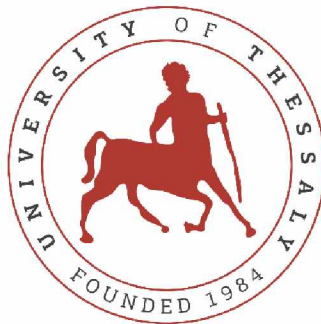


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

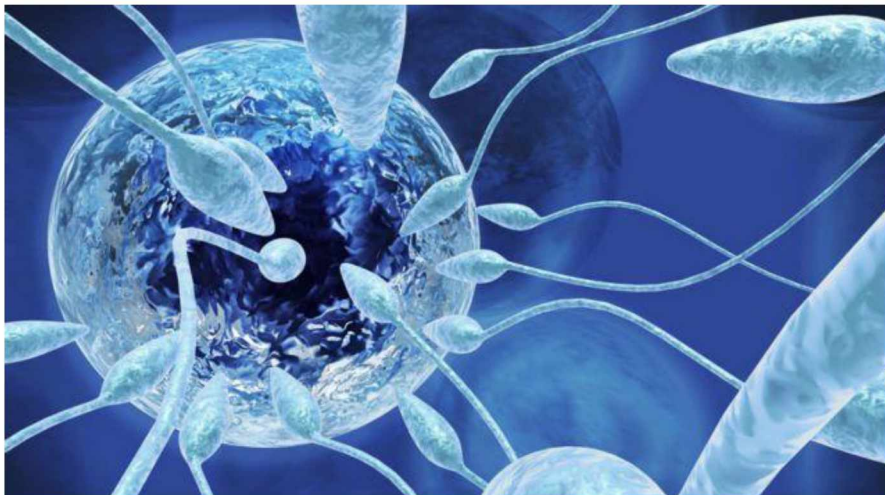
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας



Διπλωματική εργασία – Bachelor's thesis

**Έλεγχος διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε νορμοσπερμικούς άνδρες
με PCR πραγματικού χρόνου**

**Investigation of differential gene expression in normospermic men
through real-time PCR**



Χαντζογλίδης Δ. Γεώργιος

Λάρισα 2021

~ 1 ~

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

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

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

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

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Καθώς η πτυχιακή αυτή εργασία έφτασε στο τέλος της θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα τα οποία ήταν εκεί για εμένα και με βοήθησαν το καθένα ξεχωριστά με τον δικό του τρόπο να ολοκληρώσω αυτήν την προσπάθεια.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Θεολογία Σαραφίδου η οποία μέσα από την διδασκαλία των ακαδημαϊκών μαθημάτων της μου παρακίνησε το ενδιαφέρον για τον κλάδο της γενετικής και τις τεχνικές που εφαρμόζονται σε αυτήν προκειμένου να δοθούν απαντήσεις σε παγκόσμια ερωτήματα που αφορούν την ζωή. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω και για την εμπιστοσύνη της αναθέτοντάς μου ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα προς μελέτη, καθώς και για τις απεριόριστες συμβουλές και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ζήση Μαμούρη και την κυρία Αικατερίνη Μούτου για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και για την πολύτιμη βοήθειά τους εκεί όπου αυτή χρειαζόταν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας τα οποία με βοήθησαν να προσαρμοστώ μέσα στον εργαστηριακό χώρο υπό ένα πολύ ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα κάνοντάς με να νιώσω άνετα. Ακόμη, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω και για όλες τις συμβουλές, την οργάνωση και κατεύθυνση που μου παρείχαν για την ολοκλήρωση του πειράματός μου, καθώς και για την βοήθεια που παρείχαν σε εμένα, αλλά και σε οποιονδήποτε άλλον την είχε ανάγκη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους φίλους μου και την οικογένειά μου για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν προκειμένου να εκπληρώσω αυτό το ταξίδι. Τους ευχαριστώ θερμά για τις απεριόριστες ώρες εμπύχωσης και την εμπιστοσύνη που έδειξαν σε εμένα, καθώς χωρίς αυτούς τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. Φυσιολογία σπερματογένεσης.....	8
1.1. Ανδρικό αναπαραγωγικό όργανο και διαδικασία σπερματογένεσης.....	8
1.2. Κυτταροσκελετικές αλλαγές κατά την σπερματογένεση.....	11
1.2.1. Γενικές πληροφορίες.....	11
1.2.2. Η βιογένεση του ακροσώματος.....	11
1.2.3. Ο σχηματισμός του μαστιγίου.....	12
2. Ανδρική υπογονιμότητα.....	13
2.1. Γενικές πληροφορίες.....	13
2.2. Το σπερμοδιάγραμμα.....	14
2.3. Ιδιοπαθής υπογονιμότητα.....	15
2.3.1. Γενικές πληροφορίες.....	15
2.3.2. Μελέτες GWAS σε ανδρικούς πληθυσμούς για την ιδιοπαθή υπογονιμότητα..	15
2.4. Τερατοζωοσπερμία και μονογονιδιακές αιτίες της υπογονιμότητας.....	17
2.5. Μελέτες υπογονιμότητας σε επίπεδο μεταγραφής.....	18
3. Τα γονίδια των δύο πρωταμινών, <i>PRM1</i> και <i>PRM2</i> , και ο συσχετισμός τους με ανδρική υπογονιμότητα.....	21
B. ΣΚΟΠΟΣ.....	23
Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	24
1. Δείγματα RNA από σπέρμα νορμοσπερμικών ανδρών.....	24
2. Σχεδιασμός εκκινητών για τα γονίδια ενδιαφέροντος <i>PRM1</i> και <i>PRM2</i> και για τα ιδιοσυστατικά γονίδια <i>ACTB</i> και <i>RPS18</i>	24
3. Προετοιμασία εκκινητών για PCR πραγματικού χρόνου.....	27
4. Επώαση δειγμάτων RNA με DNase και έλεγχος παρουσίας DNA με PCR πραγματικού χρόνου.....	28
5. Υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων RNA σπέρματος.....	29
6. Αντίστροφη μεταγραφή δειγμάτων RNA για δημιουργία cDNA.....	30

7. Έλεγχος δειγμάτων cDNA αραιώσεων από pool και αποδοτικότητας εκκινητών με PCR πραγματικού χρόνου.....	32
8. Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου..	35
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
1. Επώαση δειγμάτων RNA με DNase και έλεγχος παρουσίας DNA με PCR πραγματικού χρόνου.....	37
2. Υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων RNA σπέρματος.....	38
3. Έλεγχος δειγμάτων cDNA αραιώσεων από pool και αποδοτικότητας εκκινητών με PCR πραγματικού χρόνου.....	39
4. Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου.....	45
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

Περίληψη

Η υπογονιμότητα στις μέρες μας αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας το οποίο ταλαιπωρεί πλήθος ζευγαριών ανά τον κόσμο κατά την προσπάθεια απόκτησης παιδιών. Ένα υψηλό ποσοστό που φαίνεται να φτάνει το 50% των περιπτώσεων αντιπροσωπεύει καθαρά την ανδρική υπογονιμότητα, ενώ αρκετές είναι και οι περιπτώσεις συνδυασμού ανδρικού και γυναικείου παράγοντα. Πρόκειται για μία πολυπαραγοντική διαταραχή με σημαντικό γενετικό υπόβαθρο. Το μεγαλύτερο ποσοστό περιπτώσεων υπογονιμότητας είναι ιδιοπαθείς μορφές, δηλαδή οφείλεται σε άγνωστα μέχρι σήμερα αίτια.

Σε αυτό το πλαίσιο, εκτός από τη μελέτη υπογόνιμων, μεγάλο ενδιαφέρον έχει και η μελέτη των νορμοσπερμικών ανδρών, καθώς έχει παρατηρηθεί μεγάλη διακύμανση στις τιμές των τριών βασικών ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος ανάμεσά τους (αριθμός, κινητικότητα και μορφολογία σπερματοζωαρίων) και ειδικότερα η ταυτοποίηση πιθανών γενετικών διαφορών όπως και διαφορών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη σπερματογένεση. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PRM1* και *PRM2* που κωδικοποιούν τις πρωταμίνες 1 και 2. Οι πρωταμίνες κατά την σπερματογένεση αντικαθιστούν σε μεγάλο ποσοστό τις ιστόνες των σπερματοζωαρίων παρέχοντας συμπύκνωση και προστασία του γενετικού υλικού από επιβλαβείς παράγοντες. Συνεπώς, πρόκειται για δύο από τα πιο κρίσιμα γονίδια για την σωστή δομή και λειτουργία των σπερματοζωαρίων και μία εκτεταμένη έρευνα της έκφρασής τους θα μπορούσε πιθανώς να παρέχει σημαντικές πληροφορίες οι οποίες θα συσχετίζονται με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου, μετά το σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών τόσο για αυτά τα γονίδια, όσο και για τα δύο ιδιοσυστατικά γονίδια, *ACTB* (β ακτίνη) και *RPS18* (ριβοσωμική πρωτεΐνη 18). Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα RNA από σπέρμα 22 νορμοσπερμικών ανδρών τα οποία επεξεργάστηκαν με DNase, έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το γονιδιωματικό DNA από το RNA. Ακολούθως έγινε σύνθεση cDNA, βελτιστοποίηση της PCR πραγματικού χρόνου και εφαρμογή της σε κάθε μεμονωμένο δείγμα. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, φάνηκε ότι τα δύο γονίδια των πρωταμινών παρουσίασαν έντονη διακύμανση έκφρασης ανάμεσα στα 22 δείγματα νορμοσπερμικών ανδρών. Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωταμινών και των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος δεν έδειξε θετικό αποτέλεσμα, αλλά πιο τεκμηριωμένα αποτελέσματα θα προκύψουν με αντίστοιχη ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων με πιθανώς πιο ακραίες τιμές παραμέτρων σπερμοδιαγράμματος.

Abstract

Nowadays, infertility is a serious health problem affecting many couples worldwide as they try to have children. A high percentage, reaching 50% of all cases, is due to male infertility, while many cases involve a combination of male and female factor. Infertility is a multifactorial disorder with an important genetic background. The largest percentage of infertility cases are idiopathic forms, meaning that its causes are unknown.

In this context, besides the investigation of infertile men, of great interest is the investigation of normospermic men as there is a big variation among the three basic quality characteristics of sperm (number, motility, morphology of spermatozoa) and specifically the identification of possible genetic factors as well as differences in gene expression levels that are associated with this variation. In this study, the expression levels of *PRM1* and *PRM2* genes, which encode protamines 1 and 2, were investigated. During spermatogenesis, most of the histones in spermatozoa are replaced by protamines providing compression and protection of the genetic material. Thus, protamines are critical genes for the normal structure and function of spermatozoa and an extended investigation about their expression levels would possibly provide important information about sperm diagram's parameters.

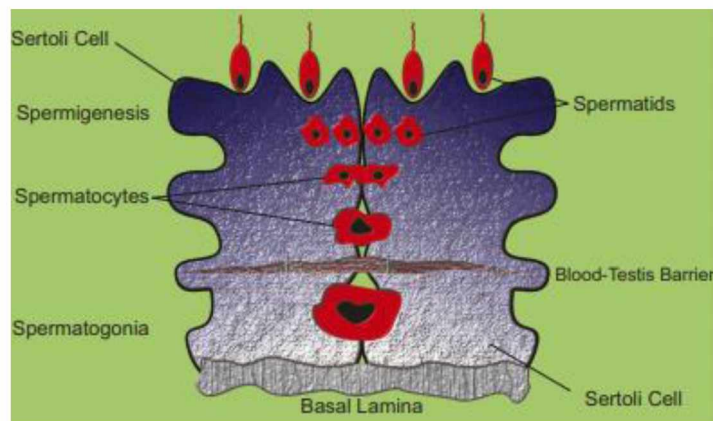
The investigation was held through real-time PCR right after the design of suitable primers about *PRM1* and *PRM2* genes, as well as the two housekeeping genes, *ACTB* (Beta Actin) and *RPS18* (Ribosomal Protein 18). Sperm RNA samples from 22 normospermic men were used for this experiment, which were treated with DNase in order to remove any DNA molecules that would contaminate the samples. Then, cDNA synthesis, real-time PCR optimization and application of it in every single sample were performed. Analysis of results showed that the two protamines' genes had intense variation of expression levels among the 22 samples of normospermic men. Correlation analysis between the protamines' expression levels and sperm diagram's parameters didn't show any positive result, but more documented results would be produced with a greater number of samples having possibly more extreme numbers of sperm diagram's parameters.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Φυσιολογία σπερματογένεσης

1.1. Ανδρικό αναπαραγωγικό όργανο και διαδικασία σπερματογένεσης

Προκειμένου να μελετηθούν και να κατανοηθούν οι παράγοντες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα, θα πρέπει πρώτα να γίνει αναφορά στα βασικά χαρακτηριστικά τα οποία σε συνδυασμό οδηγούν σε μία επιτυχημένη σπερματογένεση και γονιμότητα στους άνδρες. Το αναπαραγωγικό σύστημα του άνδρα αποτελείται από τα πρωτογενή όργανα, που είναι αρμόδια για την παραγωγή γαμετών και ορμονών, και τα δευτερογενή, που παίζουν μετέπειτα ρόλο στην διαδικασία ωρίμανσης των γαμετών. Στα πρώτα ανήκουν οι όρχις που περιβάλλονται από τον ινώδη χιτώνα μέσα στον ορχικό σάκο, ενώ στα δεύτερα οι αγωγοί και οι αδένες. Ο όρχις περιλαμβάνει δύο διακριτές δομές, που είναι τα σπερματοφόρα σωληνάρια και τα ενδιάμεσα τμήματα μεταξύ αυτών που είναι υπεύθυνα για την αιμάτωση και την ανοσολογική απόκριση της συγκεκριμένης περιοχής. Οι ενδιάμεσες περιοχές αποτελούνται από μία ποικιλία κυττάρων όπως ανοσοποιητικά, ινοβλάστες, νευρικά, συνδετικού ιστού, λεμφικών και αιματικών αγγείων και τα Leydig. Τα κύτταρα Leydig είναι από τα πιο σημαντικά καθώς ελέγχουν την παραγωγή της τεστοστερόνης και του ινσουλινοειδούς παράγοντα 3 (INSL3). Τα σπερματοφόρα σωληνάρια καταλαμβάνουν το 60-80% του συνολικού όγκου του όρχεως, επικαλύπτονται από επιθηλιακό ιστό και περιλαμβάνουν τα κύτταρα Sertoli και τα σπερματογόνα κύτταρα. Τα κύτταρα Sertoli θρέφουν, αναπτύσσουν και υποστηρίζουν μηχανικά το σπέρμα κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης. Ακόμη, είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση του σπέρματος στον αυλό και την φαγοκύτωση αποδομημένων βλαστοκυττάρων και περίσσειας κυτταροπλάσματος. Κατά την ενηλικίωση τα κύτταρα Sertoli αρχίζουν να αδρανοποιούνται σταδιακά και να σταματούν την κυτταρική διαίρεσή τους δημιουργώντας μία δομή κυττάρων που επικοινωνεί με στενούς συνδέσμους, γνωστή ως φραγμός αίματος-όρχεων (BTB) (Εικόνα 1). Αυτή η δομή είναι υπεύθυνη για την προστασία των γεννητικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω φυσικού διαχωρισμού και την ομαλή ανάπτυξη του σπέρματος (Babakhanzadeh et al., 2020).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του φραγμού αίματος-όρχεων (Babakhanzadeh et al., 2020)

Ο όρχις αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό όργανο για τους άνδρες, καθώς καθορίζει την παραγωγή των ανδρογόνων και των σπερματοζωαρίων που θα φέρουν την γενετική πληροφορία που θα κληρονομηθεί στην επόμενη γενιά. Μετά την εφηβεία τα αρσενικά άτομα παράγουν εκατομμύρια σπερματοζωάρια μέσα στα σπερματοφόρα σωληνάκια, μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών σταδίων που ονομάζεται σπερματογένεση. Έπειτα, τα ώριμα σπερματοζωάρια περνάνε μέσα από τον αυλό των σωληναρίων και αποθηκεύονται στην επιδιδυμίδα μέχρι την εκσπερμάτωση. Αυτή η πολύπλοκη διαδικασία απαιτεί έναν καλό συγχρονισμό μεταξύ γεννητικών κυττάρων και κυττάρων Sertoli, ενώ κύτταρα εκτός σωληναρίων όπως τα Leydig παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο (Cerván-Martín et al., 2020).

Η σπερματογένεση είναι μία ακριβής διαδικασία με την παραμικρή παρέκκλιση να οδηγεί σε προβλήματα γονιμότητας στους άνδρες. Κάθε κύκλος σπερματογένεσης αντιστοιχεί σε περίπου 74 μέρες στον άνθρωπο και διακρίνεται σε 4 βασικά στάδια: α) τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό και την σπερματογονική διαφοροποίηση σε σπερματοκύτταρα πριν από το στάδιο του λεπτενίου (σπερματογονιογένεση), β) την μειωτική διαίρεση των σπερματοκυττάρων σε σπερματίδες (μείωση), γ) την μετατροπή των σφαιρικών σπερματίδων σε σπερματοζωάρια (σπερμιογένεση) και δ) την απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον αυλό (σπερματογένεση) (Babakhanzadeh et al., 2020). Πιο αναλυτικά, τα γεγονότα που συμβαίνουν σε αυτά τα στάδια έχουν ως εξής:

α) Σπερματογονιογένεση: Οι πρόδρομες γεννητικές σειρές αρχικά αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων της ενδοδερμίδας και κατά την 5^η εβδομάδα της ανάπτυξης του οργανισμού του ανθρώπου μεταναστεύουν στην γεννητική οδό, όπου για τα αρσενικά άτομα το χρωμόσωμα Y θα καθορίσει και την φυσιολογία των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων. Ο όρος γονοκύτταρα χαρακτηρίζει αυτές τις κυτταρικές σειρές έως το 1^ο τρίμηνο της κύησης και μετά σταματάνε και παραμένουν στην φάση G3 του κυτταρικού κύκλου μέχρι την γέννηση του ατόμου. Έπειτα, ξεκινάει η σπερματογένεση μέσω μιτωτικού πολλαπλασιασμού των σπερματογόνιων (Babakhanzadeh et al., 2020).

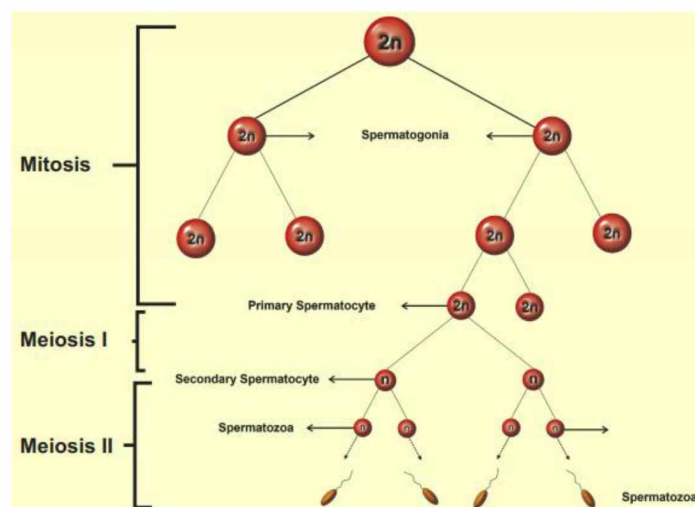
β) Μείωση: Κατά την μείωση πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός των χρωμοσωμάτων, ώστε να παραχθούν σπερματοκύτταρα γενετικά διαφοροποιημένα μεταξύ τους. Αυτά στην συνέχεια διαιρούνται δίνοντας απλοειδή κύτταρα, τους γαμέτες. (Dunleavy et al., 2019) Το συγκεκριμένο στάδιο χωρίζεται στην μείωση I και μείωση II. Στην μείωση I οι μικροσωληνίσκοι συνδέονται στις αδελφές χρωματίδες μέσω του κινετοχώρου και μεταφέρονται σε αντίθετους πόλους. Έτσι τα χρωμοσώματα μειώνονται σε αριθμό εφόσον ένα πρόδρομο σπερματοκύτταρο δίνει δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Στην μείωση II οι μικροσωληνίσκοι διαχωρίζουν τις αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος και σχηματίζονται 4 θυγατρικά απλοειδή κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα είναι οι σπερματίδες και έχουν διαφορετικό γενετικό υλικό μεταξύ τους (Babakhanzadeh et al., 2020).

γ) Σπερμιογένεση: Σε αυτό το στάδιο οι σφαιρικές σπερματίδες υφίστανται αναδιαμόρφωση αποκτώντας ένα επίμηκες σχήμα. Επιπλέον, σε αυτήν την δομή

δημιουργείται ένα μαστίγιο για κινητικότητα και το ακρόσωμα που είναι απαραίτητο για την γονιμοποίηση (Dunleavy et al., 2019). Για τον σκοπό αυτό θα πρέπει να αναδιαμορφωθεί το κυτταρόπλασμα και ο πυρήνας, όσο τα κύτταρα περνάνε από το σύστημα Golgi και βρίσκονται στο στάδιο δημιουργίας του ακροσώματος ή κατά την ωρίμανσή τους (Babakhanzadeh et al., 2020). Κατά την σπερμιόγνεση είναι που λαμβάνει χώρα και η πρωταμίνωση, όπου περίπου το 85% των ιστονών του σπέρματος αντικαθίσταται από πρωταμίνες για την καλύτερη σταθερότητα και προστασία του DNA των σπερματοζωαρίων. Το υπόλοιπο 15% του DNA που παραμένει συνδεδεμένο με ιστόνες είναι σε περιοχές που παίζουν δομικό ρόλο για το σπέρμα ή σε υποκινητές γονιδίων για την εμβρυική ανάπτυξη. Αυτές οι περιοχές μπορούν να υποστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση και φωσφορυλίωση του αμινοτελικού άκρου των ιστονών. Με αυτόν τον τρόπο αλλάζει το ηλεκτροστατικό φορτίο των χρωματίδων και με την σειρά της αλλάζει και η δομή του DNA, ώστε να είναι προσβάσιμο σε μεταγραφικούς παράγοντες (Cannarella et al., 2020).

δ) Σπερματογένεση: Στο τελικό αυτό στάδιο λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό των σπερματοφόρων σωληναρίων, ώστε να κατευθυνθούν προς την επιδιδυμίδα. Εκεί θα ωριμάσουν πλήρως και θα αποκτήσουν την απαραίτητη κινητικότητα. Αρχικά, παραμένει μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος στο μεσαίο τμήμα του σπερματοζωαρίου, η οποία κατά την έξοδο από την επιδιδυμίδα θα αφαιρεθεί από την ουρά του σπερματοζωαρίου παρέχοντας στο σπερματοζωάριο αυξημένη κινητικότητα (Babakhanzadeh et al., 2020).

Τα σπερματοζωάρια παίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη γονιμότητα, καθώς συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η ακροσωμική αντίδραση, η πρόσδεση και διείσδυση στην διαφανή ζώνη του ωοκυττάρου, η σύντηξη με το ωοκύτταρο και η ανάπτυξη του εμβρύου. Για αυτούς τους λόγους η ποιότητα των σπερματοζωαρίων είναι πολύ σημαντική για μία μελλοντική εγκυμοσύνη (Cannarella et al., 2020).



Εικόνα 2: Αναπαράσταση της σπερματογένεσης (Babakhanzadeh et al., 2020)

1.2. Κυτταροσκελετικές αλλαγές κατά την σπερματογένεση

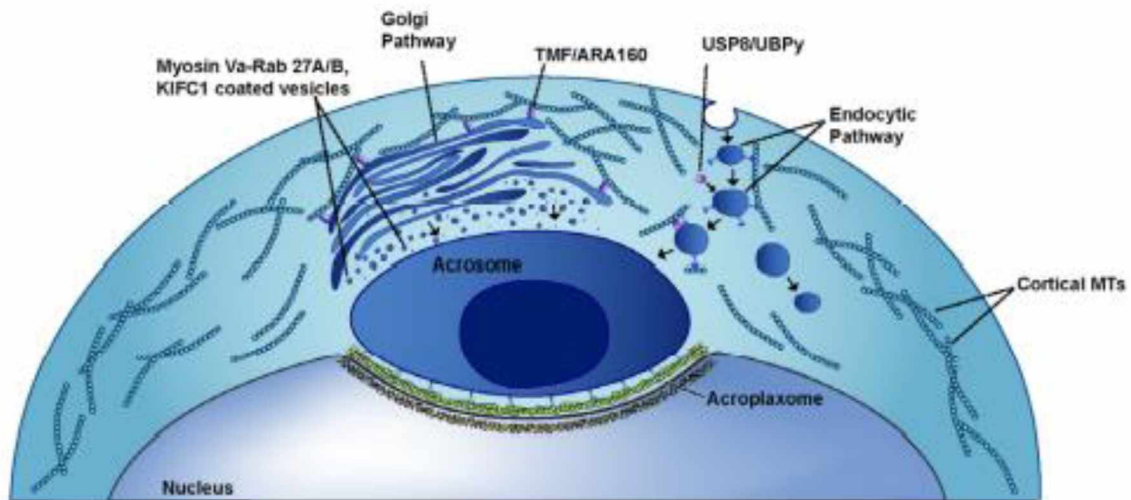
1.2.1. Γενικές πληροφορίες

Τα βασικότερα στοιχεία του κυτταροσκελετού είναι τα μόρια ακτίνης, οι μικροσωληνίσκοι, τα ενδιάμεσα ινίδια και οι πρωτεΐνες Septin. Αυτά είναι απόλυτα συνδεδεμένα με τις διαδικασίες που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης και για αυτόν τον λόγο μπορούν να καθορίσουν και την γονιμότητα στους άνδρες. Πιο συγκεκριμένα ο κυτταροσκελετός κατευθύνει τις διαδικασίες της μίτωσης και της μείωσης με τους μικροσωληνίσκους να είναι υπεύθυνοι για την δημιουργία της διπολικής μιτωτικής ατράκτου και του μεσαίου τμήματος του σπερματοζωαρίου, ενώ οι Septins και η F-ακτίνη να συμβάλλουν στον σχηματισμό της ακτινομοσίνης κατά την κυτταροκίνηση. Οι μικροσωληνίσκοι βοηθούν, επίσης, στην διατήρηση ενός επιθυμητού προσανατολισμού των κυττάρων κατά την μίτωση. Έτσι το ένα θυγατρικό κύτταρο παραμένει στην βάση της μεμβράνης του όρχεως ώστε να αυτοανανεώνεται ο πρόγονος της πρόδρομης γεννητικής σειράς, ενώ το άλλο θυγατρικό κύτταρο θα είναι σε θέση να ξεκινήσει την πορεία της διαφοροποίησής του. Τα γεννητικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό έχουν μειωμένη κυτταροκίνηση και σχηματίζουν κυτταροπλασματικές διακυτταρικές συνδέσεις ώστε να μείνουν σε σταθερές θέσεις. Αυτές οι συνδέσεις διευκολύνουν την διαδικασία της σπερματογένεσης καθώς επιτρέπουν την ανταλλαγή απαραίτητων στοιχείων μεταξύ των κυττάρων. Στον σχηματισμό τους συμμετέχουν οι Septins 2, 7 και 9, ενώ απομακρύνονται σχεδόν αμέσως οι μικροσωληνίσκοι. Οι κυτταροπλασματικοί μικροσωληνίσκοι, ωστόσο, έχουν ρόλο-κλειδί στην μείωση, όπου ζευγαρώνουν τα ομόλογα χρωμοσώματα για να ανταλλάξουν γενετικό υλικό μέσω ανασυνδυασμού. Με αυτόν τον τρόπο καθορίζεται η γενετική ποικιλότητα των γαμετών. Επίσης, κατευθύνουν τα χρωμοσώματα προς τον έναν πυρηνικό πόλο πριν την διαίρεση, μία διαδικασία στην οποία φαίνεται να συμμετέχουν και ορισμένα ειδικά συμπλέγματα τα οποία σχηματίζει η ακτίνη (Dunleavy et al., 2019).

1.2.2. Η βιογένεση του ακροσώματος

Κατά την έναρξη της σπερμιογένεσης λαμβάνει χώρα και ο σχηματισμός του ακροσώματος, ενός πυρηνικού κυστιδίου πλούσιο σε ένζυμα απαραίτητα για την αποικοδόμηση της διαφανούς ζώνης και την επιτυχή είσοδο του σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο. Αρχικά, το trans-Golgi παρέχει τα απαραίτητα προακροσωμικά κυστίδια για την δημιουργία του ακροσώματος. Οι κυτταροπλασματικοί μικροσωληνίσκοι με την βοήθεια των πρωτεϊνών USP8/UBPγ συμμετέχουν στην μετακίνηση αυτών των κυστιδίων στην περιοχή όπου θα σχηματιστεί το ακρόσωμα. Τα προακροσωμικά κυστίδια είναι επενδυμένα με τις κινητικές πρωτεΐνες myosin-Va και KIFC1 (ακτινο- και μικροσωληνινο- εξαρτώμενες αντίστοιχα) και τον υποδοχέα της πρώτης, Rab 27A/B. Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών TMF/ARA160 ανάμεσα σε

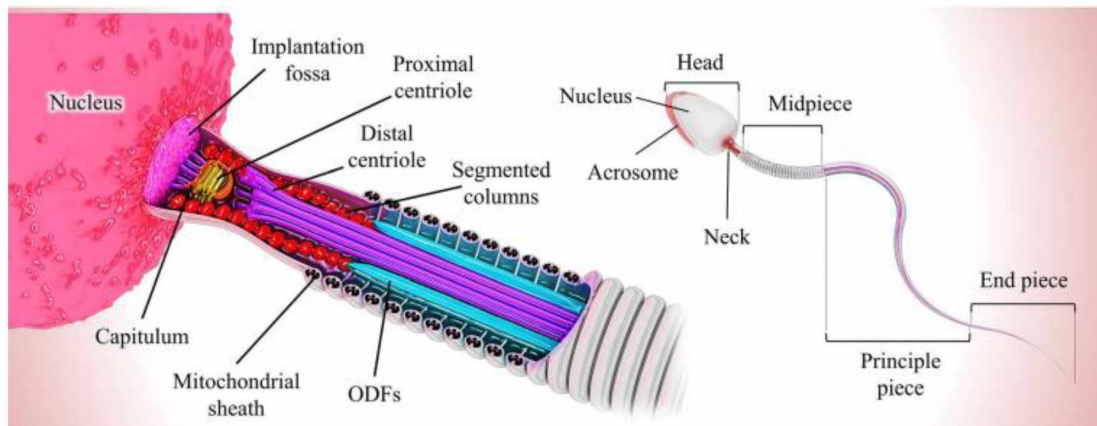
μικροσωληνίσκους και Golgi αποδεικνύουν την συμβολή του trans-Golgi στο ακρόσωμα (Dunleavy et al., 2019).



Εικόνα 3: Η βιογένεση του ακροσώματος και οι αλληλεπιδράσεις των μορίων που συμμετέχουν σε αυτήν (Dunleavy et al., 2019)

1.2.3. Ο σχηματισμός του μαστιγίου

Προκειμένου να σχηματιστεί το μαστίγιο, αρχικά, τα μιτοχόνδρια μετακινούνται και συσσωρεύονται με την βοήθεια των μικροσωληνίσκων ακριβώς κάτω από τον πυρήνα της σπερματίδας. Εκεί τοποθετούνται πάνω σε ειδικές εξωτερικές πυκνές ίνες που μοιάζουν με κερατίνη και γύρω από αυτά σχηματίζεται μία έλικα F-ακτίνης που προσδίδει σταθερότητα στην όλη δομή. Μεταξύ της δομής των μιτοχονδρίων και του πυρήνα της σπερματίδας σχηματίζεται ένας σύνδεσμος ο οποίος συγκρατεί την κεφαλή με το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου. Αυτός ο σύνδεσμος αποτελείται από ένα εγγύς και ένα απομακρυσμένο κεντριόλιο, ενώ συμμετέχει και η πρωτεΐνη Septin12 που προσδίδει σταθερότητα στον σύνδεσμο. Όλα αυτά μαζί συγκροτούν το μεσαίο τμήμα του μαστιγίου. Στην συνέχεια ακολουθεί το κύριο τμήμα από το οποίο απουσιάζουν τα μιτοχόνδρια, ενώ περιβάλλεται από ένα ινώδες περίβλημα. Αυτό, τελικά, καταλήγει στο τελικό τμήμα του μαστιγίου που είναι και το πιο λεπτό σε διάμετρο, καθώς αποτελείται από μικρότερο αριθμό ινών που περιβάλλονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη (Dunleavy et al., 2019).



Εικόνα 4: Τα επιμέρους τμήματα του σπερματοζωαρίου και η αναλυτική σύνθεση του μεσαίου τμήματος του μαστιγίου (Mazaheri Moghaddam et al., 2021)

2. Ανδρική υπογονιμότητα

2.1. Γενικές πληροφορίες

Αν κάποια ή και κάποιες από τις παραπάνω φυσιολογικές διαδικασίες δεν πραγματοποιηθεί σωστά, τότε είναι πολύ πιθανόν να υπάρξει δυσλειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος των ανδρών καταλήγοντας σε υπογονιμότητα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) ορίζει την υπογονιμότητα ως την αδυναμία σύλληψης μετά από τουλάχιστον 12 μήνες τακτικής, μη προστατευμένης σεξουαλικής επαφής (Agarwal et al., 2021). Η υπογονιμότητα είναι μία αρκετά συνηθισμένη πάθηση και εκτιμάται ότι την φέρουν περίπου 70 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, ενώ περίπου το 9% των ζευγαριών φαίνεται να αντιμετωπίζει προβλήματα στειρότητας (Reid, 2019). Σύμφωνα με τα δεδομένα του ΠΟΥ, περίπου το 50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας φαίνεται να εμπλέκει τον ανδρικό παράγοντα, με το 20-30% να αντιστοιχεί μόνο σε ανδρικές επιπλοκές και το υπόλοιπο 20-30% να είναι συνδυασμός ανδρικών και γυναικείων αιτιών (Babakhanzadeh et al., 2020).

Έχει εντοπιστεί ποικιλία αιτιών στις οποίες μπορεί να οφείλεται η ανδρική υπογονιμότητα και έχουν συσχετιστεί με μεταβλητές όπως η σπερματογένεση, η ποιότητα των γαμετών, η γονιμοποίηση ή έως και η μετέπειτα ικανότητα προσκόλλησης και ανάπτυξης του ζυγωτού στην μήτρα (Cannarella et al., 2020). Αρχικά, πολλές ασθένειες όπως η κυστική ίνωση, η νεφρική νόσος κλπ., αλλά και η παχυσαρκία με τις ορμονικές μεταβολές λόγω υψηλών ποσοτήτων λιπώδους ιστού έχουν συνδεθεί με προβλήματα στην παραγωγή σπέρματος. Πολλές φορές και το ίδιο το περιβάλλον του ατόμου είναι ικανό να επηρεάσει την φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού του συστήματος. Για παράδειγμα, η λήψη πολλών φαρμάκων, όπως τα χημειοθεραπευτικά μόρια, έχει βρεθεί ότι μπορεί να μειώσει την σπερματογένεση ή και να προκαλέσει μηχανική δυσλειτουργία (Reid, 2019). Ακόμη, πολλές επιβλαβείς ενώσεις στο περιβάλλον και γενικά ο τρόπος ζωής του ατόμου (διατροφή, κάπνισμα, αλκοόλ κλπ.) μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο στην

πορεία της σπερματογένεσης. Σημαντική επίδραση στην σπερματογένεση έχει και το ενδοκρινικό σύστημα μαζί με τις ορμονικές μεταβολές που αυτό μπορεί να υφίσταται. Έτσι, διαταραχές στην φυσιολογική λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων μπορεί να οδηγήσουν σε προβληματική παραγωγή ορμονών, όπως της γοναδοτροπικής ορμόνης απελευθέρωσης (GnRH), που καταλήγει σε μειωμένη έκκριση τεστοστερόνης και αναστολή παραγωγής σπέρματος. Τέλος, από τους σημαντικότερους παράγοντες και αιτίες της υπογονιμότητας είναι οι γενετικές (χρωμοσωμικές ή γονιδιακές) και επιγενετικές (μεθυλίωση, ακετυλίωση κλπ) ανωμαλίες (Babakhanzadeh et al., 2020).

Βέβαια, αν και υπάρχουν πολλές γνώσεις σχετικά με τις αιτίες που μπορεί να προκαλούν την ανδρική υπογονιμότητα, υπάρχει ένα εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό της τάξης του 70% των περιπτώσεων όπου τα πιθανά αίτια είναι άγνωστα. Εκεί πρόκειται για την ιδιοπαθή υπογονιμότητα (Cannarella et al., 2020).

Για τον άνδρα η διάγνωση της υπογονιμότητας μπορεί να ξεκινήσει πιο απλά με μελέτη του ιστορικού της οικογένειάς του, εξέταση της φυσικής του κατάστασης και 2 αναλύσεις σπέρματος. Ειδικά η ανάλυση σπέρματος είναι μία κρίσιμη διαδικασία που θα δώσει μία πρώτη εικόνα για την παραγωγή και ποιότητα σπέρματος του ατόμου (Peña et al., 2020).

2.2. Το σπερμοδιάγραμμα

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να διακριθεί αρχικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες οι οποίες σχετίζονται με την ποσότητα και την ποιότητα του σπέρματος αντίστοιχα. Η πρώτη περίπτωση έχει να κάνει αποκλειστικά με τον αριθμό σπερματοζωαρίων που παράγει ένας άνδρας και ποικίλει από καθόλου έως και ελάχιστα. Στην δεύτερη περίπτωση, παρ' όλο που το άτομο είναι ικανό να παράγει σπερματοζωάρια, αυτά εμφανίζουν μορφολογικά και κινητικά προβλήματα που επηρεάζουν την επιτυχία της γονιμοποίησης του ωαρίου. Η πιο σοβαρή μορφή υπογονιμότητας στους άνδρες είναι η αζωοσπερμία (AZ) (Kasak & Laan, 2021). Εδώ υπάρχει πλήρης έλλειψη παραγωγής σπερματοζωαρίων και διακρίνεται στην μη αποφρακτική (NOA) και αποφρακτική (OA) αζωοσπερμία. Η NOA είναι πιο συνηθισμένη από την OA φτάνοντας έως και το 60% των περιπτώσεων και μπορεί να οφείλεται σε ορχικά και προ-ορχικά αίτια. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχουν κυρίως γενετικές διαταραχές όπως το σύνδρομο Klinefelter, ενώ στην δεύτερη συμπεριλαμβάνονται κυρίως ενδοκρινή προβλήματα (Arshad et al., 2020). Έπειτα υπάρχει η ολιγοζωοσπερμία (OS), όπου ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι μικρότερος από 15 εκατομμύρια/ml σπερματικού υγρού. Πολλές φορές αυτό το πρόβλημα μπορεί να συνδυάζεται και με διαταραχές στην κινητικότητα (ολιγοασθενοζωοσπερμία) και την μορφολογία (ολιγοτεροζωοσπερμία) των σπερματοζωαρίων. Η ασθενοζωοσπερμία (AZS) είναι η παθολογική κατάσταση κατά την οποία επηρεάζεται η κίνηση των σπερματοζωαρίων και το 60% των περιπτώσεων είναι συνδυασμός με άλλες παθολογικές καταστάσεις υπογονιμότητας (π.χ. ασθενοτεροζωοσπερμία).

Τελευταία μεγάλη κατηγορία είναι η τερατοζωοσπερμία (TS) όπου πάνω από το 85% των σπερματοζωαρίων εμφανίζει μορφολογικές ανωμαλίες. Εδώ υπάρχει η μονομορφική και η πολυμορφική TS ανάλογα με τον αριθμό των μορφολογικών ανωμαλιών που εντοπίζονται στα σπερματοζωάρια (Agarwal et al., 2021),(Daneshmandpour et al., 2020). Οι άνδρες των οποίων τα σπερματοζωάρια απαντώνται σε φυσιολογικούς αριθμούς, κινητικότητα και μορφολογία χαρακτηρίζονται ως νορμοσπερμικοί, ενώ το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρούνται ελάχιστα σπερματοζωάρια στο σπέρμα και απαιτείται φυγοκέντρηση για εξέτασή τους ονομάζεται κρυπτοζωοσπερμία (Agarwal et al., 2021).

2.3. Ιδιοπαθής υπογονιμότητα

2.3.1. Γενικές πληροφορίες

Η ιδιοπαθής υπογονιμότητα πρόκειται για μία πολυπαραγοντική κατάσταση, στην οποία συμμετέχουν τόσο το περιβάλλον όσο και η γενετική (Cerván-Martín et al., 2020). Σε αυτήν την περίπτωση η μελέτη κοινών παραλλαγών του γονιδιώματος μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση των πιθανών αιτιών του προβλήματος. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν οι παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) και τα copy number variants (CNVs), τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν την γονιμότητα στους άνδρες (Gunes & Esteves, 2021).

Όσο αφορά το γενετικό επίπεδο υπάρχουν δύο προσεγγίσεις μελέτης γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται με υπογονιμότητα. Η μελέτη ενός υποψήφιου γονιδίου που είναι ύποπτο για υπογονιμότητα σε μοντέλα ζώων και η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος, όπως για εντοπισμό πολυμορφισμών ενός γονιδίου (SNPs) με μικροσυστοιχίες (Babakhanzadeh et al., 2020).

2.3.2. Μελέτες GWAS σε ανδρικούς πληθυσμούς για την ιδιοπαθή υπογονιμότητα

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες GWAS με σκοπό να ξεκαθαριστούν οι γενετικές αιτίες που αφορούν την ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Ωστόσο, συνήθως πρόκειται για περιορισμένες έρευνες λόγω των λιγοστών σε αριθμό δειγμάτων των ομάδων μελέτης (Cerván-Martín et al., 2020). Οι κυριότερες από αυτές είναι οι εξής:

α) Καυκάσιοι της Ευρώπης: Στην έρευνα αυτή έγινε μελέτη συσχέτισης ορισμένων SNPs με την ολιγοζωοσπερμία, την αζωοσπερμία και την ολιγοζωοσπερμία και αζωοσπερμία σε συνδυασμό. Στην πρώτη περίπτωση βρέθηκαν 4 SNPs με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ολιγοζωοσπερμία. Αυτά ήταν τα rs9814870, rs6476866, rs12920268 και rs9825719. Η δεύτερη κατηγορία της αζωοσπερμίας αντιστοιχίστηκε με τα 16 SNPs rs3105782, rs6068020, rs10841496, rs1399645, rs2063802, rs4954657, rs11707608, rs2032278, rs2976084, rs215702, rs10848911, rs4541736, rs4695097, rs4343755, rs2290870 και rs1545125. Σε αυτές τις περιπτώσεις η τιμή p-value ήταν μικρότερη από 10^{-5} . Τέλος, στην τελευταία κατηγορία βρέθηκε μόνο ένα SNP, το

rs10841496, που εντοπίζεται στο γονίδιο *PDE3A* και έχει p-value μικρότερο του 10^{-4} . Παρατηρήθηκε ότι όλα αυτά τα SNPs δεν βρίσκονται κοντά σε κάποιο γνωστό λειτουργικό στοιχείο, με κάποια από αυτά να εντοπίζονται σε περιοχές ιντρονίων ή αμετάφραστες περιοχές γονιδίων, οπότε και απαιτείται επιπλέον μελέτη (Aston & Carrell, 2009). Σε δεύτερη έρευνα βρέθηκε ότι το SNP rs10246939, που εντοπίζεται στο γονίδιο *TAS2R38* και είναι υπεύθυνο για την αμινοξική μετατροπή της ισολευκίνης σε βαλίνη, συσχετίζεται με την αζωοσπερμία (Aston et al., 2010).

β) Κινέζοι Han: Πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση SNPs σε άτομα με NOA και δύο ομάδες ατόμων ελέγχου, υγιή και με καρκίνο των πνευμόνων, που είχαν απογόνους. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν την συμμετοχή κυρίως 4 SNPs στην υπογονιμότητα. Το rs12097821 βρίσκεται 200 kb ανοδικά του γονιδίου *PRMT6*, το οποίο είναι ανάλογο του γονιδίου *Prmt5* στα ποντίκια και το οποίο έχει ρόλο στην ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων και την σπερματογένεση. Το rs2477686 εντοπίζεται στο γονίδιο *PEX10* και έτσι μπορεί να επηρεάσει την ανδρική γονιμότητα και ιδιαίτερα την κυτταροκίνηση του σπερματοκυττάρου. Το rs10842262 βρίσκεται μέσα σε ιντρόνιο του *SOX5* το οποίο ρυθμίζει την έκφραση της γονιδιακής έκφρασης κατά την σπερματογένεση. Τέλος, το rs6080550 είναι SNP του ψευδογονιδίου *LOC100289473*, για το οποίο ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί η ακριβής λειτουργία και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για λειτουργική συσχέτισή του με την υπογονιμότητα (Hu et al., 2012). Σε ξεχωριστή έρευνα πραγματοποιήθηκε και πάλι σύγκριση ατόμων με NOA και ατόμων ελέγχου σύμφωνα με τον ΠΟΥ, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά υπαίτια SNPs. Τα 4 κυριότερα που βρέθηκαν να συσχετίζονται με NOA ήταν τα rs498422, rs3129878, rs2076531 και rs7192 που εντοπίζονται όλα στην περιοχή 6p22. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται στα γονίδια *HLA-DRA*, *TSBP1* και *C6orf10* που έχουν κρίσιμο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, προτείνοντας μία πιθανή συμμετοχή του ανοσοποιητικού στην εμφάνιση NOA (Zhao et al., 2012). Ακόμη, έχουν εντοπιστεί τα SNPs rs7194, rs7099208 και rs13206743 στα γονίδια *HLA-DRA*, *ABLIM1* και *IL-17A* αντίστοιχα. Το rs7194 φαίνεται να συσχετίζεται με τα επίπεδα mRNA γονιδίων που συμμετέχουν σε ένα σημαντικό σύμπλεγμα ισοσυμβατότητας σε λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές. Το *ABLIM1* φαίνεται να συμβάλλει στην ομαλή παραγωγή ενός κρίσιμου συνδέσμου των κυττάρων Sertoli, του φραγμού αίματος-όρχεων και των σπερματιδίων, ενώ διαταραχές στο *IL-17A* μπορεί να προκαλέσουν φλεγμονή στους όρχεις και κατά συνέπεια διαταραχή της σπερματογένεσης (Hu et al., 2014). Τέλος, έχουν βρεθεί και τα rs7226979 και rs2126986 των γονιδίων *BCL2* και *GNAO1* αντίστοιχα. Το *BCL2* φαίνεται να συμμετέχει στην φυσιολογική ροή της απόπτωσης των γαμετικών κυττάρων, ενώ διαταραχές στο *GNAO1* πιθανόν να οδηγούν σε ανάπτυξη καρκίνου που επηρεάζει την ανδρική γονιμότητα (Qin et al., 2014).

γ) Hutterites: Σε αυτήν την ομάδα ατόμων πραγματοποιήθηκε ανάλυση για εντοπισμό SNPs που σχετίζονται με την ανδρική γονιμότητα και πιο συγκεκριμένα το μέγεθος της οικογένειας και το ποσοστό γεννήσεων. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με άνδρες από το Σικάγο που διέφεραν ως προς την εθνικότητα και βρέθηκαν 41 SNPs με p-values < 0.05, τα οποία συσχετίζονται με αυτά τα χαρακτηριστικά. Από αυτά, τα

rs10966811 (*TUSC1*), rs7867029 (*PSAT1*), rs12870438 (*EPSTI1*), rs7174015 (*USP8*), rs10129954 (*DPPF3*), rs680730 (*DSCAML1*), rs11236909 (*TSKU, LRR32*), rs10488786 (*ARHGAP42*) και rs724078 (*MAS1L, UBD*) εξακριβώθηκε ότι σχετίζονται πιο άμεσα με χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως ο αριθμός σπερματοζωαρίων και η κινητικότητά τους. Κατά κύριο λόγο εντοπίζονται μέσα σε ιντρόνια των γονιδίων τους, ενώ κάποια από αυτά είναι ανοδικά ή καθοδικά αυτών. Τέλος, δεν υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους, άρα, στατιστικώς, αυτά τα SNPs συμμετέχουν ξεχωριστά σε χαρακτηριστικά της γονιμότητας και ίσως αξίζει να μελετηθούν για να διαλευκανθούν ορισμένα άγνωστα αίτια της υπογονιμότητας (Kosova et al., 2012).

Τα τελευταία χρόνια, πέρα από τις μελέτες GWAS, έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται και άλλες μελέτες μεγάλης κλίμακας που αφορούν το γονιδίωμα και ίσως δώσουν περισσότερες απαντήσεις στο πρόβλημα της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας. Μερικές από αυτές είναι η συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (CGH), η ταυτοποίηση των miRNAs στο πλάσμα του σπέρματος και άλλες (Cerván-Martín et al., 2020).

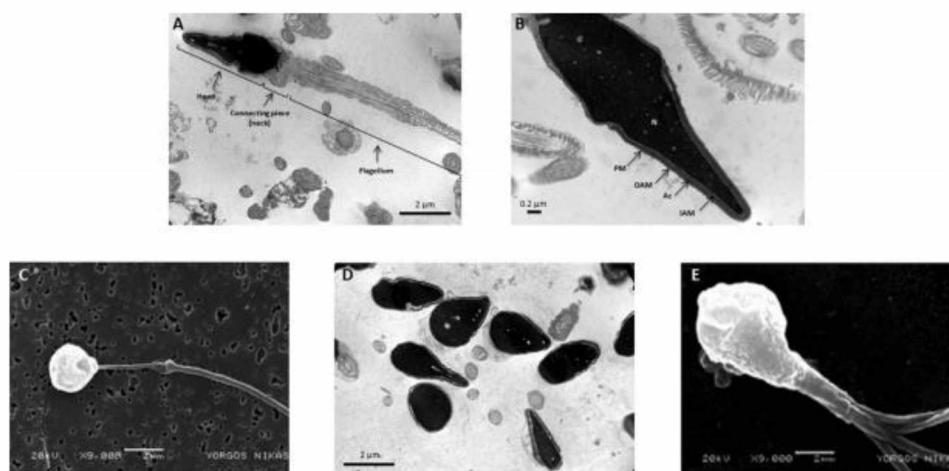
2.4. Τερατοζωοσπερμία και μονογονιδιακές αιτίες της υπογονιμότητας

Υπάρχουν λίγες περιπτώσεις μονογονιδιακών αιτιών της υπογονιμότητας και οι οποίες αφορούν ένα μικρό ποσοστό της τερατοζωοσπερμίας συγκεκριμένα. Στην τερατοζωοσπερμία παρατηρούνται σπερματοζωάρια τα οποία έχουν παραλλαγές στην μορφολογία τους, σε κεφαλή ή ουρά. Στην περίπτωση ανωμαλιών στην κεφαλή υπάρχουν 3 βασικές κατηγορίες TS: α) η γλομποζωοσπερμία, β) τα ακέφαλα σπερματοζωάρια και γ) η μακροζωοσπερμία (Εικόνα 5) (Beurois et al., 2020).

α) Γλομποζωοσπερμία: Είναι μία σπάνια και σοβαρή πάθηση όπου τα σπερματοζωάρια έχουν σφαιρική κεφαλή χωρίς ακρόσωμα και αδυνατούν να εισέλθουν στο ωάριο. Διακρίνεται στην ολική και μερική γλομποζωοσπερμία ανάλογα με το ποσοστό σφαιρικότητας της κεφαλής, ενώ υπάρχει και η ψεύδο-γλομποζωοσπερμία με ατροφικό ακρόσωμα. Τα γονίδια τα οποία έχουν, μέχρι στιγμής, συνδεθεί με την πάθηση είναι τα *SPATA16* (ομόζυγη μετάλλαξη και διαγραφή), *DPY19L2* (διαγραφή ολόκληρου γονιδίου), *PICK1* (ομόζυγη παρανοηματική μετάλλαξη), *ZPBP1* (ομόζυγη και ετερόζυγη παρανοηματική μετάλλαξη) και *CCDC62* (ομόζυγη παρανοηματική και μη νοηματική μετάλλαξη) και αφορούν χαρακτηριστικά όπως η ακεραιότητα του ακροσώματος, η μεταφορά και σύντηξη των κυστιδίων και η αλληλεπίδραση με τον πυρηνικό φάκελο (Beurois et al., 2020).

β) Ακέφαλα σπερματοζωάρια: Στην περίπτωση αυτού του συνδρόμου παρατηρούνται ακέφαλα σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτωση, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχουν και ορισμένα χωρίς μαστίγιο. Τα γονίδια *SUN5*, *PMFBP1*, *TSGA10*, *BRDT* και *CEP112* είναι τα κύρια υπεύθυνα για τον συγκεκριμένο φαινότυπο, με την δράση τους να εμπλέκεται στην σταθερή σύνδεση της κεφαλής με την ουρά. Ο κυριότερος τύπος μετάλλαξης σε αυτά είναι η μη νοηματική οδηγώντας σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης και μικρότερη πρωτεΐνη (Beurois et al., 2020).

γ) Μακροζωοσπερμία: Είναι μία επίσης σπάνια πάθηση (<1% των περιπτώσεων) όπου τα σπερματοζωάρια φέρουν μία ασυνήθιστα μεγάλη κεφαλή. Συνήθως το περιεχόμενο του DNA τους είναι αφύσικο και είναι από διπλοειδή έως τετραπλοειδή κύτταρα. Αυτό συνεπάγεται ότι παρουσιάζονται σφάλματα κατά τις 2 μειωτικές διαιρέσεις, ενώ υπάρχει μεγάλος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων. Το γονίδιο *AURKC* που συμμετέχει σε αυτές τις διαδικασίες έχει βρεθεί να επηρεάζεται σημαντικά σε αυτήν την πάθηση, καθώς έχει εντοπιστεί ομόζυγη διαγραφή ενός ζεύγους βάσεων του γονιδίου (Beurois et al., 2020).



Εικόνα 5: Απεικόνιση φυσιολογικών σπερματοζωαρίων (A,B), γλομποζωοσπερμικών (C), ακέφαλων (D) και μακροζωοσπερμικών (E) (Beurois et al., 2020)

2.5. Μελέτες υπογονιμότητας σε επίπεδο μεταγραφής

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές αναλύσεις οι οποίες στοχεύουν στην μελέτη του προφίλ έκφρασης των όρχεων, με σκοπό την ανάδειξη νέων παραγόντων υπεύθυνων για την ανδρική υπογονιμότητα. Μία από αυτές αφορά και την γονιδιακή έκφραση των γονιδίων των όρχεων υπογόνιμων ανδρών που φέρουν μικροελλείματα στην περιοχή AZFc του χρωμοσώματος Y. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι 331 γονίδια εμφάνισαν μειωμένη έκφραση και τα οποία σχετίζονται με τις διαδικασίες της κυτταρικής ανάπτυξης και της ανάπτυξης και λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα πολλά από αυτά τα γονίδια, όπως τα *DDX25*, *FKBP6* και *SPAG6*, συσχετίστηκαν με τις διαδικασίες της σπερματογένεσης, της γονιμοποίησης και της ανάπτυξης των όρχεων, υποδεικνύοντας πιθανή συμβολή στην υπογονιμότητα. Από την άλλη βρέθηκαν και 159 γονίδια, όπως το *VCY2*, με αυξημένη έκφραση που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και τον θάνατο (Gatta et al., 2010).

Σε ανάλυση προφίλ έκφρασης μεταγραφώματος με δεδομένα που αντλήθηκαν από την βάση δεδομένων NCBI-GEO και τα οποία προήλθαν από πειράματα με χρήση μικροσυστοιχιών, ανιχνεύθηκαν διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια ανάμεσα σε άτομα με διαταραχές σπερματογένεσης και άτομα ελέγχου. Η ανάλυση οντολογίας υπέδειξε την συμμετοχή αυτών των γονιδίων στην σπερματογένεση, την κυτταρική

διαφοροποίηση, την ανάπτυξη των σπερματίδων και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι αφορούσαν δομές και οργανίδια όπως το μαστίγιο, το ακρόσωμα, οι μικροσωληνίσκοι, ο πυρήνας και τα κυστίδια και άρα επηρεάζουν την φυσιολογική πορεία της σπερματογένεσης. Τα γονίδια *C22orf23*, *TSACC* και *TTC25* τα οποία εκδήλωσαν αυξημένη έκφραση στους υπογόνιμους άνδρες είναι κάποια από αυτά και έχουν ρόλο κλειδί στην σπερματογένεση και ιδιαίτερα κατά την φάση των όψιμων πρωτογενών σπερματοκυττάρων και των σπερματίδων (He et al., 2021).

Σε αναλύσεις αλληλούχησης RNA παρατηρήθηκαν 2201 υπερεκφρασμένα και 16363 υποεκφρασμένα μετάγραφα σε άτομα NOA και σε σχέση με τα άτομα ελέγχου. Περίπου 232 υποεκφρασμένα γονίδια συσχετίστηκαν με λειτουργίες των όρχεων, όπως η σπερματογένεση και η ανάπτυξη των σπερματίδων. Άλλες διαδικασίες που επηρεάστηκαν αρνητικά αφορούν την συναρμολόγηση του μαστιγίου, την μείωση, την επιδιόρθωση του DNA και την έκφραση του RNA. Τέλος, στοιχεία της ανάλυσης οντολογίας υποστηρίζουν πως ορισμένα γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται έχουν συνδεθεί με ιϊκή και αντι-ιϊκή δραστηριότητα αντίστοιχα. Άρα, πολύ πιθανόν οι ιϊκές μολύνσεις των όρχεων να συμβάλλουν στην υπογονιμότητα στους NOA άνδρες (Govindkumar et al., 2019).

Επιπλέον, πολύ σημαντικό παράγοντα φαίνεται να έχει και το εντύπωμα του σπέρματος. Πιο συγκεκριμένα, παρ' όλο που το γονιδίωμα του σπέρματος είναι αρκετά συμπιεσμένο, υπάρχουν ορισμένες υπο-μεθυλωμένες περιοχές που επιτρέπουν τόσο την προ-μειωτική όσο και την μετά-μειωτική μεταγραφή του. Μάλιστα τα μόρια RNA που παράγονται μετά την μείωση φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην γονιμοποίηση ή και αργότερα στην ανάπτυξη του εμβρύου. Έχει βρεθεί ότι η ποσότητα μεταγράφων από το σπερματικό εντυπωμένο γονίδιο *IGF2*, που παρέχεται στο ωκύτταρο μετά την σύντηξή του με το σπερματοζωάριο, μπορεί να επηρεάσει την μορφοκινητική του εμβρύου. Αυτό γιατί το *IGF2* προάγει την ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου. Η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου εξαρτάται από την μεθυλίωση της H19 που υφίσταται μόνο το πατρικό αντίγραφο και όχι το μητρικό (Cannarella et al., 2020).

Επιπρόσθετα, εξίσου καθοριστική είναι και η ύπαρξη του μεταγραφώματος του σπερματικού υγρού, καθώς με αφαίρεσή του είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μείωση της ανάπτυξης του εμβρύου. Τα σπερματοζωάρια εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία RNAs, όπως mRNAs, miRNAs, iRNAs, lncRNAs, antisense RNAs κλπ. (Cannarella et al., 2020) Ωστόσο, έχουν ανιχνευθεί πολλά δυσλειτουργικά miRNAs σε άνδρες που πάσχουν από (α) αζωοσπερμία (AZ), (β) ολιγοζωοσπερμία (OS), (γ) ασθενοζωοσπερμία (AZS) ή (δ) τερατοζωοσπερμία (TS) και έτσι πιθανόν θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για την μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας και ιδιαίτερα της ιδιοπαθούς περίπτωσης (Daneshmandpour et al., 2020).

(α) Αζωοσπερμία (AZ): Σε άτομα NOA βρέθηκαν 19 και 154 miRNAs τα οποία υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα τα hsa-miR-141, hsa-miR-429 και hsa-miR-7-1-3p εκφράζονταν σε υψηλά επίπεδα, τα hsa-miR-34b*,

hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p και hsa-miR-122 είχαν μειωμένη έκφραση, ενώ τα let7 and hsa-miR-30 εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με άτομα ελέγχου. Επίσης, το miR-525-3p βρέθηκε ότι στοχεύει την 3'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *SEMG1* το οποίο συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση, οπότε με μειωμένη έκφρασή του αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης του *SEMG1* στους αζωοσπερμικούς επηρεάζοντας αυτές τις διαδικασίες στους όρχεις. Τέλος, η μείωση έκφρασης του hsa-miR-188-3p αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του *MLH1* και επάγει την απόπτωση των σπερματοζωαρίων (Daneshmandpour et al., 2020).

(β) Ολιγοζωοσπερμία (OS): Σε αυτήν την κατηγορία, τα επίπεδα παραγωγής του hsa-miR-171a-3p έχουν αντιστοιχηθεί με την συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο υγρό του σπέρματος. Επίσης, έχουν εντοπισθεί 42 και 44 miRNAs που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται αντίστοιχα σε ολιγοασθενοζωοσπερμικά άτομα. Μια πιο ειδική περίπτωση αποτελεί η αυξημένη παρουσία των hsa-miR-21 and hsa-miR-22 σε ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων, που είναι απαραίτητα για την σπερματική χωρητικότητα. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι και το hsa-miR-34c-3p, του οποίου η έκφραση μειώνει την έκφραση του *PLCXD3* που είναι σημαντικό για την ανδρική γονιμότητα, καθώς ρυθμίζει τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Daneshmandpour et al., 2020).

(γ) Ασθενοζωοσπερμία (AZS): Η πρωτεΐνη CRISP2 είναι απαραίτητη για την κίνηση του σπερματοζωαρίου και φαίνεται ότι τα επίπεδά της επηρεάζονται από την αύξηση του hsa-miR-27b. Ακόμη, σε ασθενοζωοσπερμικά άτομα έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων των hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-34c-5p και hsa-miR-122, μείωση των hsa-miR-101-3p, let-7b-5p και let-7b-5p, ενώ και προβληματική ρύθμιση των hsa-miR-892b, hsa-miR-888 και hsa-miR-890. Αυτές οι αλλαγές έχουν συσχετισθεί με προβλήματα στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Τέλος, σε ιδιοπαθείς AZS ασθενείς εντοπίστηκαν 18 miRNAs που είχαν διαφορές στην έκφρασή τους σε σχέση με άτομα ελέγχου, με ιδιαίτερη περίπτωση την εξαιρετικά υψηλή έκφραση του hsa-miR-888-3p (Daneshmandpour et al., 2020).

(δ) Τερατοζωοσπερμία (TS): Σε άτομα με TS παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης κυρίως των hsa-miR-296-5p και hsa-miR-328-3p (Daneshmandpour et al., 2020).

Τέλος, να αναφερθεί πως σημαντικό ρόλο στην γονιμότητα έχουν το πρωτόσωμα και το μεταβόλωμα του σπέρματος. Αρκετές είναι οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε γεγονότα από την ακροσωμική αντίδραση έως και την γονιμοποίηση και ανάπτυξη του ζυγωτού, ενώ μεταβολίτες όπως κάποια αμινοξέα συμβάλλουν στην σωστή σπερματογένεση και λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Οπότε διαταραχές σε τέτοιου είδους μόρια θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα του σπέρματος και να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα (Cannarella et al., 2020).

3. Τα γονίδια των δύο πρωταμινών, *PRM1* και *PRM2*, και ο συσχετισμός τους με ανδρική υπογονιμότητα

Τα γονίδια των πρωταμινών αποτελούνται από δύο εξόνια με παρεμβολή ενός ιντρονίου. Τα *PRM1* και *PRM2* μεταγράφονται αμέσως μετά την μείωση και κατά την φάση των σφαιρικών σπερματίδων. Αυτά τα μετάγραφα είναι ικανά να μείνουν αποθηκευμένα για αρκετές μέρες πριν περάσουν στην διαδικασία της μετάφρασής τους. Αυτή η αναστολή της μετάφρασης πραγματοποιείται από σύνδεση ειδικών πρωτεϊνών αναστολέων RNA στην 3'-αμετάφραστη περιοχή των mRNAs των γονιδίων. Επίσης, τα mRNAs των πρωταμινών έχουν μία πολύ-A ουρά η οποία εμποδίζει την μετάφραση των μεταγράφων. Μόλις απομακρυνθούν οι αναστολείς και αποκοπεί η πολύ-A ουρά, είναι δυνατόν να ξεκινήσει η πρωτεϊνοσύνθεση κατά την φάση των σπερματοζωαρίων (σπερμιογένεση) (Steger & Balhorn, 2018).

Οι πρωταμίνες στο σπέρμα των ανδρών συνήθως εκφράζονται σε αναλογία 1/1 και αποκλίσεις από αυτήν την αναλογία έχουν συσχετιστεί με υπογονιμότητα. Επιπλέον, στο σπέρμα έχουν εντοπιστεί και επίπεδα mRNAs των πρωταμινών τα οποία πιθανολογείται πως συμβάλλουν στην έναρξη της γονιμοποίησης και την εγκαθίδρυση του πατρικού εντυπώματος (M. Hamad et al., 2019). Στα γαμετικά κύτταρα των ανδρών, το 85% των ιστονών αντικαθίσταται σταδιακά από τις θετικά φορτισμένες πρωταμίνες, οι οποίες συνδέονται στο αρνητικά φορτισμένο DNA δημιουργώντας μία προστατευτική δομή συμπιεσμένης χρωματίνης έναντι επιβλαβών παραγόντων. Αλλαγές στην αναλογία ιστονών/πρωταμινών μπορούν να οδηγήσουν σε βλάβες του DNA του σπέρματος και υπογονιμότητα στους άνδρες (Nemati et al., 2020).

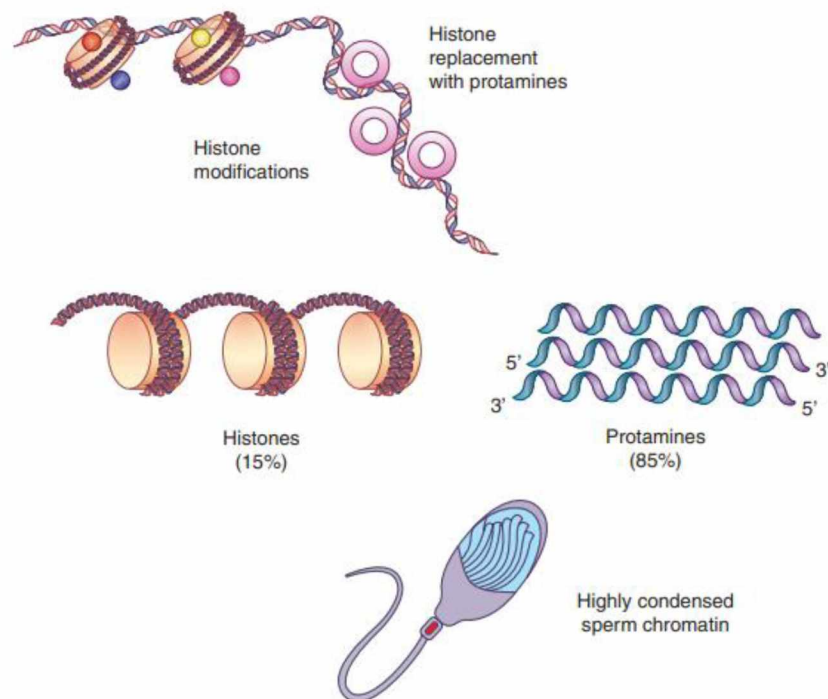
Έχει βρεθεί πως ασθενείς με υπογονιμότητα παράγουν μικρότερους όγκους σπέρματος σε σχέση με νορμοσπερμικούς. Ανάλογα εμφανίζουν μικρότερους αριθμούς, χαμηλότερη κινητικότητα και μικρότερα ποσοστά φυσιολογικής μορφολογίας και ακεραιότητας των σπερματοζωαρίων. Αντίθετα, τα επίπεδα της αποσυμπιεσμένης χρωματίνης φαίνεται να είναι αυξημένα σε υπογόνιμους άνδρες. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα των ιστονών είναι αυξημένα, ενώ της πρωταμίνης-2 μειωμένα στους υπογόνιμους άνδρες, οδηγώντας σε αύξηση της αναλογίας των ιστονών προς τις πρωταμίνες. Η αύξηση αυτής της αναλογίας είναι που οδηγεί και στα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά (M. F. Hamad, 2019).

Λόγω του ότι οι πρωταμίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην συμπίεση της χρωματίνης του σπέρματος και στην σπερματογένεση, ορισμένοι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια τους θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την έκφρασή τους. Πιο συγκεκριμένα οι πολυμορφισμοί rs2301365 και rs1646022 των γονιδίων *PRM1* και *PRM2* αντίστοιχα, έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υπογονιμότητας στους άνδρες, καθώς έχουν μεγάλη συχνότητα εμφάνισης σε υπογόνιμους άνδρες (Nemati et al., 2020). Μάλιστα ο rs2301365 συσχετίζεται με βλάβη του DNA και μη φυσιολογική μορφολογία του σπέρματος οδηγώντας σε αλλαγές έκφρασης του *PRM1*. Επίσης, ο πολυμορφισμός rs779337774 του *PRM2* οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσής του με μετατροπή του

κωδικονίου για την γλουταμίνη σε κωδικόνιο λήξης (Aydos et al., 2018). Αντίθετα, από ανάλυση συσχέτισης, ο πολυμορφισμός rs2070923 του *PRM2* βρέθηκε να δρα προστατευτικά έναντι της υπογονιμότητας. Τέτοιου είδους πολυμορφισμοί είναι ικανοί να αλλάξουν την φυσιολογική αναλογία των πρωταμινών οδηγώντας σε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης, κινητικότητας και σταθερής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων. Αυτές οι ποιοτικές αλλαγές είναι ιδιαίτερα αισθητές όσο αυξάνεται η ηλικία των ατόμων (Nemati et al., 2020).

Σε μελέτες μεταξύ νορμοσπερμικών και τερατοζωοσπερμικών ανδρών έχουν βρεθεί χαμηλότερα επίπεδα mRNAs των *PRM1* και *PRM2* στους τερατοζωοσπερμικούς, ενώ αλλάζουν και οι αναλογίες *PRM1/PRM2*. Αυτό οδηγεί και σε χαμηλότερα επίπεδα πρωταμίνωσης και συμπύκνωσης της χρωματίνης. Παρόμοιες ανωμαλίες έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενοζωοσπερμικούς άνδρες με χαμηλότερη κινητικότητα σπερματοζωαρίων (Savadi-Shiraz et al., 2015).

Τέλος, φαίνεται πως και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι συνήθειες ζωής και το κάπνισμα, μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των πρωταμινών και να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα. Ειδικότερα, στους καπνιστές έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα mRNAs του *PRM1*, μειωμένα επίπεδα για το *PRM2* και, άρα, αρκετά μεγάλες διαφορές της αναλογίας *PRM1/PRM2*. Μάλιστα αυτή η διαφορά της αναλογίας συσχετίζεται σημαντικά και σε αρνητικό βαθμό με τον όγκο του σπέρματος, τον αριθμό, την κινητικότητα και το ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Όλα αυτά υποδεικνύουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης υπογονιμότητας σε άνδρες που καπνίζουν (M. Hamad et al., 2019).



Εικόνα 6: Η αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες (Arafa et al., 2020)

B. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανδρική υπογονιμότητα, που αντιστοιχεί στο 50% περίπου των περιπτώσεων υπογονιμότητας, αποτελεί μία πολυπαραγοντική διαταραχή με το γενετικό παράγοντα να έχει σημαντική συνεισφορά. Συνεπώς, η έρευνα γονιδίων που συμβάλλουν σε αυτήν θα μπορούσε να δώσει και αποτελεσματικές λύσεις.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PRM1* και *PRM2* σε 22 νορμοσπερμικούς άνδρες με PCR πραγματικού χρόνου, ως πιθανά υποψήφια γονίδια που η έκφρασή τους σχετίζεται με την ποιότητα του σπέρματος. Οι πρωταμίνες αντικαθιστούν τις ιστόνες των σπερματοζωαρίων στην φάση της σπερμιογένεσης και προστατεύουν το γενετικό υλικό τους. Η συγκεκριμένη εργασία εντάσσεται σε μεγαλύτερο ερευνητικό πρόγραμμα του Εργαστηρίου για τη μελέτη των γενετικών αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας.

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Δείγματα RNA από σπέρμα νορμοσπερμικών ανδρών

Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος «Ανδρική γονιμότητα: γονιδιωματική, πρωτεομική και διάγνωση. Από τον εργαστηριακό πάγκο στον ασθενή», το οποίο πραγματοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» και υλοποιείται από το ΒΙΟΖ – Εργαστήριο Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής Embryolab στη Θεσσαλονίκη. Η απομόνωση RNA από τα δείγματα έγινε στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της κ. Μ. Μαρκαντώνη (υπό συγγραφή, Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν. Θεσσαλίας, επιβλέπων: Καθ. Ζ. Μαμούρης). Όλα τα δείγματα σπέρματος έχουν αναλυθεί με σπερμοδιάγραμμα. Για το παρών πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 22 δείγματα σπέρματος από εθελοντές νορμοσπερμικούς άνδρες τα οποία ήταν διατηρημένα στους -80°C.

2. Σχεδιασμός εκκινητών για τα γονίδια ενδιαφέροντος *PRM1* και *PRM2* και για τα ιδιοσυστατικά γονίδια *ACTB* και *RPS18*

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων ζευγών εκκινητών των γονιδίων σε ένα πείραμα PCR αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια του πειράματος. Αυτό γιατί οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν θα κρίνουν το κατά πόσο θα προκύψουν τα επιθυμητά προϊόντα, παραπροϊόντα ή και ομοδιμερή μεταξύ των εκκινητών. Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός ζευγών εκκινητών με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού για τα δύο γονίδια των πρωταμινών στον άνθρωπο, *PRM1* και *PRM2*, τα οποία και είναι υποψήφια για την ανδρική υπογονιμότητα. Επίσης, επιλέχθηκαν και τα 2 ιδιοσυστατικά γονίδια της ακτίνης β (*ACTB*) και της ριβοσωμικής πρωτεΐνης 18 (*RPS18*), τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά για συγκριτικό έλεγχο έκφρασης σε μελέτες με χρήση PCR πραγματικού χρόνου.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών, αρχικά, επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες mRNA των 4 γονιδίων από την ηλεκτρονική πλατφόρμα της NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), όπου ταυτόχρονα παρουσιάζονται και άλλες χρήσιμες πληροφορίες, όπως το μήκος των αλληλουχιών και τα όρια των εξονίων των γονιδίων. Λόγω του ότι τα γονίδια *PRM1* και *PRM2* ανήκουν στην ίδια οικογένεια γονιδίων ήταν απαραίτητο να ελεγχθεί η ομοιότητα των αντίστοιχων αλληλουχιών, καθώς δεν έπρεπε να επιλεγεί ζεύγος εκκινητών συμβατό και για τα δύο γονίδια. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο blastn (blast 2 sequences) της NCBI που επιτρέπει την σύγκριση μεταξύ δύο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Να αναφερθεί ότι το γονίδιο *PRM2* έχει 5 ξεχωριστά εναλλακτικά μετάγραφα και για αυτό έπρεπε να συγκριθεί το καθένα από αυτά ξεχωριστά με το *PRM1*. Με το τέλος της ανάλυσης προέκυψε ότι κανένα από τα εναλλακτικά μετάγραφα του *PRM2* δεν εμφανίζει κοινή αλληλουχία με το *PRM1* και

άρα ήταν δυνατόν να ξεκινήσει ο σχεδιασμός των εκκινητών ανεξάρτητα για κάθε γονίδιο.

Στο επόμενο στάδιο αξιοποιήθηκε το εργαλείο Primer-BLAST της NCBI το οποίο είναι ικανό να εμφανίζει πιθανά ζεύγη εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην PCR για οποιοδήποτε γονίδιο. Πριν ενεργοποιηθεί το πρόγραμμα για κάθε γονίδιο, τροποποιήθηκαν ορισμένες παράμετροι ώστε να υπάρχουν πιο αυστηρά κριτήρια στον σχεδιασμό των εκκινητών και να προκύψουν όσο το δυνατόν καλύτερα ζεύγη. Το "PCR product size" ορίσθηκε από 100 έως 200 bp, το "Primer melting temperatures (Tm)" από 58 μέχρι 62 °C με "Max Tm difference" 2, το "Primer size" από 18 έως 22 bp, ενώ το "Primer GC content (%)" από 35 έως 65%. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται και στα max self-complementarity τα οποία καλό είναι να δίνουν όσο το δυνατόν μικρότερες τιμές γίνεται (συνήθως κάτω του 4) και ακόμα περισσότερο για το 3' άκρο. Το πρόγραμμα δίνει κάποια υποψήφια ζεύγη εκκινητών για κάθε γονίδιο τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην PCR. Ωστόσο, δεν σημαίνει πως το πρώτο ζεύγος που εμφανίζεται θα είναι και το καλύτερο για το πείραμα και για αυτό απαιτείται έλεγχος των χαρακτηριστικών του καθενός ξεχωριστά.

Τέλος, μετά την επιλογή του επιθυμητού ζεύγους εκκινητών για κάθε γονίδιο, αξιοποιήθηκε το ηλεκτρονικό εργαλείο Beacon Designer το οποίο ελέγχει με μεγαλύτερη ακρίβεια την πιθανότητα δημιουργίας διμερών. Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει τα διμερή και τα hairpins να δίνουν τιμές κάτω του 4 και όσο πιο μικρές γίνεται σε απόλυτα νούμερα, ώστε να κριθεί ένα ζεύγος κατάλληλο για χρήση. Επειδή στην PCR πραγματικού χρόνου θα γίνει χρήση της χρωστικής ουσίας SYBR®Green επιλέχθηκε η αντίστοιχη επιλογή του προγράμματος και έπειτα τοποθετήθηκαν ο νοηματικός και ο αντι-νοηματικός εκκινητής κάθε ζεύγους στα κατάλληλα κελιά. Με την επιλογή "Analyze" το πρόγραμμα επεξεργάστηκε τα ζεύγη των εκκινητών και εμφάνισε πληροφορίες για την αποδοτικότητά τους. Μέσω αυτού του εργαλείου πραγματοποιήθηκε η επαλήθευση όλων των ζευγών εκκινητών για την πιθανή απόδοσή τους κατά την διάρκεια του πειράματος. Η παραγγελία όλων των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Eurofins Genomics.

α) PRM1: Το PRM1 (NM_002761.3) δίνει μόνο ένα μετάγραφο με αλληλουχία mRNA 399 bp η οποία και χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη στο Primer-BLAST για εύρεση εκκινητών. Από τα ζεύγη που εμφανίστηκαν επιλέχθηκε αυτό με τα καλύτερα δυνατά χαρακτηριστικά (Εικόνα 7), ενώ ενισχύει περιοχή που αντιστοιχεί σε τμήματα και των 2 εξονίων του γονιδίου. Το Beacon Designer έδωσε τιμές 1.8 για cross dimers, 1.1 για self-dimer και hairpin του νοηματικού εκκινητή και 0 για self-dimer και hairpin του αντι-νοηματικού οι οποίες και κρίθηκαν δεκτές.

Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GCCAGAGACAAAGAAGTCGC	Plus	20	142	161	59.21	55.00	3.00
Reverse primer	GCAGGAGTTTGGTGGATGTG	Minus	20	281	262	59.12	55.00	2.00
Product length	140							

Εικόνα 7: Το ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο PRM1

β) *PRM2*: Το *PRM2* (NM_001286357.2) έχει 5 εναλλακτικά μετάγραφα με αλληλουχίες mRNA των 680, 724, 605, 673 και 727 bp αντίστοιχα. Σε αυτήν την περίπτωση έπρεπε να γίνει έλεγχος των αλληλουχιών αυτών ώστε να επιλεγεί μία κοινή περιοχή που θα χρησιμοποιηθεί για το Primer-BLAST και να προκύψει ζεύγος εκκινητών που να αναγνωρίζει και τα 5 εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου δίνοντας το ίδιο προϊόν. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clustal Omega που συγκρίνει ταυτόχρονα πολλές αλληλουχίες σε μορφή FASTA. Η ανάλυση έδειξε πως τα 5 εναλλακτικά μετάγραφα έχουν 2 κοινές αλληλουχίες οι οποίες για το εναλλακτικό μετάγραφο της ισομορφής 3 αντιστοιχούν στις bp 1-333 (1^ο εξόνιο) και 338-605 (2^ο εξόνιο) αντίστοιχα. Η πρώτη αλληλουχία ήταν και αυτή που επιλέχθηκε για το Primer-BLAST και τον σχεδιασμό εκκινητών. Από τα ζεύγη που προέκυψαν επιλέχθηκε αυτό με τα καλύτερα χαρακτηριστικά (Εικόνα 8), ενώ το Beacon Designer έδωσε τιμές 4.2 για cross dimers, 1.3 και 0 για self-dimer και hairpin του νοηματικού εκκινητή και 3.1 για self-dimer και hairpin του αντι-νοηματικού οι οποίες και κρίθηκαν δεκτές.

Primer pair 4

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GTGAGGAGCCTGAGCGAAC	Plus	19	126	144	60.45	63.16	4.00
Reverse primer	TGGGTCCTCTCGTAGACCTC	Minus	20	253	234	59.74	60.00	4.00
Product length	128							

Εικόνα 8: Το ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο *PRM2*

γ) *ACTB*: Το *ACTB* (NM_001101.5) δίνει μόνο ένα πιθανό μετάγραφο με αλληλουχία mRNA 1812 bp. Στην περίπτωση αυτή όποιο κομμάτι αλληλουχίας και αν επιλεγόταν τυχαία έδινε εκκινητές που ενίσχυαν περιοχές και άλλων μη επιθυμητών γονιδίων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Nucleotide BLAST της NCBI, ώστε να βρεθεί μοναδική αλληλουχία του γονιδίου που να μην υπάρχει στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας και να επιλεγεί για σχεδιασμό εκκινητών. Η ανάλυση ρυθμίστηκε για "Human RefSeqGene sequences(RefSeq Gene)" και "Highly similar sequences (megablast)" και από τις αλληλουχίες που εμφάνισε επιλέχθηκε η περιοχή 1261-1740 του *ACTB* για το Primer-BLAST. Επιλέχθηκε το ζεύγος με τα καλύτερα χαρακτηριστικά (Εικόνα 9), με το Beacon Designer να δίνει τιμές 4.1 για cross dimers, 0 για self-dimer και hairpin του νοηματικού εκκινητή και 0.5 για self-dimer και hairpin του αντι-νοηματικού οι οποίες και κρίθηκαν δεκτές. Αυτό το ζεύγος εκκινητών ενισχύει περιοχή του εξονίου 6 του γονιδίου.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AGCATCCCCAAAGTTCACAAT	Plus	22	135	156	60.49	45.45	3.00
Reverse primer	GGCTTTTAGGATGGCAAGGG	Minus	20	253	234	58.89	55.00	3.00
Product length	119							

Εικόνα 9: Το ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο *ACTB*

δ) *RPS18*: Το *RPS18* (NM_022551.3) δίνει μόνο ένα μετάγραφο με αλληλουχία mRNA 549 bp, η οποία και χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη στο Primer-BLAST. Επιλέχθηκε το ζεύγος με τα καλύτερα χαρακτηριστικά (Εικόνα 10), ενώ το Beacon Designer έδωσε τιμές 1.3 για cross dimers, 2.0 και 0 για self-dimer και hairpin του νοηματικού εκκινητή και 0 για self-dimer και hairpin του αντι-νοηματικού οι οποίες και κρίθηκαν δεκτές. Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών ενισχύει περιοχή που αντιστοιχεί σε τμήματα των εξονίων 4 και 5 του γονιδίου.

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CACGCCAGTACAAGATCCCA	Plus	20	266	285	59.75	55.00	4.00
Reverse primer	AAGTGACGCAGCCCTCTATG	Minus	20	422	403	59.82	55.00	3.00
Product length	157							

Εικόνα 10: Το ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο *RPS18*

3. Προετοιμασία εκκινητών για PCR πραγματικού χρόνου

Υλικά:

- ✓ Εκκινητές για τα γονίδια *ACTB*, *RPS18*, *PRM1* και *PRM2*
- ✓ H₂O
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Vortex

Διαδικασία:

Μετά την παραγγελία των επιθυμητών εκκινητών για κάθε γονίδιο, η εταιρεία Eurofins Genomics τους παρέδωσε σε λυοφιλοποιημένη μορφή μέσα σε eppendorfs όπου αναγράφονται πληροφορίες, όπως η αλληλουχία του εκκινητή και αν πρόκειται για τον νοηματικό ή τον αντινοηματικό. Οι εκκινητές συνοδεύονταν και από πληροφορίες προσθήκης κατάλληλης ποσότητας καθαρού νερού, έτσι ώστε να διαλυτοποιηθούν σε συγκέντρωση 100 pmol/μl. Ωστόσο, για το συγκεκριμένο πείραμα θα έπρεπε να επιτευχθεί η συγκέντρωση των 50 pmol/μl για κάθε εκκινητή. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Σε κάθε eppendorf νοηματικού και αντινοηματικού εκκινητή για κάθε γονίδιο, προστέθηκε η διπλάσια ποσότητα νερού από αυτήν που αναγραφόταν στις οδηγίες της εταιρείας, ώστε να επιτευχθεί η συγκέντρωση των 50 pmol/μl ή 50000 nM.
- Όλοι οι εκκινητές επωάστηκαν για 10 min στον πάγκο σε RT. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε και για δεύτερη φορά.
- Τα eppendorf φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 15 sec στις 8000 g και πλέον αποτελούσαν το πυκνό διάλυμα (stock) των εκκινητών. Από αυτό είναι δυνατή η λήψη ποσότητας για την παρασκευή επιθυμητής συγκέντρωσης εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί στην PCR πραγματικού χρόνου.
- Σε eppendorf του 0,5 ml προστέθηκαν από 80 μl καθαρού νερού και 20 μl του κάθε εκκινητή ξεχωριστά, έτσι ώστε να επιτευχθεί αραιώση 1/5

συγκέντρωσης 10 pmol/μl ή 10000 nM για κάθε εκκινητή. Από αυτές τις αραιώσεις θα χρησιμοποιηθούν αργότερα οι εκκινητές για την PCR πραγματικού χρόνου.

- Τα δείγματα με τις αραιώσεις των εκκινητών αναδεύτηκαν καλά για περίπου 15 sec στο vortex και έπειτα αυτά μαζί με το πυκνό διάλυμα των εκκινητών αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.

4. Επώαση δειγμάτων RNA με DNase και έλεγχος παρουσίας DNA με PCR πραγματικού χρόνου

Υλικά:

- ✓ Δείγματα RNA
- ✓ rDNase I
- ✓ 10X DNase I Buffer
- ✓ DNase Inactivation Reagent
- ✓ Εκκινητές του *PRM1*
- ✓ H₂O
- ✓ Χρωστική SYBR®Green
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Μηχάνημα PCR Veriti 96 Well Thermal Cycler
- ✓ Μηχάνημα qPCR Rotor-Gene Q
- ✓ Ηλεκτρονικός υπολογιστής και κατάλληλο λογισμικό

Διαδικασία:

Μετά την απομόνωση του RNA από τα δείγματα σπέρματος πραγματοποιήθηκε αντίδραση DNase προκειμένου να κατακερματιστούν όλα τα υπολείμματα DNA που είχαν τα δείγματα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το DNA-free™ DNA Removal Kit από την εταιρεία Invitrogen, ενώ η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Σε 22 erpendorf του 0,2 ml προστέθηκαν από 15 μl του κάθε δείγματος RNA.
- Έπειτα παρασκευάστηκε ένα master mix το οποίο περιείχε από 0,1 του όγκου των δειγμάτων 10X DNase I Buffer (δηλαδή 1,5 μl) και 1 μl rDNase I για κάθε δείγμα. Το master mix ήταν για ποσότητα 25 δειγμάτων οπότε συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 37,5 μl 10X DNase I Buffer και 25 μl rDNase I, τα οποία αναδεύτηκαν καλά.
- Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν από 2,5 μl του master mix και αμέσως μετά φυγοκεντρήθηκαν όλα για λίγα sec.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της PCR όπου επώαστηκαν στους 37° C για 30 min.
- Μετά την πρώτη επώαση των δειγμάτων, προστέθηκε ακόμα 1 μl rDNase I σε κάθε δείγμα, φυγοκεντρήθηκαν για λίγα sec και επώαστηκαν για δεύτερη φορά στο μηχάνημα της PCR στους 37° C για 30 min.

- Σε όλα τα δείγματα προστέθηκαν από 2 μl DNase Inactivation Reagent, με κάθε δείγμα να αναδεύεται καλά με το χέρι, έτσι ώστε ο αναστολέας να απενεργοποιήσει κάθε ίχνος της DNase και να εγκλωβίσει τα υπολείμματα του DNA. Έπειτα τα δείγματα παρέμειναν για 2 min σε RT.
- Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1,5 min στις 10000 g, ώστε ο αναστολέας να κατακρημνιστεί και να συλλεγεί το υπερκείμενο που πλέον περιείχε καθαρό το RNA και μεταφέρθηκε σε νέα erpendorf.

Αμέσως μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων RNA πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 7) προκειμένου να επαληθευτεί η καθαρότητα των δειγμάτων από DNA. Για αυτό χρησιμοποιήθηκαν από 1,5 μl κάθε δείγματος RNA και 18,5 μl master mix για το γονίδιο *PRM1* σε συγκέντρωση 200 nM (οι συγκεκριμένοι εκκινητές είχαν χρησιμοποιηθεί ξανά σε προηγούμενο πείραμα PCR πραγματικού χρόνου και είχε αποδειχτεί ότι ενισχύουν το cDNA παράγοντας προϊόν). Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν και από ένα θετικό (περιείχε DNA) και αρνητικό (περιείχε νερό) δείγμα ελέγχου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Rotor Gene της QIAGEN επαληθεύοντας την καθαρότητα των δειγμάτων, ώστε να συνεχιστεί το πείραμα.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στον πάγο, ενώ στο τέλος τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -80° C για μελλοντική χρήση.

5. Υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων RNA σπέρματος

Υλικά:

- ✓ Δείγματα RNA
- ✓ H₂O
- ✓ Συσκευή φωτομέτρησης QUAWELL
- ✓ Ηλεκτρονικός υπολογιστής και κατάλληλο λογισμικό

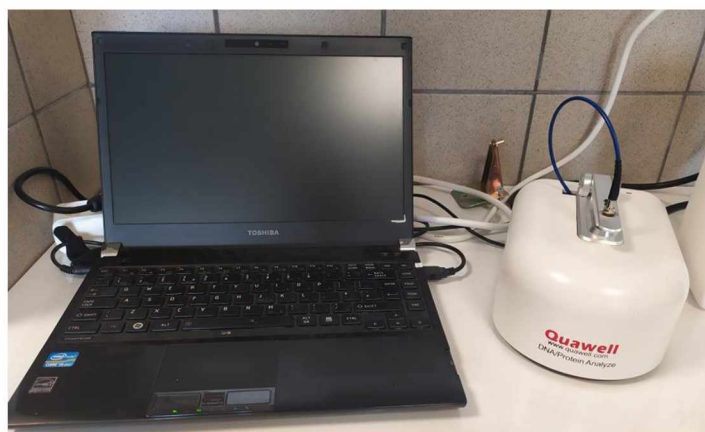
Διαδικασία:

Το επόμενο βήμα μετά την επαλήθευση της καθαρότητας των δειγμάτων RNA είναι ο υπολογισμός της συγκέντρωσής τους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η συσκευή QUAWELL η οποία ρυθμίστηκε για “nucleic acid” και “RNA” από τις επιλογές που παρέχει το πρόγραμμα του μηχανήματος.

Αρχικά, η συσκευή μηδενίστηκε με προσθήκη 2 μl καθαρού νερού στην ειδική θύρα και επιλογή “Blank→Measure”. Η ένδειξη στον υπολογιστή θα πρέπει να δείχνει από 0,2 ng/μl και όσο γίνεται πιο κοντά στο 0, ώστε να θεωρηθεί έτοιμη για υπολογισμό συγκέντρωσης των δειγμάτων. Στη συνέχεια από κάθε δείγμα RNA λήφθηκε ποσότητα 2 μl ώστε να τοποθετηθεί στην ειδική θύρα της συσκευής και να υπολογιστεί η αντίστοιχη συγκέντρωση. Κάθε 10 δείγματα, περίπου, η συσκευή μηδενιζόταν με την χρήση καθαρού νερού, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη

αξιοπιστία στους υπολογισμούς, ενώ κάθε φορά η θύρα σκουπιζόταν απαλά με χαρτί για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα δειγμάτων.

Για την συνέχεια του πειράματος είναι απαραίτητο να επεξεργαστούν όλα τα δείγματα RNA, έτσι ώστε από όλα να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα RNA σε ng. Σύμφωνα με τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων, όπου η χαμηλότερη βρέθηκε στα 73,4 ng/μl, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν συνολικά 700 ng RNA από κάθε δείγμα. Για τον λόγο αυτό διαιρέθηκε το 700 με την συγκέντρωση κάθε δείγματος ξεχωριστά προκειμένου να βρεθεί ο όγκος σε μl που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί από κάθε δείγμα συμπληρωμένος με καθαρό νερό έως τα 10 μl. Με αυτόν τον τρόπο σε τελικό όγκο 10 μl υπήρχαν διαθέσιμα 700 ng RNA από κάθε δείγμα.



Εικόνα 11: Η συσκευή QUAWELL που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων RNA.

6. Αντίστροφη μεταγραφή δειγμάτων RNA για δημιουργία cDNA

Υλικά:

- ✓ 10x RT Buffer
- ✓ 25x dNTP Mix (100 mM)
- ✓ 10x RT Random Primers
- ✓ Multiscribe Reverse Transcriptase
- ✓ RNase Inhibitor
- ✓ Nuclease-free water
- ✓ Δείγματα RNA
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Μηχάνημα PCR Veriti 96 Well Thermal Cycler

Διαδικασία:

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων RNA, το επόμενο βήμα είναι να υποστούν αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA το οποίο και θα χρησιμοποιηθεί αργότερα για την PCR πραγματικού χρόνου. Για να γίνει αυτό αξιοποιήθηκε το μηχάνημα της απλής PCR από την εταιρεία Applied Biosystems, ενώ η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με την βοήθεια του High Capacity cDNA Reverse Transcription

Kit από την Invitrogen. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για αυτήν την διαδικασία ήταν τα εξής:

- Αφού ξεπάγωσαν τα συστατικά του kit, παρασκευάστηκε ένα master mix με αυτά σε ένα erpendorf του 1,5 ml, το οποίο για κάθε αντίδραση-δείγμα περιείχε από 2 μl 10x RT Buffer, 0,8 μl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 μl 10x RT Random Primers, 1 μl Multiscribe Reverse Transcriptase, 1 μl RNase Inhibitor και 3,2 μl Nuclease-free water. Άρα σύνολο 10 μl για κάθε αντίδραση-δείγμα και από την στιγμή που το πείραμα έχει 22 δείγματα και υπολογίζεται έξτρα ποσότητα 4 δειγμάτων για αποφυγή δειγματοληπτικού σφάλματος, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά $26 \times 2 \mu\text{l} = 52 \mu\text{l}$, $26 \times 0,8 \mu\text{l} = 20,8 \mu\text{l}$, $26 \times 2 \mu\text{l} = 52 \mu\text{l}$, $26 \times 1 \mu\text{l} = 26 \mu\text{l}$, $26 \times 1 \mu\text{l} = 26 \mu\text{l}$ και $26 \times 3,2 \mu\text{l} = 83,2 \mu\text{l}$ από κάθε συστατικό αντίστοιχα.
- Το master mix φυγοκεντρήθηκε για περίπου 15 sec στις 8000 g.
- Σε 22 erpendorf των 0,2 ml, που χρησιμοποιούνται ειδικά για το μηχάνημα της PCR, προστέθηκαν από 10 μl κάθε δείγματος RNA και 10 μl του master mix που παρασκευάστηκε.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 15 sec στις 8000 g, προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες οι οποίες θα παρεμπόδιζαν την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής στο μηχάνημα της PCR.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της PCR, το οποίο ρυθμίστηκε σε ειδικό πρόγραμμα σύμφωνα με τον Πίνακα 1, ενώ ο όγκος της αντίδρασης στο μηχάνημα ορίστηκε σε 20 μl, όσο δηλαδή και ο όγκος των δειγμάτων:

Πίνακας 1: Οι παράμετροι για την αντίστροφη μεταγραφή

	Βήμα 1	Βήμα 2	Βήμα 3	Βήμα 4
Θερμοκρασία (°C)	25	37	85	4
Χρόνος (min)	10	120	5	~

- Όταν ολοκληρώθηκε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και πλέον είχαν παραχθεί τα αντίστοιχα cDNA για κάθε δείγμα, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας τα δείγματα διατηρούνταν σε πάγο λόγω ευαισθησίας του RNA, όπως και το master mix για να παραμείνουν αδρανή τα ειδικά ένζυμα που περιείχε.



Εικόνα 12: Το μηχάνημα της PCR, Veriti 96 Well Thermal Cycler.

7. Έλεγχος δειγμάτων cDNA αραιώσεων από pool και αποδοτικότητας εκκινητών με PCR πραγματικού χρόνου

Υλικά:

- ✓ Δείγματα cDNA
- ✓ Εκκινητές των γονιδίων *ACTB*, *RPS18*, *PRM1* και *PRM2*
- ✓ H₂O
- ✓ Χρωστική SYBR®Green
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Μηχάνημα qPCR Rotor-Gene Q
- ✓ Ηλεκτρονικός υπολογιστής και κατάλληλο λογισμικό

Διαδικασία:

Σε αυτό το στάδιο του πειράματος πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της έκφρασης των δειγμάτων cDNA και της αποδοτικότητας των εκκινητών για τα γονίδια *PRM1*, *PRM2*, *ACTB* και *RPS18* με το μηχάνημα της PCR πραγματικού χρόνου, Rotor Gene Q, από την εταιρεία QIAGEN. Αυτό το στάδιο αποτελεί μία απαραίτητη προεργασία πριν το τελικό πειραματικό στάδιο για τον έλεγχο της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων κάθε δείγματος ξεχωριστά. Με αυτόν τον τρόπο θα είναι δυνατόν να βρεθεί η καλύτερη εφικτή απόδοση για την αντίδραση, δηλαδή σε ποια αραιώση των δειγμάτων και ποια συγκέντρωση κάθε εκκινητή ξεχωριστά αποδίδει καλύτερα η αντίδραση, ώστε να ληφθούν όσο πιο αξιόπιστα αποτελέσματα γίνεται. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Αρχικά, σε ένα eppendorf του 0,5 ml δημιουργήθηκε ένα pool από τα δείγματα cDNA, που παρασκευάστηκαν σε προηγούμενο στάδιο, με προσθήκη 3 μl από κάθε δείγμα ξεχωριστά. Από την στιγμή που στο πείραμα υπάρχουν 22 δείγματα, ο συνολικός όγκος του pool ήταν περίπου 60 μl.

- Αυτό το pool των δειγμάτων υπέστη 7 διαδοχικές αραιώσεις των 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200 αντίστοιχα σε νέα erpendorf του 0,5 ml. Για κάθε νέα αραιώση πραγματοποιούνταν δειγματοληψία από την αμέσως προηγούμενη αραιώση, έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε μίας να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερος μετά την προθήκη της απαραίτητης ποσότητας νερού.

Πίνακας 2: Οι όγκοι των αραιώσεων του pool και οι αναλογίες (μl) δειγμάτων και νερού για την δημιουργία τους

Αραιώση	Αρχικός όγκος (μl)	Τελικός όγκος (μl)
1/5	52 (pool) + 208 (νερό) = 260	260 – 132,5 = 127,5
1/10	132,5 (1/5) + 132,5 (νερό) = 265	265 – 140 = 125
1/20	140 (1/10) + 140 (νερό) = 280	280 – 152,5 = 127,5
1/40	152,5 (1/20) + 152,5 (νερό) = 305	305 – 176 = 129
1/50	176 (1/40) + 44 (νερό) = 220	220 – 95 = 125
1/100	95 (1/50) + 95 (νερό) = 190	190 – 62,5 = 127,5
1/200	62,5 (1/100) + 62,5 (νερό) = 125	125

- Μετά την δημιουργία κάθε αραιώσης, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για περίπου 15 sec στις 8000 g. Οι ποσότητες των αραιώσεων αυτών αρκούν για αρκετές δοκιμές.
- Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ειδικό master mix για τους εκκινητές κάθε γονιδίου ξεχωριστά στο οποίο η συγκέντρωση νοηματικού (F) και αντινοηματικού (R) εκκινητή ήταν από 300 nM. Η PCR πραγματοποιείται για όγκο δείγματος 20 μl και για τον λόγο αυτό σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης προστέθηκαν στο master mix 0,6 μl από κάθε εκκινητή της αραιώσης 1/5, που παρασκευάστηκε σε προηγούμενο στάδιο, για κάθε αντίδραση-δείγμα. Ταυτόχρονα προστέθηκαν 10 μl της χρωστικής SYBR®Green για κάθε δείγμα, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα συμπληρώθηκε με νερό. Η χρωστική SYBR®Green διατηρείται σε erpendorf καλυμμένο με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας. Για δοκιμές της αντίδρασης όπου η συγκέντρωση των εκκινητών έπρεπε να είναι 150 nM και 350 nM, τα master mixes παρασκευάστηκαν με προσθήκη 0,3 μl και 0,7 μl αντίστοιχα από κάθε εκκινητή της αραιώσης 1/5 για κάθε αντίδραση-δείγμα. Στο σημείο αυτό τα δείγματα που δοκιμάστηκαν στην PCR ήταν οι 7 διαδοχικές αραιώσεις του pool των δειγμάτων cDNA και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου με νερό. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία κάθε δείγμα παρασκευάστηκε επί 2 φορές, ώστε να ελέγχονται πιθανά δειγματοληπτικά σφάλματα με βάση τις κοινές καμπύλες από την PCR πραγματικού χρόνου. Άρα κάθε master mix για συγκέντρωση εκκινητών 300 nM, 350-300 nM (συνδυασμός συγκεντρώσεων εκκινητών) και 150 nM παρασκευάστηκε σε ποσότητα 2 x 8 (δείγματα) + 3 (επιπλέον) = 19 αντιδράσεων-δειγμάτων σύμφωνα με τους Πίνακες 3-5:

Πίνακας 3: Master mix για συγκέντρωση εκκινητών 300 nM

Συστατικό	Συνολικός όγκος συστατικού (μl)
SYBR®Green	19 x 10 = 190
Εκκινητής F	19 x 0,6 = 11,4
Εκκινητής R	19 x 0,6 = 11,4
Νερό	19 x 8,8 = 167,2

Πίνακας 4: Master mix για συγκέντρωση εκκινητών 350-300 nM

Συστατικό	Συνολικός όγκος συστατικού (μl)
SYBR®Green	19 x 10 = 190
Εκκινητής F	19 x 0,7 = 13,3
Εκκινητής R	19 x 0,6 = 11,4
Νερό	19 x 8,7 = 165,3

Πίνακας 5: Master mix για συγκέντρωση εκκινητών 150 nM

Συστατικό	Συνολικός όγκος συστατικού (μl)
SYBR®Green	19 x 10 = 190
Εκκινητής F	19 x 0,3 = 5,7
Εκκινητής R	19 x 0,3 = 5,7
Νερό	19 x 9,4 = 178,6

- Κάθε master mix φυγοκεντρήθηκε για περίπου 15 sec στις 8000 g.
- Σε erpendorf 0,2 ml προστέθηκαν από 1,5 μl δείγματος της κάθε αραιώσης του pool των cDNA και 18,5 μl του επιθυμητού master mix, ανάλογα με το γονίδιο που έπρεπε να μελετηθεί κάθε φορά. Για τα αρνητικά δείγματα ελέγχου προστέθηκε 1,5 μl νερού αντί δείγματος. Εδώ απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την προσθήκη της ελάχιστης ποσότητας δείγματος, ώστε να είναι σίγουρο πως θα τοποθετηθεί ολόκληρη στον πυθμένα του erpendorf.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 15 sec στις 8000 g, ώστε να απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες.
- Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην ειδική κεφαλή του μηχανήματος Rotor-Gene Q της εταιρείας QIAGEN και με το κατάλληλο πρόγραμμα ενεργοποιήθηκε η διαδικασία της αντίδρασης. Σε αυτό περιλαμβάνονται ένα στάδιο στους 95° C για 10 min, οι 40 κύκλοι της αντίδρασης με καθέναν να χαρακτηρίζεται από 95° C για 30 sec, 61° C για 1 min και 72° C για 1 min και τέλος το στάδιο της καμπύλης αποδιάταξης με 95° C για 1 min, 55° C για 30 sec και 95° C για 30 sec.
- Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής, τα αποτελέσματα της αντίδρασης αποθηκεύτηκαν σε στικάκι για την μετέπειτα ανάλυσή τους, ενώ τα δείγματα απορρίφθηκαν.

Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο για την προστασία των δειγμάτων, ενώ τα συστατικά που παρασκευάστηκαν σε προηγούμενα στάδια φυγοκεντρήθηκαν για λίγα δευτερόλεπτα πριν την χρήση τους. Επιπλέον, μετά την παρασκευή των

master mix και των δειγμάτων για την PCR, όλα τα διαλύματα αναδεύτηκαν καλά με την βοήθεια της πιπέτας, ώστε να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση των συστατικών κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για την μικρή ποσότητα της αντίδρασης (20 μl). Μετά την χρήση τους, όλα τα συστατικά αποθηκεύτηκαν και πάλι στις ανάλογες συνθήκες ψύξης τους για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 13: Το μηχάνημα της qPCR, Rotor-Gene Q.

8. Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου

Υλικά:

- ✓ Δείγματα cDNA
- ✓ Εκκινητές των γονιδίων *ACTB*, *RPS18*, *PRM1* και *PRM2*
- ✓ H₂O
- ✓ Χρωστική SYBR®Green
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Μηχάνημα qPCR Rotor-Gene Q
- ✓ Ηλεκτρονικός υπολογιστής και κατάλληλο λογισμικό

Διαδικασία:

Μετά την επίτευξη των επιθυμητών αποδόσεων για τα 4 γονίδια από συγκεκριμένες συγκεντρώσεις εκκινητών για το καθένα, το πείραμα προχώρησε στο τελικό στάδιο για τον έλεγχο της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων στόχων στα 22 δείγματα cDNA. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Αρχικά, όλα τα δείγματα υπέστησαν αραιώση 1/5 με προσθήκη 6 μl δείγματος από το cDNA και 24 μl καθαρού νερού σε νέα erpendorf (σύνολο 30 μl αραιωμένου cDNA για κάθε δείγμα).
- Όλα τα δείγματα αραιωμένου cDNA αναδεύτηκαν καλά με πιπέτα και φυγοκεντρήθηκαν για 15 sec στις 8000 g.
- Έπειτα, δημιουργήθηκαν master mixes για τα 4 γονίδια σε ποσότητα 50 δειγμάτων για το καθένα (έτσι ώστε να αρκεί και για τα duplicates των δειγμάτων) και με συγκέντρωση εκκινητών αντίστοιχη με αυτήν που έδωσε την επιθυμητή απόδοση για κάθε γονίδιο ξεχωριστά.

- Σε 44 eppendorf του 0,2 ml προστέθηκαν 2 φορές (μία για κάθε duplicate δείγματος) από 1,5 μl κάθε δείγματος αραιώσης 1/5 και 18,5 μl του master mix για το γονίδιο που ήταν να μελετηθεί κάθε φορά. Χρησιμοποιήθηκαν και από 2 αρνητικά δείγματα ελέγχου για κάθε γονίδιο.
- Τα δείγματα που προετοιμάστηκαν για κάθε γονίδιο τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα Rotor Gene Q και ενεργοποιήθηκε η αντίδραση με το κατάλληλο πρόγραμμα. Κατά την διάρκεια αυτής, ήταν δυνατή η παρακολούθηση των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου σε κάθε δείγμα ξεχωριστά.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο, ενώ αναλυτικότερες πληροφορίες για τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην qPCR υπάρχουν στην παράγραφο 7 της μεθοδολογίας.

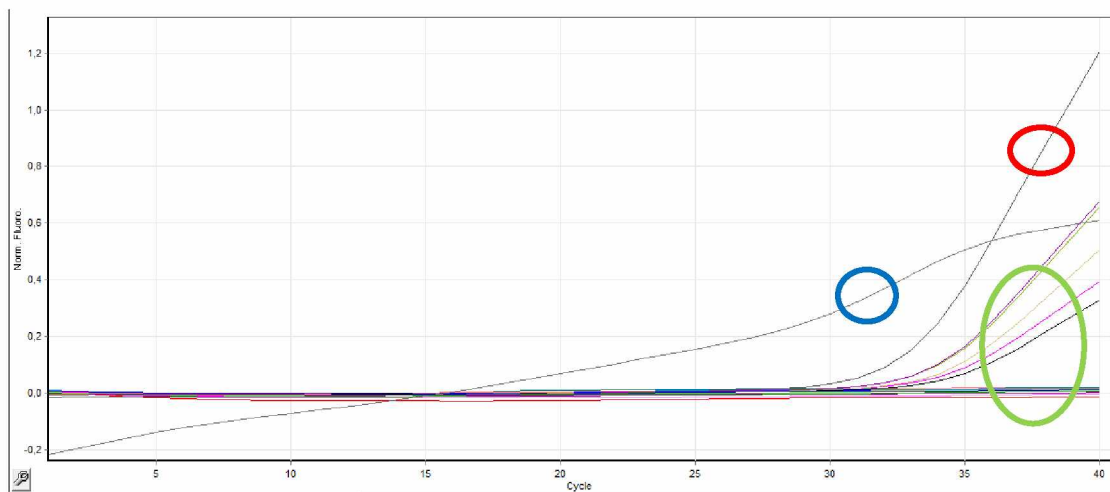
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρών πείραμα, με στόχο τον έλεγχο του τρόπου έκφρασης των γονιδίων *PRM1* και *PRM2* σε δείγματα σπέρματος νορμοσπερμικών ανδρών, πραγματοποιήθηκε επώαση με DNase των δειγμάτων RNA που είχαν απομονωθεί από τα δείγματα σπέρματος, υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA, αντίστροφη μεταγραφή για παραγωγή cDNA και έλεγχος απόδοσης και έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος και των ιδιοσυστατικών γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα των παραπάνω διαδικασιών αναλύονται παρακάτω.

1. Επώαση δειγμάτων RNA με DNase και έλεγχος παρουσίας DNA με PCR πραγματικού χρόνου

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε ένα εμπλουτισμένο πρωτόκολλο επώασης των 22 δειγμάτων RNA από το σπέρμα των νορμοσπερμικών ανδρών με DNase, προκειμένου να κατακερματιστούν όλα τα πιθανά υπολείμματα DNA που είχαν. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της παρουσίας DNA στα δείγματα αυτά με PCR πραγματικού χρόνου, που ενισχύει μόνο προϊόντα DNA και όχι RNA, με χρήση ενός θετικού (DNA) και ενός αρνητικού (νερό) δείγματος ελέγχου.

Στην Εικόνα 14 φαίνονται οι καμπύλες ενίσχυσης για τα δείγματα ελέγχου καθώς και ενδεικτικά για ορισμένα από τα δείγματα RNA που επώαστηκαν με DNase. Ο άξονας x αντιστοιχεί στους 40 κύκλους της αντίδρασης, ενώ ο άξονας y αντιστοιχεί στο σήμα της χρωστικής SYBR®Green που είναι ανάλογο με την ενίσχυση κάθε φορά. Για το θετικό δείγμα ελέγχου που φαίνεται με μπλε χρώμα παρατηρήθηκε αξιόλογη ενίσχυση προϊόντος DNA (περίπου 22^{ος} κύκλος της αντίδρασης) όπως αναμενόταν, ενώ για τα δείγματα που επώαστηκαν με DNase και το αρνητικό δείγμα ελέγχου που φαίνονται με πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα δεν παρατηρήθηκε καθόλου ενίσχυση προϊόντος DNA ή ελάχιστη που δεν κρίθηκε ως αξιοσημείωτη (μετά τον 35^ο κύκλο της αντίδρασης) όπως και αναμενόταν.



Εικόνα 14: Οι καμπύλες ενίσχυσης για το θετικό δείγμα ελέγχου (μπλε), το αρνητικό δείγμα ελέγχου (κόκκινο) και για ορισμένα από τα 22 δείγματα RNA που επώαστηκαν με DNase (πράσινο).

Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα από την PCR πραγματικού χρόνου, τα 22 δείγματα RNA από το σπέρμα των νορμοσπερμικών ανδρών κρίθηκαν ως καθαρά από DNA και ήταν δυνατό να συνεχιστεί το πείραμα. Το επόμενο βήμα ήταν ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του καθαρού από DNA πλέον RNA.

2. Υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων RNA σπέρματος

Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων RNA (καθαρών από DNA) που απομονώθηκε από το σπέρμα των εθελοντών νορμοσπερμικών ανδρών, προέκυψαν οι τιμές που αντιστοιχούν στην συγκέντρωση του RNA στα 22 αυτά δείγματα σπέρματος νορμοσπερμικών ανδρών. Μετά από τους κατάλληλους υπολογισμούς βρέθηκαν οι όγκοι (μl) δείγματος RNA και καθαρού νερού που θα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν κάθε φορά, έτσι ώστε όλα τα δείγματα να είναι διαθέσιμα σε όγκο 10 μl και συνολική ποσότητα 700 ng RNA για την σύνθεση cDNA (τελική συγκέντρωση δειγμάτων RNA 70 ng/μl). Όλες οι τιμές που αναφέρθηκαν παραπάνω παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, μαζί με τον κωδικό για κάθε δείγμα που προέρχεται και από έναν νορμοσπερμικό άνδρα:

Πίνακας 6: Οι τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων RNA από το σπέρμα νορμοσπερμικών ανδρών και οι κωδικοί τους

Αριθμός	Κωδικός	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	Όγκος (μl) για 700 ng RNA	Όγκος (μl) ddH ₂ O
1	38687	73,4	9,54	0,46
2	39325	172,5	4,05	5,95
3	39345	290,9	2,4	7,6
4	39420	187,1	3,75	6,25
5	39444	248,6	2,82	7,18
6	39850	77,7	9	1
7	39873	104,7	6,69	3,31
8	40558	155,9	4,5	5,5
9	13738	165,8	4,22	5,78
10	37561	177	3,95	6,05
11	38787	175,7	3,98	6,02
12	39626	150,7	4,65	5,35
13	40308	201,2	3,48	6,52
14	40108	191,1	3,66	6,34
15	38498	178,5	3,92	6,08
16	40092	108,9	6,42	3,58
17	33612	344,4	2,04	7,96
18	39627	213,2	3,28	6,72
19	39199	213,2	3,28	6,72
20	40462	103,6	6,76	3,24
21	36444	213,7	3,27	6,73
22	37207	229,9	3,05	6,95

3. Έλεγχος δειγμάτων cDNA αραιώσεων από pool και αποδοτικότητας εκκινητών με PCR πραγματικού χρόνου

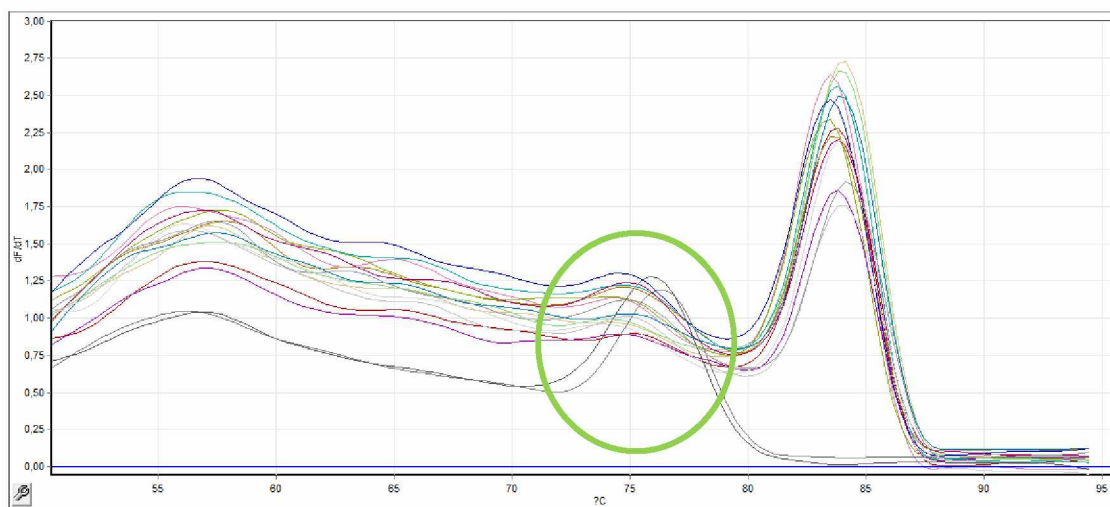
Αφού βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις του RNA από τα 22 δείγματα σπέρματος των νορμοσπερμικών ανδρών και υπέστησαν επεξεργασία αραιώσης ώστε όλα να έχουν τελική συγκέντρωση 70 ng/μl σε τελικό συνολικό όγκο 10 μl, ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή του RNA. Με αυτόν τον τρόπο τα 22 δείγματα RNA μετατράπηκαν σε cDNA, καθώς η PCR πραγματικού χρόνου είναι ικανή να ενισχύσει μόνο DNA και όχι RNA. Έπειτα δημιουργήθηκε το pool των δειγμάτων cDNA που προέκυψαν και από αυτό παρασκευάστηκαν οι 7 διαδοχικές αραιώσεις, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200. Αυτές οι αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως τα δείγματα για την PCR πραγματικού χρόνου προκειμένου να βρεθούν οι αποδόσεις των ιδιοσυστατικών γονιδίων και των γονιδίων ενδιαφέροντος. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών για κάθε γονίδιο, ενώ όλες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (duplicates) για μεγαλύτερη αξιοπιστία του πειράματος. Η εύρεση της απόδοσης των γονιδίων είναι απαραίτητη ώστε να βρεθεί και η συγκέντρωση εκκινητών που χρειάζεται κάθε γονίδιο, προκειμένου να αποδώσει καλύτερα στην αντίδραση.

Αναλυτικότερα, όσο αφορά την συγκέντρωση των εκκινητών, τα 2 ιδιοσυστατικά γονίδια *ACTB* και *RPS18* δοκιμάστηκαν για συγκέντρωση εκκινητών στα 300 nM, το *PRM1* για συγκέντρωση εκκινητών στα 200 nM, 300 nM, 350-300 nM (συνδυασμός συγκεντρώσεων εκκινητών F και R αντίστοιχα) και 350 nM, ενώ το *PRM2* για συγκέντρωση εκκινητών στα 200-150 nM (συνδυασμός συγκεντρώσεων εκκινητών F και R αντίστοιχα), 150 nM, 200 nM και 300 nM.

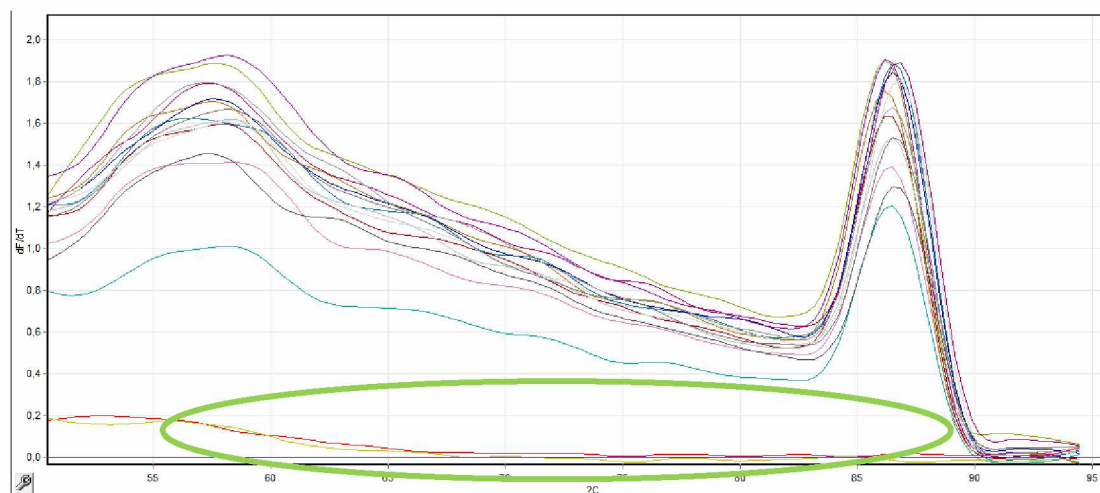
Ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων με πρώτο βήμα να ελεγχθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης των δειγμάτων σε κάθε αντίδραση από τις καμπύλες αποδιάταξης των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου κάθε φορά. Στα διαγράμματα των καμπυλών αποδιάταξης φαίνεται η θερμοκρασία αποδιάταξης στον άξονα χ και το σήμα της χρωστικής SYBR®Green στον άξονα γ. Όλες οι καμπύλες που αντιστοιχούν στα προς μελέτη δείγματα θα πρέπει να εντοπίζονται κοντά στους 85°C, ενώ οι καμπύλες για τα δείγματα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει είτε να βρίσκονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 85°C υποδηλώνοντας απλά την δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, είτε να μην εντοπίζονται καθόλου.

Στις Εικόνες 15 και 16 φαίνονται ενδεικτικά οι καμπύλες αποδιάταξης για τα δείγματα των γονιδίων *RPS18* και *PRM2*. Με πράσινο χρώμα είναι σημειωμένες οι καμπύλες των διπλών δειγμάτων αρνητικού ελέγχου για τα δύο αυτά γονίδια. Όπως φαίνεται, οι καμπύλες αποδιάταξης για τα δείγματα αρνητικού ελέγχου του *RPS18* εντοπίζονται περίπου στους 75°C που σημαίνει ότι απλά δημιουργούν διμερή οι εκκινητές, ενώ για το *PRM2* δεν εντοπίζονται καθόλου οι αντίστοιχες καμπύλες. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι πως δεν υπήρξε καμία επιμόλυνση κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Κάθε άλλη περίπτωση αντίδρασης και για τα άλλα γονίδια (της οποίας οι καμπύλες αποδιάταξης δεν παρουσιάζονται σε εικόνα) έδινε

ένα από τα δύο αυτά πιθανά αποτελέσματα που σημαίνει ότι σε καμία αντίδραση δεν υπήρξε επιμόλυνση των δειγμάτων.



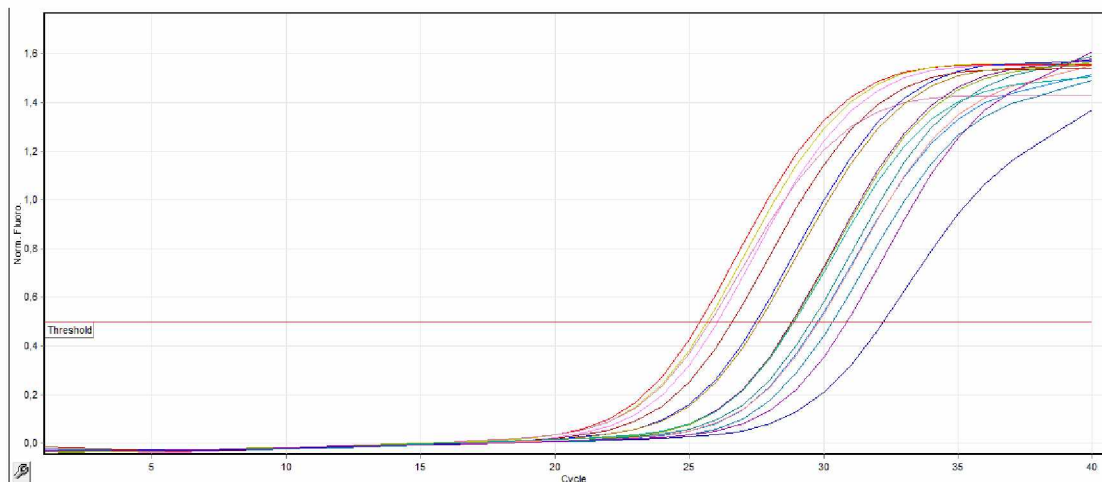
Εικόνα 15: Οι καμπύλες αποδιάταξης για τα δείγματα του γονιδίου RPS18. Με πράσινο φαίνονται οι καμπύλες των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου.



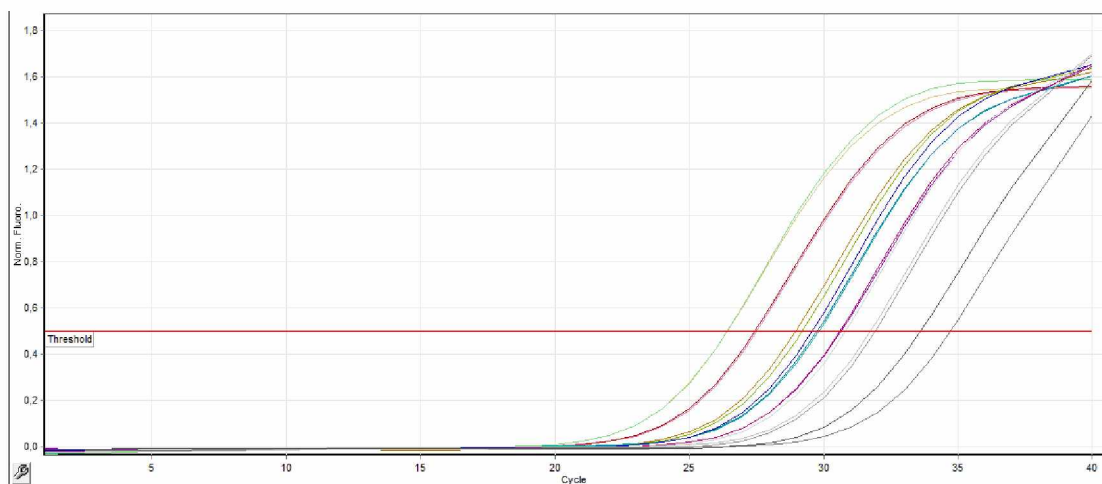
Εικόνα 16: Οι καμπύλες αποδιάταξης για τα δείγματα του γονιδίου PRM2. Με πράσινο φαίνονται οι καμπύλες των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου.

Από την στιγμή που επιβεβαιώθηκε η μη μόλυνση των δειγμάτων για κάθε γονίδιο από τις καμπύλες αποδιάταξης, το επόμενο βήμα ήταν να ληφθούν οι τιμές των κύκλων Ct για κάθε δείγμα διαδοχικής αραιώσης από κάθε γονίδιο (μαζί και των duplicates) από τις καμπύλες ενίσχυσης. Οι τιμές Ct είναι οι κύκλοι που χρειάζεται κάθε δείγμα ώστε να φτάσει σε τόση έκφραση όση αυτή που ορίζεται με ένα κατώφλι. Η έκφραση αυτή στην αντίδραση μεταφράζεται σε ένταση σήματος της χρωστικής SYBR®Green. Στο συγκεκριμένο πείραμα το κατώφλι ορίσθηκε σε 0,5 που αντιστοιχεί σε κάποιο σημείο της εκθετικής φάσης των καμπυλών ενίσχυσης.

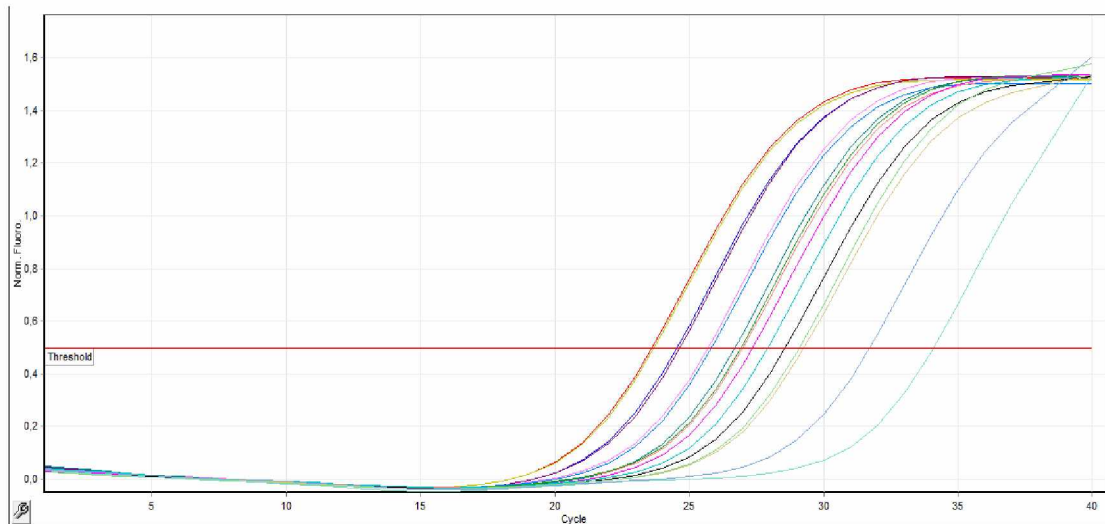
Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο κατώφλι για όλα τα γονίδια προκειμένου να είναι εφικτή η αντικειμενική σύγκριση έκφρασής τους. Στις Εικόνες 17-20 φαίνονται οι καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων διαδοχικών αραιώσεων για τα γονίδια *ACTB*, *RPS18*, *PRM1* και *PRM2*, με βάση τις οποίες και για κατώφλι 0,5 λήφθηκαν οι αντίστοιχες τιμές Ct.



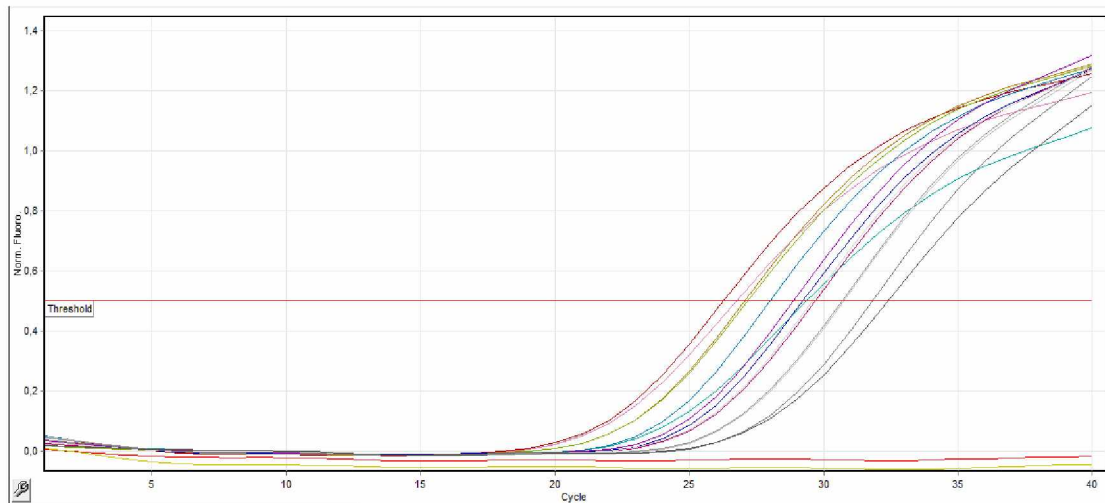
Εικόνα 17: Οι καμπύλες ενίσχυσης για τις διαδοχικές αραιώσεις του γονιδίου *ACTB* (κατώφλι=0,5 / C=300 nM).



Εικόνα 18: Οι καμπύλες ενίσχυσης για τις διαδοχικές αραιώσεις του γονιδίου *RPS18* (κατώφλι=0,5 / C=300 Nm).



Εικόνα 19: Οι καμπύλες ενίσχυσης για τις διαδοχικές αραιώσεις του γονιδίου PRM1 (κατώφλι=0,5 / C=350-300 nM).



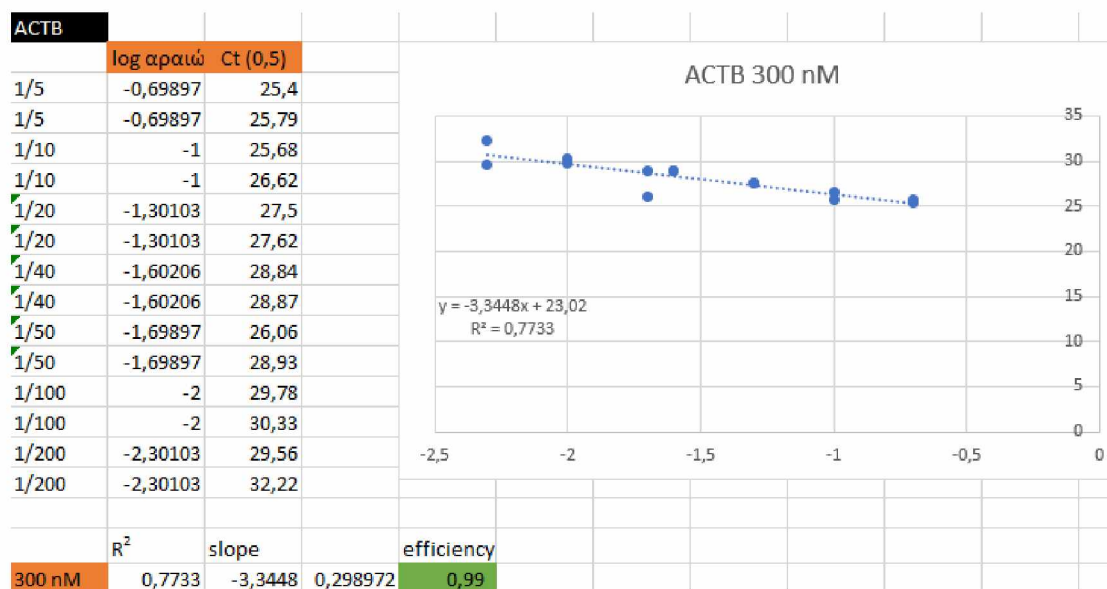
Εικόνα 10: Οι καμπύλες ενίσχυσης για τις διαδοχικές αραιώσεις του γονιδίου PRM2 (κατώφλι=0,5 / C=150 nM).

Με βάση τις τιμές Ct που λήφθηκαν από τις καμπύλες ενίσχυσης των Εικόνων 17-20 κατασκευάστηκαν και οι αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες για την εύρεση των αποδόσεων των 4 γονιδίων με την χρήση του προγράμματος excel. Για τον σκοπό αυτό στην πρώτη στήλη σημειώθηκαν όλες οι διαδοχικές αραιώσεις, στην δεύτερη οι τιμές των λογαρίθμων των διαδοχικών αραιώσεων και στην τρίτη οι τιμές Ct για κατώφλι 0,5 (σε κάθε περίπτωση υπήρχαν και τα αντίστοιχα duplicates). Στην συνέχεια σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη ακριβώς δίπλα από τις στήλες αυτές με την χρήση του γραφήματος διασποράς, ενώ επιλέχθηκε να εμφανιστούν το R^2 και η εξίσωση $y = ax + \beta$. Κάθε φορά η ευθεία της πρότυπης καμπύλης σχεδιάζεται από τα σημεία των λογαρίθμων των 7 διαδοχικών αραιώσεων και των τιμών Ct που αντιστοιχούν σε αυτές τις αραιώσεις. Το R^2 υποδηλώνει το πόσο καλά είναι τα duplicates των δειγμάτων και θα πρέπει να είναι όσο πιο υψηλό γίνεται, ενώ το a

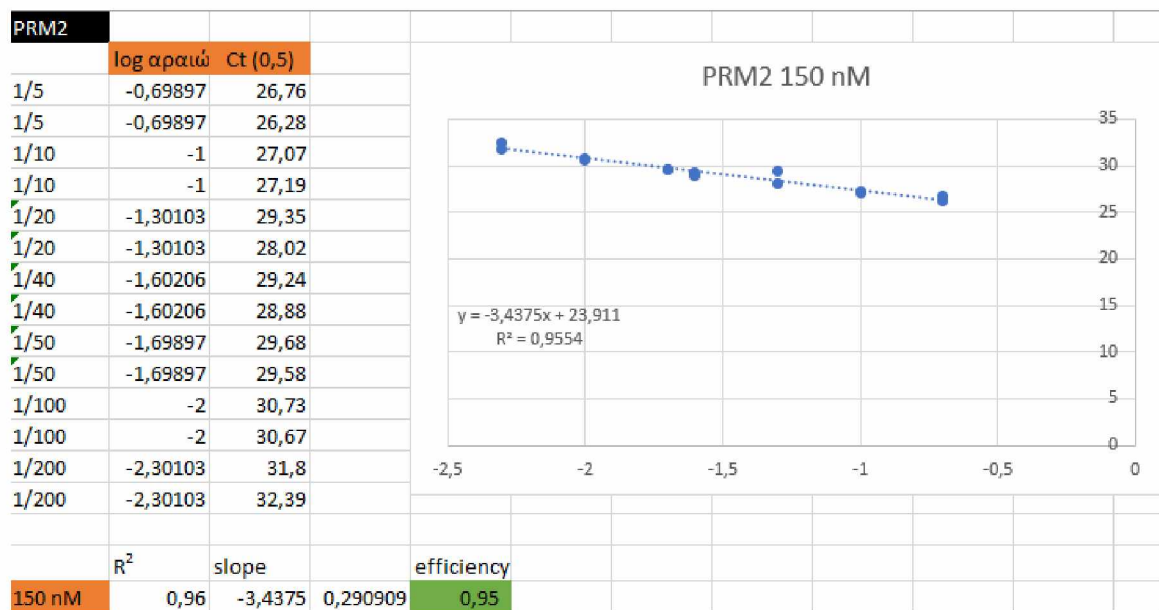
είναι η κλίση της ευθείας. Τέλος, η απόδοση E της PCR πραγματικού χρόνου υπολογίζεται από τον τύπο $Efficiency = 10^{(-1/slope)} - 1$, όπου slope είναι η κλίση της ευθείας (α), και η οποία απόδοση θεωρείται ιδιαίτερα αποδεκτή για τιμές μεταξύ 0,95-1,05.

Στις Εικόνες 21-24 παρουσιάζονται αναλυτικά οι πληροφορίες που αντιστοιχούν στην κατάλληλη και επιθυμητή απόδοση για τα 4 γονίδια (1^η στήλη: διαδοχικές αραιώσεις, 2^η στήλη: λογάριθμος διαδοχικών αραιώσεων, 3^η στήλη: τιμές Ct για κατώφλι=0,5, στα δεξιά φαίνεται η ευθεία της πρότυπης καμπύλης για κάθε γονίδιο με τον άξονα x να είναι οι τιμές της 2^{ης} στήλης και τον y οι τιμές της 3^{ης} στήλης, κάτω από την ευθεία παρουσιάζονται η εξίσωση $y = \alpha x + \beta$ και το R^2 , ενώ μεταξύ των κελιών slope-efficiency δίνεται η τιμή $-1/slope$).

Αναλυτικότερα, το γονίδιο ACTB έδωσε $R^2 = 0,7733$ (η τιμή αν και σχετικά μέτρια έγινε αποδεκτή λόγω των πολλαπλών σημείων της ευθείας), κλίση = -3,3448 και E = 0,99 σε συγκέντρωση εκκινητών 300 nM, το γονίδιο RPS18 έδωσε $R^2 = 0,9661$, κλίση = -3,3 και E = 1,01 σε συγκέντρωση εκκινητών 300 nM, το γονίδιο PRM1 έδωσε $R^2 = 0,994$, κλίση = -3,4622 και E = 0,94 σε συγκέντρωση εκκινητών 350-300 nM (F και R αντίστοιχα) και το γονίδιο PRM2 έδωσε $R^2 = 0,9554$, κλίση = -3,4375 και E = 0,95 σε συγκέντρωση εκκινητών 150 nM. Όλα ήταν για κατώφλι 0,5.



Εικόνα 21: Οι τιμές Ct, R^2 , κλίσης, E και συγκέντρωσης εκκινητών για το γονίδιο ACTB.



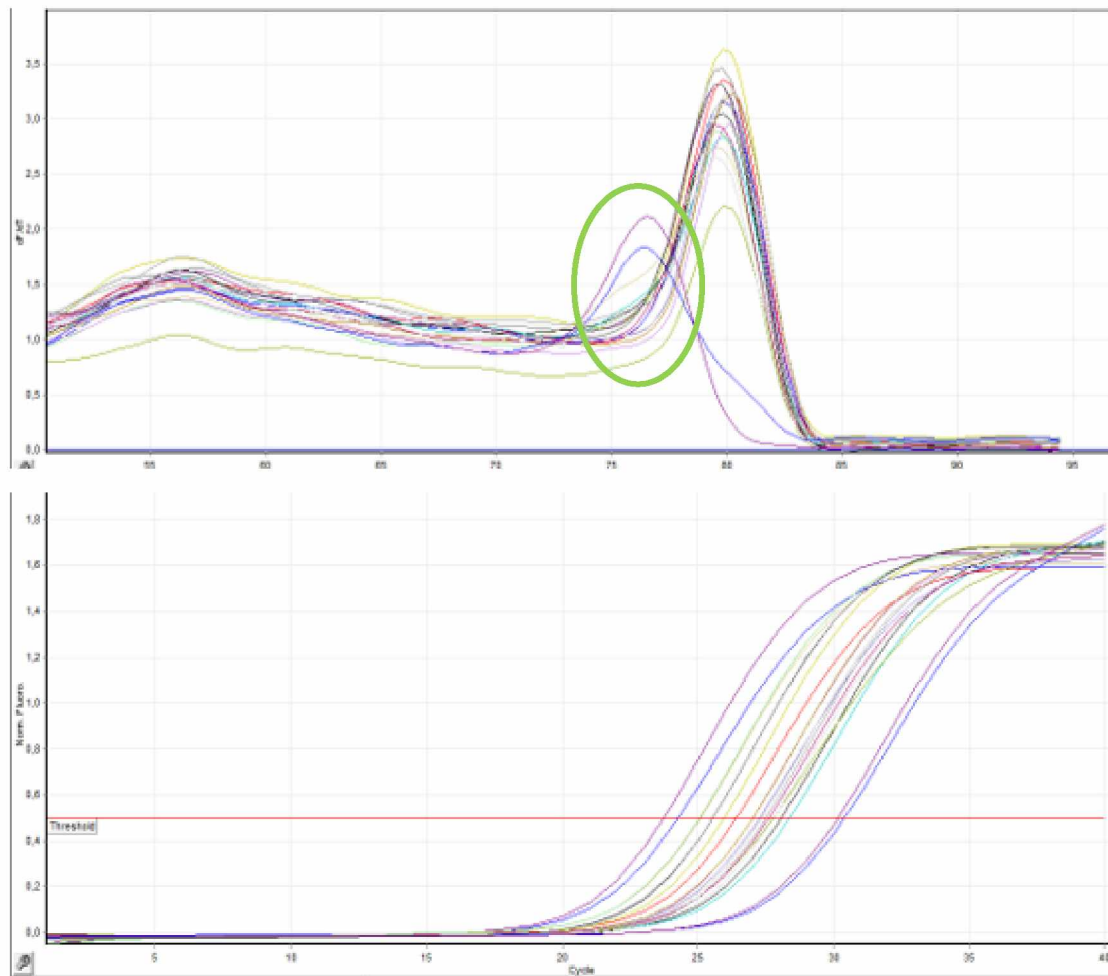
Εικόνα 24: Οι τιμές Ct, R², κλίσης, E και συγκέντρωσης εκκινητών για το γονίδιο PRM2.

Με την εύρεση της επιθυμητής απόδοσης για κάθε γονίδιο και την συγκέντρωση εκκινητών που αντιστοιχεί σε αυτήν και θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί, ήταν δυνατή η συνέχεια του πειράματος που περιλαμβάνει τον έλεγχο έκφρασης κάθε δείγματος cDNA ξεχωριστά για κάθε γονίδιο και στην κατάλληλη συγκέντρωση εκκινητών με PCR πραγματικού χρόνου.

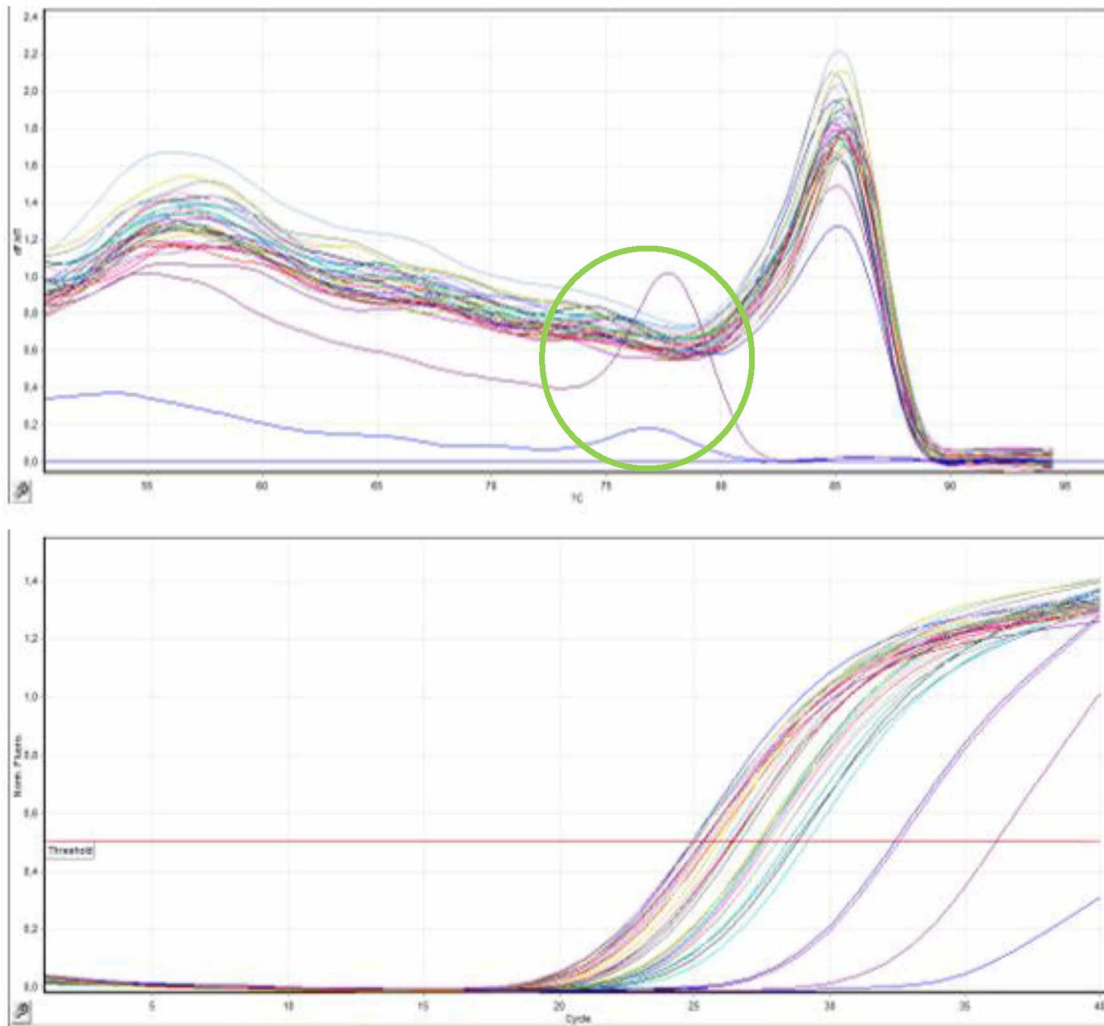
4. Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου

Το πρώτο στάδιο για αυτό το βήμα του πειράματος ήταν η αραίωση των μεμονωμένων δειγμάτων cDNA και η PCR πραγματικού χρόνου κάθε αραιωμένου δείγματος για κάθε γονίδιο στην συγκέντρωση εκκινητών που είχε προσδιοριστεί σύμφωνα με το προηγούμενο βήμα. Η αραίωση που επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί στα δείγματα cDNA ήταν η 1/5, ενώ σε κάθε περίπτωση το κάθε δείγμα προετοιμάστηκε για την αντίδραση εις διπλούν (duplicates). Στο τέλος αυτής της διαδικασίας τα 22 δείγματα μαζί με το αρνητικό δείγμα ελέγχου (και τα duplicates) έδωσαν για κάθε γονίδιο ξεχωριστά τις καμπύλες αποδιάταξης και ενίσχυσης. Σύμφωνα με τις καμπύλες αποδιάταξης και τα αρνητικά δείγματα ελέγχου έγινε και πάλι ο έλεγχος για πιθανές επιμολύνσεις των δειγμάτων, ενώ από τις καμπύλες ενίσχυσης λήφθηκαν οι τιμές Ct για τα 22 δείγματα για κάθε γονίδιο ξεχωριστά.

Στις Εικόνες 25 και 26 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες αποδιάταξης και ενίσχυσης (για κατώφλι 0,5) για κάποια από τα δείγματα cDNA αραίωσης 1/5 στα γονίδια *ACTB* και *PRM1*. Με πράσινο φαίνονται οι καμπύλες αποδιάταξης των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου.



Εικόνα 25: Επάνω είναι οι καμπύλες αποδιάταξης και κάτω οι καμπύλες ενίσχυσης (κατώφλι 0,5) για ορισμένα από τα δείγματα στο γονίδιο ACTB και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM. Με πράσινο φαίνονται οι καμπύλες αποδιάταξης για τα αρνητικά δείγματα ελέγχου που υποδεικνύουν την απουσία πιθανής επιμόλυνσης (βρίσκονται κάτω από τους 85° C).



Εικόνα 26: Επάνω είναι οι καμπύλες αποδιάταξης και κάτω οι καμπύλες ενίσχυσης (κατώφλι 0,5) για ορισμένα από τα δείγματα στο γονίδιο PRM1 και συγκέντρωση εκκινητών 350-300 nM (F και R αντίστοιχα). Με πράσινο φαίνονται οι καμπύλες αποδιάταξης για τα αρνητικά δείγματα ελέγχου που υποδεικνύουν την απουσία πιθανής επιμόλυνσης (βρίσκονται κάτω από τους 85°C).

Σε κάθε άλλη αντίδραση των δειγμάτων cDNA αραιώσης 1/5 για οποιοδήποτε γονίδιο (οι αντίστοιχες καμπύλες δεν παρουσιάζονται), οι καμπύλες αποδιάταξης έδιναν παρόμοιο αποτέλεσμα με τις παραπάνω που σημαίνει ότι δεν υπήρξε καμία επιμόλυνση των δειγμάτων και ήταν δυνατή η λήψη των τιμών Ct από τις αντίστοιχες καμπύλες ενίσχυσης για κατώφλι 0,5.

Οπότε, τελικά, για κάθε δείγμα cDNA αραιώσης 1/5 που υποβλήθηκε στην PCR πραγματικού χρόνου κάθε γονίδιο στην συγκέντρωση εκκινητών που είχε προσδιοριστεί, προέκυψαν 2 τιμές Ct. Μετά την επαλήθευση ότι οι τιμές αυτές δεν υπερβαίνουν τον 0,5 κύκλο μεταξύ τους (ώστε να είναι αντικειμενικά τα αποτελέσματα των αντιδράσεων), υπολογίστηκε η μέση τιμή Ct (Πίνακας 7) για κάθε δείγμα σε κάθε γονίδιο, το οποίο και αντιπροσωπεύει τον κύκλο στον οποίο η έκφραση του γονιδίου στο συγκεκριμένο δείγμα φτάνει το κατώφλι το οποίο είχε οριστεί, δηλαδή το 0,5.

Πίνακας 7: Οι τιμές των μέσων τιμών Ct για τα 4 γονίδια σε κάθε δείγμα.

Δείγμα	<i>ACTB</i> (300 nM)	<i>RPS18</i> (300 nM)	<i>PRM1</i> (350-300 nM)	<i>PRM2</i> (150 nM)
1	26,21	26,07	25,645	26,32
2	24,015	23,945	25,09	25,315
3	28,465	28,785	27,67	27,065
4	27,83	30,455	27,615	26,03
5	28,135	28,39	24,94	24,395
6	28,25	29,705	28,99	27,135
7	25,09	27,42	25,035	26,56
8	29,035	29,055	26,315	24,28
9	27,16	27,095	25,43	24,335
10	29,265	29,95	25,305	24,39
11	27,415	27,81	27,39	26,32
12	29,47	30,29	28,57	26,67
13	27,465	29,725	32,46	29,975
14	27,72	28,04	26,28	27,2
15	27,43	28,025	28,035	27,69
16	25,56	26,01	26,56	26,285
17	26,515	29,465	26,125	25,4
18	28,77	29,44	24,075	25,145
19	26,335	26,845	27,76	27,145
20	24,64	29,405	25,335	26,805
21	29,6	30,99	28,015	28,865
22	26,38	30,275	27,595	26,43

Το επόμενο βήμα ήταν η μετατροπή των αποτελεσμάτων αυτών στην κατάλληλη μορφή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου ενδιαφέροντος σε κάθε δείγμα σε σχέση με τα ιδιοσυστατικά γονίδια. Αρχικά, από τις μέσες τιμές Ct που προέκυψαν από κάθε δείγμα υπολογίστηκε το R_0 (Πίνακας 8) που αντιστοιχεί στα επίπεδα του αρχικού φθορισμού, τα οποία και αναλογούν στα αρχικά επίπεδα mRNA. Το R_0 υπολογίζεται από τον τύπο $R_0 = R_{Ct} / (E+1)^{Ct}$, όπου:

R_{Ct} είναι τα επίπεδα φθορισμού που αντιστοιχούν στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μέχρι αυτά να φτάσουν στο κατώφλι που ορίστηκε, δηλαδή $R_{Ct} = 0,5$. Για λόγους ευκολίας στον τύπο χρησιμοποιήθηκε η τιμή 500 έναντι της 0,5.

E είναι η απόδοση (efficiency) του κάθε γονιδίου (υπενθυμίζεται πως οι αποδόσεις των 4 γονιδίων είναι 0,99 (*ACTB*), 1,01 (*RPS18*), 0,94 (*PRM1*) και 0,95 (*PRM2*)) και

Ct είναι οι μέσες τιμές Ct που βρέθηκαν για κάθε δείγμα σε κάθε γονίδιο (Πίνακας 7).

Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο παράγοντας κανονικοποίησης (NF) από τα δύο ιδιοσυστατικά γονίδια για κάθε δείγμα σύμφωνα με τον τύπο $NF = (R_{0(ACTB)} + R_{0(RPS18)}) / 2$. Έπειτα η κάθε τιμή R_0 για τα δύο γονίδια ενδιαφέροντος διαιρέθηκε με το NF, ενώ

βρέθηκε και η τιμή του λόγου $PRM1/PRM2$ για κάθε δείγμα που σύμφωνα με την θεωρία σε νορμοσπερμικούς άνδρες θα πρέπει να είναι περίπου 1 (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Όλες οι τιμές R_0 των 4 γονιδίων, οι τιμές NF, οι τιμές των R_0 των γονιδίων ενδιαφέροντος προς το αντίστοιχο NF ($PRM1/NF$, $PRM2/NF$) και οι τιμές $PRM1/PRM2$.

Sample	ACTB (R0)	RPS18 (R0)	NF	PRM1 (R0)	PRM1/NF	PRM2 (R0)	PRM2/NF	PRM1/PRM2
1	0,0000073	0,0000063	0,0000068	1,958E-05	2,889	1,103E-05	1,627	1,776
2	0,0000331	0,0000277	0,0000303	2,833E-05	0,935	2,162E-05	0,714	1,311
3	0,0000015	0,0000009	0,0000012	5,094E-06	4,210	6,694E-06	5,533	0,761
4	0,0000024	0,0000003	0,0000008	5,284E-06	6,285	1,339E-05	15,928	0,395
5	0,0000019	0,0000012	0,0000016	3,13E-05	20,120	4,003E-05	25,734	0,782
6	0,0000018	0,0000005	0,0000009	2,117E-06	2,240	6,388E-06	6,759	0,331
7	0,0000158	0,0000025	0,0000062	2,938E-05	4,721	9,389E-06	1,509	3,130
8	0,0000010	0,0000008	0,0000009	1,254E-05	13,861	4,324E-05	47,780	0,290
9	0,0000038	0,0000031	0,0000034	2,26E-05	6,609	4,167E-05	12,190	0,542
10	0,0000009	0,0000004	0,0000006	2,455E-05	40,132	4,017E-05	65,649	0,611
11	0,0000032	0,0000019	0,0000024	6,136E-06	2,515	1,103E-05	4,519	0,557
12	0,0000008	0,0000003	0,0000005	2,8E-06	5,529	8,722E-06	17,224	0,321
13	0,0000031	0,0000005	0,0000012	2,106E-07	0,171	9,532E-07	0,775	0,221
14	0,0000026	0,0000016	0,0000020	1,284E-05	6,332	6,115E-06	3,016	2,099
15	0,0000032	0,0000016	0,0000023	3,996E-06	1,774	4,404E-06	1,956	0,907
16	0,0000114	0,0000066	0,0000087	1,066E-05	1,231	1,129E-05	1,304	0,944
17	0,0000059	0,0000006	0,0000019	1,423E-05	7,622	2,042E-05	10,936	0,697
18	0,0000013	0,0000006	0,0000009	5,564E-05	64,192	2,422E-05	27,947	2,297
19	0,0000067	0,0000037	0,0000050	4,798E-06	0,968	6,345E-06	1,280	0,756
20	0,0000215	0,0000006	0,0000036	2,407E-05	6,621	7,968E-06	2,192	3,021
21	0,0000007	0,0000002	0,0000004	4,049E-06	10,676	2,005E-06	5,286	2,020
22	6,492E-06	3,3492E-07	0,0000015	5,354E-06	3,631	1,024E-05	6,947	0,523

Γενικά, φαίνεται πως τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων ενδιαφέροντος, PRM1 και PRM2, καθώς και η τιμή του μεταξύ τους λόγου (Πίνακας 8) παρουσιάζουν έντονη διακύμανση ανάμεσα στους συγκεκριμένους 22 νορμοσπερμικούς άνδρες. Παρόμοια έντονη διακύμανση παρουσιάζουν και οι τιμές των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος αυτών των ανδρών (Πίνακας 9) και για τον λόγο αυτό έγινε προσπάθεια ελέγχου συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με τα χαρακτηριστικά αυτά.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση συσχέτισης των αποτελεσμάτων ήταν το IBM SPSS Statistics 26. Σε μια προσπάθεια ελέγχου και σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson, οι τιμές $PRM1/NF$ και $PRM2/NF$ (3^η και 5^η στήλη αντίστοιχα) επεξεργάστηκαν περαιτέρω και βρέθηκε η τετραγωνική τους ρίζα (4^η και 6^η στήλη αντίστοιχα) που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης. Δίπλα από τις τιμές αυτές για κάθε δείγμα παρουσιάζονται και οι τιμές των χαρακτηριστικών των 22 δειγμάτων που είναι ο αριθμός σπερματοζωαρίων/ml, το ποσοστό κινητικότητας και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Πίνακας 9).

Για υπόθεση $\chi=0$, οι τιμές για κάθε μεταβλητή του Πίνακα 9 και οι τιμές του λόγου $PRM1/PRM2$ από τον Πίνακα 8 ακολουθούν κανονική κατανομή. Αυτό σημαίνει ότι

αν $r_{\text{value}} < 0,05$ για κάποια μεταβλητή στην ανάλυση για έλεγχο κανονικής κατανομής, τότε αυτή η μεταβλητή δεν ακολουθεί κανονική κατανομή. Σύμφωνα με τον Πίνακα 10, οι τιμές r_{value} για τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε οποιαδήποτε μορφή είναι μικρότερες του 0,05. Πιο συγκεκριμένα το r_{value} για τις τιμές έκφρασης του *PRM1* είναι 0 και 0,003 για τετραγωνική ρίζα, για το *PRM2* είναι 0,001 και 0,047 για τετραγωνική ρίζα, ενώ για τον λόγο *PRM1/PRM2* είναι 0,001 (σημειωμένα με κόκκινο). Αυτό σημαίνει ότι οι μεταβλητές αυτές δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, όπως θα έπρεπε προκειμένου να εφαρμοστεί ο συντελεστής συσχέτισης Pearson. Για τον λόγο αυτό απορρίφθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος στατιστικής ανάλυσης συσχέτισης των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 9: Οι κωδικοί των 22 δειγμάτων, οι τιμές *PRM1/NF* και *PRM2/NF* (3^η και 5^η στήλη αντίστοιχα) μαζί με την τετραγωνική τους ρίζα (4^η και 6^η στήλη αντίστοιχα) και τα χαρακτηριστικά του σπέρματος των δειγμάτων (αριθμός, κινητικότητα, μορφολογία).

Sample	CODE	PRM1/NF		PRM2/NF		NUMBER	MOTILITY	MORPH.
1	38687	2,889	1,700	1,627	1,275	20,5	73	7
2	39325	0,935	0,967	0,714	0,845	36	47	7
3	39345	4,210	2,052	5,533	2,352	25	61	5
4	39420	6,285	2,507	15,928	3,991	27,9	51	5
5	39444	20,120	4,486	25,734	5,073	24	76	9
6	39850	2,240	1,497	6,759	2,600	15,3	54	8
7	39873	4,721	2,173	1,509	1,228	15,5	56	9
8	40558	13,861	3,723	47,780	6,912	25	59	7
9	13738	6,609	2,571	12,190	3,491	17	70	6
10	37561	40,132	6,335	65,649	8,102	49,5	61	11
11	38787	2,515	1,586	4,519	2,126	45,5	43	4
12	39626	5,529	2,351	17,224	4,150	20	50	9
13	40308	0,171	0,414	0,775	0,880	51,7	57	5
14	40108	6,332	2,516	3,016	1,737	41	53	6
15	38498	1,774	1,332	1,956	1,398	28	62	11
16	40092	1,231	1,109	1,304	1,142	34	72	8
17	33612	7,622	2,761	10,936	3,307	45,2	64	4
18	39627	64,192	8,012	27,947	5,286	52,5	47	12
19	39199	0,968	0,984	1,280	1,132	26	60	12
20	40462	6,621	2,573	2,192	1,480	32	40	8
21	36444	10,676	3,267	5,286	2,299	51,5	71	10
22	37207	3,631	1,906	6,947	2,636	50	74	8

Πίνακας 10: Οι τιμές rvalue (κόκκινο) για τις μεταβλητές έκφρασης των γονιδίων και των ποιοτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων σπέρματος.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PRM1Expres sion	PRM1Expres sionRiza	PRM2Expres sion	PRM2Expres sionRiza
N		22	22	22	22
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9,6938	2,5828	12,1275	2,8837
	Std. Deviation	14,97606	1,77963	16,64603	1,99804
Most Extreme Differences	Absolute	,328	,233	,259	,186
	Positive	,328	,233	,259	,186
	Negative	-,262	-,136	-,246	-,154
Test Statistic		,328	,233	,259	,186
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,003 ^c	,001 ^c	,047 ^c

		GeneRatio	Number	Motility	Morphology
N		22	22	22	22
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1,1042	33,3227	59,1364	7,7727
	Std. Deviation	,88506	12,94869	10,48943	2,44816
Most Extreme Differences	Absolute	,254	,159	,123	,099
	Positive	,254	,159	,074	,099
	Negative	-,159	-,139	-,123	-,088
Test Statistic		,254	,159	,123	,099
Asymp. Sig. (2-tailed)		,001 ^c	,151 ^c	,200 ^{c,d}	,200 ^{c,d}

Τελικά, αξιοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman για τον οποίο δεν είναι απαραίτητο οι τιμές των μεταβλητών να ακολουθούν κανονική κατανομή. Για αυτήν την μέθοδο συγκρίθηκαν οι τιμές έκφρασης των γονιδίων *PRM1* και *PRM2*, πριν την μετατροπή τους σε ρίζα (στήλες 6 και 8 αντίστοιχα από Πίνακα 8), και οι τιμές από τον λόγο *PRM1/PRM2* (στήλη 9 από Πίνακα 8) με τις τιμές από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος (Πίνακας 9), έτσι ώστε να βρεθεί εάν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ αυτών των μεταβλητών. Για να υπάρξει θετική ή αρνητική συσχέτιση μεταξύ δύο μεταβλητών θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης να είναι όσο πιο κοντά στην τιμή +1 ή -1 αντίστοιχα, ενώ όσο πιο κοντά στο 0 είναι τόσο μικρότερη συσχέτιση θα έχουν οι δύο μεταβλητές.

Στους Πίνακες 11-13 παρουσιάζονται οι συντελεστές συσχέτισης Spearman (κόκκινο) των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PRM1*, *PRM2* και του μεταξύ τους λόγου σε σχέση με τις τιμές του αριθμού/ml, της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων για τα 22 δείγματα των νορμοσπερμικών ανδρών. Αναλυτικότερα, η έκφραση του γονιδίου *PRM1* έχει συντελεστές συσχέτισης 0,099 για τον αριθμό, 0,059 για την κινητικότητα και 0,189 για την μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Η έκφραση του γονιδίου *PRM2* έχει συντελεστές συσχέτισης -0,034 για τον αριθμό, 0,073 για την κινητικότητα και 0,096 για την μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Τέλος, ο λόγος *PRM1/PRM2* έχει συντελεστές συσχέτισης 0,103 για τον αριθμό, -0,046 για την κινητικότητα και 0,336 για την μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Πίνακας 11: Οι συντελεστές συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PRM1* σε σχέση με τον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Correlations

			PRM1Expression	Number
Spearman's rho	PRM1Expression	Correlation Coefficient	1,000	,099
		Sig. (2-tailed)	.	,660
		N	22	22
			PRM1Expression	Motility
Spearman's rho	PRM1Expression	Correlation Coefficient	1,000	,059
		Sig. (2-tailed)	.	,795
		N	22	22
			PRM1Expression	Morphology
Spearman's rho	PRM1Expression	Correlation Coefficient	1,000	,189
		Sig. (2-tailed)	.	,400
		N	22	22

Πίνακας 12: Οι συντελεστές συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PRM2* σε σχέση με τον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Correlations

			PRM2Expression	Number
Spearman's rho	PRM2Expression	Correlation Coefficient	1,000	-,034
		Sig. (2-tailed)	.	,881
		N	22	22
			PRM2Expression	Motility
Spearman's rho	PRM2Expression	Correlation Coefficient	1,000	,073
		Sig. (2-tailed)	.	,745
		N	22	22
			PRM2Expression	Morphology
Spearman's rho	PRM2Expression	Correlation Coefficient	1,000	,096
		Sig. (2-tailed)	.	,672
		N	22	22

Πίνακας 13: Οι συντελεστές συσχέτισης του λόγου *PRM1/PRM2* σε σχέση με τον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Correlations

			GeneRatio	Number
Spearman's rho	GeneRatio	Correlation Coefficient	1,000	,103
		Sig. (2-tailed)	.	,647
		N	22	22
			GeneRatio	Motility
Spearman's rho	GeneRatio	Correlation Coefficient	1,000	-,046
		Sig. (2-tailed)	.	,838
		N	22	22
			GeneRatio	Morphology
Spearman's rho	GeneRatio	Correlation Coefficient	1,000	,336
		Sig. (2-tailed)	.	,126
		N	22	22

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PRM1* και *PRM2* με τον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυτών των μεταβλητών, καθώς όλοι οι συντελεστές βρέθηκαν να είναι πιο κοντά στην τιμή 0 παρά στην τιμή 1.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, με την ολοκλήρωση του συγκεκριμένου πειράματος έχουν προκύψει τρία βασικά συμπεράσματα τα οποία θα μπορούσαν να διευκολύνουν στο μέλλον την διαδικασία άλλων πειραμάτων που στοχεύουν στην μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας και όχι μόνο.

Το πρώτο συμπέρασμα είναι πως πιθανότατα η διαδικασία της απομόνωσης του RNA από το σπέρμα των νορμοσπερμικών ανδρών δεν ήταν απόλυτα επιτυχής, καθώς τα δείγματα περιείχαν και πρόσμιξη γονιδιωματικού DNA κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό. Αυτό είναι δυνατόν να οφείλεται σε αδυναμία του σταδίου επώασης με DNase που είναι ενσωματωμένο στο πρωτόκολλο της απομόνωσης RNA και για τον λόγο αυτό θα ήταν καλό να ελεγχθεί η αποδοτικότητά του. Ωστόσο, το επιπλέον και εμπλουτισμένο πρωτόκολλο επώασης με DNase που ακολουθήθηκε στο παρών πείραμα, ήταν ικανό να απομακρύνει κάθε ίχνος γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA επιτρέποντας την μετέπειτα διαχείρισή τους. Οπότε, εναλλακτικά, προτείνεται η απευθείας εμπλουτισμένη επώαση των δειγμάτων RNA με DNase για απαλλαγή από το DNA, για οποιοδήποτε πείραμα.

Το δεύτερο συμπέρασμα είναι πως έγινε επιτυχής σχεδιασμός εκκινητών για τα ιδιοσυστατικά γονίδια *ACTB* και *RPS18*, καθώς και για τα γονίδια ενδιαφέροντος *PRM1* και *PRM2*. Αυτά τα ζεύγη εκκινητών (Εικόνες 7-10) είναι ικανά να ενισχύσουν αποτελεσματικά τα προϊόντα κατά την PCR πραγματικού χρόνου. Επίσης, μέσω αυτών των εκκινητών, έγινε και επιτυχής κανονικοποίηση των γονιδίων ενδιαφέροντος σε σχέση με τα ιδιοσυστατικά γονίδια. Όλα αυτά υποδεικνύουν την αποτελεσματική λειτουργία των συγκεκριμένων ζευγών εκκινητών για τα γονίδια αυτά, οι οποίοι και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω.

Τέλος, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων γνωστοποιήθηκε ότι τα δύο γονίδια των πρωταμινών παρουσιάζουν αρκετά έντονες διαφορές και διακυμάνσεις κατά την έκφρασή τους ανάμεσα στα 22 δείγματα των νορμοσπερμικών ανδρών. Παρόμοιες διακυμάνσεις είχαν και οι τιμές των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος (αριθμός, κινητικότητα και μορφολογία σπερματοζωαρίων) και για τον λόγο αυτό έγινε ανάλυση συσχέτισης μεταξύ όλων αυτών των τιμών. Μετά από την ανάλυση συσχέτισης δεν παρατηρήθηκαν θετικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των δύο πρωταμινών και του λόγου τους με τις παραμέτρους από το σπερμοδιάγραμμα, κάτι το οποίο θα μπορούσε να είναι ενδεικτικό και για μεγαλύτερης κλίμακας πείραμα με περισσότερα δείγματα. Ωστόσο, σίγουρα, πιο τεκμηριωμένα και ακριβή αποτελέσματα είναι δυνατόν να προκύψουν από αντίστοιχη ανάλυση η οποία να περιλαμβάνει μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και πιθανότατα πιο ακραίες τιμές παραμέτρων σπερμοδιαγράμματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2020). *Genetics of Male Infertility: A Case-Based Guide for Clinicians*.
- Arshad, M. A., Majzoub, A., & Esteves, S. C. (2020). Predictors of surgical sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: summary of current literature. *International Urology and Nephrology*, 52(11), 2015–2038. <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02529-4>
- Aston, K. I., & Carrell, D. T. (2009). Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *Journal of Andrology*, 30(6), 711–725. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007971>
- Aston, K. I., Krausz, C., Laface, I., Ruiz-Castané, E., & Carrell, D. T. (2010). Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Human Reproduction*, 25(6), 1383–1397. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq081>
- Aydos, O. S. E., Hekmatshoar, Y., Altlnok, B., Özkan, T., Şakirağaoğlu, O., Karadağ, A., Kaplan, F., Ilgaz, S., Taşplnar, M., Yükselen, I., Sunguroğlu, A., & Aydos, K. (2018). Genetic Polymorphisms in PRM1, PRM2, and YBX2 Genes are Associated with Male Factor Infertility. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 22(1), 55–61. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0040>
- Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., & Khodadadian, A. (2020). Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. *International Journal of General Medicine*, 13, 29–41. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S241099>
- Beurois, J., Cazin, C., Kherraf, Z. E., Martinez, G., Celse, T., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P. F., & Coutton, C. (2020). Genetics of teratozoospermia: Back to the head. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 34(6). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101473>
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioi, L. M., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2020). Molecular biology of spermatogenesis: Novel targets of apparently idiopathic male infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051728>
- Cerván-Martín, Castilla, Palomino-Morales, & Carmona. (2020). Genetic Landscape of Nonobstructive Azoospermia and New Perspectives for the Clinic. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 300. <https://doi.org/10.3390/jcm9020300>
- Daneshmandpour, Y., Bahmanpour, Z., Hamzeiy, H., Mazaheri Moghaddam, M., Mazaheri Moghaddam, M., Khademi, B., & Sakhinia, E. (2020). MicroRNAs association with azoospermia, oligospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia: a systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and*

- Genetics*, 37(4), 763–775. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01674-9>
- Dunleavy, J. E. M., O'Bryan, M. K., Stanton, P. G., & O'Donnell, L. (2019). The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction*, 157(2), R53–R72. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0457>
- Gatta, V., Raicu, F., Ferlin, A., Antonucci, I., Scioletti, A. P., Garolla, A., Palka, G., Foresta, C., & Stuppia, L. (2010). Testis transcriptome analysis in male infertility: New insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-401>
- Govindkumar, B., Kavyashree, B., Bajpai, A. K., Davuluri, S., Shruthi, K., Vasani, S., Madhusudhan, M., Chandrasekhar Darshan, S., Neelima, C., Vashishtkumar, B., Sailaja, O., & Acharya Kshitish, K. (2019). *Listing candidate diagnostic markers and transcriptomic exploration of the molecular basis of a type of male infertility (Non-Obstructive Azoospermia), via next generation sequencing methods*. 1–19. <https://doi.org/10.1101/778670>
- Gunes, S., & Esteves, S. C. (2021). Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia*, 53(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/and.13586>
- Hamad, M. F. (2019). Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. *Reproductive Biology*, 19(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.03.001>
- Hamad, M., Shelko, N., Montenarh, M., & Hammadeh, M. E. (2019). The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. *Human Fertility*, 22(2), 104–110. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1382733>
- He, H., Yu, F., Shen, W., Chen, K., Zhang, L., Lou, S., Zhang, Q., Chen, S., Yuan, X., Jia, X., & Zhou, Y. (2021). The Novel Key Genes of Non-obstructive Azoospermia Affect Spermatogenesis: Transcriptomic Analysis Based on RNA-Seq and scRNA-Seq Data. *Frontiers in Genetics*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.608629>
- Hu, Z., Li, Z., Yu, J., Tong, C., Lin, Y., Guo, X., Lu, F., Dong, J., Xia, Y., Wen, Y., Wu, H., Li, H., Zhu, Y., Ping, P., Chen, X., Dai, J., Jiang, Y., Pan, S., Xu, P., ... Sha, J. (2014). Association analysis identifies new risk loci for non-obstructive azoospermia in Chinese men. *Nature Communications*, 5(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4857>
- Hu, Z., Xia, Y., Guo, X., Dai, J., Li, H., Hu, H., Jiang, Y., Lu, F., Wu, Y., Yang, X., Li, H., Yao, B., Lu, C., Xiong, C., Li, Z., Gui, Y., Liu, J., Zhou, Z., Shen, H., ... Sha, J. (2012). A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nature Genetics*, 44(2), 183–186. <https://doi.org/10.1038/ng.1040>
- Kasak, L., & Laan, M. (2021). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human*

- Genetics*, 140(1), 135–154. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02112-y>
- Kosova, G., Scott, N. M., Niederberger, C., Prins, G. S., & Ober, C. (2012). Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans. *American Journal of Human Genetics*, 90(6), 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.016>
- Mazaheri Moghaddam, M., Mazaheri Moghaddam, M., Hamzeiy, H., Baghbanzadeh, A., Pashazadeh, F., & Sakhinia, E. (2021). Genetic basis of acephalic spermatozoa syndrome, and intracytoplasmic sperm injection outcomes in infertile men: a systematic scoping review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(3), 573–586. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02008-w>
- Nemati, H., Sadeghi, M., Nazeri, M., & Mohammadi, M. (2020). Evaluation of the association between polymorphisms of PRM1 and PRM2 and the risk of male infertility: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Scientific Reports*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74233-3>
- Peña, V. N., Kohn, T. P., & Herati, A. S. (2020). Genetic mutations contributing to non-obstructive azoospermia. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 34(6), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101479>
- Qin, Y., Ji, J., Du, G., Wu, W., Dai, J., Hu, Z., Sha, J., Hang, B., Lu, C., Xia, Y., & Wang, X. (2014). Comprehensive pathway-based analysis identifies associations of BCL2, GNAO1 and CHD2 with non-obstructive azoospermia risk. *Human Reproduction*, 29(4), 860–866. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu013>
- Reid, I. R. (2019). Recent advances in understanding and managing paget's disease [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research*, 8(May). <https://doi.org/10.12688/f1000research.19676.1>
- Savadi-Shiraz, E., Edalatkhah, H., Talebi, S., Heidari-Vala, H., Zandemami, M., Pahlavan, S., Modarressi, M. H., Akhondi, M. M., Paradowska-Dogan, A., & Sadeghi, M. R. (2015). Quantification of sperm specific mRNA transcripts (PRM1, PRM2, and TNP2) in teratozoospermia and normozoospermia: New correlations between mRNA content and morphology of sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 82(1), 26–35. <https://doi.org/10.1002/mrd.22440>
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 47(4), 273–279. <https://doi.org/10.1111/ahc.12361>
- Zhao, H., Xu, J., Zhang, H., Sun, J., Sun, Y., Wang, Z., Liu, J., Ding, Q., Lu, S., Shi, R., You, L., Qin, Y., Zhao, X., Lin, X., Li, X., Feng, J., Wang, L., Trent, J. M., Xu, C., ... Chen, Z. J. (2012). A genome-wide association study reveals that variants within the HLA region are associated with risk for nonobstructive azoospermia. *American Journal of Human Genetics*, 90(5), 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.001>