



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Ανάλυση πολυμορφισμών γονιδίων καθοριστικών για την
ομαλή σπερματογένεση και συσχέτιση με ανδρική
υπογονιμότητα.*

*Analysis of gene polymorphisms crucial for normal sper-
matogenesis and correlation with male infertility.*



*Διπλωματική εργασία
Παρασκευά Χαρίκλεια Χάρη*

Τριμελής Επιτροπή

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Διδάκτορας - Μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π.) του τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλλαν στην υλοποίησή της και με βοήθησαν με κάθε τρόπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ζήση Μαμούρη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος , καθώς και την βοήθεια και την καθοδήγηση του , την οποία παρείχε απλόχερα σε μένα και σε οποιόν την ζητούσε .

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Μαρκαντώνη, για την βοήθεια της στο εργαστήριο, για τις συμβουλές που μου έδωσε για την συγγραφή της εργασίας αυτής, αλλά κυρίως για το γεγονός ότι δέχτηκε να μου σταθεί ως μέντορας καθώς και σαν φίλη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου , οι οποίοι μου παρέχουν τα μέσα αλλά και το κίνητρο και τις αξίεςέτσι ώστε να μπορώ να πραγματοποιώ τους στόχους τους οποίους θέτω.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη

Abstract

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανδρική υπογονιμότητα

- 1.1. Ορισμός και γενικές πληροφορίες
- 1.2. Σπερματογένεση
- 1.3. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας
- 1.4. Μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας και προβλήματα
- 1.5. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας

2. Το Σπερμοδιάγραμμα και η γενετική πίσω από αυτό

2.1. Μορφολογία σπερματοζωαρίων

- 2.1.1. Γενικές πληροφορίες
- 2.1.2. Ρόλος του γονιδίουDPY16L2 στην ανδρική υπογονιμότητα

2.2. Κινητικότητα σπερματοζωαρίων

- 2.2.1. Γενικές πληροφορίες
- 2.2.2. Ρόλος των γονιδίων CFAP43/44 στην ανδρική υπογονιμότητα

2.3. Αριθμός σπερματοζωαρίων

- 2.3.1. Γενικές πληροφορίες
- 2.3.2. Ρόλος των γονιδίων KIT και KITLGστην ανδρική υπογονιμότητα

B. ΣΚΟΠΟΣ

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Βιολογικό υλικό

2. ΑπομονόωσηγονιδιωματικούDNA από σπέρμα
 - 2.1. Υλικά
 - 2.2. Μεθοδολογία

3. Χειρισμοίνουκλεϊκώνοξέων
 - 3.1. Εκχύλιση με φιανόλη/χλωροφόρμιο
 - 3.1.1. Μεθοδολογία
 - 3.2. Κατακρήμνισηνουκλεϊκώνοξέωνμε αιθανόλη
 - 3.2.1. Υλικά
 - 3.2.2. Μεθοδολογία

4. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA
 - 4.1. Με χρήση φασματοφωτομετρίας
 - 4.1.1. Υλικά
 - 4.1.2. Μεθοδολογία
 - 4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
 - 4.2.1. Υλικά
 - 4.2.2. Μεθοδολογία

5. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

6. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK
 - 6.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης
 - 6.2. Quality control

7. Βάσεις δεδομένων

Δ. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εξαγωγή SNPs

2. Ανάλυση συσχέτισης

3. Σύγκριση συχνοτήτων μεταξύ πληθυσμών

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περίληψη

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα που απασχολεί πολλά ζευγάρια παγκοσμίως και μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα οικονομικά, ψυχολογικά αλλά και κοινωνικά προβλήματα. Συγκεκριμένα, η υπογονιμότητα παρατηρείται στο 15% των ζευγαριών και ο ανδρικός παράγοντας συνεισφέρει στο 50% των περιπτώσεων. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή, στην οποία περιβαλλοντικοί παράγοντες, αλλά και μεγάλος αριθμός γονιδίων συνεισφέρει στην εμφάνιση του φαινοτύπου. Το σπερμοδιάγραμμα είναι η βασική μέθοδος κλινικής διερεύνησης του σπέρματος. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών του σπέρματος ερμηνεύεται ως προς τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα και μορφολογία τους. Ο αριθμός των γονιδίων που συνεισφέρουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου είναι αρκετά μεγάλος, καθώς η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη συντονισμένη δράση χιλιάδων γονιδίων. Ωστόσο, σημαντικό ρόλο παίζουν τα γονίδια που μελετήθηκαν σε αυτή την έρευνα (DPY19L2, KIT, KITLG, CFAP43 και CFAP44), τα οποία σχετίζονται με τους παράγοντες που μελετούνται στο σπερμοδιάγραμμα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) στα γονίδια που προαναφέρθηκαν, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση. Ειδικότερα, με ανάλυση συσχέτισης (association analysis) έγινε προσπάθεια εντοπισμού SNPs, με σημαντική διαφορά στη συχνότητα αλληλομόρφων, μεταξύ υγιών ατόμων και ατόμων με προβλήματα υπογονιμότητας. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των συχνοτήτων των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στον ελληνικό πληθυσμό, με τις παγκόσμιες συχνοτήτες. Δυνητικά, τα SNPs αυτά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης, που να αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό συγκεκριμένα, εάν γίνουν μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των cases και των controls.

Abstract

Infertility is a major problem that concerns many couples worldwide and can lead to a variety of economic, psychological and social problems. Specifically, infertility is observed in 15% of couples and the male factor contributes in 50% of cases. Male infertility is a multifactorial disorder, in which environmental factors and a large number of genes contribute to the appearance of phenotype. Seminogram is the basic method of clinical investigation of sperm. The analysis of sperm characteristics is interpreted in terms of sperm count, their motility and morphology. The number of genes contributing to the appearance of phenotype is quite large, as spermatogenesis is an extremely complex process that requires the coordinated action of thousands of genes. The genes studied in this research (DPY19L2, KIT, KITLG, CFAP43, and CFAP44) play an important role, which are related to the factors studied in the seminogram. In particular, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were studied in the genes mentioned above in order to establish their effect on sperm function. Semen samples from normospermic and non-Normospermic men of the Greek population were used and after genotype of DNA samples followed bioinformatics analysis. In particular, association analysis was an attempt to identify SNPs, with a significant difference in the frequency of interactions, between healthy individuals and people with infertility problems. Subsequently, the frequencies of the mutant interforms in the Greek population were compared with the global frequencies. Potentially, these SNPs could be used as diagnostic indicators, involving the Greek population in particular, if studies are carried out on a larger number of samples and statistically significant differences are found between cases and controls.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανδρική υπογονιμότητα

1.1. Ορισμός και γενικές πληροφορίες

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που ενδέχεται να αντιμετωπίζουν τα σύγχρονα ζευγάρια, τα οποία ετοιμάζονται να ξεκινήσουν τη δική τους οικογένεια, είναι αυτό της υπογονιμότητας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η υπογονιμότητα ορίζεται, κλινικά, ως η αδυναμία σύλληψης έπειτα από τουλάχιστον ένα χρόνο τακτικής σεξουαλικής επαφής χωρίς προφυλάξεις. Η υπογονιμότητα θεωρείται πρωτοπαθής, όταν ο άνδρας ή η γυναίκα δεν έχουν επιτύχει εγκυμοσύνη στο παρελθόν και δευτεροπαθής όταν έχει επιτευχθεί εγκυμοσύνη. Η υπογονιμότητα αποτελεί κρίσιμο στοιχείο της αναπαραγωγικής υγείας, αφού μπορεί να οδηγήσει σε δυσφορία και κατάθλιψη, καθώς και σε διάκριση και αποκλεισμό(Mascarenhasetal., 2012).

Υπολογίζεται, ότι η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 15% των ζευγαριών, δηλαδή 48,5 εκατομμύρια ζευγάρια παγκοσμίως . Παρόλο που αυτά τα ποσοστά αναφέρονται συχνά, πρόκειται για συγχώνευση αριθμών από όλο τον κόσμο και, ως εκ τούτου, δεν αντανακλά ποσοστά σε συγκεκριμένες χώρες και περιοχές. Σε κάποιες περιοχές, όπως η Βόρεια Αφρική και η Μέση Ανατολή, οι πολιτισμικές διαφορές και οι πατριαρχικές κοινωνίες αποτρέπουν την συλλογή ακριβών στατιστικών, κι έτσι, συνήθως, ο γυναικείος σύντροφος κατηγορείται για την στειρότητα. Ως εκ τούτου, οι άνδρες δεν συμφωνούν να υποβάλλονται σε εξετάσεις γονιμότητας, με αποτέλεσμα την μειωμένη καταγραφή των περιστατικών ανδρικής υπογονιμότητας(Agarwal et al., 2015).

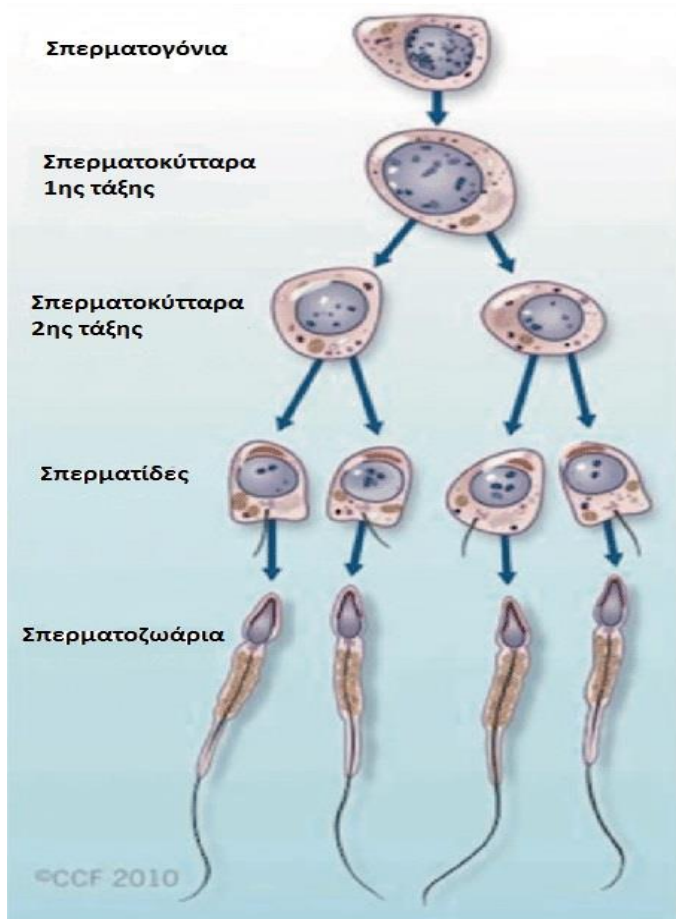
Παρόλο που η καταγραφή των περιστατικών της ανδρικής υπογονιμότητας αποτελεί πρόβλημα σε κάποιες χώρες, φαίνεται ότι η συνεισφορά του ανδρικού παράγοντα αγγίζει το 50% των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα, το 30% των περιπτώσεων οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα, ενώ το 20% οφείλεται σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα(Katz et al., 2017).

Η ανδρική γονιμότητα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως, συγγενείς ή επίκτητες ουρογεννητικές ανωμαλίες, κακοήθειες, λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος, αυξημένη θερμοκρασία του όσχεου, ενδοκρινικές διαταραχές, γενετικές ανωμαλίες και ανοσολογικούς παράγοντες(Mascarenhas et al., 2012). Επίσης, η ανδρική γονιμότητα εξαρτάται από τις διαδικασίες παραγωγής και μεταφοράς του σπέρματος, τις διαδικασίες δηλαδή της σπερματογένεσης, οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και εμπλέκουν το νευρικό, το ενδοκρινικό αλλά και το ανοσοποιητικό σύστημα(Katz et al., 2017).

Στο 30% των περιπτώσεων η αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας είναι άγνωστη, ενώ στο 10% των περιπτώσεων δεν μπορεί καν να εξηγηθεί ιατρικά(Poongothai et al., 2009). Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, το οποίο επηρεάζει πάρα πολλά ζευγάρια παγκοσμίως και είναι απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω, έτσι ώστε να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή(Agarwal et al., 2015).

1.2. Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλασιασμού και κυτταρικής διαφοροποίησης, κατά την οποία τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά στα σπερματοζωάρια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στα σπερματοφόρα σωληνάκια του όρχι και ολοκληρώνεται στην επιδιδυμίδα με την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων (Donnell et al., 2001). Στον άνθρωπο παράγονται καθημερινά περίπου 200 εκατομμύρια πλήρως διαφοροποιημένα σπερματοζωάρια(Storey, 2006). Χρονικά, το διάστημα που είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί εξέλιξη ενός πρόδρομου γαμετικού κυττάρου σε ώριμο σπερματοζωάριο συνιστά ένα κύκλο σπερματογένεσης, η διάρκεια του οποίου εμφανίζει διαφορές ανάλογα με τον οργανισμό που μελετάται, για τον άνθρωπο είναι περίπου 70 μέρες (Vander, 2011).



Εικόνα 1: Απεικόνιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης (SharmaR&Agarwala, 2011).

Αρχικά, τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, που βρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα των σπερματοφόρων σωληναρίων πολλαπλασιάζονται μιτωτικά. Μερικά από αυτά παραμένουν ως πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, διατηρώντας ένα σταθερό απόθεμα, ενώ άλλα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια. Στη ζώνη ανάπτυξης των σπερματοφόρων σωληναρίων τα διπλοειδή σπερματογόνια αρχίζουν τη μείωση κι έτσι κατά την πρόφαση I προκύπτουν τα σπερματοκύτταρα 1^{ης} τάξεως, τα οποία είναι διπλοειδή (2n). Με την ολοκλήρωση της μείωσης για κάθε σπερματοκύτταρο 1^{ης} τάξεως, στη ζώνη ωρίμανσης, προκύπτουν δύο σπερματοκύτταρα 2^{ης} τάξεως (n). Καθένα από αυτά εισέρχεται

σε μια ακόμη διαδικασία μείωσης (μείωση II) και τελικά προκύπτουν δύο απλοειδείς σπερματίδες (n) από κάθε σπερματοκύτταρο 2^{ης} τάξεως (Ζίφαetal., 2008). Στο στάδιο αυτό, οι σπερματίδες βρίσκονται κλεισμένες σε κοιλώματα που διαμορφώνονται από εγκολπώματα της μεμβράνης των κυττάρων Sertoli. Ταυτόχρονα με την εξέλιξη της διαδικασίας της σπερματογένεσης, παρατηρείται πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα μετακινούνται προς το επάνω μέρος των σωληναρίων, κοντά στον αυλό (Vander, 2011). Έπειτα, πραγματοποιείται η μετατροπή των σφαιρικών σπερματιδίων σε ώριμες, επιμηκυμένες σπερματίδες μέσα από μία διαδικασία που ονομάζεται σπερμιογένεση. Η σπερμιογένεση ορίζεται ως μία μορφολογική μετατροπή των σπερματιδίων μέχρι το σχηματισμό των σπερματοζωαρίων, μέσα από μια διαδικασία 19 σταδίων διαφοροποίησης. Στη φάση αυτή, παρουσιάζεται ένα πρωτοφανές παράδειγμα κυτταρικής διαφοροποίησης, στην οποία συμπεριλαμβάνονται η συμπύκνωση χρωματίνης, ο μετασχηματισμός και η

επιμήκυνση του πυρήνα, η σταδιακή απώλεια του κυτταροπλάσματος, η βιογένεση του μαστιγίου και ο σχηματισμός του ακροσώματος(Chocuetal., 2012). Με την ωρίμανση των σπερματίδων, απελευθερώνονται από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό του σπερματοφόρου σωληναρίου, μέσω της διαδικασίας της σπερμίας(Ο'Donnell et al., 2011). Στη συνέχεια, τα σπερματοζώαρια, μέσω του ορχικού δικτύου μεταφέρονται στην επιδιδυμίδα, όπου και ολοκληρώνεται η ωρίμανση τους, αποκτούν την τελική τους μορφή, γίνονται ικανά για γονιμοποίηση και αποθηκεύονται(Chocuetal., 2012). Τέλος, φτάνουν στον προστάτη, έναν σημαντικό αρσενικό αδέν, και εμπλουτίζονται με το προστατικό υγρό ώστε να σχηματιστεί το σπέρμα. Η προώθηση του σπέρματος γίνεται μέσω της σύσης και της εκσπερμάτωσης (Ζίφαetal., 2008).

1.3. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Η εμφάνιση υπογονιμότητας σε ένα ζευγάρι απαιτεί την περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγηση της κατάστασης προκειμένου να γίνει διάγνωση (Katz et al., 2017).

Η διάγνωση και εκτίμηση των παραγόντων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα βασίζεται στα εξής (Katz et al., 2017):

- **Λήψη λεπτομερούς ιστορικού:** Απόκτηση πληροφοριών που σχετίζονται με τη σεξουαλική ζωή του ατόμου, χειρουργικές επεμβάσεις, ασθένειες, έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης διαφόρων ασθενειών.
- **Κλινική εξέταση:** Περιλαμβάνει γενικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη φυσιολογία του ατόμου, αλλά και παρατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου ώστε να εντοπιστούν διάφορες πιθανές ανωμαλίες, καθώς και ανατομική εξέταση.
- **Ορμονικές εξετάσεις:** Είναι η βασική εξέταση που χρησιμοποιείται, περιλαμβάνει τη μέτρηση των επιπέδων FSH (ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη), η οποία διεγείρει τη σπερματογένεση δρώντας στα κύτταρα Sertoli και τη μέτρηση της τεστοστερόνης, που αποτελεί το κυριότερο ανδρογόνο.

- Ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα): Αποτελεί το σημαντικότερο στάδιο της διαδικασίας και περιλαμβάνει τη μέτρηση παραγόντων που αφορούν, τόσο τα σπερματοζωάρια, όσο και το σπερματικό υγρό, έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος (Poongothai et al., 2009). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι κατώτερες τιμές αναφοράς για τις διάφορες παραμέτρους που μετρώνται, όπως τις έχει ορίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Katz et al., 2017).

Παράγοντες	Κατώτερες τιμές αναφοράς
Όγκος	≥1.5 mL
pH	≥7.2
Συγκέντρωση σπέρματος	≥15 εκατομ. /mL
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥39 εκατομμύρια
Συνολική κινητικότητα	≥40%
Προοδευτική κινητικότητα	≥32%
Βιωσιμότητα	≥58%
Φυσιολογική μορφολογία	≥4%
Λευκοκύτταρα	<1.0 x 10 ⁶ /mL

Πίνακας 1: Μετρήσεις κατά την ανάλυση σπέρματος και κατώτερες τιμές αναφοράς σύμφωνα με τον WHO (Katz et al., 2017).

Συνεπώς, ένας άνδρας που εμφανίζει τις προαναφερθείσες φυσιολογικές τιμές σε μία ανάλυση σπέρματος θεωρείται νορμοσπερμικός, ενώ αποκλίσεις από τα όρια που δίνονται οδηγούν σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις (WHO, 2010). Κάθε μία πάθηση είναι αποτέλεσμα αλλαγών μιας ή περισσότερων παραμέτρων (Πίνακας 2).

1.4. Μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας και προβλήματα

Η ανδρική υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται από ένα πρότυπο πολυπαραγοντικής ή σύνθετης κληρονομησης (Jungwirth et al., 2015). Είναι, δηλαδή, το αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων, μεταξύ γενετικών, αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων (Thompson & Thompson, 2011).

Ο αριθμός των γονιδίων που συνεισφέρουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου είναι μεγάλος, καθώς η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη συντονισμένη δράση χιλιάδων γονιδίων (Hotaling, 2013). Επίσης, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το αλκοόλ, το κάπνισμα, η κατανάλωση καφεΐνης αλλά και η παχυσαρκία, μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του σπέρματος (Durairajanayagam, 2018). Ακόμα μια σημαντική παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την αναπαραγωγική ικανότητα είναι η ηλικία και η έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες (Leaver, 2016).

Επομένως, γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας αποτελεί μια πρόκληση (Miyamoto et al., 2017). Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη μελέτη πολυπαραγοντικών διαταραχών, όπως και η ανδρική υπογονιμότητα, αποτελούν οι αναλύσεις συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association studies – GWAS). Έχουν ήδη μάλιστα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη πολλών ασθενειών και τη διερεύνηση μονοπατιών που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες (Jungwirth et al., 2015).

1.5. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας

Νωρίς στην εμβρυογένεση, κύτταρα τα οποία θα γίνουν γαμετικά ακολουθούν διαφορετική πορεία από τα υπόλοιπα κύτταρα. Τα γαμετικά κύτταρα δεν είναι προγραμματισμένα να διεκπεραιώνουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες, αλλά να διαιωνίζουν το είδος, μέσω της μεταφοράς του γενετικού υλικού στην επόμενη γενιά.

Για να επιτευχθεί αυτό, τα γαμετικά κύτταρα υφίστανται μείωση και εκτενή μορφογένεση, η οποία μεταμορφώνει τα κυκλικά κύτταρα σε σπέρμα, το οποίο κινείται ελεύθερα, αναζητώντας το άλλο του μισό, το ωκύτταρο. Ωστόσο, για να διαμορφωθούν όλα αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά, χρειάζονται διάφορα γονίδια και ρυθμιστικοί μηχανισμοί. Περίπου 11% του συνολικού αριθμού των γονιδίων της *Drosophila*, συμμετέχουν στη γονιμοποίηση της. Αν ανάλογος αριθμός γονιδίων, σχετίζονται με την ανδρική γονιμότητα και στα θηλαστικά, μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας, σχετίζεται με καταστροφικές μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια (Yi-Nan Lin et al., 2014).

Οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν την σημαντικότερη αιτία πρόκλησης της ανδρικής υπογονιμότητας, συμβάλλοντας σε ένα ποσοστό 15-30% (Ferlin et al., 2007). Το γενετικό υπόβαθρο της υπογονιμότητας αφορά κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μικροελλείμματα στο Y χρωμόσωμα και γονιδιακές μεταλλάξεις, που μπορούν να επηρεάσουν ένα εύρος φυσιολογικών διαδικασιών, όπως η ορμονική ομοιόσταση, η σπερματογένεση και η ποιότητα του σπέρματος (Ferlin et al., 2007; Poongothai et al., 2009).

- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες: Μπορεί να πρόκειται για κάποια ανευπλοειδία, όπως το σύνδρομο Klinefelter (47, XXY) ή για κάποια δομική ανωμαλία, όπως είναι η μετάθεση κατά Robertson. Το σύνδρομο Klinefelter προκαλεί υπογονιμότητα και υπογοναδισμό, με αποτέλεσμα το 75-90% των ανδρών που πάσχουν να εμφανίζουν αζωοσπερμία (Selice et al., 2010; Wisner et al., 2012). Ακόμα, άτομα που φέρουν ένα επιπλέον Y χρωμόσωμα (47, XYY) μπορεί να εμφανίσουν ανωμαλίες στη σπερματογένεση (Shefi & Turek, 2006)
- Μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y και περιοχές AZF: Το χρωμόσωμα Y περιέχει την πλειοψηφία των γονιδίων που είναι σημαντικά για τις διαδικασίες της σπερματογένεσης και του καθορισμού του αρσενικού φύλου. Μικροελλείμματα του χρωμοσώματος Y παρατηρούνται συχνά σε αζωοσπερμικούς, αλλά και σε ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες. Τα πιο συχνά μικροελλείμματα παρατηρούνται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Yq και συγκεκριμένα στην περιοχή AZF (azoospermia factor region), η οποία διακρίνεται σε τρεις υποπεριοχές: AZFa,

AZFb, AZFc. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές περιέχει γονίδια με σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Το CDY είναι ένα ακόμη γονίδιο που εμπλέκεται στη σπερματογένεση, το οποίο εδράζεται στο βραχίονα Υq και ανάμεσα στις περιοχές AZFa και AZFb, αλλά και το *TSPY* που εδράζεται στο βραχίονα Υp (O'Flynn O'Brien et al., 2010).

- Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί σε αυτοσωμικά γονίδια: Πολλά αυτοσωμικά γονίδια μελετώνται για τον πιθανό τους ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι το 60-90% των ατόμων με αζωοσπερμία φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR*, στο χρωμόσωμα 7. Ακόμη, το γονίδιο *SHBG* (sex-hormonebindingglobulin) έχει μελετηθεί για τον πιθανό του ρόλο στη σπερματογένεση καθώς συμμετέχει στη μεταφορά ορμονών που καθορίζουν το φύλο σε διάφορους ιστούς-στόχους και στη ρύθμιση της συγκέντρωσης ανδρογόνων στους όρχεις. Άλλα γονίδια που ίσως εμπλέκονται είναι τα γονίδια υποδοχέων οιστρογόνων *ESR1*, *ESR2* και το γονίδιο του υποδοχέα FSH, *FSHR* (O'Flynn O'Brien et al., 2010).
- Μεταλλάξεις σε γονίδια του χρωμοσώματος X: Πολλά γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμα X εκφράζονται στους όρχεις και ίσως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση. Ένα από τα πιο σημαντικά είναι το γονίδιο του υποδοχέα ανδρογόνων, *AR*. Συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι περίπου 2% των ανδρών με πρόβλημα υπογονιμότητας φέρουν κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο ενώ οι υγιείς άνδρες δεν φέρουν καμία. Ένα ακόμη γονίδιο με πιθανό ρόλο είναι το *USP26* που εκφράζεται στους όρχεις, κατά τα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης (O'Flynn O'Brien et al., 2010).

2. Το Σπερμοδιάγραμμα και η γενετική πίσω από αυτό

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η κλινική διερεύνηση για τον άνδρα είναι το σπερμοδιάγραμμα και η εξέταση για ανίχνευση αντισωμάτων κατά του σπέρματος. Το σπέρμα του άνδρα λαμβάνεται με αυνανισμό, έπειτα από αποχή >3 ημερών. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών του σπέρματος ερμηνεύεται ως προς τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα και μορφολογία τους, σύμφωνα με τις τιμές του WHO. Το φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα είναι δυνατόν να αποκλείσει περαιτέρω διερεύνηση. Ο ενδοκρινολογικός έλεγχος, η καλλιέργεια του σπέρματος και του προστατικού εκκρίματος και η βιοψία των όρχεων για ταυτοποίηση μεταξύ της αποφρακτικής και μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας δεν αποτελούν βασικό έλεγχο. Η πραγμάτωση τους είναι αναγκαία όταν από την κλινική εξέταση, το ιστορικό και την ανάλυση του σπέρματος προκύπτουν σοβαρές υποψίες (Ιατράκης, 2009).

Το σπερμοδιάγραμμα συνήθως περιλαμβάνει την φυσική, την μικροσκοπική εξέταση και μακροσκοπική εξέταση. Οι φυσιολογικές τιμές του σπερμοδιαγράμματος αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO):

Όγκος	1.5 ml
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων	$\geq 15 \times 10^6 / \text{ml}$
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	$\geq 39 \times 10^6$
Κινητικότητα	$\geq 40\%$ για το άθροισμα των σπερματοζωαρίων με ζωηρή και νωθρή προωθητική κινητικότητα $\geq 32\%$ για τα σπερματοζωάρια με ζωηρή προωθητική ικανότητα
Μορφολογία	$\geq 4\%$ κατά Kruger φυσιολογικές μορφές
Ζωτικότητα	58%
pH	$\geq 7,2$
Φρουκτόζη	$\geq 13 \mu\text{mol} / \text{εκσπερμάτιση}$
α-γλυκοσιδάση (ουδέτερη)	$\geq 20 \text{ IU} / \text{εκσπερμάτιση}$

Πίνακας 2: Τιμές αναφοράς για τις εξετάσεις σπέρματος

Οι αποκλίσεις από τις παραπάνω τιμές του σπερμοδιαγράμματος αξιολογούνται από τον γιατρό, έτσι ώστε να δοθεί η κατάλληλη αγωγή για την βελτίωση των χαρακτηριστικών του σπέρματος ή να δοθεί μια κατεύθυνση στο ζευγάρι στην προσπάθειά τους να τεκνοποιήσουν. Παρόλο που ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στο δείγμα είναι σημαντικός, άλλοι παράγοντες όπως η κινητικότητα και η μορφολογία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της ανδρικής γονιμότητας και για αυτό το λόγο ο καταλληλότερος άνθρωπος να ερμηνεύσει τα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος είναι ο εξειδικευμένος γιατρός (Αρκουλής, 2003).

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης σπέρματος, μπορεί να γίνει ταξινόμηση των περιπτώσεων της ανδρικής υπογονιμότητας, ανάλογα με τους παράγοντες που επηρεάζονται (Colaco & Modi, 2018). Συγκεκριμένα, λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, η ποιότητα του σπέρματος (κινητικότητα και μορφολογία) ή και τα δύο (Poongothaietal., 2009):

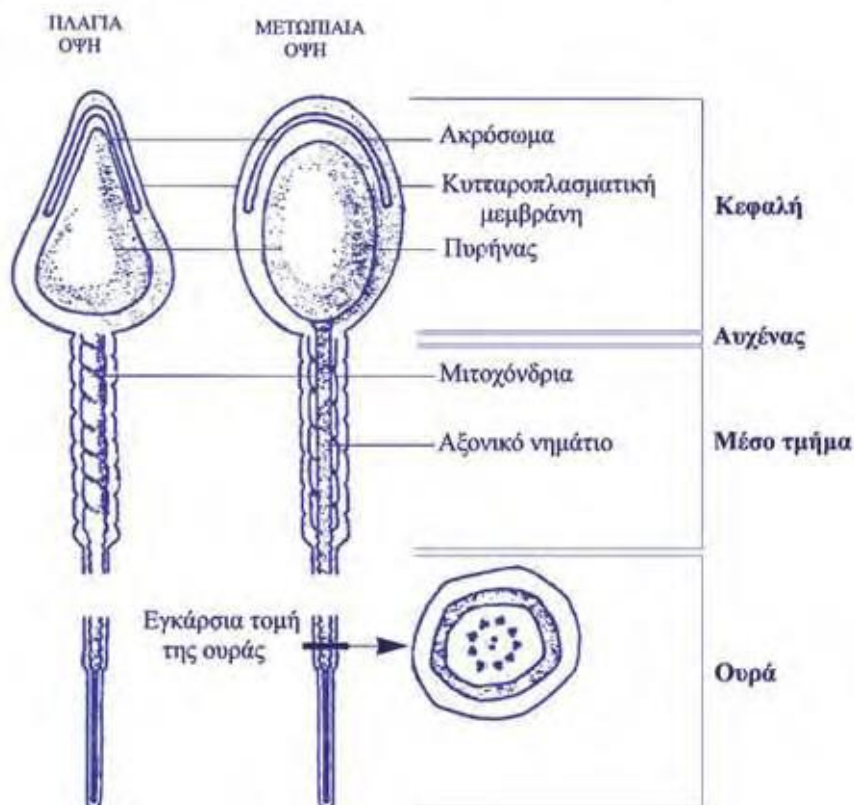
- Αζωοσπερμία: Χαρακτηρίζεται ως η απουσία σπερματοζωαρίων από το σπέρμα και διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες. Η αποφρακτική αζωοσπερμία (obstructive azoospermia - OA) οφείλεται σε διάφορα προβλήματα που αφορούν τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων και του σπέρματος. Ενώ, η μη αποφρακτική οφείλεται σε κάποιο πρόβλημα κατά την παραγωγή των σπερματοζωαρίων (non obstructive azoospermia – NOA). Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία συναντάται πιο συχνά από την αποφρακτική.
- Ολιγοζωοσπερμία: Παρατηρούνται λιγότερα από $15-20 \times 10^6$ σπερματοζωάρια στο σπέρμα.
- Σοβαρή ολιγοζωοσπερμία: Παρατηρούνται λιγότερα από 5×10^6 σπερματοζωάρια στο σπέρμα.
- Ασθενοζωοσπερμία: Παρατηρείται χαμηλή κινητικότητα σε λιγότερο από το 50% των σπερματοζωαρίων.
- Τερατοζωοσπερμία: Παρατηρείται ότι λιγότερο από 30% των σπερματοζωαρίων έχουν φυσιολογική μορφολογία.

- Ασπερμία: Είναι η απουσία σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση.
- Νορμοζοοσπερμία: Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων στο σπέρμα.

2.1. Μορφολογία σπερματοζωαρίου

Ένα σπερματοζώαριο είναι απλοειδές κύτταρο με 23 χρωμοσώματα, έχει ολικό μήκος 50 μm και αποτελείται από δύο μορφολογικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές:

- την κεφαλή
- την ουρά ή μαστίγιο.
- τον αυχένα



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του σπερματοζωαρίου

- i. Η κεφαλή (Εικόνα 3) του φυσιολογικού σπερματοζωαρίου έχει σχήμα ωοειδές, μήκος 3-5 μm, πλάτος 2-3 μm και πάχος 1,5 μm. Αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα, τα οποία καλύπτονται από την πυρηνική μεμβράνη και το μετακροσωματικό έλυτρο. Ο πυρήνας περιέχει το γενετικό υλικό του άνδρα. Το DNA των σπερματοζωαρίων έχει λίγο διαφορετική δομή από το DNA των σωματικών κυττάρων: το DNA βρίσκεται συμπυκνωμένο στον μικρότερο δυνατό όγκο, έτσι ώστε να εξοικονομείται χώρος. Το ακρόσωμα καλύπτει τα πρόσθια δύο τρίτα του πυρήνα και αποτελείται από δύο τμήματα, το πρόσθιο και το τμήμα του ισημερινού (Georgadaki et al., 2016).
- ii. Η ουρά (Εικόνα 3) έχει μήκος 40-50 μm, αποτελείται από δέκα συνολικά ζεύγη ινιδίων (ένα κεντρικό και εννέα περιφερικά) και προσδίδει στο σπερματοζώαριο τη χαρακτηριστική κινητικότητά του. Το μεσαίο τμήμα, που βρίσκεται στην αρχή της ουράς, έχει μήκος 5-7 μm και πλάτος 1 μm. Περιέχει το αξονικό νημάτιο που περιβάλλεται από ινίδια και 1-2 κεντροσωμάτια. Επίσης, περιλαμβάνει μιτοχόνδρια, ενζυμικά συστήματα γλυκολύσεως και οξειδώσεως και προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και την κινητικότητα (Georgadaki et al., 2016).
- iii. Ο αυχέννας (Εικόνα 3) είναι τμήμα που συνδέει κεφαλή και ουρά (Georgadaki et al., 2016).

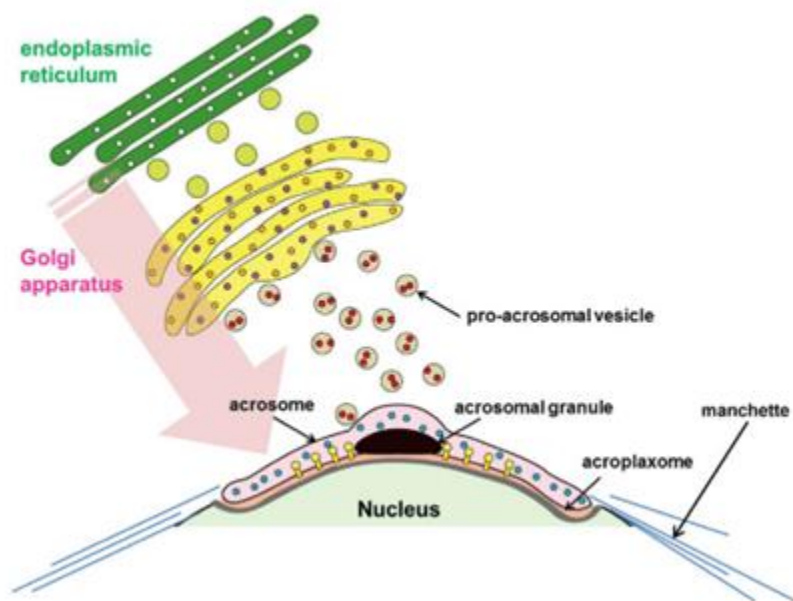
Η τελική μεταμόρφωση των σπερματιδίων σε ώριμα σπερματοζώαρια περιλαμβάνει την απώλεια κυτταροπλάσματος, το σχηματισμό του ακροσώματος και του μαστιγίου και τη μετανάστευση των κυτταρικών οργανιδίων στην τελική τους θέση στο ώριμο κύτταρο (Γ. Σ. Παρανυχιανακης, 1986). Τα φυσιολογικά κύτταρα του σπέρματος έχουν οβάλ σχήμα κεφαλής με μια πρόσθια δομή που μοιάζει με πώμα και ονομάζεται ακρόσωμα. Το ακρόσωμα προέρχεται από τα σωμάτια Golgi και περιέχει ένζυμα (ακροσίνη, υαλουρονιδάση) και υποδοχείς απαραίτητους για την αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με τη διάφανη ζώνη του ωοκυττάρου, επιτρέποντας στο σπερματοζώαριο να γονιμοποιήσει το ωάριο (National Library of Medicine, 2020).

Η γλομποζωοσπερμία είναι μια σπάνια πάθηση (<0,1%) που επηρεάζει μόνο τους άνδρες. Η ολική γλομποζωοσπερμία χαρακτηρίζεται από την παρουσία σπερματοζωαρίων με στρογγυλή κεφαλή και απουσία ακροσώματος σε ένα ποσοστό 100% προκαλώντας στειρότητα. Η μερική γλομποζωοσπερμία, αναφέρεται σε ασθενείς που έχουν 20-60% των σπερματοζωαρίων τους με αυτή την πάθηση. Η ανωμαλία αυτή, καθιστά αδύνατη τη γονιμοποίηση του ωαρίου μια κατάσταση που αναπόφευκτα οδηγεί σε υπογονιμότητα. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως η πάθηση αυτή οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις στο γονίδιο DPY19L2, μεταλλάξεις οι οποίες βρίσκονται στο 70 τοις εκατό περίπου των ανδρών με αυτή την ανωμαλία . Μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια ενδέχεται επίσης να προκαλούν γλομποζωοσπερμία (Tavalaee et al., 2018).

2.1.1. Γονίδιο DPY19L2

Το γονίδιο DPY19L2 έχει 22 εξόνια και το προκύπτον πρωτεϊνικό προϊόν αποτελείται από 758 αμινοξέα (DeBraekeleer et al., 2015). Το Dpy19L2 αποδείχθηκε ότι εκφράζεται κυρίως στις σπερματίδες και στον ποντικό η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη που βλέπει προς το ακροσωμικό κυστίδιο, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του ακροσώματος στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της σπερμογένεσης (Mitchell et al., 2017). Μπορεί να εμπλέκεται στην δημιουργία του πρόσθιου πόλου των σπερματοζωαρίων και στην τοποθέτηση του ακροπλαξώματος (acroplaxome), μια υποακροσωματική κυτταροσκελετική πλάκα στην οποία διασυνδέονται τα κυστίδια που προέρχονται από το σύστημα Golgi (Harbuz et al., 2011). Η πρωτεΐνη DPY19L2 πιστεύεται ότι είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 10 διαμεμβρανικά τμήματα και με τις N-τελικές και C-τελικές περιοχές να βρίσκονται στο νουκλεοπλάσμα. Εκφράζεται συγκεκριμένα σε σπερματοζωάρια και εντοπίζεται μόνο στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη του πυρήνα που αντικρίζει το ακρόσωμα (Εικόνα 3). Συμμετέχει, επίσης, στην αγκυροβόληση του ακροσώματος στον πυρήνα, γεφυρώνοντας τον πυρηνικό φάκελο τόσο στο πυρηνικό πυκνό στρώμα όσο και στο ακροπλάξωμα (acroplaxome) (De Braekeleer et al., 2015).

Εκτός από τη δομική λειτουργία της κατά τη διάρκεια της βιογένεσης του ακροσώματος, η λειτουργία της C-μαννοζυλοτρανσφεράσης της προγονικής πρωτεΐνης DPY-19 έθεσε την υπόθεση ότι η DPY19L2 μπορεί να συμμετέχει στην γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών του σπέρματος. Πολλές πιθανές πρωτεΐνες έχουν προταθεί να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη DPY19L2 κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες SUN που ανήκουν στο σύμπλοκο LINC (συνδέτησνουκλεοσκελετών και κυτταροσκελετού—linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) σε συνδυασμό με πρωτεΐνες KASH (Pierre et al., 2012).



Εικόνα 3: Σχεδιάγραμμα του εμπρόσιου τμήματος της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (Fujihara Y et al., 2012).

2.1.2. Ρόλος του γονιδίου DPY16L2 στην ανδρική υπογονιμότητα

Το γονίδιο DPY19L2 παρέχει οδηγίες για την έκφραση μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στα αναπτυσσόμενα σπερματοκύτταρα. Η πρωτεΐνη DPY19L2 εμπλέκεται στην ανάπτυξη του ακροσώματος και στην επιμήκυνση της κεφαλής των σπερματοζωαρίων, διεργασίες απαραίτητες για την ωρίμανση του σπερματικού κυττάρου. Μεταλλάξεις στο DPY19L2 γονίδιο οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικής πρωτεΐνης DPY19L2. Ως αποτέλεσμα, τα σπερματοζωάρια δεν έχουν ακρόσωμα και δεν επιμηκύνονται σωστά.

Χωρίς ακρόσωμα, τα μη φυσιολογικά αυτά σπερματοζωάρια δεν είναι σε θέση να περάσουν μέσα από την εξωτερική μεμβράνη του ωαρίου για να το γονιμοποιήσουν, οδηγώντας σε υπογονιμότητα (Harbuz et al., 2011).

2.2. Κινητικότητα σπερματοζωαρίων

Αρχικά, το σπέρμα εναποτίθεται στον κόλπο. Όμως, δεν είναι έτοιμο να γονιμοποιήσει το ωάριο παρ'όλο που μπορεί να κινηθεί. Το σπέρμα βρίσκεται σε ζελατινώδη μορφή, περιέχει άφθονη χοληστερόλη στις μεμβράνες, γλυκοπρωτεΐνες και άλλους ανασταλτικούς για τη γονιμοποίηση παράγοντες (Ikawa et al., 2010). Η διαδικασία της ενεργοποίησής του ξεκινάει με την απομάκρυνση της χοληστερόλης και των πρωτεϊνών και άλλων γεγονότων. Το τελικό στάδιο είναι η υπερενεργοποίηση, μια ενεργοβόρα διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από έντονη κίνηση της ουράς και μεγάλη ικανότητα «κολύμβησης» του σπέρματος (Georgadaki et al., 2016; Ikawa et al., 2010). Πολλά σπερματοζωάρια πεθαίνουν πριν φτάσουν να γονιμοποιήσουν το ωάριο λόγω του αντίξοου όξινου περιβάλλοντος στον κόλπο και την μήτρα. Όσα σπερματοζωάρια επιζούν, πρέπει να κολυμπήσουν μια απόσταση περίπου ίση με 15-18cm μέσα στην τραχηλική βλέννη, έτσι ώστε να φτάσουν στη μήτρα και στη συνέχεια στις σάλπιγγες, όπου γίνεται η γονιμοποίηση του ωαρίου από ένα σπερματοζωάριο (Georgadaki et al., 2016).

Ο στόχος του σπέρματος είναι να γονιμοποιήσει το ωάριο. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει να αποκτήσει κινητικότητα στην επιδιδυμίδα και υπερκινηθείσα κινητικότητα στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Η κινητικότητα επιτυγχάνεται μόνο όταν το σπέρμα παρουσιάζει ένα πλήρως λειτουργικό μαστίγιο, το οποίο είναι ικανό να παράγει ενέργεια για να τροφοδοτήσουν την κίνηση (Vijayaraghavan et al., 2016).

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εκτιμάται σύμφωνα με το νέο WHO 2010 σε τρία είδη, σε αντίθεση με τους τέσσερις τύπους κινητικότητας που προτεινόταν στα προηγούμενα εγχειρίδια (α. ταχεία προωθητική, β. νωθρή προωθητική, γ. επιτόπια, δ. ακινησία): (WHO, 2010)

- Κίνηση σπερματοζωαρίων (είτε κινούνται ταχέως είτε βραδέως είτε πραγματοποιούν μεγάλους κύκλους) ανεξαρτήτως ταχύτητας

- Επιτόπια κίνηση (κίνηση σε μικρούς κύκλους, κίνηση της κεφαλής ή της ουράς χωρίς να κινείται το υπόλοιπο τμήμα του σπερματοζωαρίου)
- Ακίνησία

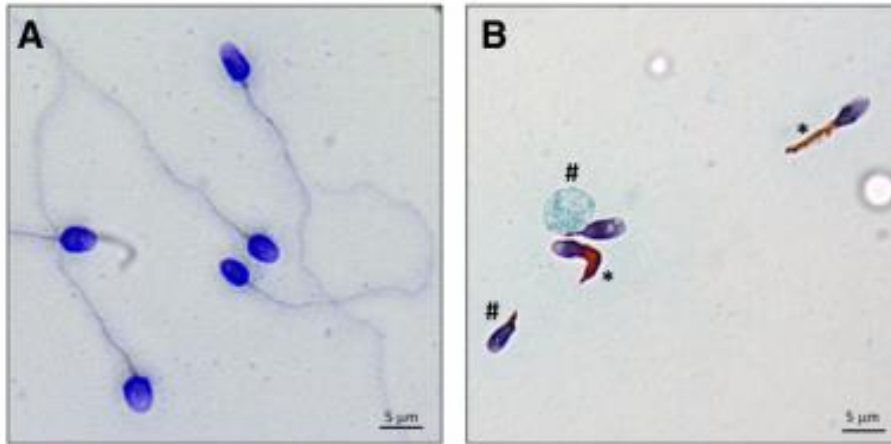
Η γενετική βάση και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη συναρμολόγηση και τη λειτουργία του μαστιγίου δεν είναι πλήρως κατανοητοί, ιδιαίτερα στον άνθρωπο. Υπάρχουν αρκετές αιτίες για την μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος, από τις οποίες κάποιες μπορούν να αποφευχθούν και να διορθωθούν, ενώ άλλες σχετίζονται με γενετικά ελαττώματα (RPereira et. al, 2019). Δύο γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με τον σχηματισμό και τη λειτουργία του μαστιγίου και ίσως σχετίζονται με τη μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι τα γονίδια CFAP43 και CFAP44.

2.2.1. Γονίδια CFAP43 και CFAP44

Το γονίδιο CFAP43 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 και έχει 38 εξόνια, που κωδικοποιούν 1665 πρωτεΐνες. Ενώ, το γονίδιο CFAP44 (γνωστό και ως WDR52) στο χρωμόσωμα 3 και έχει 35 εξόνια, που κωδικοποιούν 1854 πρωτεΐνες (Coutton et al., 2018). Τα δύο αυτά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μαστίγιο και τα τριχίδια του μαστιγίου (cilia- and flagella-associated protein 43/44) (Tang et al., 2017). Οι πρωτεΐνες του μαστιγίου συμμετέχουν τόσο στο σχηματισμό, όσο και στη λειτουργία του αξονικού νηματίου (UniProt).

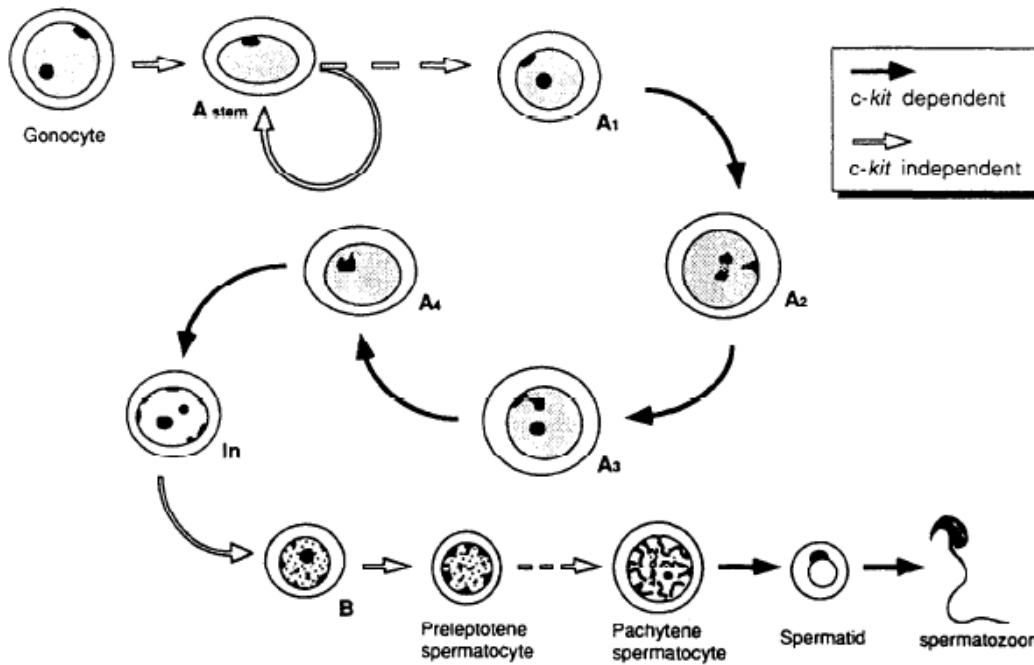
2.2.2. Ρόλος των γονιδίων CFAP43/44 στην ανδρική υπογονιμότητα

Άντρες με πολλαπλές μορφολογικές ανωμαλίες στο μαστίγιο (MMAF) έχουν ανώμαλα σπερματοζωάρια, με κοντό, συσπειρωμένο ή και καθόλου μαστίγιο, κάτι που βλάπτει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Tang et al., 2017). Το MMAF χαρακτηρίζεται από σχεδόν ολική ασθενοζοοσπερμία (Εικόνα 4), λόγω της παρουσίας ενός μωσαϊκού προτύπου φαινοτυπικών ανωμαλιών του μαστιγίου (Nsota Mbang et al., 2019).



Εικόνα 4: Μορφολογικές ανωμαλίες (MMAF)

A) Άτομα μάρτυρες, B) Άτομα με φαινότυπο MMAF (Nsota Mbango et al., 2019).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των εξαρτώμενων και μη-σταδίων από τον υποδοχέα KIT.

Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τα βήματα που μπορεί να εξαρτώνται από την έκφραση του *c-kit*, ενώ τα ανοικτά βέλη είναι ανεξάρτητα από το *c-kit* (Alexander Sandra et al., 1997).

Οι αναγνωρισμένες μεταλλάξεις είναι κατανεμημένες κατά μήκος των γονιδίων CFAP43 και CFAP44, κάτι που δείχνει ότι και οι δύο πρωτεΐνες είναι απαραίτητες ολόκληρες για την ακεραιότητα της λειτουργίας τους (Coutton et al., 2018).

2.3. Αριθμός σπερματοζωαρίων

2.3.1. Γονίδια KIT και KITLG

Το γονίδιο KIT κωδικοποιεί έναν υποκινητή κινάσης τυροσίνης και το γονίδιο KITLG κωδικοποιεί τον προσδέτη του, τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 4 (Alexander Sandra et al., 1997). Ο προσδέτης KITLG είναι γνωστός και ως SCF (παράγοντας βλαστοκυττάρων) (A. Ruiz et al., 2006).

Ο υποδοχέας KIT εκφράζεται στα πρώιμα σπερματοκύτταρα, στο ακρόσωμα των σπερματίδων, στο ακρόσωμα των σπερματοζωαρίων στους όρχεις, αλλά και στα κύτταρα Leydig (Galan et al., 2006; Sandlow et al., 1997). Ενώ, η έκφραση του KITLG γίνεται στα κύτταρα Sertoli και Leydig (Galan et al., 2006).

Ο υποκινητής KIT έχει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση διακυτταρικών σημάτων, τα οποία ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση (Sandlow et al., 1997). Γενικά, η σηματοδότηση του συστήματος αυτού παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αρσενικών γαμετικών κυττάρων, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής περιόδου (Rothschild et al., 2003).

Κατά τη σύνδεση του προσδέτη KITLG, στον υποδοχέα KIT, ο υποδοχέας διμερίζεται και ενεργοποιείται η περιοχή της κινάσης. Κατάλοιπα τυροσίνης του υποδοχέα φωσφορυλιώνονται και συμπεριφέρονται ως θέσεις σύνδεσης μορίων, τα οποία ενεργοποιούν διαφορετικά μοριακά μονοπάτια, όπως η αιματοποίηση, η μελανογένεση και η γαμετογένεση (Galan et al., 2006). Συγκεκριμένα, η σύνδεση του προσδέτη οδηγεί

στην ωρίμανση των αρσενικών γαμετικών κυττάρων σε διάφορα στάδια, για παράδειγμα στην ωρίμανση των σπερματογόνιων τύπου A και στη διαμόρφωση του ακροσώματος (Sandlow et al., 1997).

2.3.2. Ρόλος των γονιδίων KIT και KITLG στην ανδρική υπογονιμότητα

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των όρχεων η αλληλεπίδραση του KITLG με τον υποδοχέα KIT διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή ωρίμανση και επιβίωση των αρσενικών γαμετικών κυττάρων, αλλά και στην κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των σπερματοζωαρίων. Μεταλλάξεις στο σύστημα αυτό είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τον πρωτογενή πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των αρσενικών γαμετικών κυττάρων, οδηγώντας σε υπογονιμότητα, αφού ελάχιστα πρωτογενή γαμετικά κύτταρα έφταναν στη γονάδα (Kissel, 2000; Rothschild et al., 2003)

Το σύστημα KIT/KITLG έχει συσχετιστεί με τον μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, η έκφραση του KITLG στο σπερματικό πλάσμα σχετίστηκε με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, διότι υπογόνιμοι άντρες είχαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA KITLG, σε σχέση με γόνιμους άντρες (Galan et al., 2006). Αυτή η κατάσταση είναι γνωστή και ως Ολιγοζωοσπερμία (Poongothai et al., 2009).

B. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανδρική υπογονιμότητα απασχολεί καθημερινά, όλο και περισσότερα ζευγάρια σε ολόκληρο τον κόσμο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον για έγκαιρη και αποτελεσματική πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας να έχει αυξηθεί σημαντικά. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη και ο εντοπισμός των γενετικών αιτιών της. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική διαταραχή, άρα μεγάλος αριθμός γονιδίων συνεισφέρει στην εμφάνιση του φαινοτύπου.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση, καταγραφή και ανάδειξη πολυμορφισμών των γονιδίων DPY19L2, CFAP43, CFAP44, KIT και KITLG, τα οποία σχετίζονται άμεσα με τη μορφολογία, την κινητικότητα και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, αντίστοιχα. Οι παράγοντες αυτοί λαμβάνονται υπόψη κατά την ανάλυση σπέρματος, ώστε να διερευνηθεί το αναπαραγωγικό δυναμικό ενός άντρα. Άρα, η ενδεδειγμένη και ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τα γονίδια που καθορίζουν τους παράγοντες αυτούς, πρόκειται να συμβάλει σε μία ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με το προφίλ του ασθενή, ώστε να προταθούν κατάλληλες τεχνικές αντιμετώπισης που θα οδηγήσουν σε μια επιτυχή κύηση. Ακόμη, είναι πιθανό να προκύψουν δεδομένα που θα διευκολύνουν τη διάγνωση και την πρόγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό που απομονώθηκε από βιολογικό δείγμα σπέρματος τόσο από μη νορμοσπερμικούς, όσο και από νορμοσπερμικούς άνδρες (ολιγοσπερμικούς, ασθενοσπερμικούς, τερατοσπερμικούς και συνδυασμό των κατηγοριών) που ανήκουν στον ελληνικό πληθυσμό. Τα δείγματα (αίμα και σπέρμα) συλλέχθηκαν στο κέντροεξωσωματικήςγονιμοποίησης“EMBRYOLAB”, στα πλαίσια του προγράμματος “Spermatogene”, σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και το εργαστήριο BIOZ.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και του εργαστηρίου, η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από την αρχή της συναίνεσης ύστερα από πληροφόρηση του δότη και από την αρχή της προστασίας των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων που συλλέγονται και υπόκεινται σε επεξεργασία.

2. Απομομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα

4.1.1. 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

4.1.2. Μεθοδολογία

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο “Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm” (Weyrich, 2012).

Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα.

Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζωάρια. Το σπερματικό υγρό 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. Επίσης, οι διθειοφυλικό δεσμοί της λιπιδικής μεμβράνης εμποδίζουν τη λύση των κυττάρων και δυσκολεύουν την απομόνωση του γενετικού υλικού. Προκειμένου να παρακαμφθεί αυτό το εμπόδιο χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DDT. Ακόμη, το διάλυμα ομογενοποίησης (LysisBuffer) περιέχει EDTA, δηλαδή έναν χηλικόυποκαταστάτη που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά αυτά ιόντα αποτελούν συμπράγοντα για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, κι έτσι η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επιπρόσθετα, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή. Τέλος, το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

Παρόλα αυτά, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Πρωτόκολλο:

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, LysisBuffer.
5. Προσθήκη 2,5 μl Triton-X100 (0,5%), 200 μl DTT (0,1M) και 40 μl πρωτεΐνάσης 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.

3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

3.1.1. Μεθοδολογία

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη /χλωροφόρμιο πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ώστε το DNA να είναι υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται φαινόλη για τον διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες με τη δημιουργία δυο διακριτών φάσεων, της υδατικής φάσης που βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και της οργανικής φάσης που βρίσκονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η παρουσία του χλωροφορμίου έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, προσδίδοντας μεγαλύτερη πυκνότητα στην οργανική φάση.

Πρωτόκολλο:

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 επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

3.2.1. Υλικά

- CH₃COONa (3M)
- Αιθανόλη
- TE-buffer

3.2.2. Μεθοδολογία

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφάλατωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα των νουκλεϊκών οξέων και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na⁺, τα οποία συνδέονται με αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων, ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων.

Πρωτόκολλο:

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου (CH_3COONa), όγκου V/10, συγκέντρωσης 3M και αιθανόλη όγκου 2V.
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται -80°C για 1-2 ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C .
3. Στη συνέχεια απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500μl αιθανόλης 75%
4. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13,000 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε TE-buffer ή υδατικό διάλυμα.

4. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA

4.1. Με χρήση φασματοφωτομετρίας

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260nm 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 και $\sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ για μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια.

Ακόμη, ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή δείχνει κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος OD 260/OD 280 κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

Για τη φωτομέτρηση των δειγμάτων DNA έγινε αραίωση 2 μl διαλύματος DNA σε 98 μl ddH₂O κι έπειτα, οι τιμές της απορρόφησης στα 260 nm ανάχθηκαν σε συγκέντρωση DNA.

4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

4.2.1. Υλικά

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

4.2.2. Μεθοδολογία

Μία από τις κύριες μεθόδους ποσοτικοποίησης δειγμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με κυμαινόμενη συγκέντρωση, ανάλογα με το μέγεθος του ηλεκτροφορούμενου DNA. Πρόκειται για μια τεχνική διαχωρισμού φορτισμένων μορίων και συγκεκριμένα του DNA στο πείραμα αυτό. Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο το οποίο κινείται διαμέσου της πηκτής της αγαρόζης από τον αρνητικό πόλο 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 το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή, κι επομένως η ένταση φθορισμού, είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder).

Εκτός από τον ποιοτικό προσδιορισμό του DNA, η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει πληροφορίες και για τη φυσική κατάσταση του DNA, δηλαδή 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 ngDNA.

Για την προετοιμασία του πηκτώματος χρησιμοποιείται αγαρόζη, που αποτελεί έναν ευθύγραμμο πολυσακχαρίτη, ο οποίος εκχυλίζεται σε μεγάλες ποσότητες από αρκετά είδη ερυθροφύκων και σχηματίζει πήκτωμα με πόρους που κυμαίνονται από 100 έως 300 nm διάμετρο. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης

στο πήκτωμα. Έτσι, η συγκέντρωση της αгарόζης καθορίζει το εύρος των τμημάτων DNA που μπορούν να διαχωριστούν.

Τέλος, η χρωστική SERVA αποτελεί μια πιο ασφαλή εναλλακτική έναντι της χρήσης βρωμιούχοαιθιδίου. Συγκεκριμένα, προσδένεται σε DNA και RNA προκαλώντας την εμφάνιση φθορισμού και είναι εξίσου ευαίσθητη με το βρωμιούχοαιθίδιο αλλά είναι μη καρκινογόνος και σύμφωνα με το τεστ AMES προκαλεί πολύ λιγότερες μεταλλάξεις.

Πρωτόκολλο:

1. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αгарόζης 1% w/v αναμειγνύεται αгарόζη σε σκόνη (0,3 γρ.) με 45 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές και να διαλυθεί η αгарόζη.
2. Γίνεται προσθήκη 4 ml χρωστικής SERVA και ακολουθεί 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 αгарόζης).
5. Το πήκτωμα αгарόζης 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 (5 ml). Έπειτα, γίνεται προσθήκη των δειγμάτων στις θέσεις («πηγαδάκια») του πηκτώματος.
7. Ακολουθεί εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης και ηλεκτροφόρηση για περίπου 15-20 λεπτά.
8. Τέλος, πραγματοποιείται παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

5. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

Η αλληλούχιση των δειγμάτων DNA έγινε μέσω γονοτύπησης και πραγματοποιήθηκε από το κέντρο HuGeF στην Ολλανδία. Πιο συγκεκριμένα, η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του chip της Illumina, Infinium® GlobalScreeningArray. Το συγκεκριμένο chip προσφέρει πληροφορίες για 642.824 δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (SNPs), και ως εκ τούτου προσφέρει μια αρκετά μεγάλη κάλυψη του γονιδιώματος και ιδιαιτέρως 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 τέτοια chips βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για μια συγκεκριμένη περιοχή, περίπου 50 bp γύρω από τα SNPs, τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε γυάλινη πλάκα. Αρχικά, γίνεται πολλαπλασιασμός και προετοιμασία του DNA-στόχου και ακολουθεί υβριδοποίηση και επιμήκυνση με νουκλεοτιδικές βάσεις οι οποίες είναι σημασμένες με διαφορετικές φθορίζουσες. Έπειτα από διαδοχικά στάδια πλύσης πραγματοποιείται ανίχνευση των φθορίζοντων προϊόντων που προκύπτουν με ειδικό laser. Διαφορετικά χρώματα φθορισμού οδηγούν στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι αρχικά, η συγκέντρωση των δειγμάτων σπέρματος αλλά και η γονοτύπησης 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 χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας (Μαρία Μαρκαντώνη, διδακτορική διατριβή σε εξέλιξη).

6. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK

Για να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PLINK(Purcell et al., 2007). Το PLINK είναι ένα εργαλείο Βιοπληροφορικής που χρησιμοποιείται για αναλύσεις συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος και εκτελείται τόσο σε UNIX, όσο και σε Windows λειτουργικά συστήματα. Το PLINK δίνει τη δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων γονοτύπων και φαινοτύπων προκειμένου να παραχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Πρόκειται για ένα πρόγραμμα με γραμμή εντολών γραμμένο σε C/C++ επομένως όλες οι εντολές έχουν την εξής δομή:

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

Επίσης, 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:

- Αρχείο MAP (*.map). Πρόκειται για ένα αρχείο που περιλαμβάνει μια λίστα των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP) που έχουν αλληλουχηθεί. 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 brunits).

```
1 rs6587445 0 6757
1 rs6681339 0 6758
1 rs4916176 0 6759
1 rs14851 0 6760
1 rs6587759 0 6761
1 rs7521920 0 6762
2 rs7594567 0 6763
2 rs4438516 0 6764
2 rs1870693 0 6765
```

Εικόνα 7: Παράδειγμα μορφής αρχείου MAP

- Αρχείο PED (*.ped). Πρόκειται για ένα αρχείο που περιλαμβάνει τους γονοτύπους κάθε ατόμου αλλά και πρόσθετες πληροφορίες. Κάθε γραμμή του αρχείου αντιστοιχεί σε ένα άτομο. Το αρχείο περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 στήλες. Η πρώτη στήλη συνήθως είναι ένας κωδικός που αντιστοιχεί στην οικογένεια (FamilyID) 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).

```
FAM001  1  0  0  1  2  A A  G G  A C
FAM001  2  0  0  1  2  A A  A G  0 0
...
```

Εικόνα 8: Παράδειγμα μορφής αρχείου PED

Στα αρχεία που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ωστόσο, η πρώτη στήλη αντιστοιχεί σε έναν αύξοντα αριθμό για την αρίθμηση των δειγμάτων ενώ η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί σε έναν αύξοντα αριθμό που δείχνει τη σειρά αλληλούχισης των δειγμάτων.

6.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση φαινοτύπων και γονοτύπων απαιτείται η δημιουργία ενός αρχείου που προκύπτει από την ένωση των επιμέρους αρχείων που αντιστοιχούν σε αποτελέσματα αλληλούχισης διαφορετικών plates. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση τόσο μεγαλύτερη είναι 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). (Εικόνα 8)

```

C:\Users\Mapiánva\PLINK>plink --file GSA1pheno
-----
PLINK! | v1.07 | 10/Aug/2009
-----
(C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
-----
For documentation, citation & bug-report instructions:
http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----

Web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... failed connection

Problem connecting to web

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Tue May 28 23:39:27 2019

Options in effect:
  --file GSA1pheno

692368 (of 692368) markers to be included from [ GSA1pheno.map ]
96 individuals read from [ GSA1pheno.ped ]
96 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
52 cases, 44 controls and 0 missing
96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 692368 SNPs
96 founders and 0 non-founders found
14961 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
10 SNPs with no founder genotypes observed
Warning, MAF set to 0 for these SNPs (see --nonfounders)
Writing list of these SNPs to [ plink.nof ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.992454
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 692368 SNPs
After filtering, 52 cases, 44 controls and 0 missing
After filtering, 96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex

```

Εικόνα 8: Άνοιγμα αρχείου GSA1pheno (.map, .ped) με PLINK

Τα αποτελέσματα από το 2ο plate ονομάζονται GSA2pheno και πρόκειται επίσης για δύο αρχεία (GSA2pheno.map, GSA2pheno.ped). (Εικόνα 9). Υπάρχει, επίσης και ένα 3^ο plate, το οποίο ονομάζεται GSA3pheno.

Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα χειρισμού γενετικών δεδομένων μέσω μια σειράς εντολών με τις οποίες ο χρήστης μπορεί να αναδιατάξει, αποκωδικοποιήσει και συγχωνεύσει δεδομένα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι:

plink - - fileGSA1pheno - -mergeGSA2pheno.pedGSA2pheno.map - - recode - - outGSAmerged

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 GSAmerged (.map, .ped).

```
C:\Users\Μαριάννα\PLINK>plink --file GSA2pheno
-----@
      PLINK!          |    v1.07          |    10/Aug/2009
-----@
(C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
  http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----@

Web-based version check ( --noweb to skip )
Recent cached web-check found...Problem connecting to web

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Tue May 28 23:58:51 2019

Options in effect:
  --file GSA2pheno

692366 (of 692366) markers to be included from [ GSA2pheno.map ]
96 individuals read from [ GSA2pheno.ped ]
96 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
48 cases, 48 controls and 0 missing
96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
96 founders and 0 non-founders found
19228 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
7 SNPs with no founder genotypes observed
Warning, MAF set to 0 for these SNPs (see --nonfounders)
Writing list of these SNPs to [ plink.nof ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.99018
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
After filtering, 48 cases, 48 controls and 0 missing
After filtering, 96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
```

Εικόνα 9: Άνοιγμα αρχείου GSA2pheno (.map, .ped) με PLINK

6.2. Quality control

Ο στόχος των αναλύσεων συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος, όπως τονίστηκε και στην εισαγωγή, είναι να ταυτοποιηθούν SNPs που συνεισφέρουν στην εμφάνιση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου. Ένας καθοριστικός παράγοντας όμως, που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα, είναι η ποιότητα των δεδομένων. Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και να μην προκύψουν ψευδώς θετικές ή ψευδώς αρνητικές συσχετίσεις, είναι απαραίτητο πριν την ανάλυση να πραγματοποιηθεί το στάδιο του qualitycontrol ώστε να απομακρυνθούν μη αξιόπιστα δείγματα και SNPs. Κακή ποιότητα δεδομένων μπορεί να οφείλεται σε κακή ποιότητα των δειγμάτων DNA, λάθη κατά το χειρισμό των δειγμάτων, λάθη κατά την αλληλούχιση πιθανόν λόγω μη σωστής υβριδοποίησης κ.α. (Marees et al., 2018).

Το πρώτο στάδιο του qualitycontrol αφορά την απομάκρυνση των SNPs τα οποία δεν έχουν αλληλουχηθεί σωστά στα περισσότερα δείγματα καθώς 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% genotypingrate, 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 qualitycontrol χρησιμοποιείται η εντολή:

plink - - mind 0.01

Αυτή η 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 minorallelefrequency, δηλαδή συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου, ≥ 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 mafthreshold. 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 qualitycontrol, 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 qualitycontrol στα δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε η εξής εντολή:

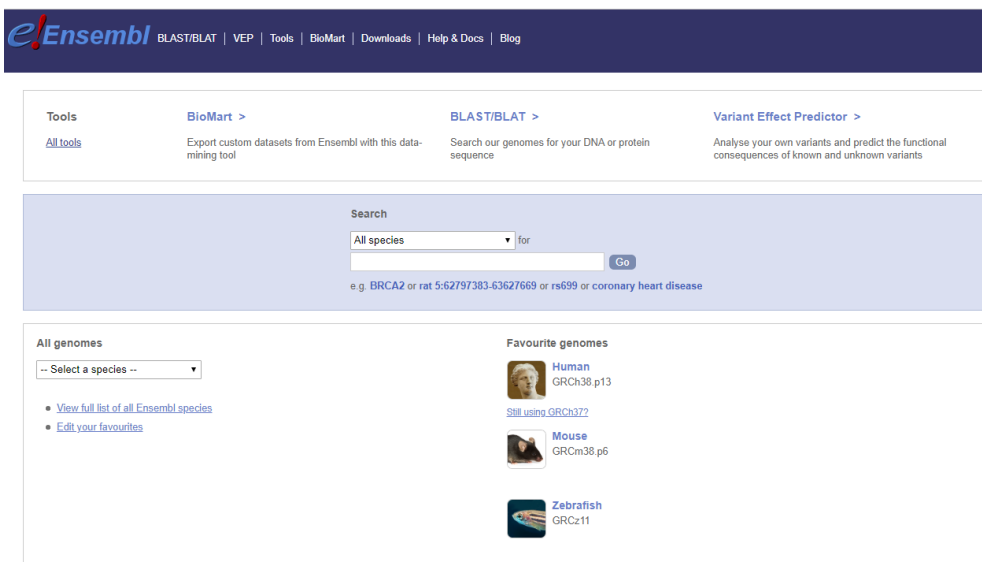
```
plink --file GSAmerged --geno 0.01 --mind 0.01 --maf 0.05 --tab --recode --out GSAQC
```

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 qualitycontrol. Ως αρχείο ανάλυσης ορίστηκε το GSAmerged 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.

7. Βάσεις δεδομένων

Για την επιλογή των κατάλληλων SNPs για περαιτέρω ανάλυση, αλλά και για εύρεση προσθέτων χρήσιμων πληροφοριών αξιοποιήθηκαν οι εξής βάσεις δεδομένων :

I. EnsemblGrCh37



Εικόνα 9: Αρχική σελίδα της B.D. Ensembl

Η Ensembl είναι μια από τις γνωστές βάσεις δεδομένων για ανάκτηση γονιδιωματικών πληροφοριών και αποτελεί πρακτικά μια μηχανή αναζήτησης του γονιδιώματος διάφορων οργανισμών. Στην συγκεκριμένη εργασία ήταν πολύ χρήσιμο για την εύρεση πληροφοριών για τα SNPs, στα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση, αφού παρέχονται πληροφορίες για την θέση τους, τους φαινοτύπους που έχουν συσχετιστεί με αυτό και τα ποσοστά μεταλλάξης τους σε διάφορους πληθυσμούς.

Αλλά βασικά εργαλεία της Ensembl, αποτελούν το BLAST, το οποίο παρέχει την δυνατότητα αναζήτησης συγκεκριμένων αλληλουχιών στο γονιδίωμα και εύρεση της σε αυτό. Στην ανάλυση των δεδομένων αυτόν έγινε με βάση το γονιδίωμα αναφοράς GRCh37.

II. SNPnexus

The screenshot shows the SNPnexus web application interface. At the top, there is a purple header with the 'SNPnexus' logo on the left and the 'Barts Cancer Institute' logo on the right. Below the header is a navigation bar with links for 'Home', 'About', 'User Guide', 'Example', 'News', 'Citation', and 'Contact'. The main content area is divided into two sections: 'User details' and 'Query Options'. The 'User details' section contains two input fields: 'Email address (optional):' and 'Dataset name (optional):'. The 'Query Options' section includes a 'Query Type' dropdown menu set to 'Batch Query', a 'Batch Query' section with a text area for pasting queries (up to 100K SNPs/InDels) and a 'Load Example' link, and a file upload section with a 'Data auswählen' button and a 'Keine ausgewählt' status.

Εικόνα 10: Αρχική σελίδα της B.D. SNPnexus

Η SNPnexus είναι μια βάση δεδομένων που προσφέρει πληροφορίες για SNPs συνδυάζοντας δεδομένα από διαφορετικές πηγές πραγματοποιώντας μεταξύ άλλων και Annotation (Dayem Ullah et al., 2018).

Οι πολυμορφισμοί DNA αποτελούν εναλλακτικές μορφές ενός χρωμοσωμικού τόπου που διαφέρουν ως προς την αλληλουχία τους. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) αφορούν την αλλαγή σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων σε μια θέση του γονιδιώματος (Russell, 2006). Συναντώνται με μεγάλη συχνότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα και αποτελούν μια σημαντική πηγή για τη διερεύνηση της γενετικής βάσης πολλών ασθενειών. Είναι πλέον αποδεκτό ότι συγκεκριμένα SNPs αυξάνουν την προδιάθεση για την εμφάνιση συγκεκριμένων ασθενειών, όπως είναι ο διαβήτης και ο καρκίνος, ή επηρεάζουν την εξέλιξη της ασθένειας. Επομένως, πολυμορφισμοί που επηρεάζουν τη

λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, όταν βρίσκονται σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και οδηγούν σε αλλαγή των αμινοξέων, πολυμορφισμοί που επηρεάζουν θέσεις εναλλακτικού ματίσματος ή βρίσκονται σε ρυθμιστικά στοιχεία ή συντηρημένες non-coding περιοχές, αποτελούν στόχους μελέτης για διάφορες ασθένειες.

Η SNPnexus προσφέρει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες ώστε να διευκολύνεται κάθε φορά η επιλογή των SNPs που πιθανόν συνεισφέρουν στον εκάστοτε φαινότυπο και πληρούν τα κριτήρια της μελέτης σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό (Chelala et al., 2009).

Συγκεκριμένα, με την αναζήτηση κάθε SNP 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 (DayemUllahetal., 2012).

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##. Στη συνέχεια, από την υποενότητα Annotationcategories επιλέγεται η έκδοση γονιδιώματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά και ορίζονται οι διάφορες 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 οι παράμετροι miR-BASE 20.0 και microRNAs (miRNARegistry) / snoRNAs and scaRNAs (snoRNA-LBME-DB) από την ενότητα Regulatory elements και 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.

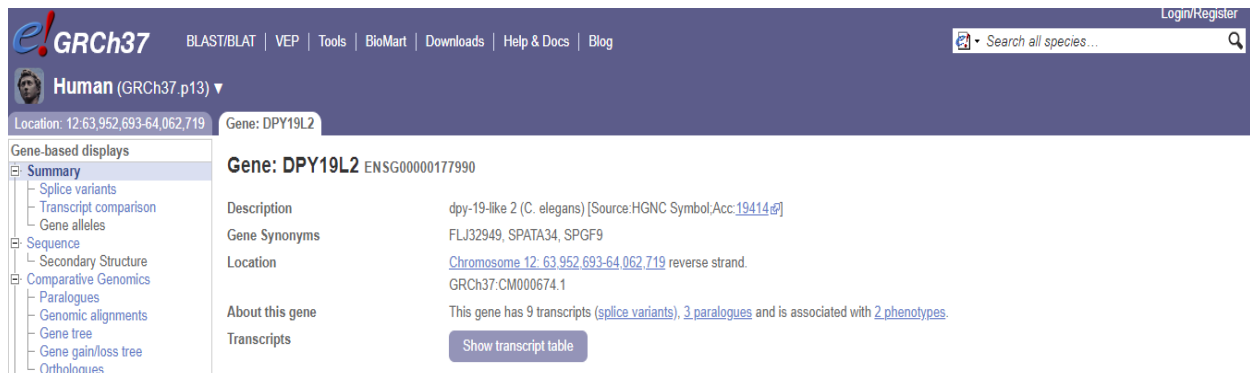
Έγινε δηλαδή αναζήτηση ώστε να εντοπιστούν SNPs που βρίσκονται σε θέσεις πρόσδεσης miRNAs αλλά και SNPs που επηρεάζουν άμεσα μικρά ρυθμιστικά RNAs όπως miRNAs, snoRNAs και scaRNAs. Η επιλογή GAD χρησιμοποιήθηκε ώστε να εντοπιστεί βιβλιογραφία που αφορά την συσχέτιση των SNPs με ασθένειες και πιθανόν συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε ξεχωριστή σελίδα χωρισμένα σε υποενότητες ώστε να είναι πιο εύκολη η πλοήγηση σε αυτά.

Δ. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εξαγωγή SNPs

Αρχικά, έγινε αναζήτηση των θέσεων των γονιδίων στην βάση δεδομένων Ensembl και στην συνέχεια, εξαγωγή των SNPs που βρίσκονται στις θέσεις αυτές μέσω του PLINK ως εξής :

Για το γονίδιο DPY19L2:



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene DPY19L2. The top navigation bar includes links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. The search bar contains 'Search all species...'. The main content area displays the gene's location (12:63,952,693-64,062,719) and the gene name DPY19L2. A sidebar on the left lists various gene-based displays such as Summary, Splice variants, Transcript comparison, Gene alleles, Sequence, Secondary Structure, Comparative Genomics, Paralogues, Genomic alignments, Gene tree, Gene gain/loss tree, and Orthologues. The main content area provides a description of the gene as 'dpy-19-like 2 (C. elegans)', lists synonyms (FLJ32949, SPATA34, SPGF9), and shows its location on chromosome 12. It also mentions that the gene has 9 transcripts, 3 paralogues, and is associated with 2 phenotypes. A 'Show transcript table' button is located at the bottom of the gene information section.

Εικόνα 11: Το γονίδιο DPY19L2 στην Ensembl

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι το γονίδιο DPY19L2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12, ξεκινάει στην θέση 63,952,693 και εκτείνεται μέχρι την θέση 64,062,719.

Η εξαγωγή των SNPs έγινε με τις εξής εντολές :

```
--file GSA2020clean --chr 3 --from-bp 63952693 --to-bp 64062719 --write-snpList --out DPY19L2
```

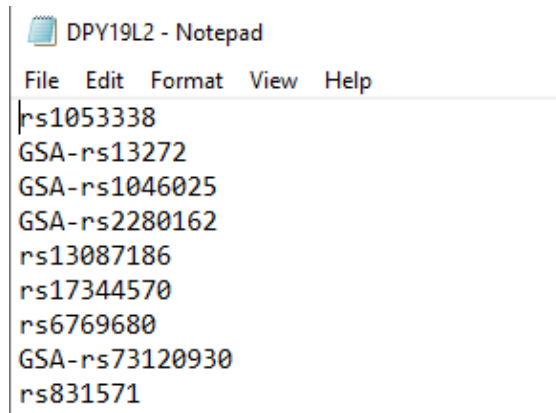
Όπουπάρθηκε το αρχείο GSA2020clean και εξάχθηκαν τα SNPs από την θέση 63952693 μέχρι την 64062719 και εισάχθηκαν σε ένα νέο αρχείο Snplist (το οποίο περιέχει μόνο τα rs# των SNPs) με όνομα DPY19L2.

```
4012 MB RAM detected; reserving 2006 MB for main workspace.
Allocated 1128 MB successfully, after larger attempt(s) failed.
.ped scan complete (for binary autoconversion).
Performing single-pass .bed write (20016 variants, 282 people).
--file: DPY19L2-temporary.bed + DPY19L2-temporary.bim + DPY19L2-temporary.fam
written.
9 out of 20016 variants loaded from .bim file.
282 people (282 males, 0 females) loaded from .fam.
282 phenotype values loaded from .fam.
Using 1 thread (no multithreaded calculations invoked).
Before main variant filters, 282 founders and 0 nonfounders present.
Calculating allele frequencies... done.
Total genotyping rate is 0.995666.
9 variants and 282 people pass filters and QC.
Among remaining phenotypes, 131 are cases and 151 are controls.
List of variant IDs written to DPY19L2.snplist .
```

Εικόνα 12: Εξαγωγή SNPs από PLINK

Στα κόκκινα πλαίσια της παραπάνω εικόνας φαίνονται κάποιες πληροφορίες, οι οποίες είναι χρήσιμες για την περεταίρω ανάλυση των δεδομένων καθώς και την επαλήθευση της ανάλυσης μέσω PLINK . Συγκεκριμένα, βλέπουμε από ποιες θέσεις του γονιδιώματος έγινε η εξαγωγή των SNPs καθώς και τον αριθμό των συνολικών ατόμων (282) , τον αριθμό των cases και controls (131cases και 151controls) και το φύλο των ατόμων (282 αρσενικά άτομα και 0 θηλυκά άτομα).

Τέλος βλέπουμε ότι η ανάλυση έδωσε 9SNPs στο τελικό αρχείο.



```
DPY19L2 - Notepad
File Edit Format View Help
rs1053338
GSA-rs13272
GSA-rs1046025
GSA-rs2280162
rs13087186
rs17344570
rs6769680
GSA-rs73120930
rs831571
```

Εικόνα 13: Τα SNPs του γονιδίου DPY19L2

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα γονίδια: CFAP43, CFAP44, KIT, KITLG

Στην συνέχεια τα SNPστων αρχείων αυτών αναλύθηκαν με τη βοήθεια του SNPnexus, με βάση τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν προηγουμένως .

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα ανάλυσης, μέσω του SNPnexus για το γονίδιο DPY19L2.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με SNPnexus, σε ότι αφορά την υπάρχουσα βιβλιογραφία, που να συνδέει τα συγκεκριμένα SNPs με κάποιον παθολογικό φαινότυπο αναπαρίστανται ως εξής :

Variation ID	GAD ID	Association	Associated SNPs	Phenotype	Disease Class	Gene	Reference
rs1053338	736588	Y	rs10510280	Body Weight	METABOLIC	LRRN1	Caroline S Fox et al
rs1053338	731521	Y	rs10510283	Menopause	REPRODUCTION	LRRN1	Kathryn L Lunetta et al
rs1053338	733922	Y	rs10510283	Cholesterol, HDL	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al
rs1053338	731523	Y	rs10510285	Menopause	REPRODUCTION	LRRN1	Kathryn L Lunetta et al
rs1053338	731524	Y	rs10510286	Menopause	REPRODUCTION	LRRN1	Kathryn L Lunetta et al
rs1053338	733934	Y	rs10510286	Cholesterol, HDL	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al
rs1053338	733971	Y	rs10510286	Cholesterol, HDL	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al
rs1053338	733902	Y	rs3846148	Cholesterol, HDL	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al
rs1053338	734224	Y	rs3846148	Cholesterol, HDL	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al
rs1053338	735613	Y	rs3846148	Triglycerides	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al
rs1053338	731525	Y	rs3846149	Menopause	REPRODUCTION	LRRN1	Kathryn L Lunetta et al
rs1053338	731522	Y	rs10510289	Menopause	REPRODUCTION	LRRN1	Kathryn L Lunetta et al
rs1053338	733950	Y	rs10510289	Cholesterol, HDL	METABOLIC	LRRN1	Sekar Kathiresan et al

Εικόνα 14: Αποτελέσματα της SNP Nexus για το γονίδιο DPY19L2

Το αρχείο αυτό δίνει πληροφορίες για το όνομα του SNP, τον παθολογικό φαινότυπο που έχει συσχετιστεί με το SNP αυτό, την κατηγορία της ασθένειας και την σχετική βιβλιογραφία.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα γονίδια, για να βρεθεί τυχόν σχετικός φαινότυπος.

Τελικά, συσχέτιση με ανδρική υπογονιμότητα βρέθηκε μόνο για τα γονίδια KITLG.

Τα SNPs είναι τα εξής:

KITLG	rs995030
	GSA-rs113502828
	rs1466692
	rs3782181
	rs4474514

Πίνακας 3: SNPs του γονιδίου KITLG

Αν και δεν βρέθηκε συσχέτιση των υπόλοιπων SNPs σε προηγούμενη βιβλιογραφία, η ανάλυση συνεχίστηκε για όλα τα SNP με το ίδιο τρόπο.

Έπειτα, συλλέχθηκαν κάποιες επιπλέον πληροφορίες για τα επιμέρους SNPs, μέσω της Ensembl, οι οποίες σχετίζονται με τις πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων του κάθε SNP.

rs3782181 SNP

Most severe consequence	intron variant See all predicted consequences
Alleles	C/A Ancestral: C MAF: 0.38 (C) Highest population MAF: 0.48
Location	Chromosome 12:88953561 (forward strand) VCF: 12 88953561 rs3782181 C A
Evidence status	
HGVS names	This variant has 5 HGVS names - Show
Synonyms	This variant has 2 synonyms - Show
Genotyping chips	This variant has assays on 9 chips - Show
Original source	Variants (including SNPs and indels) imported from dbSNP (release 153) View in dbSNP
About this variant	This variant overlaps 4 transcripts , 1 regulatory feature , has 2504 sample genotypes , is associated with 3 phenotypes and is mentioned in 4 citations .

Εικόνα 16: Πληροφορίες για το SNPrs3782181 στην Ensembl

Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται κάποιες πληροφορίες για το SNP rs3782181, από την βάση δεδομένων Ensembl. το SNP αυτό φαίνεται να κατηγοριοποιείται ως ιντρονική μετάλλαξη.

Οι πληροφορίες αυτές, για το κάθε SNP, δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

GENES	SNPs	MUTATIONS
KITLG	rs995030	μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή
	GSA-rs113502828	ιντρονική μετάλλαξη
	rs1466692	ιντρονική μετάλλαξη
	rs3782181	ιντρονική μετάλλαξη
	rs4474514	ιντρονική μετάλλαξη
KIT	rs1498821	ιντρονική μετάλλαξη
	rs994965	ιντρονική μετάλλαξη
	rs725344	ιντρονική μετάλλαξη
	rs55808507	ιντρονική μετάλλαξη
	GSA-rs6852162	ιντρονική μετάλλαξη
	rs7662508	ιντρονική μετάλλαξη
	rs1498828	ιντρονική μετάλλαξη
	GSA-rs6554139	ιντρονική μετάλλαξη
DPY19L2	rs1053338	παρανοηματική μετάλλαξη
	GSA-rs13272	μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή
	GSA-rs1046025	μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή
	GSA-rs2280162	μετάλλαξη σε μη-κωδικοποιητική περιοχή (εξώνιο)
	rs13087186	μετάλλαξη στην 5' περιοχή
	rs17344570	μετάλλαξη στην 5' περιοχή
	rs6769680	μετάλλαξη σε διαγονιδιακή περιοχή
	GSA-rs73120930	μετάλλαξη σε διαγονιδιακή περιοχή
rs831571	μετάλλαξη σε ρυθμιστική περιοχή	
CFAP43/WDR69	rs10748891	μετάλλαξη σε διαγονιδιακή περιοχή
	GSA-rs581533	ιντρονική μετάλλαξη
	GSA-rs642743	ιντρονική μετάλλαξη
	rs76986594	ιντρονική μετάλλαξη
	rs79228804	ιντρονική μετάλλαξη
	GSA-rs17752045	ιντρονική μετάλλαξη
	rs703343	ιντρονική μετάλλαξη
CFAP44/WDR52	rs3814407	μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή
	rs2270781	παρανοηματική μετάλλαξη
	GSA-rs7617723	ιντρονική μετάλλαξη
	rs13064411	συνώνυμη μετάλλαξη
	rs6438140	ιντρονική μετάλλαξη
	rs73235075	ιντρονική μετάλλαξη
	GSA-rs16845107	παρανοηματική μετάλλαξη
rs59722850	παρανοηματική μετάλλαξη	

Πίνακας 4: Κατηγοριοποίηση μεταλλάξεων για κάθε SNP

Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να φανούν χρήσιμες στην εκτίμηση της επίδρασης που θα μπορούσε να έχει μια μετάλλαξη των SNPs αυτών στον φαινότυπο. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη σε ένα SNP που βρίσκεται σε περιοχή ιντρονίου, αναμένεται να

έχει μικρότερη επίδραση στον φαινότυπο, σε σχέση με μια μετάλλαξη που να επηρεάζει το τελικό πρωτεϊνικό προϊόν .

2. Ανάλυση συσχέτισης

Αμέσως μετά το στάδιο του quality control, τα δεδομένα είναι έτοιμα για να χρησιμοποιηθούν σε μια ανάλυση συσχέτισης ώστε να εντοπιστούν SNPs με διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων, ανάμεσα σε cases και controls. Προκειμένου να γίνει αυτό, χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα στατιστικά τεστ ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας που μελετάται κάθε φορά, δηλαδή αν τα χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από την ασθένεια είναι ποιοτικά ή ποσοτικά (Marees et al., 2018).

Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα πραγματοποίησης ανάλυσης συσχέτισης με την εξής εντολή:

plink - - assoc

Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποιεί τη δοκιμασία χ^2 για να συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε control και cases για κάθε SNP. SNPs που συνεισφέρουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου αναμένεται να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στις συχνότητες αλληλομόρφων ανάμεσα σε controls και cases. Το αρχείο που προκύπτει από την ανάλυση δίνει τις συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε SNP σε controls και cases, την τιμή του χ^2 αλλά και τις τιμές p-value και oddsratio.

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
1	rs6681049	1	1	0.1591	0.2667	2	3.067	0.07991	0.5203
1	rs4074137	2	1	0.07955	0.07778	2	0.001919	0.9651	1.025
1	rs1891905	4	1	0.4091	0.4	2	0.01527	0.9017	1.038
1	rs9729550	5	1	0.1705	0.08889	2	2.631	0.1048	2.106
1	rs3813196	6	1	0.03409	0.02222	2	0.2296	0.6318	1.553
1	rs12044597	11	1	0.5	0.4889	2	0.02198	0.8822	1.045
1	rs10907185	12	1	0.3068	0.2667	2	0.3509	0.5536	1.217
1	rs11260616	13	1	0.2326	0.2	2	0.2754	0.5998	1.212
1	rs745910	14	1	0.1395	0.1932	2	0.9013	0.3424	0.6773
1	rs262688	17	1	0.2045	0.1667	2	0.4227	0.5156	1.286
1	rs2460000	18	1	0.25	0.2778	2	0.1767	0.6742	0.8667
1	rs260509	19	1	0.125	0.2	2	1.835	0.1755	0.5714
1	rs2645091	20	1	0.1818	0.1444	2	0.4557	0.4996	1.316
1	rs2643895	21	1	0.05682	0.1111	2	1.7	0.1923	0.4819
1	rs2840529	22	2	0.4432	0.4667	1	0.09896	0.7531	0.9096
1	rs3736330	23	2	0.4432	0.5222	1	1.113	0.2914	0.7282
1	rs4233033	24	1	0.125	0.1222	2	0.00317	0.9551	1.026
1	rs942817	25	1	0.1477	0.2333	2	2.11	0.1463	0.5695
1	rs2236395	26	1	0.5114	0.4222	2	1.421	0.2333	1.432
1	rs7550231	27	1	0.3977	0.4556	2	0.6082	0.4355	0.7892
1	rs735000	28	1	0.06818	0.1	2	0.5837	0.4449	0.6585
1	rs6679232	29	1	0.1023	0.06667	2	0.731	0.3926	1.595

Εικόνα 15: Παράδειγμα αρχείου αποτελεσμάτων που προκύπτει με την εντολή - -assoc.

Οι στήλες αντιστοιχούν: (1) στο χρωμόσωμα όπου βρίσκεται το SNP, (2) στο rs# του SNP, (3) στη θέση του ζεύγους βάσεων, (4) στον κωδικό του αλληλομόρφου A1, (5) στη συχνότητα εμφάνισης του A1 στα δείγματα cases, (6) στη συχνότητα εμφάνισης του A1 στα δείγματα controls, (7) στον κωδικό του αλληλομόρφου A2, (8) στην τιμή του χ^2 , (9) στην τιμή του p-value και (10) στο oddsratio.

Η τιμή p-value (Observed level of significance ή probability value) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων και η τιμή του δηλώνει πόσο πιθανό είναι η συσχέτιση ενός αλληλομόρφου με την ασθένεια να οφείλεται στην τύχη. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του τόσο λιγότερο πιθανό είναι η συσχέτιση να οφείλεται στην τύχη.

Η τιμή odds ratio ή λόγος σχετικών πιθανοτήτων δείχνει πόσο πιθανό είναι να ανήκει κανείς στην ομάδα cases αν φέρει το αλληλόμορφο που συσχετίζεται με τη νόσο (risk allele). Αποτελεί ουσιαστικά ένα μέτρο της δύναμης της συσχέτισης. Ακόμη, τιμές oddsratio ίσες με τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης και μη εμφάνισης της νόσου είναι ίσες, δηλαδή δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και εμφάνισης της ασθένειας, ενώ τιμές μεγαλύτερες από τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες

εμφάνιση είναι μεγαλύτερες από τις πιθανότητες μη εμφάνισης. Τέλος τιμές odds ratio μικρότερες από τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης της νόσου είναι μικρότερες από τις πιθανότητες μη εμφάνισης.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση είναι:

plink - - fileGSAQC - -assoc

η οποία με βάση τα δεδομένα του αρχείου GSAQC παράγει ένα νέο αρχείο που περιέχει τις πληροφορίες που αναφέρονται παραπάνω και ονομάζεται GSAQC.assoc. Από το συγκεκριμένο αρχείο επιλέχθηκαν τα SNPs με $p\text{-value} \leq 0.05$ και $oddsratio > 1$. Η συγκεκριμένη τιμή p-value δηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των αλληλομόρφων η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί από την τύχη και η τιμή oddsratio μεγαλύτερης της μονάδας δηλώνει ότι τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης του χαρακτήρα που μελετάται, δηλαδή της ανδρικής υπογονιμότητας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά το στάδιο του Quality Control τα SNPs που διατηρήθηκαν είχαν p-value της τάξης του 10^{-4} .

Στον παρακάτω Πίνακα φαίνονται τα SNPs από όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν, οι συχνότητες στα control(F_U) και στα cases(F_A), καθώς και οι τιμές P-Value.

Gene		A1	F_A	F_U	A2	P-Value
CFAP43/WDR69	rs10748861	T	0.3596	0.3134	C	0.277
	GSA-rs581533	C	0.4079	0.3433	T	0.1381
	GSA-rs642743	A	0.4781	0.4478	C	0.4998
	rs76986594	T	0.09211	0.1082	C	0.5527
	rs79228804	A	0.1579	0.1579	C	1
	GSA-rs17752045	C	0.2105	0.2127	A	0.9532
	rs703343	T	0.2675	0.2351	C	0.4222
	CFAP44/WDR52	rs3814407	A	0.1096	0.1374	G
rs2270781		A	0.1404	0.1604	G	0.5335
GSA-rs7617723		T	0.0614	0.07836	C	0.4624
rs13064411		G	0.1272	0.1194	A	0.7923
rs6438140		C	0.4035	0.3993	A	0.9232
rs73235075		A	0.07018	0.05597	G	0.5148
GSA-rs16845107		A	0.0614	0.07836	C	0.4624
rs59722850		G	0.1842	0.2015	A	0.6273
KIT		RS1498821	G	0.386	0.3843	T
	rs994965	C	0.3026	0.3209	T	0.6619
	rs725344	A	0.08333	0.1007	G	0.5052
	rs55808507	T	0.2061	0.1654	C	0.2444
	GSA-rs6852162	A	0.2807	0.2761	G	0.9096
	rs7662508	C	0.443	0.4291	T	0.7561
	rs1498828	T	0.2434	0.2537	C	0.7906
	GSA-rs6554139	C	0.4211	0.4104	T	0.8112
	KITLG	rs995030	A	0.1447	0.1381	G
GSA-rs113502828		G	0.06579	0.05224	T	0.5215
rs1466692		G	0.07456	0.04478	A	0.1588
rs3782181		C	0.1623	0.1567	A	0.866
rs4474514		G	0.1637	0.1567	A	0.8325
DPY19L2	rs1053338	G	0.1228	0.1604	A	0.2329
	GSA-rs13272	G	0.4079	0.3731	A	0.4287
	GSA-rs1046025	T	0.1754	0.1679	C	0.8245
	GSA-rs2280162	A	0.1886	0.1754	G	0.7033
	rs13087186	A	0.307	0.2761	G	0.4499
	rs17344570	A	0.1228	0.153	C	0.3331
	rs6769680	A	0.3553	0.2873	C	0.1055
	GSA-rs73120930	A	0.06818	0.05769	G	0.6362
rs831571	T	0.2544	0.2127	C	0.2728	

Πίνακας 5: Συχνότητες στα control(F_U) και στα cases(F_A), καθώς και οι τιμές P-Value, όλων των SNPσπου μελετήθηκαν

3. Σύγκριση συχνοτήτων μεταξύ πληθυσμών

Στη συνέχεια της ανάλυσης, έγινε λήψη δεδομένων από την Ensembl, σχετικά με τα ποσοστά γονοτύπων στα SNPs του γονίδιου KITLG. Η Ensembl παρέχει δεδομένα για διάφορους πληθυσμούς, αλλά στην ανάλυση αυτή πάρθηκαν τα δεδομένα για τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, καθώς και τα συνδικάστηκα δεδομένα όλων των πληθυσμών (African, American, East Asian, South Asian, European).

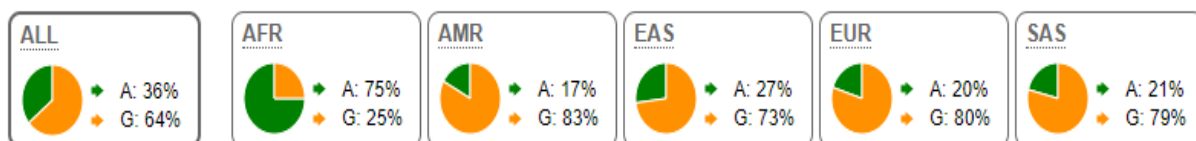
Τα δεδομένα αυτά προέρχονται από το 1000 Genomes Project του IGSR. Το 1000 Genomes Project έτρεξε από το 2008 μέχρι το 2015 δημιουργώντας τον μεγαλύτερο δημόσιο κατάλογο ανθρωπίνων γενετικών παραλλαγών και γενετικών δεδομένων. Τα δεδομένα που παρέχονται, δίνονται ως ποσοστά για τα διαφορετικά αλληλόμορφα (πχ 40% A 60% T) και ως ποσοστά των διαφορετικών γονοτύπων (πχ A/A 20% A/T 30% T/T 50%). Έγινε χρήση των ποσοστών γονοτύπων.

Τα αποτελέσματα της διεργασίας αυτής φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.

Για το γονίδιο KITLG:

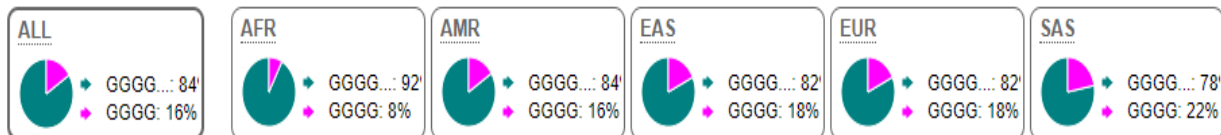
rs995030: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: G



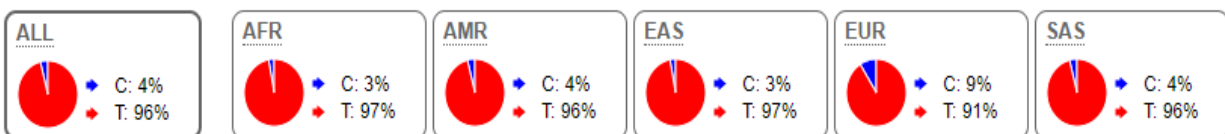
rs11350228: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: GGGGG

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: GGGG



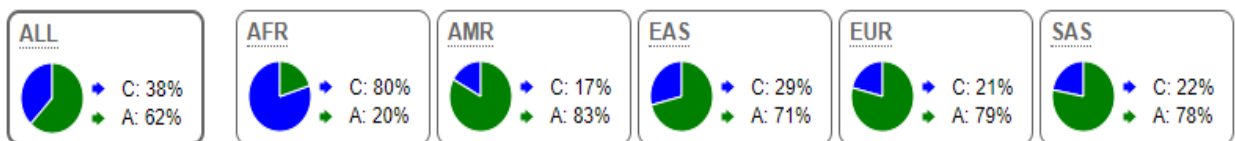
rs1466692: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: C



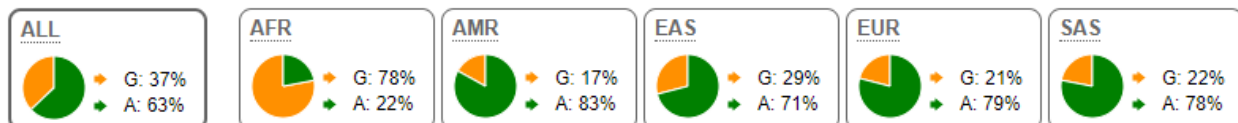
rs3782181: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: A



rs4474514: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G

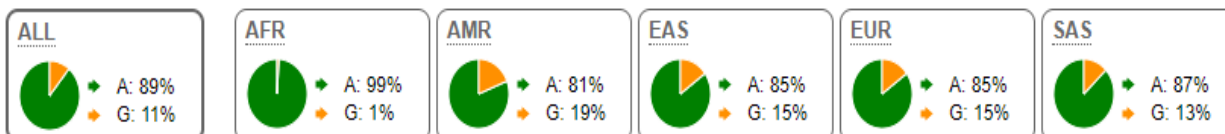
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: A



Για το γονίδιο DPY19L2:

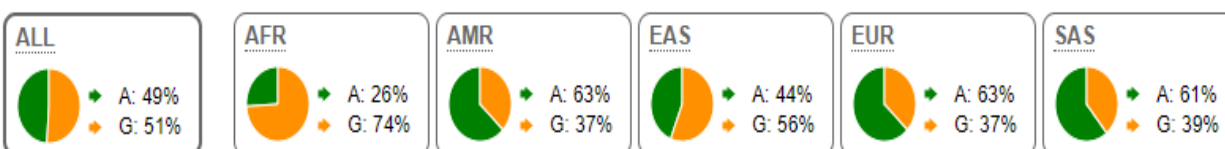
rs1053338: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: G



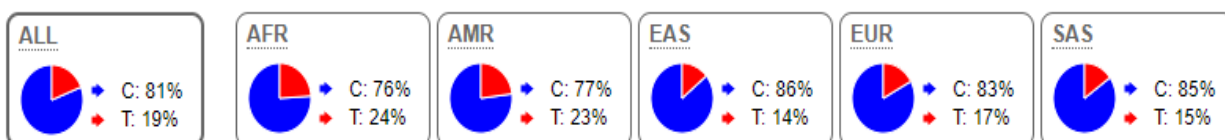
rs13272: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: G



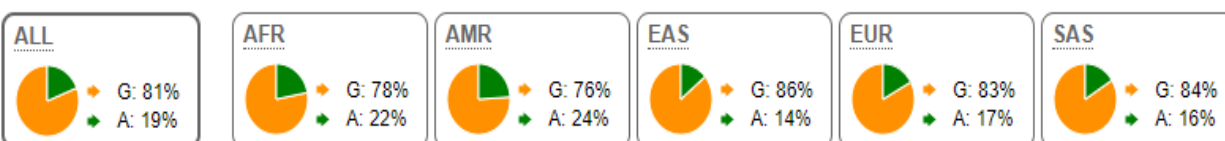
rs1046025: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A

μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: G

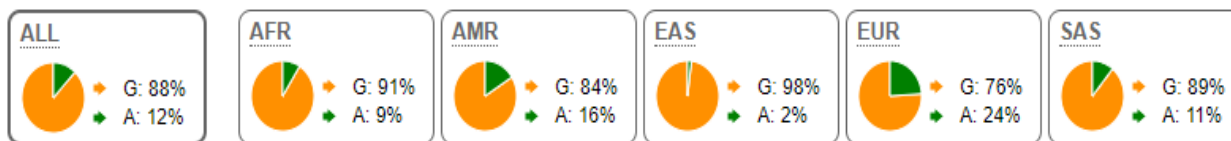


rs2280162: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A

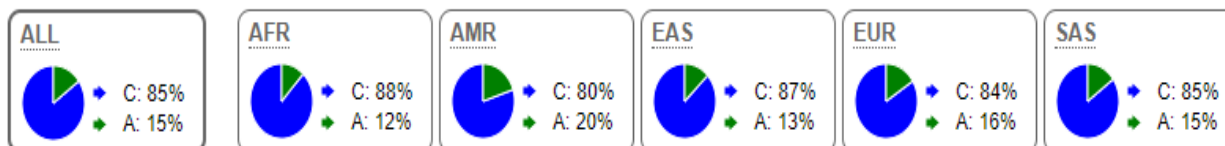
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: G



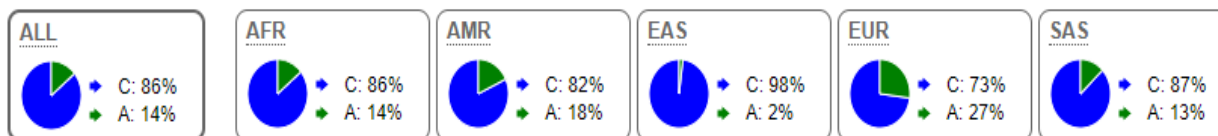
rs13087186: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: A



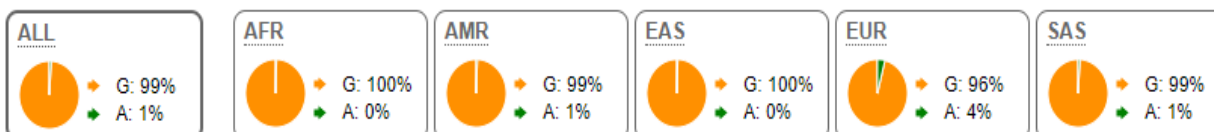
rs17344570: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: A



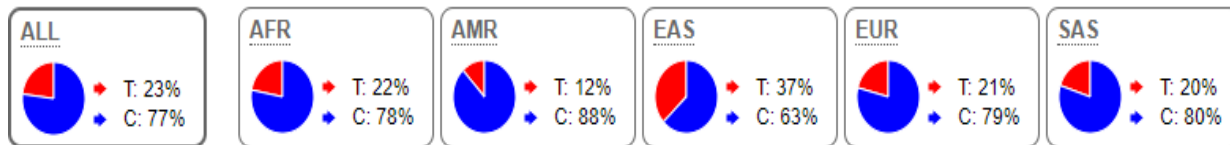
rs6769680: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



rs73120930: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: A

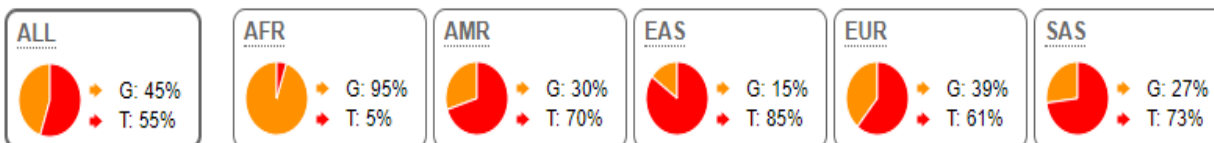


rs831571: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: T

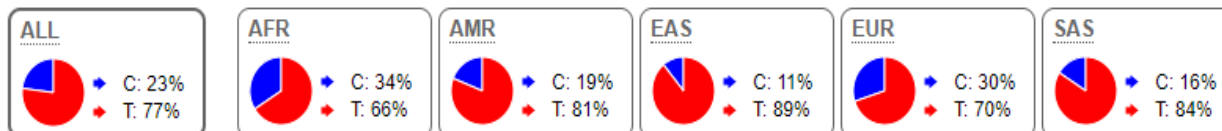


Για το γονίδιοKIT:

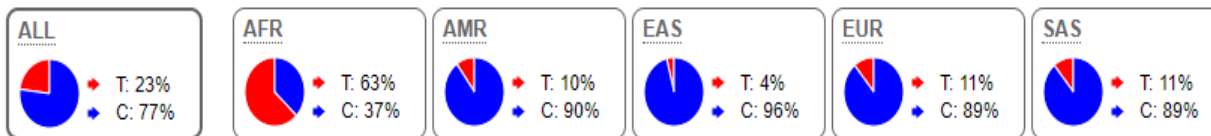
rs1498821: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: T



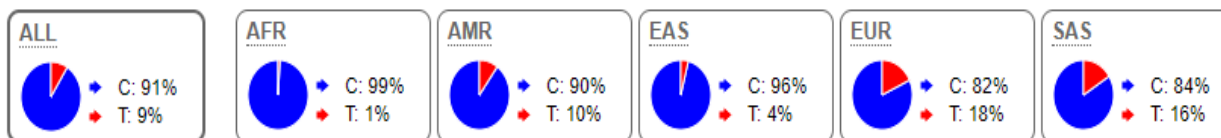
rs994965: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:T
μεταλλαγμένοαλληλόμορφο: C



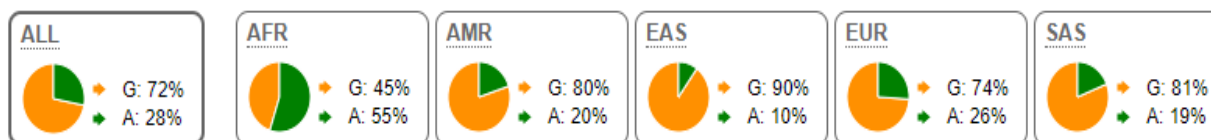
rs725344: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



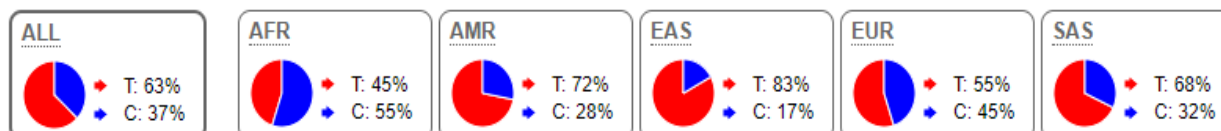
rs55808507: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T



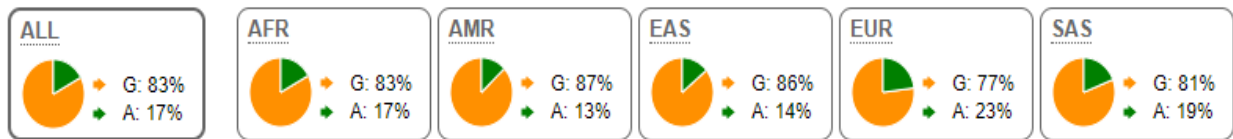
rs6852162: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



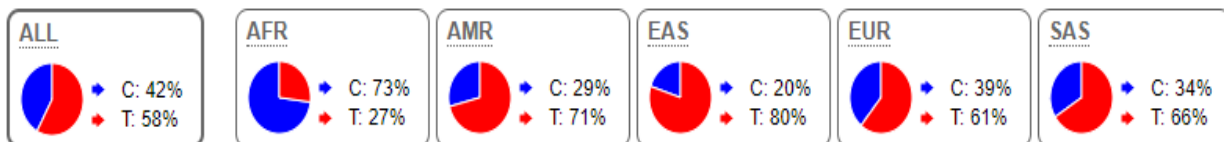
rs7662508: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



rs1498828: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

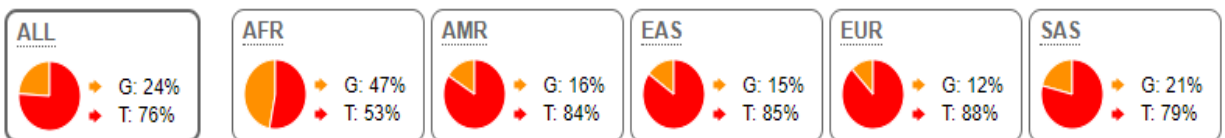


rs6554139: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

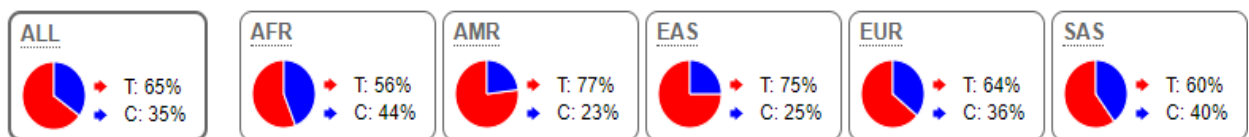


Για το γονίδιο CFAP43/WDR69:

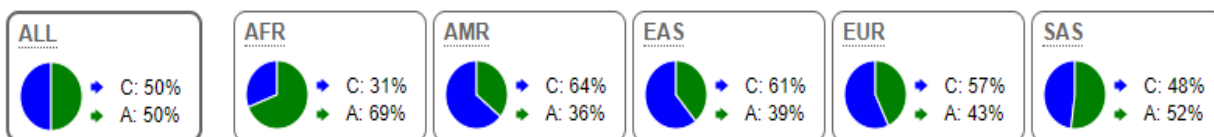
rs10748891: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T



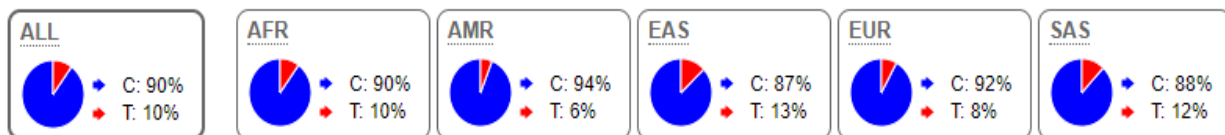
rs581533: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:T
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



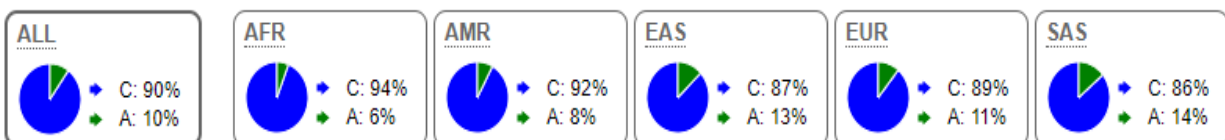
rs642743: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



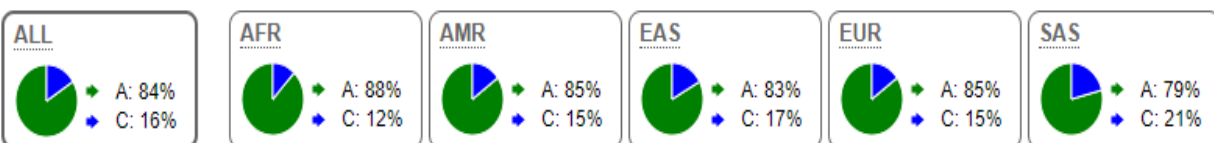
rs76986594: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T



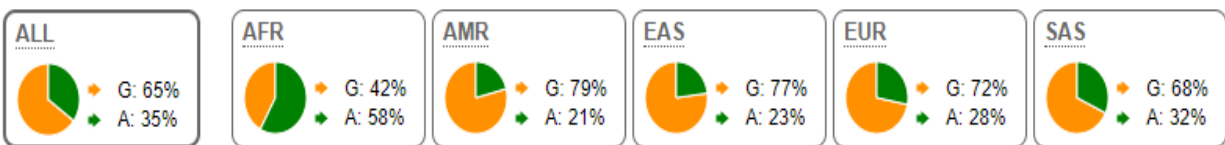
rs79228804: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



rs17752045: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

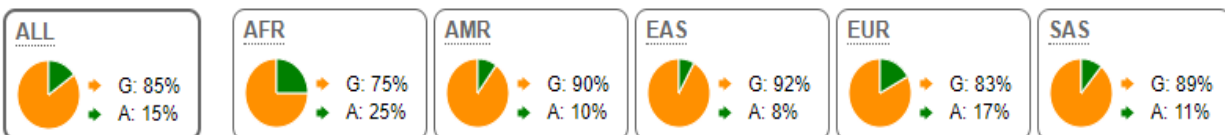


rs703343: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G

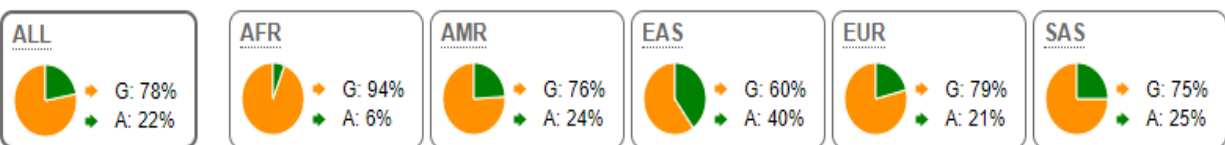


Για το γονίδιο CFAP44/WDR52:

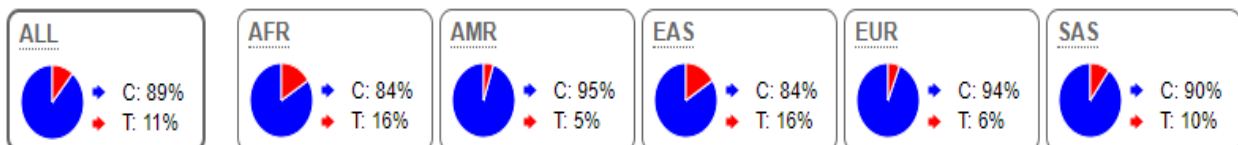
rs3814407: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



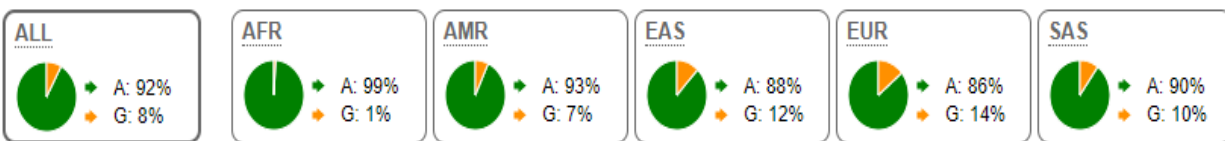
rs2270781: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



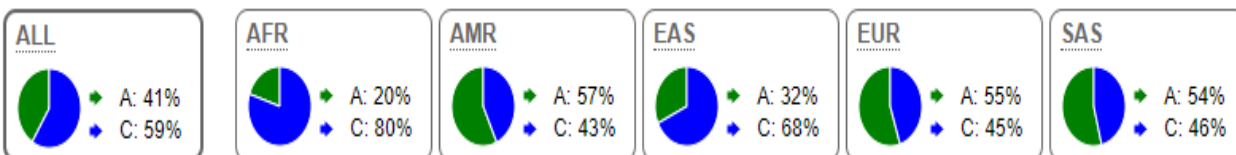
rs7617723: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:T
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



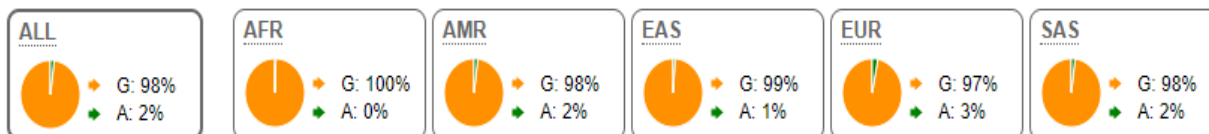
rs13064411: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A
μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



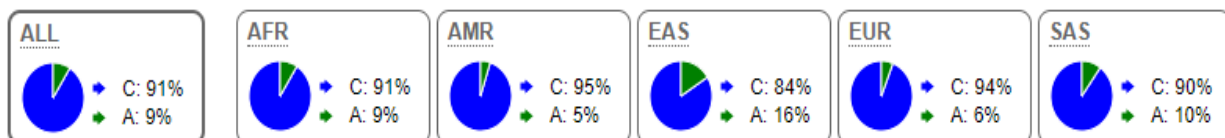
rs6438140: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



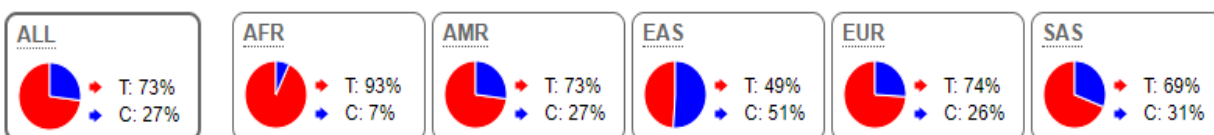
rs73235075: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:G
μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



rs16845107: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:A
μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



rs59722850: αλληλόμορφο αγρίου τύπου:C
 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα SNPs, στα οποία βρέθηκαν αποκλίσεις μεταξύ των ποσοστών στον ελληνικό πληθυσμό και παγκοσμίως. Βρέθηκαν SNPs, στον ελληνικό πληθυσμό, τα οποία είχαν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου, σε σχέση με τα παγκόσμια ποσοστά. Βρέθηκαν, όμως, και SNPs, τα οποία εμφάνιζαν μικρότερη συχνότητα στον ελληνικό πληθυσμό, συγκριτικά με τα παγκόσμια ποσοστά.

<i>GENE</i>	<i>SNP</i>	<i>Συχνότητες στον ελληνικό πληθυσμό</i>	<i>Συχνότητες στον παγκόσμιο πληθυσμό</i>
KITLG	rs1466692	7%	4%
DPY19L2	rs13272	41%	51%
	rs13087186	30%	12%
	rs6769680	35%	14%
	rs73120930	6%	1%
	rs1498821	38%	55%
KIT	rs725344	8%	77%
	rs55808507	20%	9%
	rs6852162	28%	72%
	rs1498828	24%	17%
CFAP43	rs10748891	36%	76%
	rs79229908	16%	10%
CFAP44	rs3814407	11%	85%
	rs7325075	7%	2%

Πίνακας 6: Συγκρίσεις συχνοτήτων των SNPs μεταξύ ελληνικού και παγκόσμιου πληθυσμού

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, καθώς συχνά οδηγεί στην εμφάνιση οικονομικών, ψυχολογικών αλλά και κοινωνικών προβλημάτων. Συγκεκριμένα, απασχολεί περίπου το 15% των ζευγαριών παγκοσμίως και ο ανδρικός παράγοντας συνεισφέρει περίπου στο 50% των περιπτώσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον για έγκαιρη και αποτελεσματική πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας να έχει αυξηθεί σημαντικά.

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαταραχή που επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από γενετικούς παράγοντες. Η διαδικασία της σπερματογένεσης άλλωστε, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί αυστηρή ρύθμιση και έκφραση γονιδίων σε συγκεκριμένα επίπεδα και συγκεκριμένο χρόνο.

Το σπερμοδιάγραμμα είναι η βασική μέθοδος κλινικής διερεύνησης του σπέρματος. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών του σπέρματος ερμηνεύεται ως προς τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα και μορφολογία τους.

Ο αριθμός των γονιδίων που συνεισφέρουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου είναι αρκετά μεγάλος, καθώς η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη συντονισμένη δράση χιλιάδων γονιδίων. Ωστόσο, σημαντικό ρόλο παίζουν τα γονίδια που μελετήθηκαν σε αυτή την έρευνα (DPY19L2, KIT, KITLG, CFAP43, CFAP44), τα οποία σχετίζονται με τους παράγοντες που μελετούνται στο σπερμοδιάγραμμα.

Η βιοπληροφορική ανάλυση των SNPs αυτών των γονιδίων, μπορεί να δώσει δεδομένα που δυνητικά θα διευκολύνουν τη διάγνωση και την πρόγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Ωστόσο, είναι δύσκολο να ληφθούν οριστικά αποτελέσματα περιορισμένων πειραμάτων και διεργασιών και συνεπώς είναι σημαντικό να ληφθεί υπ'όψιν ότι τα πειράματα και οι αναλύσεις έγιναν πάνω σε δεδομένα σχετικά μικρού αριθμού ατόμων ($n=282$) και SNPs ($n=37$).

Οι δύο κυρίες αναλύσεις που έγιναν αφορούν:

- Ανάλυση συσχέτισης, ώστε να εντοπιστούν SNPs με διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων, ανάμεσα σε cases και controls.
- Σύγκριση των δεδομένων με αυτά άλλων πληθυσμών.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) στα γονίδια που προαναφέρθηκαν, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη γονιδίων έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών.

Ειδικότερα, με ανάλυση συσχέτισης (association analysis) έγινε προσπάθεια εντοπισμού SNPs, με σημαντική διαφορά στη συχνότητα αλληλομόρφων, μεταξύ υγιών ατόμων και ατόμων με προβλήματα υπογονιμότητας. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες αλληλομόρφων, μεταξύ υγιών ατόμων και ατόμων με προβλήματα υπογονιμότητας, όμως αυτό μπορεί να οφείλεται και στο μικρό αριθμό ατόμων, που συμμετείχαν στο πείραμα.

Έγινε επίσης, αναζήτηση στη βιβλιογραφία για αυτά τα γονίδια, στην οποία μόνο το γονίδιο KITLG έδειξε συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα. Παρ'όλα αυτά, η μη εύρεση βιβλιογραφίας δεν αποκλείει τη συχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα, η οποία μπορεί να αποδειχθεί με λειτουργικά πειράματα.

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των συχνοτήτων των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στον ελληνικό πληθυσμό, με τις παγκόσμιες συχνότητες. Σε αυτό το σκέλος της ανάλυσης βρέθηκαν κάποια ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Βρέθηκαν SNPs, στον ελληνικό πληθυσμό, τα οποία είχαν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου, σε σχέση με τα παγκόσμια ποσοστά. Βρέθηκαν, όμως, και SNPs, τα οποία εμφάνιζαν μικρότερη συχνότητα στον ελληνικό πληθυσμό, συγκριτικά με τα

παγκόσμια ποσοστά, κάτι που μπορεί να υποδηλώνει την γενετική ετερογένεια των συγκεκριμένων τόπων, ανα πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα αυτή της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των συχνοτήτων εμφάνισης των SNPs, μεταξύ νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικώνάνδρων του Ελληνικού πληθυσμού. Μελέτη περισσότερων δειγμάτων, ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα.

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα SNPs rs1466692, rs13087186, rs6769680, rs73120930, rs55808507 και rs1498828 είχαν μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης στον ελληνικό πληθυσμό, σε σχέση με τα παγκόσμια δεδομένα. Ενώ, τα SNPs rs13272, rs725344, rs6852162 και rs10748891, φάνηκε να έχουν μικρότερη συχνότητα εμφάνισης στον ελληνικό πληθυσμό, συγκριτικά με τον παγκόσμιο.

Δυνητικά, τα SNPs αυτά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης, που να αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό συγκεκριμένα, εάν γίνουν μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των cases και των controls.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αρχικός σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας ήταν η εύρεση διαφορών στην έκφραση των γονιδίων DPY19L2, KIT, KITLG, CFAP43, CFAP44, μεταξύ των ατόμων με υπογονιμότητα και των ατόμων με φυσιολογικό φαινότυπο. Αυτό, θα γινόταν με χρήση της μεθόδου RealTimePCR.

Αρχικά, έγινε απομόνωση RNA από σπέρμα, με του RNeasyPlusUniversalKit.

Στα πλαίσια του πειράματος δοκιμάστηκαν 3 μέθοδοι απομόνωσης RNA από σπέρμα, ώστε να βρεθεί η πιο αποτελεσματική.

1. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plus Universal Kit με Qiazol lysis buffer. Όμως, η συγκέντρωση του RNA που μετρήθηκε ανά δείγμα δεν ήταν ικανοποιητική, γι' αυτό έγιναν κάποιες δοκιμές για βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου, όπως αύξηση ποσότητας αρχικού δείγματος, διαφορετικές στροφές και διαστήματα ομογενοποίησης κ.α., κάτι που δεν φάνηκε να βελτιώνει τα αποτελέσματα.
2. Στη συνέχεια, στη θέση του Qiazol (lysis buffer), χρησιμοποιήθηκε RLT, στο οποίο προστέθηκε β-μερκαπτεθανόλη, η οποία είναι πιο ισχυρή στη διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι βρίσκονται σε πληθώρα στα σπερματοζωάρια. Αυτή η μέθοδος φάνηκε πολύ πιο αποτελεσματική, διότι τα σπερματοζωάρια είναι πιο ανθεκτικά από άλλα είδη κυττάρων, λόγω των δισουλφιδικών δεσμών που περιέχει και χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί ένα πιο δυνατό lysisbuffer. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής ήταν η μεγάλη συγκέντρωση DNA στο τελικό.
3. Τέλος, δοκιμάστηκε και το πρωτόκολλο NucleoZol, στο οποίο προστέθηκαν τα βήματα πλύσης με SCLB και PBS, ώστε να απομακρυνθούν όλα τα άλλα είδη κυττάρων και να απομονωθεί RNA μόνο από τα σπερματοκύτταρα.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι, το σπέρμα, ως σωματικό υγρό, περιέχει πληθώρα άλλων κυττάρων, όπως ερυθροκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα κ.α. Γι' αυτό το λόγο, απαιτείται ένα αρχικό βήμα πλύσεων και απομάκρυνσης όλων αυτών των κυττάρων.

Αρχικά, γίνεται φυγοκέντριση του δείγματος, ώστε να διαχωριστούν τα κύτταρα από το σπερματικό υγρό και στη συνέχεια, μια πλύση με PBS, ώστε να απομακρυνθεί κάθε ίχνος σπερματικού υγρού, καθώς και νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιαλύεται σε SCLB (0.05% SDS και 0.05% Triton), το οποίο διαρρηγνύει το κυτταρικό τοίχωμα όλων των άλλων κυττάρων, εκτός από τα σπερματοζωάρια. Γίνεται επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και έπειτα μια ακόμα φυγοκέντριση και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το ίζημα, που περιέχει μόνο σπερματοζωάρια, υφίσταται λύση με το lysis buffer.

Άρα, εν τέλει, χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη μέθοδος, συγκεκριμένα το πρωτόκολλο του RNeasyPlusUniversalKit, με lysis buffer RLT με β-μερκαπτεθανόλη και για να αντιμετωπιστεί το μειονέκτημά της έγινε προσθήκη DNAase στο τέλος, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα DNA.

Πρωτόκολλο:

1. Φυγοκέντριση 200μl σπέρματος για 8 λεπτά στα 8000 rpm στους 4°C.
2. Προσθήκη 1ml PBS και φυγοκέντριση για 8 λεπτά στα 8000 rpm στους 4°C.
3. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 1ml SCLB.
4. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκέντριση για 8 λεπτά στα 8000rpm στους 4°C.
5. Αφαίρεση υπερκειμένου, προσθήκη 900μl RLT και ομογενοποίηση.
6. Μεταφορά σε νέο tube και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
7. Προσθήκη 100μl gDNA και ισχυρή ανάδευση.
8. Προσθήκη 180μl χλωροφόρμιου και ισχυρή ανάδευση.
9. Επώαση για 2-3 λεπτά.
10. Φυγοκέντριση για 25 λεπτά στα 12000rpm στους 4°C και μεταφορά της υδατικής φάσης (περίπου 600μl) σε νέο tube.
11. Προσθήκη 600μl αιθανόλης 70%.
12. Μεταφορά 700μl δείγματος σε RNeasy στήλη και φυγοκέντριση για 15 δευτερόλεπτα στα 8000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου.

13. Επανάληψη του βήματος 12.
14. Προσθήκη 700μl RWT buffer, φυγοκέντριση για 15 δευτερόλεπτα στα 8000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη υπερκειμένου.
15. Προσθήκη 500μl RPE buffer, φυγοκέντριση για 15 δευτερόλεπτα στα 8000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη υπερκειμένου.
16. Προσθήκη 500μl RPE buffer, φυγοκέντριση για 2 λεπτά στα 8000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη υπερκειμένου.
17. Μεταφορά στήλης σε νέο collection tube και φυγοκέντριση σε full speed για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Μεταφορά στήλης σε tube 1.5ml, προσθήκη 40μl RNase-free water και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στα 8000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Επανάληψη του βήματος 18, χρησιμοποιώντας το υπόλειμμα που έχει κατακρημνιστεί στο tube.
20. Αποθήκευση του δείγματος στους -80°C .

Για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του RNA, έγινε φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην ηλεκτροφόρηση, σε αντίθεση με το πήκτωμα του DNA, στο οποίο εμφανίζονται δύο διακριτές ζώνες που αντιπροσωπεύουν το 18s και 28s rRNA, στην περίπτωση του RNA, τα 18s και 28srRNA είναι απενεργοποιημένα, γι' αυτό στο πήκτωμα εμφανίζεται μόνο μια ζώνη. Στα δείγματά μας, όμως, δεν ήταν διακριτές οι δύο αυτές ζώνες. Ωστόσο, η φωτομέτρηση των δειγμάτων, η οποία έγινε με το μηχάνημα NanoDrop, έδειξε μεγάλες συγκεντρώσεις RNA και πολύ καλούς λόγους 260/280, κάτι που επιβεβαίωνε την καθαρότητα του δείγματος.

Μετά την απομόνωση του RNA, έγινε προσθήκη DNAσης και θα ακολουθούσε η μετατροπή σε cDNA και η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, με τη χρήση της RealTimePCR.

Όμως, λόγω της εξάπλωσης του COVID-19 και του lockdown που ακολούθησε, το πείραμα διακόπηκε και έγινε αλλαγή του θέματος σε βιοπληροφορική ανάλυση των

πολυμορφισμών των συγκεκριμένων γονιδίων, μεταξύ των ατόμων με υπογονιμότητα (cases) και των ατόμων με φυσιολογικό φαινότυπο (control).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
2. Chelala, C., Khan, A., Lemoine, R.N., (2009). SNPnexus: a web database for functional annotation of newly discovered and public domain single nucleotide polymorphisms, *Bioinformatics*, 25(5),p. 655–661.
3. Chocu, S., Calvel, P., Rolland, A. D., & Pineau, C. (2012). Spermatogenesis in mammals: Proteomic insights. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(4), 179–190. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.691943>
4. Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0330-5>
5. Coutton, C., Vargas, A. S., Amiri-Yekta, A., Kherraf, Z. E., Ben Mustapha, S. F., Le Tanno, P., Wambergue-Legrand, C., Karaouzène, T., Martinez, G., Crouzy, S., Daneshpour, A., Hosseini, S. H., Mitchell, V., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., Deleuze, J. F., ... Ray, P. F. (2018). Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in Trypanosoma and human. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02792-7>
6. Dayem Ullah, A.Z., Lemoine, R.N., Chelala, C., (2012), SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants, *Nucleic Acids Research*, 40(W1), p. W65–W70.
7. Dayem Ullah, A.Z., Oscanoa, J., Wang, J., Nagano, A., Lemoine, N. R., & Chelala, C. (2018). SNPnexus: assessing the functional relevance of genetic variation to facilitate the promise of precision medicine. *Nucleic acids research*, 46(W1), W109–W113.
8. De Braekeleer, M., Nguyen, M. H., Morel, F., & Perrin, A. (2015). Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *Journal of Assisted*

- Reproduction and Genetics*, 32(4), 615–623. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0433-2>
9. Donnell, L. O., Robertson, K. M., Jones, M. E., Simpson, E. R., & Henry, P. (2001). *Estrogen and Spermatogenesis**. 22(3), 289–318.
 10. Durairajanayagam, D. (2018). Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.004>
 11. Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., & Foresta, C. (2007). Male infertility: Role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 734–745. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60677-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60677-3)
 12. Galan, J. J., De Felici, M., Buch, B., Rivero, M. C., Segura, A., Royo, J. L., Cruz, N., Real, L. M., & Ruiz, A. (2006). Association of genetic markers within the KIT and KITLG genes with human male infertility. *Human Reproduction*, 21(12), 3185–3192. <https://doi.org/10.1093/humrep/del313>
 13. Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979–986. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
 14. Harbuz, R., Zouari, R., Pierre, V., Ben Khelifa, M., Kharouf, M., Coutton, C., Merdassi, G., Abada, F., Escoffier, J., Nikas, Y., Vialard, F., Koscinski, I., Triki, C., Sermondade, N., Schweitzer, T., Zhioua, A., Zhioua, F., Latrous, H., Halouani, L., ... Ray, P. F. (2011). A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *American Journal of Human Genetics*, 88(3), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.007>
 15. Hotaling, M.J. (2013). Genetics of Male Infertility. *Urol Clin North Am*, 41(1), p.1-17.
 16. Ikawa, M., Benham, A. M., Okabe, M., Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., & Okabe, M. (2010). Fertilization : a sperm ' s journey to and interaction with the oocyte Find the latest version : Review series Fertilization : a sperm ' s journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 984–994. <https://doi.org/10.1172/JCI41585.984>
 17. Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G. ., Giwercman, A., Kopa, Z., C.Krausz, &

- Tournaye, H. (2015). Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology*, 77(3), 42. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-193-6>
18. Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility - The other side of the equation. *Australian Family Physician*, 46(9), 641–646.
19. Kissel, H. (2000). Point mutation in Kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for Kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other Kit responses. *The EMBO Journal*, 19(6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1312>
20. Leaver, R. B. (2016). *of Causes and Treatment Options*. 25(18), 35–41.
21. Lin YN., Matzuk M.M. (2014) Genetics of Male Fertility. In: Rosenwaks Z., Wassarman P. (eds) Human Fertility. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1154. Humana Press, New York, NY
22. Maya N. Mascarenhas, Seth R. Flaxman, Ties Boerma, Sheryl Vanderpoel, Gretchen A. Stevens (2012) National, regional and global trends in infertility: a systematic analysis of 277 health surveys, *PLoS Medicine*, 9(12), 1-12.
23. Marees, A.T., de Kluiver, H., Stringer, S., Vorspan, F., Curis, E., Marie-Claire, C., Derks, E.M. (2018). A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis, *International journal of methods in psychiatric research*, 27(2), 1608
24. Mitchell, M. J., Metzler-Guillemain, C., Toure, A., Coutton, C., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2017). Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clinical Genetics*, 91(2), 208–216. <https://doi.org/10.1111/cge.12900>
25. Miyamoto, T., Minase, G., Shin, T., Ueda, H., Okada, H., & Sengoku, K. (2017). Human male infertility and its genetic causes. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 81–88. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12017>
26. Nsota Mbango, J. F., Coutton, C., Arnoult, C., Ray, P. F., & Touré, A. (2019). Genetic causes of male infertility: Snapshot on morphological abnormalities of the sperm flagellum. *Basic and Clinical Andrology*, 29(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0083-9>
27. O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. (2011). Spermiation. *Spermatogenesis*, 1(1), 14–35. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525>

28. O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C., & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility*, 93(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.045>
29. Pierre, V., Martinez, G., Coutton, C., Delaroche, J., Yassine, S., Novella, C., Pernet-Gallay, K., Hennebicq, S., Ray, P. F., & Arnoult, C. (2012). Absence of Dpy19L2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development (Cambridge)*, 139(16), 2955–2965. <https://doi.org/10.1242/dev.077982>
30. Poongothai, J., Gopenath, T. S., Manonayaki, S., & Poongothai, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*, 50(4), 336–347.
31. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., de Bakker, P.I., Daly, M.J., Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses, *American journal of human genetics*, 81(3), 559–575.
32. Rentería M.E., Cortes A., Medland S.E. (2013). Using PLINK for Genome-Wide Association Studies (GWAS) and Data Analysis. In: Gondro C., van der Werf J., Hayes B. (eds) *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1019. Humana Press, Totowa, NJ.
33. Rothschild, G., Sottas, C. M., Kissel, H., Agosti, V., Manova, K., Hardy, M. P., & Besmer, P. (2003). A Role for Kit Receptor Signaling in Leydig Cell Steroidogenesis¹. *Biology of Reproduction*, 69(3), 925–932. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014548>
34. Russell, P.J. (2006). *iGenetics, Μια Μεντελική Προσέγγιση (μεταφρ.)*. Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα, σελ. 75-79.
35. Sandlow, J. I., Feng, H. L., & Sandra, A. (1997). Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology*, 49(3), 494–500. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(96\)00494-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00494-3)
36. Selice R., Di Mambro A., Garolla A., Ficarra V., Iafrate M., Ferlin A., Foresta C. Spermatogenesis in. Klinefelter syndrome. *J Endocrinol Invest*. 33: 789-93

37. Shefi, S., & Turek, P. J. (2006). Definition and current evaluation of subfertile men. *International Braz J Urol*, 32(4), 385–397. <https://doi.org/10.1590/S1677-55382006000400002>
38. Storey, B. T. (2006). The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration: edited by Christopher De Jonge and Christopher Barratt. 359 pp., United Kingdom: Cambridge University Press; 2006. ISBN: 0-521-85397-4. Cost: \$95.00. *Journal of Andrology*, 27(6), 707–707. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001305>
39. Tang, S., Wang, X., Li, W., Yang, X., Li, Z., Liu, W., Li, C., Zhu, Z., Wang, L., Wang, J., Zhang, L., Sun, X., Zhi, E., Wang, H., Li, H., Jin, L., Luo, Y., Wang, J., Yang, S., & Zhang, F. (2017). Biallelic Mutations in CFAP43 and CFAP44 Cause Male Infertility with Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *American Journal of Human Genetics*, 100(6), 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.012>
40. Tavalae, M., Nomikos, M., Lai, F. A., & Nasr-Esfahani, M. H. (2018). Expression of sperm PLC ζ and clinical outcomes of ICSI-AOA in men affected by globozoospermia due to DPY19L2 deletion. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.013>
41. Thompson & Thompson «Ιατρική Γενετική», εκδόσεις Πασχαλίδης
42. Turner, S., Armstrong, L. L., Bradford, Y., Carlson, C. S., Crawford, D. C., Crenshaw, A. T., Ritchie, M. D. (2011). Quality control procedures for genome-wide association studies. *Current protocols in human genetics*, Chapter 1, Unit 1.19.
43. Vijayaraghavan, S., Jo, M., & Fardilha, M. (2016). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*, 96(December 2016), 2–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337>
44. VanderA. (2011). Φυσιολογία του ανθρώπου. Όγδοη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
45. Weyrich, A. (2012), Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98: 2.13.1-2.13.3.
46. Wiser H.J., Sandlow J., and Köhler Tobias S. (2012). Causes of Male Infertility.

Male Infertil. 3-14

47. Ιατράκης, Γ.Μ., 2009. Συμβουλευτική στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή. Αθήνα: ♣ Εκδόσεις Δεσμός.
48. Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Α. (2008). *Βιολογία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 785-790