozygous mutation frequency	31%	32%	2%	0%	0%

	rs213987	rs11764070	rs17452984
ancestral genotype frequency	11%	8%	48%
total mutation frequency	89%	92%	52%
heterozygous mutation frequency	40%	30%	42%
homozygous mutation frequency	49%	62%	10%

Για τον πολυμορφισμό rs4730797 όπου οι υπολογισμοί έγιναν σε σύνολο 247 ατόμων τα ποσοστά είναι τα εξής :

	rs4730797
ancestral genotype frequency	8%
total mutation frequency	92%
heterozygous mutation frequency	34%
homozygous mutation frequency	58%

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δείγματα από 248 άτομα τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν σε control και cases με βάση την εξέταση σπερμοδιαγράμματος που προηγήθηκε.

Εφόσον υφίσταται παρουσία σπέρματοζωαρίων στο σπερμοδιάγραμμα (δηλαδή δεν είναι κάποια περίπτωση αζωοσπερμίας), τα δείγματα αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τρεις παράγοντες :

α) τον αριθμό των σπέρματοζωαρίων, όπου τα δείγματα με αριθμό μικρότερο του φυσιολογικού χαρακτηρίστηκαν ως ολιγοσπερμικά

β) την κινητικότητα των σπέρματοζωαρίων, όπου τα δείγματα με σπέρματοζωάρια των οποίων η κινητικότητα ήταν μικρότερη της φυσιολογικής, χαρακτηρίστηκαν ως ασθενοσπερμικά και

γ) την μορφολογία των σπέρματοζωαρίων, όπου τα δείγματα με σπέρματοζωάρια με μορφολογία διαφορετική από την φυσιολογική χαρακτηρίστηκαν ως τερατοσπερμικά.

Το κάθε δείγμα ενός ατόμου με μη φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα μπορεί να έχει οποιονδήποτε πιθανό υνδυασμό των τριών αυτών παραγόντων. Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως controls είναι εκείνα με τις φυσιολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα τους. Αντίθετα, τα άτομα με τα παθολογικά εύρηματα κατηγοριοποιήθηκαν στην ομάδα των cases. Άρα λοιπόν τα 248 άτομα διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, αυτή των controls με 134 δείγματα και εκείνη των cases με 114 δείγματα.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου γονοτύπων στις ομάδες με φυσιολογικό φαινότυπο (controls) και στις ομάδες με μεταλλαγμένο φαινότυπο (cases).

A) Συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου γονότυπων σε ομάδες control :

	rs756665	rs213950	rs17450482	rs2299445	rs73215927
total mutation frequency	81%	81%	20%	16%	10%
heterozygous mutation frequency	31%	49%	19%	16%	10%
homozygous mutation frequency	50%	32%	1%	0%	0%
ancestral genotype frequency	19%	19%	80%	84%	90%

	rs213987	rs11764070	rs17452984
total mutation frequency	88%	91%	49%
heterozygous mutation frequency	40%	28%	38%
homozygous mutation frequency	48%	63%	11%
ancestral genotype frequency	12%	9%	51%

Για τον πολυμορφισμό rs4730797 όπου οι υπολογισμοί έγιναν σε σύνολο 113 ατόμων τα ποσοστά είναι τα εξής :

	rs4730797
total mutation frequency	91%
heterozygous mutation frequency	31%
homozygous mutation frequency	60%
ancestral genotype frequency	9%

Άρα λοιπόν για την ομάδα των control ατόμων προκύπτουν κατά μέσο όρο οι παρακάτω τιμές :

total mutation frequency	59%
heterozygous mutation frequency	29%
homozygous mutation frequency	29%
ancestral genotype frequency	41%

B) Συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου γονότυπων σε ομάδες cases :

	rs756665	rs213950	rs17450482	rs2299445	rs73215927
total mutation frequency	85%	85%	17%	14%	11%
heterozygous mutation frequency	54%	54%	14%	14%	11%
homozygous mutation frequency	31%	31%	3%	0%	0%
ancestral genotype frequency	15%	15%	83%	86%	89%

	rs213987	rs11764070	rs17452984
total mutation frequency	89%	93%	55%
heterozygous mutation frequency	40%	33%	47%
homozygous mutation frequency	49%	60%	8%
ancestral genotype frequency	11%	7%	45%

Για τον πολυμορφισμό rs4730797 όπου οι υπολογισμοί έγιναν σε σύνολο 113 ατόμων τα ποσοστά είναι τα εξής :

	rs4730797
total mutation frequency	93%
heterozygous mutation frequency	38%
homozygous mutation frequency	55%
ancestral genotype frequency	7%

### **Σύγκριση δεδομένων διαφορετικών πληθυσμών**

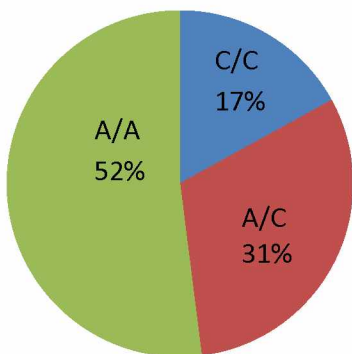
Στο τελευταίο στάδιο ανάλυσης συλλέχθηκαν τα δεδομένα που παρατίθενται στη βάση δεδομένων Ensembl σχετικά με τα ποσοστά γονοτύπων στα SNPs του γονιδίου CFTR. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των ευρωπαϊκών πληθυσμών καθώς και τα συνδυαστικά δεδομένα όλων των πληθυσμών (African , American , East Asian, South Asian, European).

Τα δεδομένα αυτά προέρχονται από το 1000 Genomes Project του IGSR (2008-2015) το οποίο δημιούργησε τον μεγαλύτερο δημόσιο κατάλογο ανθρωπίνων γενετικών παραλλαγών και γενετικών δεδομένων. Τα δεδομένα δίνονται ως ποσοστά για τα διαφορετικά αλληλόμορφα (πχ 40%, A 60% T) και ως ποσοστά των διαφορετικών γονοτύπων (πχ A/A 20% A/T 30% T/T 50%).

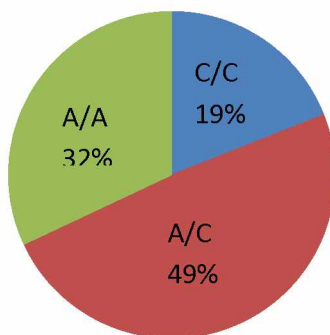
Στην παρούσα ανάλυση έγινε χρήση των ποσοστών γονοτύπων και τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.



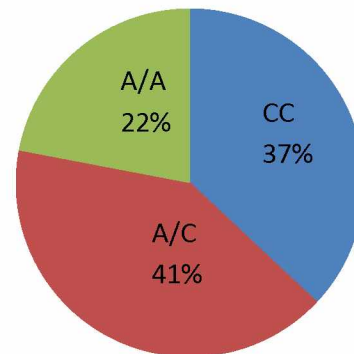
1. **rs756665** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : C, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



Γράφημα 1α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

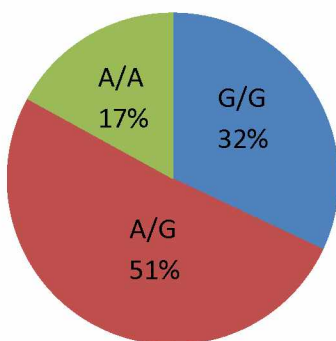


Γράφημα 1β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

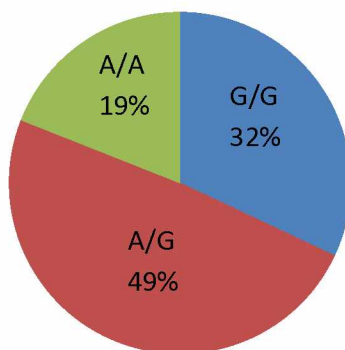


Γράφημα 1γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

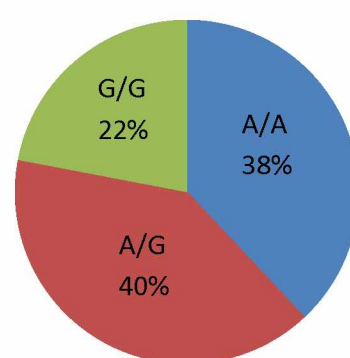
2. **rs213950** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : A, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



Γράφημα 2α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

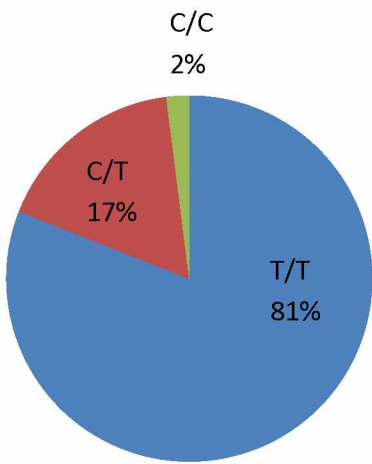


Γράφημα 2β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

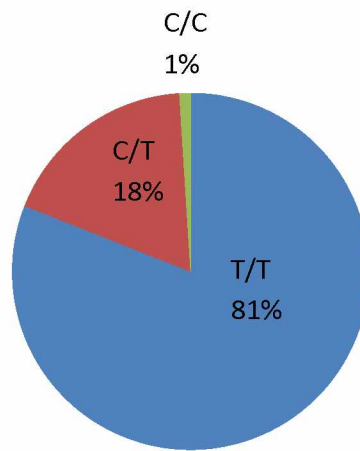


Γράφημα 2γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

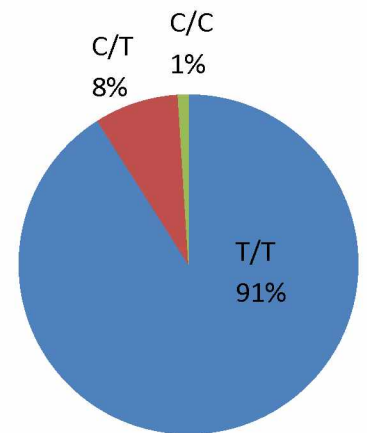
3. **rs17450482** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



Γράφημα 3α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

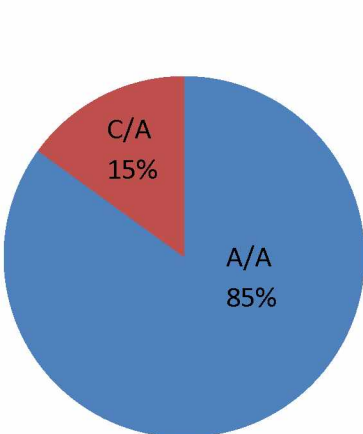


Γράφημα 3β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

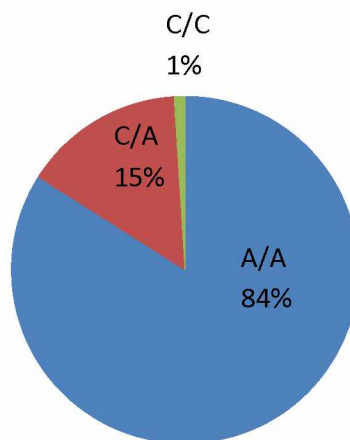


Γράφημα 2γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

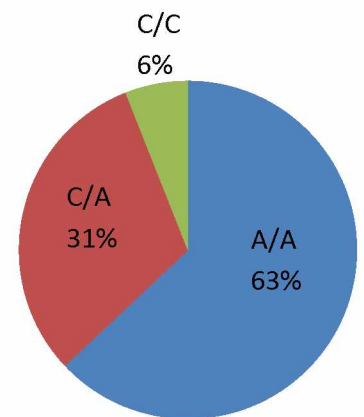
4. **rs2299445** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : A, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



Γράφημα 4α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού



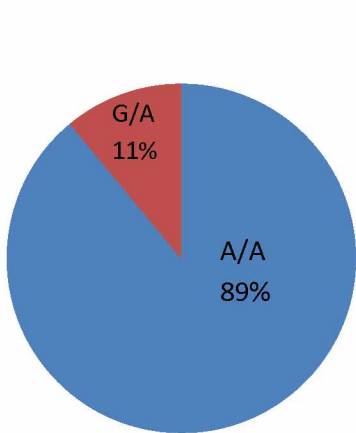
Γράφημα 4β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών



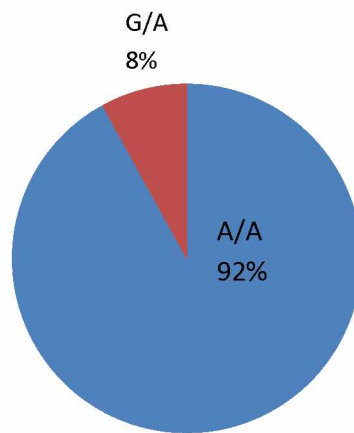
Γράφημα 4γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

\

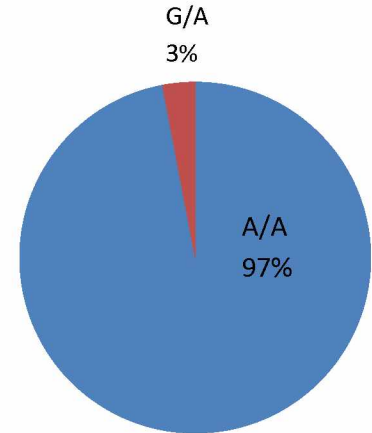
5. **rs73215927** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : A, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



Γράφημα 5α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

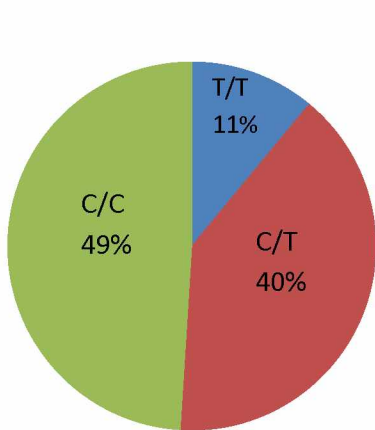


Γράφημα 5β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

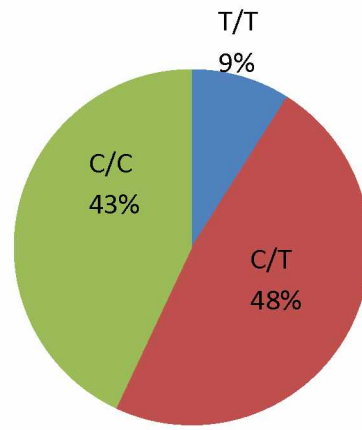


Γράφημα 5γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

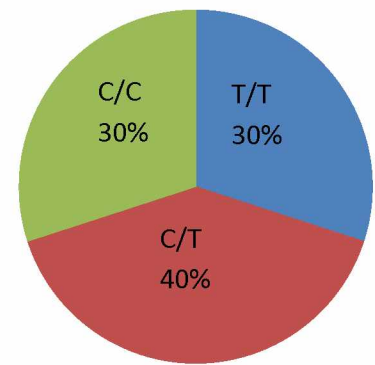
6. **rs213987** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



Γράφημα 6α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

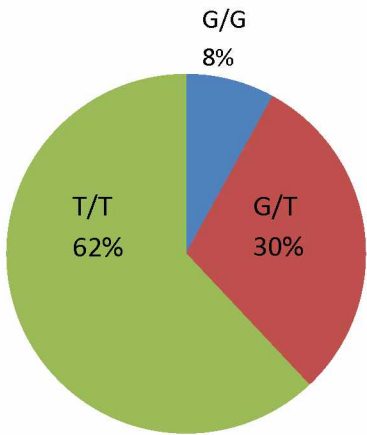


Γράφημα 6β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

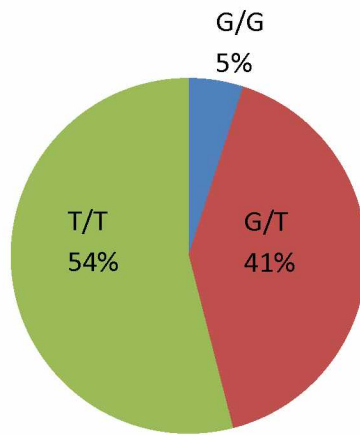


Γράφημα 6γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

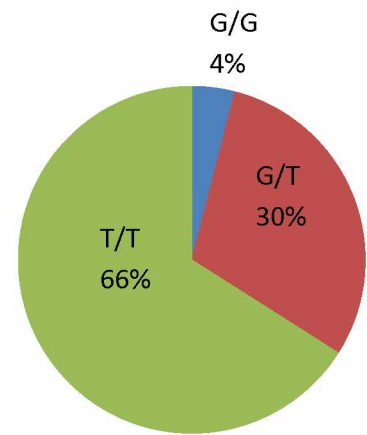
7. **rs11764070** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : G, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T



Γράφημα 7α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

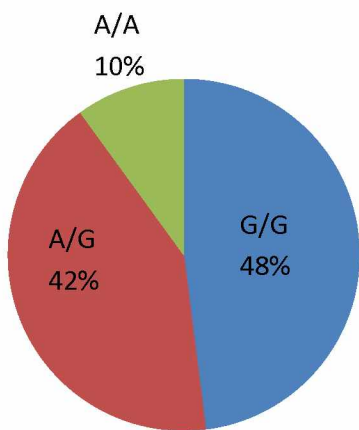


Γράφημα 7β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

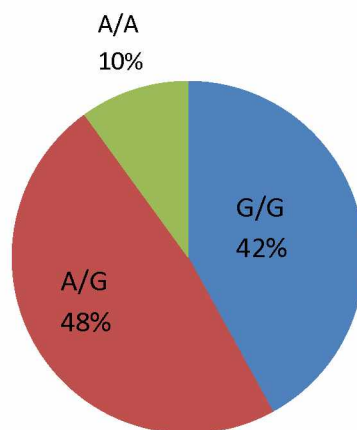


Γράφημα 7γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

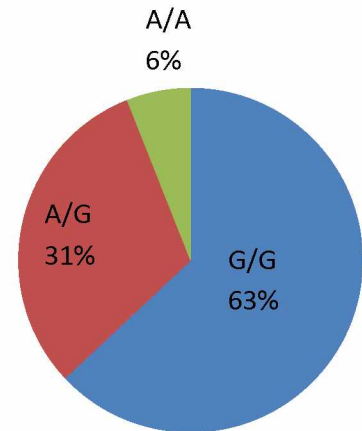
8. **rs17452984** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : G, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



Γράφημα 8α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού

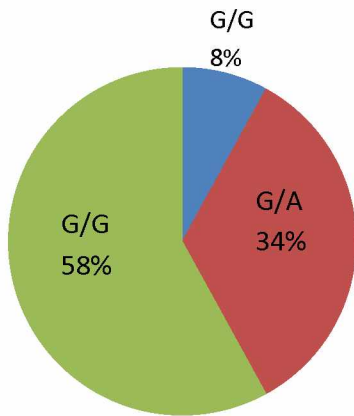


Γράφημα 8β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

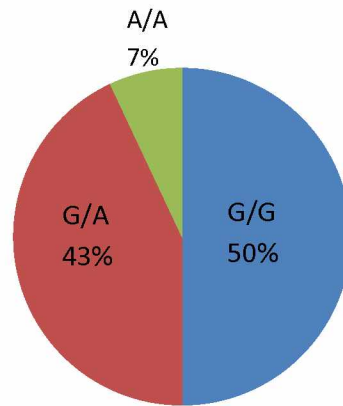


Γράφημα 8γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

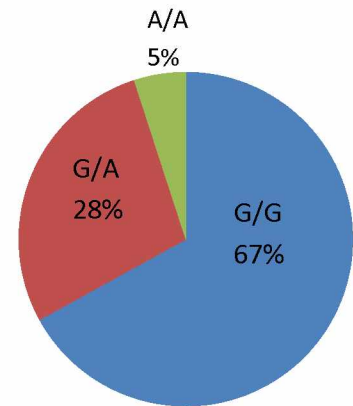
9. **rs4730797** αλληλόμορφο αγρίου τύπου : G, μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



Γράφημα 9α : Δεδομένα του ελληνικού πληθυσμού



Γράφημα 9β : Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών



Γράφημα 9γ : Δεδομένα όλων των πληθυσμών

## Συζήτηση

Η υπογονιμότητα ορίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμός Υγείας (WHO) ως η ανικανότητα ενός σεξουαλικά ενεργού ζευγαριού να επιτύχει εγκυμοσύνη, έπειτα από ένα έτος μη προστατευμένης συνουσίας. Η υπογονιμότητα επηρεάζει 70 εκατομμύρια ανθρώπους καθώς και το 9% των ζευγαριών παγκοσμίως ενώ στο 50% των άτεκνων ζευγαριών, συναντάται ένας παράγοντας που συνδέεται με τη ανδρική υπογονιμότητα μαζί με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος. Σημαντικός παράγοντας εμφάνισης της υπογονιμότητας στους άνδρες, μεταξύ άλλων, αποτελούν οι γονιδιακές μεταλλάξεις.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των πολυμορφισμών δύο γονιδίων που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα. Η διερεύνηση έγινε σε ένα σύνολο 248 δειγμάτων του ελληνικού πληθυσμού τα οποία συλλέχθηκαν μέσω του προγράμματος Spermogene με τελικό σκοπό τη μελέτη των γενετικών παραγόντων της ανδρικής υπογονιμότητας και το σχεδιασμό εξειδικευμένων διαγνωστικών μέσων .

Το πρώτο γονίδιο που μελετήθηκε είναι το ADGRG2 το οποίο κωδικοποιεί για έναν GPCR υποδοχέα με τοπολογία στην επιδιδυμίδα, ο οποίος εμπλέκεται στην συγγενή αμφοτερόπλευρη απουσία σπερματικών πόρων (CBAVD) και κατ'επέκταση στην ανδρική υπογονιμότητα. Παρ'όλα αυτά, στο σύνολο το δειγμάτων που μελετήθηκαν, δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού και άρα αποκλείεται από το σύνολο των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων που απορρέουν. Είναι όμως σημαντικό να διεξαχθούν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας, για την διεξαγωγή ασφαλέστερων και σαφέστερων συμπερασμάτων για την εμπλοκή του γονιδίου αυτού στην ανδρική υπογονιμότητα, στον ελληνικό πληθυσμό,

Το δεύτερο γονίδιο, του οποίου οι πολυμορφισμοί διερευνήθηκαν, είναι το γονίδιο του ρυθμιστή διαμεμβρανικής αγωγιμότητας στην κυστική ίνωση (CFTR) το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη CFTR η οποία είναι ένα κανάλι ιόντων χλωρίου, στη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων πολλών οργάνων. Μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR εμπλέκονται σε διάφορες διαταραχές που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα. Σ'αυτές ανήκουν η συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (CBAVD) και η συγγενής μονόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (CUAVD).

Χρησιμοποιήθηκαν 248 δείγματα, τα οποία γονοτυπήθηκαν με το Infinium Global Screening Array της Illumina. Στη συνέχεια, με χρήση των κατάλληλων βιοπληροφορικών μεθόδων, τα

δείγματα αναλύθηκαν για τον εντοπισμό πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα και απομονώθηκαν οι γονότυποι των πολυμορφισμών αυτών. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν τρεις αναλύσεις :

1. Ανάλυση των ποσοστών των μεταλλάξεων των SNPs σε όλα τα γονοτυπημένα άτομα ανεξάρτητα από τον φαινότυπο τους, σύμφωνα με την εξέταση σπερμοδιαγράμματος που προηγήθηκε.
2. Ανάλυση των ποσοστών των SNPs ξεχωριστά, τόσο στις ομάδες με φυσιολογικό φαινότυπο (controls) αλλά και στις ομάδες με τον μεταλλαγμένο φαινότυπο (cases).
3. Σύγκριση των συνολικών συχνοτήτων μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR στα δείγματα του εργαστήριου (δείγματα ελληνικού πληθυσμού) με τις συχνότητες μετάλλαξης σε άλλους πληθυσμούς.

Από την πρώτη ανάλυση και εξετάζοντας τα ποσοστά μεταλλάξεων των SNPs σε όλα τα γονοτυπημένα άτομα, φαίνεται ότι υπάρχει μια διαφοροποίηση στις συχνότητες εντοπισμού μεταλλάξεων, των εννέα πολυμορφισμών που εξετάστηκαν. Σε αυτή την περίπτωση όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι ένα συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο επηρεάζει την πιθανότητα εμφάνισης της υπογονιμότητας, διότι αφενός η υπογονιμότητα δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ή όχι ενός μεταλλαγμένου νουκλεοτιδίου αλλά είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλάξεων και αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων. Αφετέρου ακόμα και αν η ύπαρξη ενός συγκεκριμένου μεταλλαγμένου νουκλεοτιδίου είναι ικανή να προκαλέσει την εμφάνιση ασθένειας, δεν σημαίνει ότι η κληρονόμηση του θα υποδεικνύει με τη σειρά της την εμφάνιση ασθένειας.

Από τη δεύτερη ανάλυση προέκυψε ότι το ποσοστό της εμφάνισης μεταλλαγμένου γονότυπου μεταξύ των δειγμάτων ήταν 60% ενώ έπειτα από σύγκριση με τον φαινότυπο παρατηρήθηκε ότι το 59% των δειγμάτων με μεταλλαγμένο γονότυπο παρουσίαζε φυσιολογικό φαινότυπο. Άρα λοιπόν, παρά την ύπαρξη φυσιολογικού φαινότυπου υπάρχει κάποιο γενετικό υπόβαθρο για εμφάνιση υπογονιμότητας. Σε κάποιες περιπτώσεις, διάφοροι παράγοντες ή άλλες μεταλλάξεις που μπορεί να δρουν συνεργιστικά με τους προαναφερθέντες πολυμορφισμούς, μπορούν να δημιουργήσουν το κατάλληλο υπόβαθρο για την εμφάνιση διαταραχών υπογονιμότητας.

Τέλος, όσον αφορά την τρίτη ανάλυση, η σύγκριση των δεδομένων των δειγμάτων του ελληνικού πληθυσμού με άλλους, μπορεί αφενός να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον αντίκτυπο που

έχει ο αριθμός των μεταλλάξεων κάθε SNP στον ελληνικό πληθυσμό. Αφετέρου μπορεί να χρησιμεύσει για τη σύγκριση των ποσοστών μετάλλαξης του ελληνικού πληθυσμού σε σχέση με τους υπολοίπους πληθυσμούς και για τη σύγκριση των ποσοστών εμφάνισης της ανδρικής υπογονιμότητας στον ελληνικό πληθυσμό σε σχέση με άλλους πληθυσμούς.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτουν νέα ερωτήματα που πρέπει να διερευνηθούν.

Πρώτον, τα ποσοστά μεταλλάξεων με τα οποία έχουν συγκριθεί τα δεδομένα που λήφθηκαν από την βιοπληροφορική ανάλυση αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό. Όμως διαφορά μοτίβα κληρονομής μεταλλάξεων είναι πιο συντηρημένα μέσα σε έναν πληθυσμό απ' ό τι αναμεσά σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Έτσι πρέπει να ξεκαθαριστεί αν ένα άτομο έχει μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, και αυτό οδηγεί στην εκδήλωση υπογονιμότητας ή αν ένα άτομο έχει μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων επειδή αυτό συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό στον πληθυσμό στον οποίον ανήκει το άτομο.

Δεύτερον πρέπει να γίνει συσχέτιση των ειδικών παραγόντων σε κάθε πληθυσμό με τα ποσοστά μετάλλαξης στον πληθυσμό αυτό. Ειδικοί παράγοντες σε κάθε πληθυσμό όπως είναι το κλίμα, η διατροφή, το κάπνισμα, η παχυσαρκία κ.α. οι οποίοι διαφέρουν από πληθυσμό σε πληθυσμό και άρα εμπλέκονται διαφορετικά στη δημιουργία μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με την υπογονιμότητα.

Συμπερασματικά, είναι σκόπιμο να διεξαχθούν μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας και αλληλούχισης του γονιδιώματος, που να συμπεριλάβουν την επίδραση άλλων παραγόντων όπως είναι οι περιβάλλοντικοί, εθνικοί και επιγενετικοί παράγοντες, καθώς οι τελευταίοι τείνουν να συσσωρεύονται με την ηλικία. Είναι επίσης σκόπιμο να διεξαχθούν μελέτες, όπου τα άτομα θα εμφανίζουν μια συγκεκριμένη διαταραχή υπογονιμότητας για την διεξαγωγή ασφαλέστερων και σαφέστερων συμπερασμάτων.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. Jungwirth , T. Diemer , Z. Kopa, C. Krausz, S. Minhas, H. Tournaye. (2018) "European Association of Urology: Guidelines On Male Infertility "
- Dabaja Ali A., Schlegel Peter N. (2013) Medical treatment of male infertility, *Translational Andrology and Urology*, 2014;3(1):9-16
- Délot EC and Vilain EJ (2015) Nonsyndromic 46,XX Testicular Disorders of Sex Development, *GeneReviews U.S. National Library of Medicine*
- Dimitriadis F., Adonakis G., Kaponis A., Mamoulakis C, Takenaka A., Sofikitis N., Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility (2017) Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility, *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction* pp 1-47
- D. A. S. de Souza, F. R. Faucz, L. Pereira-Ferrari, V. S. Sotomaior and S. Raskin, (2018) Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling, *Andrology* 6(1): 127–135.
- Elborn J.S (2016) Cystic fibrosis, *The lancet* 388, 2519-2531
- Fainberg J and Kashanian JA.(2019) Recent advances in understanding and managing male infertility [version 1; peer review: 3] *F1000Research* , 8(F1000 Faculty Rev):670
- Faraj K, Dave C, Bennett RC, Vakharia P (2016) Male Infertility: Practice Essentials, *Medscape* <http://tinyurl.com/jp4vsyv>
- Fawzy F, Hussein A, Mahmoud Eid M, Ahmed Mahmoud A, Kashash A, and Salem HK (2015) Cryptorchidism and Fertility, *Clinical Medical Insights: Reproductive Health* 9: 39–43.
- Gajbhiye, R., & Gaikwad, A. (2017). Cystic Fibrosis, CFTR Gene, and Male Infertility. *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment, Andrologia* 32(2). 131–150.
- Guo Y. et al., (2009) Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain, *J Histochem Cytochem* 57(12) 1113-1120
- Hajder M, Hajder E and Husic A (2016) The Effects of Total Motile Sperm Count on Spontaneous Pregnancy Rate and Pregnancy After IUI Treatment in Couples with Male Factor and Unexplained Infertility. *Medical Archives: Journal of the Academy of Medical Sciences in Bosnia and Herzegovina* 70(1): 39–43
- Hongcai Cai, Xingrong Qing, Jean Damascene Niringiyumukiza, Xuxin Zhan, Dunsheng Mo, Yuanzhong Zhou and Xuejun Shang (2018) CFTR variants and renal abnormalities in males with congenital unilateral absence of the vas deferens (CUAVD): a systematic review and meta-analysis of observational studies, *GENETICS in MEDICINE*
- Huang Q., Ding W., Wei MX. (2008) Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population, *World Journal of Gastroenterology* 28;14(12):1925-30

- Jiang *et al.*,(2017) CFTR gene mutations and polymorphism are associated with nonobstructive azoospermia: From case-control study, *Gene* 626, 282-289
- Jianmin Yu, Zhanghui Chen, Ya Ni, and Zhongxiang Li, (2012) CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis , *Human Reproduction* 27(1):25-35
- Jonathan Jarow, Mark Sigman, Peter N. Kolettis, Larry R. Lipshultz, R. Dale McClure, Ajay K. Nangia, Cathy Kim Naughton, Gail S. Prins, Jay I. Sandlow, Peter N. Schlegel, Optimal Evaluation of the Infertile Male (2011) American Urological Association
- Krausz C.(2011) Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25(2):271–85.
- Leaver, R. B. (2016). Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing, British Journal of Nursing* 25(18), S35–S40. doi:10.12968/bjon.2016.25.18.s35
- Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR.(2004) Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(49):17294–9.
- Marees AT et al., (2018) A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis, *Int J Methods Psychiatr Res* 27(2):
- Mohammed SK, Jan A., (2019) *Young Syndrome*. StatPearls Publishing.
- Patat, O., Pagnin, A., Siegfried, A., Mitchell, V., Chassaing, N., Faguer, S., ... Bieth, E. (2016). Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *The American Journal of Human Genetics*, 99(2), 437–442.doi:10.1016/j.ajhg.2016.06.01
- Peeters, M. C., Fokkelman, M., Boogaard, B., Egerod, K. L., van de Water, B., IJzerman, A. P., & Schwartz, T. W. (2015). The adhesion G protein-coupled receptor G2 (ADGRG2/GPR64) constitutively activates SRE and NFκB and is involved in cell adhesion and migration. *Cellular Signalling*, 27(12), 2579–2588.
- Pizzol D, Bertoldo A and Foresta C (2014) Male infertility: biomolecular aspects, *BioMol Concepts*; 5(6): 449–456
- Quintana-Gallego E, Isabel Delgado-Pecellinc I, Calero Acuña C (2014), CFTR Protein Repair Therapy in Cystic Fibrosis, *Archivos de bronconeumologia*, 50(4):146-50
- Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL and Bush A,(2015) Cystic fibrosis *Nature Reviews Disease Primers* 14;1:15010
- Rentería et al., (2013) Using PLINK for Genome-Wide Association Studies (GWAS) and Data Analysis, *Methods Mol Biol* 1019:193-213

- Schram CA (2012) Atypical cystic fibrosis Identification in the primary care setting, *Can Fam Physician* 58(12):1341-5
- Sikka SC, Hellstrom W.JG 9(2016) Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure *Asian Journal of Andrology* 18(3):392-401
- Sokol RZ.(2009) Endocrinology of male infertility: evaluation and treatment. *Semin Reprod Med.* 27(2):149–58.
- Stacy Colaco, Deepak Mod (2018): Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility , *Reproductive Biology and Endocrinology* 16:14
- Tahmasbpour E., Balasubramanian D and Agarwal A (2014) A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART), *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31(9): 1115–1137.
- Thompson & Thompson (2011) *Ιατρική Γενετική, Εκδόσεις Πολιτεία*
- Turner S. et al., (2011) Quality Control Procedures for Genome-Wide Association Studies *Curr Protoc Hum Genet.* Unit1.19
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions., *J.Cyst.Fibros* (1):13-29
- Yang, B., Wang, J., Zhang, W., Pan, H., Li, T., Liu, B., Wang, B. (2017). Pathogenic role of ADGRG2 in CBAVD patients replicated in Chinese population. *Andrology*, 5(5), 954–957.
- Zhang, D.-L., Sun, Y.-J., Ma, M.-L., Wang, Y., Lin, H., Li, R.-R., ... Sun, J.-P. (2018). Gq activity- and  $\beta$ -arrestin-1 scaffolding-mediated ADGRG2/CFTR coupling are required for male fertility. *eLife*, 7.doi:10.7554/elife.33432
- Ζίφα Αιμιλία (2016) *Διακυτταρική Επικοινωνία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας*
- Ιωαννίδης Δ. & Χατζημουρατίδης Α, (2010) *Εγχειρίδιο Κλινικής Ουρολογίας, Εκδόσεις Ροτόντα*
- Κωνσταντίνος Παππάς, Αλεξάνδρα Πενθερουδάκη, Εμμανουήλ Φερδούτσης, Γεώργιος Μελέτης, Μαρία Κοκκινάκη, Γεώργιος Πατσουράκης, Νικόλαος Μπαχλιτζανάκης (2011) *Βρογχεκτασίες σε συγγενή νοσήματα Παθολογία, απεικόνιση, διαγνωστική προσέγγιση, ΠΝΕΥΜΩΝ Τεύχος 3ο, Τόμος 24ος*
- Μελέκος Μ., (2005) *Σύγχρονη Ουρολογία , Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης*