



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΛΛΗΝΩΝ
ΑΣΘΕΝΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΑΝΔΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ
ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ**

**STUDY OF THE GENETIC PROFILE OF GREEK
ASTHENOZOOSPERMIC INDIVIDUALS USING NEXT-
GENERATION SEQUENCING (NGS)**



ΚΟΝΤΣΕ ΧΡΥΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

**STUDY OF THE GENETIC PROFILE OF GREEK
ASTHENOZOOSPERMIC INDIVIDUALS USING NEXT-
GENERATION SEQUENCING (NGS)**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Πρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΓΙΑΝΝΟΥΛΗΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ	Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία έλαβε μέρος από τον Φεβρουάριο του 2022 έως και τον Ιούνιο του 2022 στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (ΒΙΟΖ). Με την υλοποίησή της, λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους βοήθησαν με κάθε τρόπο στη διεκπεραίωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ζήση Μαμούρη που μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα και με εμπιστεύθηκε να συμμετέχω στο εργαστήριο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Θεμιστοκλή Γιαννούλη και τον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη για τη διάθεση και συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα την υποψήφια διδάκτορα Μαρία-Άννα Κυργιαφίνη για τη βοήθεια, καθοδήγηση και συνεχή υποστήριξη σε κάθε βήμα αυτής της πτυχιακής. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή για τη συνεργασία μας ήταν πράγματι αξιοσημείωτη. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που διατηρούν στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αγάπη, στήριξη και συμπαράσταση σε κάθε βήμα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύγχρονη κοινωνία η υπογονιμότητα φαίνεται να είναι ένα ευρέως διαδεδομένο πρόβλημα που απασχολεί πολλά ζευγάρια και μπορεί να οδηγήσει σε πλήθος ψυχολογικών και κοινωνικών προβλημάτων. Συγκεκριμένα, η υπογονιμότητα εντοπίζεται σε ένα στα έξι ζευγάρια με το 50% αυτών των περιπτώσεων να οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή, η οποία επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όσο και από το γενετικό υπόβαθρο του ανθρώπου. Πολυάριθμα γονίδια φαίνεται να συμμετέχουν στην εκδήλωση αυτού του φαινοτύπου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ένα γενετικό υπόβαθρο, όπως οι μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της σπερματογένεσης σχετίζεται με τροποποιημένη συγκέντρωση και κινητικότητα των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα και κατά συνέπεια συμβάλουν στην αρσενική στειρότητα. Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing) προτείνεται τα τελευταία χρόνια ως μια νέα γρήγορη, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος σκιαγράφησης του γονοτύπου ενός οργανισμού. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνώνται οι μεταλλάξεις γονιδίων που δεν συναντώνται φυσιολογικά και πιθανόν να ευθύνονται για την εκδήλωση της υπογονιμότητας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες από τον Ελληνικό πληθυσμό. Για την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA, αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος με τη μέθοδο αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS), ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν και επεξεργασία με στόχο τον εντοπισμό των πιο σημαντικών πολυμορφισμών και άρα γονιδίων και τέλος, εισαγωγή των γονιδίων αυτών σε βάσεις δεδομένων για διερεύνηση και αξιολόγηση της λειτουργίας τους. Εντοπίστηκαν 155 πολυμορφισμοί που χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής επίδρασης και 715 που χαρακτηρίστηκαν μέτριας επίδρασης σε αρκετά γονίδια, τα οποία με περαιτέρω διερεύνηση στις βάσεις δεδομένων εντοπίστηκαν να συνεισφέρουν σε διάφορα μονοπάτια για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού και τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Έτσι, με την διερεύνηση των γονιδίων που ευθύνονται για την ασθενοσπερμία θα δοθεί η ευκαιρία εύκολης διάγνωσης και αντιμετώπισής της.

ABSTRACT

In modern society infertility seems to be a widespread problem that concerns many couples and can lead to severe psychological and social problems. Specifically, infertility is common in one in six couples with 50% of these cases being caused by the male factor. Male infertility is a multifactorial disorder, which is affected by both environmental factors and human genetic background. Numerous genes appear to be involved in the manifestation of this phenotype. There is evidence that a genetic background, such as mutations in genes involved in the process of spermatogenesis, is associated with altered abnormal concentration and motility of sperm and therefore contributes to male infertility. Next Generation Sequencing has been proposed to be a new fast, economical and efficient method of mapping an organism's genotype. In the present thesis, we will investigate mutations in genes that are rare and may be responsible for the appearance of asthenospermia. For this purpose, we used semen samples from normospermic and non-normospermic men from the Greek population. For the analysis of the samples, we isolated DNA, then the whole genome was sequenced by the new generation sequencing method (NGS) and afterwards the resulting data were analysed and examined in order to identify the most important polymorphisms and therefore the most valuable genes. Finally, the genes were introduced in databases to investigate and evaluate their operation. Polymorphisms in several genes were identified, 155 of which were characterized as high impact and 715 as moderate. Further investigation of these genes in the databases showed that they contribute to various pathways for the normal functioning of the organism and the process of spermatogenesis. Thus, the investigation of the genes responsible for asthenospermia will give the opportunity for easy diagnosis and treatment for this situation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Ανδρική υπογονιμότητα.....	9
1.1. Ορισμός.....	9
1.2. Η διαδικασία της σπερματογένεσης.....	9
1.3. Διάκριση υποτύπων ανδρικής υπογονιμότητας.....	12
1.4. Αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας.....	13
1.5. Διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας.....	16
2. Ασθενοσπερμία.....	19
2.1. Γονίδια που σχετίζονται με σοβαρή ασθενοσπερμία.....	20
2.1.1. ELF4G1.....	20
2.1.2. DNAH9.....	21
2.1.3. CATSPER.....	23
2.1.4. Υποκινητής του γονιδίου GRP78.....	24
2.1.5. AKAP4.....	25
2.1.6. TUBB2C.....	26
2.2. Μονοπάτια – Μηχανισμοί που πιθανόν εμπλέκονται στην ασθενοσπερμία.....	26
2.2.1. Πρωτεασώματα.....	26
2.2.2. Μεταφορά – ροή ιόντων.....	27
2.3. Μεθοδολογία μελέτης της ασθενοσπερμίας.....	28
2.3.1. Διερεύνηση της ασθενοσπερμίας σε επίπεδο DNA – NGS (Next Generation Sequencing)	29
2.3.2. Διερεύνηση της ασθενοσπερμίας σε επίπεδο DNA – GWAS (Genome-Wide Association Studies)	30
2.3.3. Μελέτες μεταγραφωμικής.....	32
2.3.4. Πρωτέωμα και μελέτες πρωτεωμικής.....	33
2.3.5. Επιγενετικές τροποποιήσεις.....	34

B. ΣΚΟΠΟΣ.....	36
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
1. Επιλογή των ασθενών και βιολογικό υλικό.....	37
2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος.....	37
3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός των πιο σημαντικών πολυμορφισμών.....	36
4. Βάσεις δεδομένων.....	39
4.1. Ensembl Genome Browser.....	39
4.2. STRING.....	41
4.3. ShinyGO 0.76.....	42
4.3. Gorilla: Gene Ontology enRiChment anaLysis and visuaLizAtion tool.....	43
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
1. Ταυτοποίηση μεταλλαγμάτων υψηλής επίδρασης.....	44
2. Ταυτοποίηση μεταλλαγμάτων μέτριας επίδρασης.....	47
3. Μελέτη του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις μέτριας και υψηλής επίδρασης.....	47
E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

1.1 Ορισμός και γενικές πληροφορίες

Η ανδρική υπογονιμότητα με βάση τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) ορίζεται ως η αδυναμία σύλληψης, έπειτα από δώδεκα μήνες συχνής σεξουαλικής συνεύρεσης χωρίς προφυλάξεις. Το φαινόμενο αυτό συναντάται σε σημαντικό ποσοστό, περίπου 8-12% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία (Agarwal et al., 2020). Επιπλέον, μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες, αυτές της πρωτογενούς και της δευτερογενούς υπογονιμότητας. Η πρωτογενής υπογονιμότητα είναι όταν δεν έχει επιτευχθεί ποτέ εγκυμοσύνη, ενώ η δευτερογενής είναι όταν έχει επιτευχθεί τουλάχιστον μία προηγούμενη εγκυμοσύνη. Η πρωτογενής φαίνεται να είναι αυτή που εντοπίζεται συχνότερα στα ζευγάρια. Ακόμη, είναι γεγονός ότι η υπογονιμότητα αφορά και τα δύο φύλα, ανδρικό και γυναικείο. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι οι ανδρικοί παράγοντες ευθύνονται για το 20-70% των περιπτώσεων υπογονιμότητας (Babakhanzadeh et al., 2020).

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική παθολογική κατάσταση με μεγάλη ετερογένεια στο φαινότυπο που μπορεί να ποικίλλει από πλήρη απουσία σπερματοζωαρίων στους όρχεις, μέχρι διακριτές αλλαγές στην ποιότητα του σπέρματος, την κινητικότητα κ.α. (Krausz et al., 2018).

1.2 Η διαδικασία της σπερματογένεσης

Η ανδρική γονιμότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαδικασία παραγωγής και μεταφοράς του σπέρματος. Η σπερματογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία τα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα σχηματίζουν σπερματοζωάρια μέσα στους όρχεις. Η σπερματογένεση αποτελεί μία πολύ σημαντική διαδικασία και οποιαδήποτε διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα στους άνδρες. Ο όρος σπερματογένεση χρησιμοποιείται ουσιαστικά για να περιγράψει την ανάπτυξη των αρσενικών γαμετών από διπλοειδή σπερματογόνια που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαφοροποιημένων απλοειδών γεννητικών κυττάρων στους σπερματοφόρους σωληνίσκους. Κάθε κύκλος σπερματογένεσης στον άνθρωπο απαιτεί 72 ημέρες (Babakhanzadeh et al., 2020).

Η ρύθμιση της σπερματογένεσης γίνεται, επίσης, σε ορμονικό και ενδοκρινικό επίπεδο. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η τεστοστερόνη και η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), μεταξύ άλλων ορμονών, απαιτούνται για την επιτυχή ολοκλήρωση της σπερματογένεσης (Babakhanzadeh et al., 2020).

Η διαδικασία της σπερματογένεσης χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις:

- 1) **Σπερματογονιογένεση:** Αρχικά, μεταξύ των κυττάρων της ενδοδερμίδας αναπτύσσονται τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, τα σπερματογόνια, και στην 5^η εβδομάδα ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού μεταναστεύουν στην

γεννητική οδό. Στα αρσενικά το χρωμόσωμα Y θα καθορίσει το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα. Στο 1^ο τρίμηνο της κύησης αυτές οι κυτταρικές σειρές χαρακτηρίζονται ως γονοκύτταρα. Έπειτα, σταματάει η ανάπτυξή τους και παραμένουν στην φάση G3 του κυτταρικού κύκλου έως τη γέννηση. Τα σπερματογόνια, μάλιστα, παραμένουν ανενεργά έως την ήβη. Αυτή τη φάση ακολουθεί μιτωτικός πολλαπλασιασμός και σπερματογονική διαφοροποίηση σε προ-λεπτοτενικά σπερματοκύτταρα (Babakhanzadeh et al., 2020).

2) Μειωτική διαίρεση: Η παραγωγή σπερματοκυττάρων που διαφέρουν μεταξύ τους γίνεται μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού κατά τη μείωση. Τα σπερματοκύτταρα, στη συνέχεια, διαιρούνται δίνοντας τους γαμέτες, οι οποίοι είναι απλοειδή κύτταρα. Η μείωση συμβαίνει σε 2 στάδια, τη μείωση I και II.

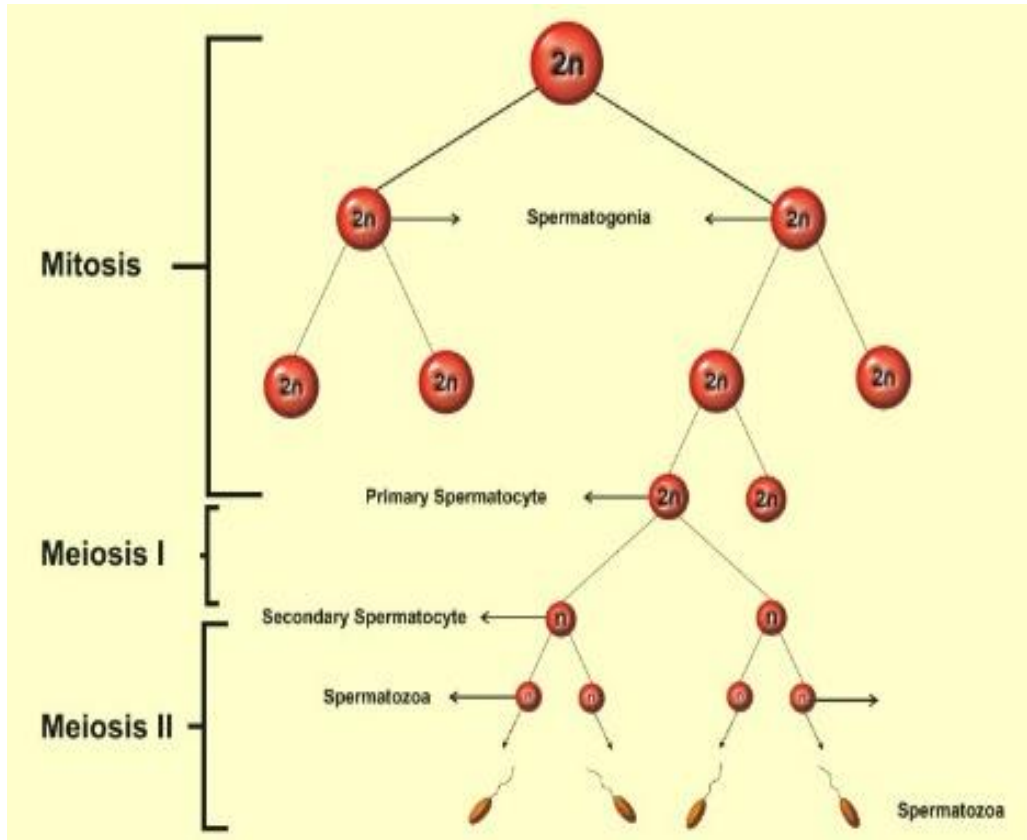
Μείωση I: Κατά τη μείωση I, οι μικροσωληνίσκοι συνδέονται στις αδελφές χρωματίδες και μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους. Επομένως, από κάθε πρόδρομο σπερματοκύτταρο προκύπτουν 2 δευτερογενή σπερματοκύτταρα.

Μείωση II: Κατά τη μείωση II, οι αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος διαχωρίζονται και μέσω του κυτταροσκελετού σχηματίζονται 4 θυγατρικά απλοειδή κύτταρα, τα οποία ονομάζονται σπερματίδες και διαφέρουν στη σύσταση του γενετικού τους υλικού (Babakhanzadeh et al., 2020).

3) Σπερμιογένεση: Κατά τη σπερμιογένεση, οι στρόγγυλες σπερματίδες μετατρέπονται σε ώριμα σπερματοζωάρια. Πιο συγκεκριμένα, αναδιαμορφώνονται και αποκτούν ένα πιο επίμηκες σχήμα. Χαρακτηριστικά, η ουρά του σπερματιδίου αυξάνεται με σκοπό να δημιουργηθεί το μαστίγιο-ουρά με υψηλή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια, τα οποία συμβάλλουν στην πραγματοποίηση της κίνησης. Έπειτα, ο πυρήνας συμπυκνώνεται και τοποθετείται πιο κεντρικά. Ακόμη, στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου ξεκινά να σχηματίζεται το ακρόσωμα, το οποίο συνίσταται από πρωτεολυτικά ένζυμα όπως ακροσίνη, θρυψίνη, υαλουρονιδάση και πρωτεάσες που θα χρησιμεύσουν στη λύση της διαφανούς ζώνης του ωαρίου ώστε να εισέλθει το σπερματοζωάριο σε αυτό κατά τη γονιμοποίηση. Στη φάση της σπερμιογένεσης συμβαίνει ακόμη το φαινόμενο της πρωταμίνωσης, όπου περίπου 85% των ιστονών του σπέρματος αντικαθίστανται από πρωταμίνες για τη σταθερότητα και προστασία του DNA (Babakhanzadeh et al., 2020).

Μόνο μετά την οριστική διαφοροποίησή των σπερματίδων σε ώριμα σπερματοζωάρια αυτά μπορούν να απελευθερωθούν στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, υπό την επίδραση της τεστοστερόνης, για να καταλήξουν, μέσω του ορχικού δικτύου, στην επιδιδυμίδα (Babakhanzadeh et al., 2020).

4) Σπερματογένεση: Τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό των σπερματοφόρων σωληναρίων, με κατεύθυνση προς την επιδιδυμίδα. Στην επιδιδυμίδα θα ωριμάσουν πλήρως και θα αποκτήσουν την κινητικότητα που τους αρμόζει. Στην αρχή, στο μεσαίο τμήμα του σπερματοζωαρίου παραμένει ορισμένη ποσότητα κυτταροπλάσματος, η οποία, τελικά, αφαιρείται από την ουρά του σπερματοζωαρίου κατά την έξοδό του από την επιδιδυμίδα, προσδίδοντας στο σπερματοζωάριο αυξημένη κινητικότητα (Babakhanzadeh et al., 2020).



Εικόνα 1: Διαδικασία σπερματογένεσης.

Η κινητικότητα του σπέρματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη φυσιολογική γονιμοποίηση. Χαρακτηριστικά, πάνω από το 80% των δειγμάτων σπέρματος από υπογόνιμους άνδρες εμφανίζουν ασθενοσπερμία, δηλαδή κακή κινητικότητα του σπέρματος. Σε μελέτες σε μοντέλα ποντικών έχουν συσχετιστεί διάφορες μεταλλάξεις γονιδίων με ασθενοσπερμία αλλά ερευνητές θεωρούν ότι είναι αρκετά σπάνιο να εντοπιστούν μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια σε ανθρώπους με ασθενοσπερμία (Takasaki et al., 2014).

1.3 Διάκριση υποτύπων ανδρικής υπογονιμότητας

Με βάση τα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος, όπως αναλύεται προηγουμένως, μπορεί να γίνει διάκριση σε διάφορους υποτύπους ανδρικής υπογονιμότητας. Πιο συγκεκριμένα (Agarwal et al., 2021):

Ασπερμία: Ορίζεται ως η πλήρης απουσία σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση.

Ασθενοσπερμία: Η κατάσταση κατά την οποία παρατηρούνται σπερματοζωάρια με ποσοστό προοδευτικής κινητικότητας μικρότερο της φυσιολογικής τιμής.

Ασθενοτερατοσπερμία: Πρόκειται για συνδυασμό υποτύπων ανδρικής υπογονιμότητας καθώς εμφανίζονται σπερματοζωάρια με ποσοστό προοδευτικής κινητικότητας και φυσιολογικής μορφολογίας μικρότερα των φυσιολογικών τιμών.

Αζωοσπερμία: Ορίζεται ως η απουσία σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση.

Κρυπτοσπερμία: Είναι η απουσία σπερματοζωαρίων σε φρέσκο δείγμα σπέρματος. Τα σπερματοζωάρια μπορούν να εντοπιστούν όμως έπειτα από φυγοκέντρηση.

Αιμοσπερμία (αιματοσπερμία): Η παρουσία ερυθροκυττάρων στην εκσπερμάτιση.

Λευκοσπερμία (λευκοκυτταροσπερμία, πυοσπερμία): Η παρουσία λευκοκυττάρων στην εκσπερμάτιση σε μεγαλύτερα ποσοστά από μια καθορισμένη οριακή τιμή.

Νεκροσπερμία: Η κατάσταση κατά την οποία παρατηρούνται χαμηλά ποσοστά ζωντανών και υψηλά ποσοστά ακίνητων σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση.

Νορμοσπερμία: Η κατάσταση κατά την οποία ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό προοδευτικά κινούμενων και μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι ίσο ή μεγαλύτερο από το ελάχιστο όριο αναφοράς.

Ολιγοασθενοσπερμία: Παρατηρείται όταν ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από το ελάχιστο όριο αναφοράς.

Ολιγοασθενοτερατοσπερμία: Ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό τόσο των προοδευτικά κινούμενων όσο και των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από το ελάχιστο όριο αναφοράς.

Ολιγοτερατοσπερμία: Η κατάσταση κατά την οποία ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από το ελάχιστο όριο αναφοράς.

Ολιγοσπερμία: Ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων του δείγματος είναι μικρότερη από το ελάχιστο όριο αναφοράς.

Τερατοσπερμία: Το ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από το ελάχιστο όριο αναφοράς.

1.4 Αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα στους άνδρες μπορεί να οφείλεται σε ποικίλες αιτίες, ωστόσο, σχεδόν στο 40% των υπογόνιμων ανδρών δεν υπάρχει σαφής αιτιολογία και χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής. Εξαρτάται, μάλιστα, από την παραγωγή και τη μεταφορά του σπέρματος, μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία, που ρυθμίζεται από το ενδοκρινικό, το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα. Έτσι, έρευνες δείχνουν ότι μπορεί να προκληθεί από ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων, που περιλαμβάνουν ανατομικές ή γενετικές ανωμαλίες, συστηματικές ή νευρολογικές ασθένειες, λοιμώξεις, τραύματα, περιβαλλοντικούς παράγοντες κ.α. Στον [Πίνακα 1](#) παρουσιάζονται μερικά από τα βασικότερα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας με βάση το μηχανισμό (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Πίνακας 1: Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας με βάση το μηχανισμό

Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	
Προ-ορχικά	
<ul style="list-style-type: none">➤ Υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός – Σύνδρομο Kallman➤ Υπερπρολακτιναιμία➤ Φάρμακα	
Ορχικά	
<ul style="list-style-type: none">➤ Κιρσοκήλη➤ Κρυφορχία➤ Καρκίνος όρχεων➤ Ακτινοβολία➤ Χημειοθεραπεία ή άλλα φάρμακα➤ Γενετική αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία	<ul style="list-style-type: none">➤ Μικροδιαγραφές χρωμοσώματος Y➤ Σύνδρομο Klinefelter➤ Περιβαλλοντική μόλυνση➤ Τραυματισμός ή τραύμα➤ Πρωτοπαθής ακτινωτή δυσκινησία κ.α.
Μετά-ορχικά	
<ul style="list-style-type: none">➤ Συνουσία➤ Φάρμακα➤ Παλίνδρομη εκσπερμάτιση➤ Συγγενής αμφίπλευρη απουσία σπερματικού αγγείου➤ Απόφραξη σπερματικού πόρου➤ Βαζεκτομή ή ιατρογενής κάκωση του σπερματικού αγγείου	<ul style="list-style-type: none">➤ Σύνδρομο Young➤ Τραυματισμός νεύρων➤ Τραυματισμός σπονδυλικής στήλης➤ Συστημική νόσος

Ορμονικές ανωμαλίες: Ο άξονας ρύθμισης της αναπαραγωγής των ανδρών είναι γνωστός ως άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων. Αποτελείται, δηλαδή, από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τους όρχεις. Ο άξονας αυτός λειτουργεί συχνά, ώστε να παρέχει την κατάλληλη συγκέντρωση ορμονών για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ο υποθάλαμος απελευθερώνει την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH), η οποία θα επάγει την έκκριση γοναδοτροπινών (FSH και LH) από την υπόφυση. Αυτές οι ορμόνες προκαλούν, έπειτα, την παραγωγή στεροειδών ορμονών από τις γονάδες, όπως η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη, και η τεστοστερόνη, καθώς και πεπτιδικές ορμόνες, όπως η ανασταλίνη και ακτιβίνη και τον αυξητικό παράγοντα που μοιάζει

με την ινσουλίνη 1. Η έλλειψη GnRH προκαλεί ένα σύνολο διαταραχών που επηρεάζουν το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Ένα από αυτά είναι γνωστό ως σύνδρομο Kallmann και σχετίζεται με αλλαγή στην αίσθηση της όσφρησης και απουσία σεξουαλικής ωρίμανσης. Οι θεραπευτικές επιλογές για την ανεπάρκεια GnRH περιλαμβάνουν: χρήση σεξουαλικών στεροειδών, γοναδοτροπινών και ένεση GnRH. Ομοίως, η αδυναμία της υπόφυσης να παράγει επαρκείς ποσότητες ωχρινότροπου ορμόνης (LH) και ωθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία να διεγείρει τους όρχεις και να παράγει τεστοστερόνη και σπέρμα. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια της υπόφυσης χρειάζονται μακροχρόνια ορμονική θεραπεία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές όπως σακχαρώδη διαβήτη, καρδιακές παθήσεις και ελαττώματα των οστών. Αντίθετα, οι αυξημένες συγκεντρώσεις LH και FSH σχετίζονται με χαμηλές συγκεντρώσεις τεστοστερόνης, οδηγώντας σε ελαττώματα στη σπερματογένεση. Επομένως, η χρήση υψηλών δόσεων τεστοστερόνης και οιστρογόνων μπορεί να είναι μια βιώσιμη θεραπευτική επιλογή επειδή καταστέλλει την παραγωγή LH και FSH. Η αυξημένη προλακτίνη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή σπέρματος, μειωμένη λίμπιντο και στυτική δυσλειτουργία. Η υπερπρολακτιναιμία οδηγεί σε υπογονιμότητα στο 11% των ατόμων με oligospermia. Σε πολλές περιπτώσεις, ένας αγωνιστής ντοπαμίνης μπορεί επίσης να είναι μια καλή θεραπευτική επιλογή (Babakhanzadeh et al., 2020).

Σωματικά αίτια: Τα σωματικά ή ανατομικά προβλήματα διαταράσσουν την παραγωγή σπέρματος και προκαλούν απόφραξη της οδού εκσπερμάτισης. Η διεύρυνση των αγγείων του σπέρματος, γνωστή ως κισσοκήλη, είναι ένα από τα πιο κοινά προβλήματα ανδρικής υπογονιμότητας που επηρεάζει περίπου το 40% των ανδρών. Η συστροφή των όρχεων ακόμη, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους όρχεις λόγω πίεσης στα αγγεία του σπέρματος και μείωσης της κυκλοφορίας του αίματος στην περιοχή. Οι χρόνιες και οξείες λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων μπορεί επίσης να είναι κοινές αιτίες υπογονιμότητας στους άνδρες. Χαρακτηριστικά, η ιογενής λοίμωξη από παρωτίτιδα μπορεί να οδηγήσει σε ατροφία των όρχεων και στειρότητα. Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα επίσης, όπως η γονόρροια και τα χλαμύδια, μπορούν να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα στους άνδρες λόγω απόφραξης στην επιδιδυμίδα. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις, το σπέρμα εκσπερματώνεται στην ουροδόχο κύστη, ένα φαινόμενο γνωστό ως υποτροπιάζουσα εκσπερμάτιση, και αποτελεί περίπου το 2% των περιπτώσεων υπογονιμότητας που μπορεί να προκληθούν από ανατομικά προβλήματα του σφιγκτήρα της ουροδόχου κύστης (Babakhanzadeh et al., 2020).

Σεξουαλικά προβλήματα: Πολλά σεξουαλικά προβλήματα είναι τόσο σωματικά όσο και ψυχολογικά. Η στυτική δυσλειτουργία, η πρόωπη εκσπερμάτιση και η αδυναμία εκσπερμάτισης είναι παραδείγματα προβλημάτων σεξουαλικής επαφής που επηρεάζουν την ικανότητα γονιμοποίησης (Babakhanzadeh et al., 2020).

Περιβάλλον και τρόπος ζωής: Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας φαίνεται ότι μπορεί να παίξει επίσης η έκθεση σε διάφορα χημικά και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Άνδρες που εκτίθενται σε επικίνδυνες ουσίες στο χώρο εργασίας τους, συμπεριλαμβανομένων διαλυτών, εντομοκτόνων, συγκολλητικών και ακτινοβολίας μπορεί να οδηγηθούν σε στειρότητα. Η έκθεση στην

ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή σπέρματος ενώ η έκθεση σε υψηλές δόσεις μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη υπογονιμότητα. Από την άλλη, η υπερβολική χρήση αντηλιακού μπορεί επίσης να οδηγήσει σε προσωρινή μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Επαγγέλματα που απαιτούν παρατεταμένο κάθισμα, όπως η οδήγηση, ή η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως η εργασία στα αρτοποιεία, μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη γονιμότητα. Ακόμη, η προοδευτική υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος μπορεί να σχετίζεται με το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ, αλλά και η κακή διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα. Σε μια πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι η υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης του σπέρματος στους άνδρες (Tsai et al., 2013).

Η επαναλαμβανόμενη χρήση ναρκωτικών επίσης, όπως η κοκαΐνη και τα κανναβινοειδή, σχετίζεται με σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του σπέρματος και της τεστοστερόνης στους άνδρες. Τα οπιοειδή ναρκωτικά μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν αρνητικά την κινητικότητα του σπέρματος και την ανδρική γονιμότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι υπήρχε σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της χρήσης ηρωίνης και των αναλογιών υποκατάστασης ιστόνης προς πρωταμίνη μεταξύ Ιρανών ανδρών (Mojarrad et al, 2021). Μελέτες έχουν δείξει, ακόμη, ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση στους άνδρες μειώνει την κινητικότητα του σπέρματος και ο τρόπος αντιμετώπισης και πρόληψης αυτού του προβλήματος είναι η συνεχής χρήση αντιοξειδωτικών και ουσιών που περιέχουν βιταμίνη C. Επιπλέον, η παρουσία ρύπων και διοξειδίου του θείου στον αέρα επηρεάζει τη μορφολογία του σπέρματος και έχει επίσης επιζήμια επίδραση στην κινητικότητα του (Babakhanzadeh et al., 2020).

Γενετικοί παράγοντες: Οι γενετικοί παράγοντες εντοπίζονται στο 15% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες: χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μονογονιδιακές μεταλλάξεις. Ορισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι κληρονομικές και άλλες επίκτητες. Η πιο κοινή γενετική αιτία αζωοσπερμίας είναι το σύνδρομο Klinefelter, το οποίο αποτελεί περίπου το 14% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. 47,ΧΥΥ χρωμοσωμικά ελαττώματα μπορεί να προκαλέσουν δυσλειτουργία της σπερματογένεσης λόγω αυξημένης FSH και της ύπαρξης του Υ χρωμοσώματος σε δύο αντίγραφα. Ακόμη, το σύνδρομο Noonan, σε αντιστοιχία με το σύνδρομο Turner που παρατηρείται στις γυναίκες, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια σπερματογένεσης λόγω αυξημένης FSH. Μετατοπίσεις συμβαίνουν ακόμη στο 3% των ασθενών με σοβαρή ολιγοζωοσπερμία, η πιο σημαντική εκ των οποίων είναι η Robertsonian. Οι αυτοσωματικές αναστροφές είναι επίσης οκτώ φορές πιο συχνές σε υπογόνιμους άνδρες και παρόλο που αυτές οι ανακατατάξεις είναι ισορροπημένες, σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν σε σοβαρή ολιγοασθενότερατοσπερμία ή αζωοσπερμία (Babakhanzadeh et al., 2020).

Ο ρόλος του χρωμοσώματος Υ αναγνωρίστηκε επίσης από τον Zofardi και τους συνεργάτες του με ανάλυση καρυότυπου των ελλειμμάτων στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Υ σε έξι υπογόνιμους άνδρες. Η περιοχή αυτή καλείται AZF, "azoospermia factor", δηλαδή παράγοντας αζωοσπερμία και περιέχει τρεις ζώνες: AZFa, AZFb και AZFc. Μικροελλείψεις παρατηρούνται σε αυτές μετά τον

ανασυνδυασμό παρόμοιων θραυσμάτων σε παλινδρομικές αλληλουχίες. Οι μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y είναι παρούσες στο 10% των υπογόνιμων ανδρών. Η πιο κοινή μικροελλείψη εμφανίζεται στην περιοχή AZFc, αντιπροσωπεύοντας το 80% των περιπτώσεων (Babakhanzadeh et al., 2020).

Ορισμένες γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν επίσης συσχετιστεί με παθολογικά σύνδρομα που προκαλούν υπογονιμότητα, όπως η συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού αγγείου (CBAVD), η οποία προκαλεί αποφρακτική αζωοσπερμία στο 80 με 90% των περιπτώσεων. Η παραπάνω παθολογική κατάσταση οφείλεται σε μια μετάλλαξη στο γονίδιο *CFTR* το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση κυστικής ίνωσης (Babakhanzadeh et al., 2020).

Επιδιόρθωση DNA και σταθερότητα γονιδιώματος: Οι βλάβες DNA αποτελούν τις κυριότερες αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας και της ανώμαλης σπερματογένεσης. Η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης έχει αρνητικές επιδράσεις στην κινητικότητα και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Οι ρήξεις μονόκλωνης και δίκλωνης αλυσίδας (DSBs) είναι οι πιο συνηθισμένοι τύποι βλαβών του DNA που μπορούν να δημιουργηθούν μέσω διαφόρων εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της ακτινοβολίας και του οξειδωτικού στρες. Οι δίκλωνες ρήξεις μπορούν να επισκευαστούν με μηχανισμούς ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR) ή ένωσης μη ομόλογων άκρων (NHEJ) (Donkin & Barrès, 2018).

Επιγενετικοί παράγοντες: Οι βασικές τροποποιήσεις που παρατηρούνται επιγενετικά είναι η ακετυλίωση και η μεθυλίωση και μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, τα γεννητικά κύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με ένα σημαντικό και γενικευμένο επιγενετικό επαναπρογραμματισμό. Ένα από αυτά τα γεγονότα είναι η υποκατάσταση της ιστόνης με την πρωταμίνη. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει επίσης αλλοιωμένη επιγενετική λειτουργία στο σπέρμα από άνδρες με ολιγοσπερμία και ολιγοασθενοτεροσπερμία. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η υπερμεθυλίωση πολλών γονιδίων, οδηγεί σε ανεπάρκεια παραμέτρων του σπέρματος ή σε ανδρική υπογονιμότητα (Donkin & Barrès, 2018).

Βιταμίνη D: Η βιταμίνη D είναι ακόμη ένας παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει άμεσα την κινητικότητα του σπέρματος. Η βιταμίνη D σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως η έκθεση στον ήλιο, η μελάγχρωση του δέρματος, το γεωγραφικό πλάτος, η παχυσαρκία και η ατμοσφαιρική ρύπανση (Donkin & Barrès, 2018).

Συνεπώς, η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή με μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τόσο το φαινότυπο αλλά όσο και τα αίτια που μπορεί να την προκαλέσουν (Donkin & Barrès, 2018).

1.5 Διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας

Η αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί αν υπάρχει υποψία για τη γονιμότητα του αρσενικού συντρόφου, λόγω προηγούμενου ιστορικού ή συννοσηρότητας. Οι άνδρες που δεν προσπαθούν να συλλάβουν αλλά έχουν ανησυχίες σχετικά με τη γονιμότητά τους μπορούν επίσης να υποβληθούν σε

προληπτική αξιολόγηση μετά από κατάλληλη συμβουλευτική (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

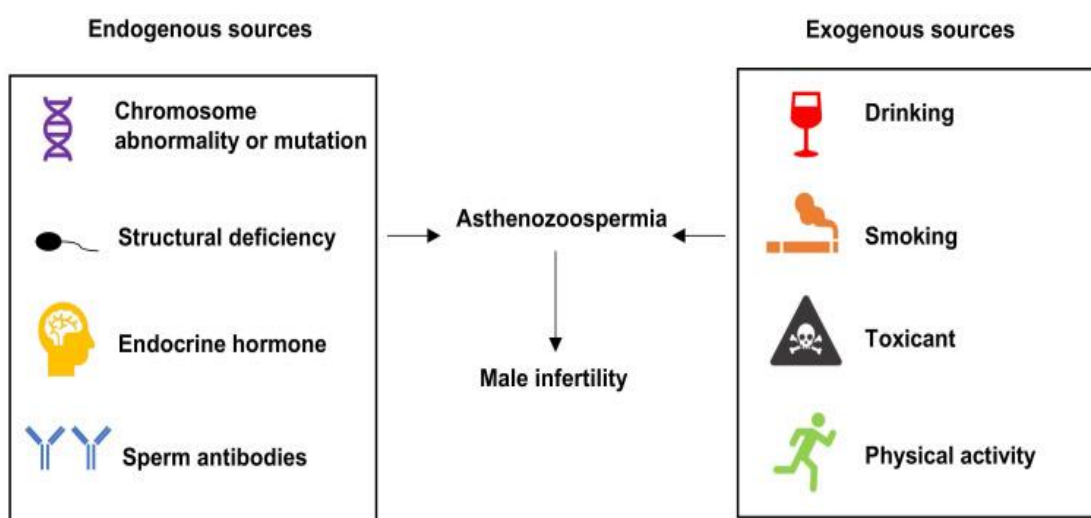
- 1) **Ιστορικό:** Η αξιολόγηση της ανδρικής γονιμότητας ξεκινά με τη λήψη ενός ενδελεχούς ιστορικού που περιλαμβάνει πιθανά ιατρικά, χειρουργικά, γενετικά, συγγενή, συμπεριφορικά και περιβαλλοντικά αίτια. Ακόμη, λαμβάνεται ένα λεπτομερές σεξουαλικό ιστορικό. Καταγράφεται μεταξύ άλλων αν έχουν προηγηθεί χειρουργικές επεμβάσεις, νοσήματα, έκθεση σε χημικές ουσίες, τρόπος ζωής, οικογενειακό ιστορικό κ.α. Σημαντικό ρόλο παίζει ακόμη τόσο η ηλικία του ασθενούς όσο και του συντρόφου, καθώς και το αναπαραγωγικό ιστορικό και των δύο.
- 2) **Φυσική εξέταση:** Κατά τη διάρκεια της φυσικής εξέτασης, κύριος στόχος είναι να εξεταστούν και να αξιολογηθούν η ανατομία του πέους, ο βαθμός αρρενωποποίησης, τα χαρακτηριστικά των όρχεων και της επιδιδυμίδας, η παρουσία κισσοκήλης, ανωμαλίες στην ορθική εξέταση, ενδείξεις προηγούμενης χειρουργικής επέμβασης κ.α.
- 3) **Ενδοκρινική εξέταση:** Καθώς οι ορμόνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης, απαιτείται ορμονική εξέταση που περιλαμβάνει κυρίως μέτρηση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και των πρωινών επιπέδων τεστοστερόνης με λήψη περιφερικού αίματος. Σε ασθενείς με χαμηλή τεστοστερόνη, συνιστώνται περαιτέρω διερεύνηση, συμπεριλαμβανομένης της επαναλαμβανόμενης πρωινής τεστοστερόνης, της ελεύθερης τεστοστερόνης, της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της προλακτίνης. Η σχέση μεταξύ αυτών των ορμονών επιτρέπει τον προσδιορισμό της πηγής της ανωμαλίας στις περισσότερες περιπτώσεις.
- 4) **Ανάλυση σπέρματος/σπερμοδιάγραμμα:** Η ανάλυση σπέρματος είναι η σημαντικότερη εξέταση που συνήθως καθορίζει τελικά αν υπάρχει διαταραχή της ανδρικής υπογονιμότητας ή όχι και περιλαμβάνει την επαρκή συλλογή δειγμάτων σπέρματος ώστε να επιτευχθεί αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα. Για τη συλλογή του δείγματος συνίσταται σεξουαλική αποχή από δύο έως τρεις ημέρες. Μικρότερες περιόδους αποχής ίσως έχουν αρνητικό αντίκτυπο στον αριθμό των σπερματοζωαρίων, ενώ μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μπορεί να επηρεάσουν την κινητικότητά τους. Καλό είναι τα δείγματα να λαμβάνονται στο εργαστήριο έπειτα από σαφείς οδηγίες, ειδάλλως αν συλλέγονται στο σπίτι να διατηρούνται σε θερμοκρασία σώματος κατά τη μεταφορά προς το εργαστήριο. Η ανάλυση συνίσταται να πραγματοποιείται εντός μίας ώρας. Για της διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας συνήθως πραγματοποιείται αξιολόγηση των μετρήσιμων παραμέτρων με βάση τις κανονικές τιμές που έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ως εξής:

Πίνακας 2: Φυσιολογικές τιμές παραμέτρων που εξετάζονται στο σπέρμα

Παράμετροι	Κανονικές τιμές
Όγκος	≥1.5ml
pH	≥7.2
Συγκέντρωση σπέρματος	≥15 εκατομμύρια/mL
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥39 εκατομμύρια
Συνολική κινητικότητα	≥40%
Ποσοδευτική κινητικότητα	≥32%
Βιωσιμότητα	≥58%
Φυσιολογική μορφολογία	≥4%
Λευκοκύτταρα	<1.0 x 10 ⁶ / mL

2.ΑΣΘΕΝΟΣΠΕΡΜΙΑ

Η ασθενοζωοσπερμία, επίσης γνωστή ως ασθενοσπερμία, είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας και η γενετική της αιτιολογία είναι ελάχιστα κατανοητή. Χαρακτηρίζεται από μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ανιχνεύεται σε περισσότερο από το 40% των υπογόνιμων ασθενών. Επειδή το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων σε περιπτώσεις σοβαρής ασθενοσπερμίας είναι < 1%, αυτή η κατάσταση αποτελεί μια επείγουσα πρόκληση στην αναπαραγωγική ιατρική. Πολλά γονίδια έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με τη σοβαρή ασθενοσπερμία ωστόσο, αυτές οι γονιδιακές μεταλλάξεις εντοπίζονται μόνο σε σποραδικές περιπτώσεις και μπορούν να εξηγήσουν μόνο ένα μικρό κλάσμα σοβαρών περιπτώσεων, επομένως είναι μεγάλη ανάγκη να διερευνηθούν πρόσθετες γενετικές αιτίες (Sha et al., 2019).



Εικόνα 2: Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν σε ασθενοσπερμία (Sha et al., 2019).

Αρκετοί παράγοντες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την ασθενοσπερμία, όπως φαίνεται στην [Εικόνα 2](#). Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν συσχετιστεί με ανεπάρκεια σπέρματος και διάφορες αλλαγές στην ανδρική γονιμότητα συμπεριλαμβανομένης της ασθενοσπερμίας. Οι πολλαπλές μορφολογικές ανωμαλίες του μαστιγίου του σπέρματος (MMAF: multiple morphological abnormalities of the sperm flagella) είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται ως μια από τις πιο γνωστές αιτίες της ασθενοσπερμίας. Κυρίως μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις διάγνωσης με MMAF, όπως στα γονίδια *DNAH1*, *CFAP43*, *CFAP44*, *CFAP69* και *QRICH2*. Εκτενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας αυτών των γονιδίων θα μπορούσαν να προκαλέσουν MMAF και να οδηγήσουν σε ανδρική υπογονιμότητα (L. Li & Chen, 2021).

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό επίσης, το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη φυσιολογία της κινητικότητας του σπέρματος δεν είναι σε μεγάλο βαθμό γνωστές κι επομένως, η μοριακή βάση της ασθενοσπερμίας δεν είναι πλήρως κατανοητή. Οι

αιτίες της κακής κινητικότητας του σπέρματος περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων διαταραχές του μεταβολισμού, δομικές διαταραχές στο μαστίγιο του σπέρματος και λειτουργική ανεπάρκεια της επιδιδυμίδας ή άλλων βοηθητικών σεξουαλικών αδένων. Ακόμη, είναι πιθανό μεμονωμένες μεταλλάξεις να έχουν τη δυναμική να προκαλέσουν αποτυχία γονιμοποίησης αλλά έχει καταστεί σαφές ότι απαιτείται η αναγνώριση συγκεκριμένων μορίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην κινητικότητα του σπέρματος (Cao et al., 2018).

2.1. Γονίδια που σχετίζονται με σοβαρή ασθenoσπερμία

Διάφορες μελέτες έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση συγκεκριμένων μεταλλάξεων οι οποίες επηρεάζουν την κινητικότητα του σπέρματος και μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρή ασθenoσπερμία. Μεταξύ άλλων, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στα εξής γονίδια: *EIF4G1* (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης μετάφρασης 4G1), *SPAG17* (γονίδιο του αντιγόνου 17 που σχετίζεται με το σπέρμα), *AKAP3* (γονίδιο της πρωτεΐνης αγκυροβόλησης της α-κινάσης 3), *AKAP4* (γονίδιο της πρωτεΐνης αγκυροβόλησης της α-κινάσης 4), *SEPT4* (σεπτίνης 4), *DNAH1* (γονίδιο της αξονικής βαριάς αλυσίδας δυνεΐνης 1), *CATSPER2* (γονίδιο που κωδικοποιεί το σχετιζόμενο με το σπέρμα κανάλι κατιόντων 2), *GALNTL5* (γονίδιο του πολυπεπτιδίου που μοιάζει με τη N-ακετυλογαλακτοζαμινυλοτρανσφεράση 5) και *NSUN7* (μέλος 7 της οικογένειας της μεθυλοτρανσφεράσης του RNA NOP2/Sun) (Sha et al., 2019).

Τα παραπάνω γονίδια σχετίζονται κυρίως με το κεντρικό ζεύγος μικροσωληνίσκων, με ελαττώματα στη μέση περιοχή του σπέρματος (midpiece) όπου βρίσκονται τα μιτοχόνδρια, το αξόνημα, τη ροή ανιόντων ή τη διαδικασία της γλυκόλυσης και τα ένζυμα από τα οποία αυτή ρυθμίζεται (Sha et al., 2019).

2.1.1. *EIF4G1*

Το γονίδιο *EIF4G1* (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης μετάφρασης 4G1) έχει μέγεθος περίπου 20,8 kb και περιέχει 31 εξόνια που κωδικοποιούν 1599 αμινοξέα. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς και στρατολογεί τις πρωτεΐνες eIF4E και eIF4A για να σχηματίσουν το σύμπλεγμα eIF4, το οποίο ρυθμίζει την έναρξη μετάφρασης των mRNAs. Ακόμη, σχετίζεται με το κυτταροπλασματικό μέρος της πρωτεΐνης που δεσμεύει Poly(A) (PABPC1, HGNC:8554). Αυτοί είναι δύο σημαντικοί ρυθμιστές της μεταφραστικής καταστολής στο κυτταρόπλασμα μειωτικών και πρώιμων απλοειδών σπερματογόνιων κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το *EIF4G1* μπορεί να συμμετέχει στη διαδικασία της μεταγραφικής ρύθμισης στην όψιμη σπερματογένεση σε ποντίκια. Ωστόσο, ο ρόλος του *EIF4G1* στην όψιμη σπερματογένεση, ειδικά στο ανθρώπινο σπέρμα, παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής (Sha et al., 2019).

Συγκεκριμένα, μελέτη που έγινε στον άνθρωπο για τον έλεγχο των παραλλαγών γονιδίων σε έναν ασθενή με σοβαρή ασθenoσπερμία χρησιμοποιώντας Whole Exome Sequencing (WES), οδήγησε στον εντοπισμό δύο διαλληλικών μεταλλάξεων στο εξόνιο 13 και στο εξόνιο 17 του γονιδίου *EIF4G1*. Και οι δύο θέσεις μετάλλαξης είναι

σπάνιες και δυνητικά επιβλαβείς. Η αλληλούχηση κατά Sanger χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση της μετάλλαξης του γονιδίου *EIF4G1* στον ασθενή και στους γονείς του. Ακόμη, η ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε μια διαταραγμένη αξονική δομή με ελαττώματα. Για να αξιολογηθεί η επίδραση των διαλληλικών μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη EIF4G1, μετρήθηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης EIF4G1 στο σπέρμα του ασθενούς με Western blot και ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης EIF4G1 στο σπέρμα του ασθενούς ήταν πολύ μειωμένη σε σύγκριση με εκείνη στο σπέρμα υγιών ατόμων. Εκτός από τα επίπεδα της πρωτεΐνης EIF4G1 που ήταν εξαιρετικά χαμηλά και ο μιτοχονδριακός δείκτης της υπομονάδας 411 της κυτοχρωματικής οξειδάσης c (COXIV) και η μιτοχονδριακά κωδικοποιημένη συνθάση του ATP 6 (ATP6) εμφάνισαν μειωμένη έκφραση στα σπερματοζώαρια του ασθενούς. Τα πειραματικά αυτά ευρήματα, λοιπόν, δείχνουν ότι το γονίδιο *EIF4G1* είναι ένα νέο υποψήφιο γονίδιο που μπορεί να σχετίζεται με σοβαρή ασθενοσπερμία. (Sha et al., 2019)

2.1.2. DNAH9

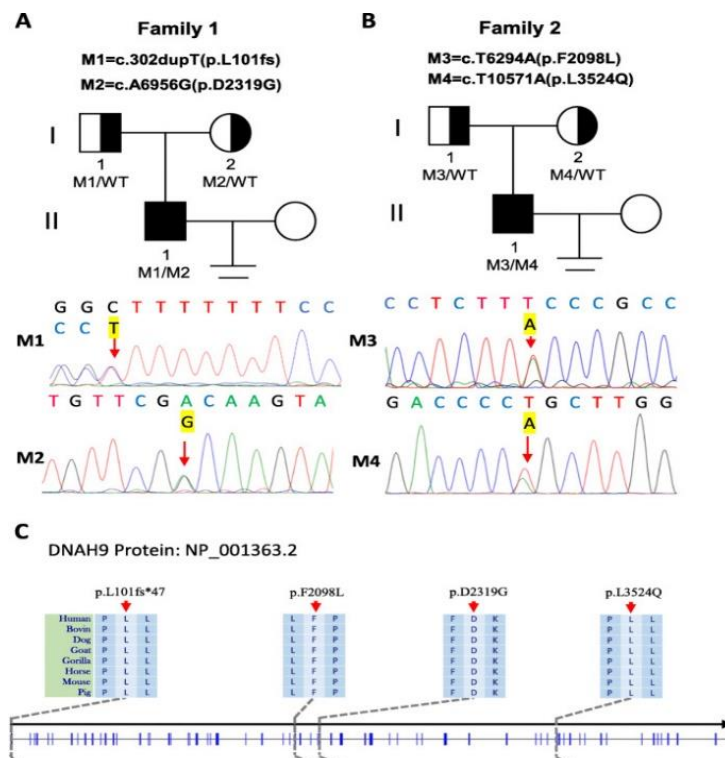
Η σοβαρή ασθενοσπερμία εκδηλώνεται συχνά ως ένα από τα αντιπροσωπευτικά χαρακτηριστικά της πρωτοπαθούς βλεφαρικής δυσκινησίας (PCD: Primary ciliary dyskinesia), η οποία περιλαμβάνει μια ευρεία κινητική δυσλειτουργία των βλεφαρίδων στην αναπνευστική οδό και στο σπέρμα. Οι περισσότερες από τις περιπτώσεις πρωτοπαθούς βλεφαρικής δυσκινησίας σχετίζονται με γενετικές μεταλλάξεις και ορισμένα από αυτά τα γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί, όπως τα *DNAH5*, *DNAH9* και *DNAH11*. Το γονίδιο *DNAH9* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέρος των βαρέων αλυσίδων του εξωτερικού βραχίονα δυνεΐνης (ODA) και εκφράζεται σε όλο το μήκος του μαστιγίου του σπέρματος. Αρκετές έρευνες έχουν αναφέρει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNAH9* προκάλεσαν κινητική δυσλειτουργία των βλεφαρίδων. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Fassad et al. συμμετείχαν 536 ασθενείς με PCD και βρέθηκαν 4 περιπτώσεις μεταξύ 3 οικογενειών που έφεραν μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του *DNAH9*. Μία από τις τέσσερις περιπτώσεις παρουσιάστηκε με έντονη ασθενοσπερμία ενώ οι άλλες 3 περιπτώσεις δεν υποβλήθηκαν σε έλεγχο γονιμότητας λόγω πολύ μικρής ηλικίας. Ακόμη, στην έρευνα των Loges et al. διερευνήθηκαν 548 άτομα με κλασικά συμπτώματα PCD ή ύποπτα περιστατικά PCD και βρέθηκαν 5 περιπτώσεις με μεταλλάξεις στο *DNAH9*. Ωστόσο, δεν πραγματοποιήθηκαν εξετάσεις που να σχετίζονται με το σπέρμα σε αυτές τις περιπτώσεις (Tang et al., 2021).

Αν και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNAH9* έχουν αναγνωριστεί ως μια σημαντική αιτία συνδρομικής ασθενοσπερμίας, όπως η κινητική δυσλειτουργία των βλεφαρίδων, η συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *DNAH9* και της μη συνδρομικής ασθενοσπερμίας δεν έχει εξεταστεί. Ακόμη, η πιθανότητα παραλλαγές του *DNAH9* να έχουν επιπτώσεις στη δομή της ουράς του σπέρματος, παραμένει ασαφής (Tang et al., 2021).

Χαρακτηριστικά, σε μία μελέτη πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση όλων των εξωνίων του γονιδιώματος (WES: Whole Exome Sequencing) σε δύο Κινέζους άνδρες με σοβαρή μη συνδρομική ασθενοσπερμία. Πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική

ανάλυση για να αναζητηθούν σημαντικές ομόζυγες ή σύνθετες ετερόζυγες παραλλαγές και τελικά και στις δύο περιπτώσεις εντοπίστηκαν σύνθετες ετερόζυγες παραλλαγές στο γονίδιο *DNAH9*. Στη συνέχεια, η αλληλούχηση κατά Sanger επαλήθευσε τις προσδιορισμένες παραλλαγές και τη γονική τους προέλευση καθώς οι γονείς τους προσδιορίστηκαν ως ετερόζυγοι φορείς. Για την παρατήρηση της δομής της ουράς του σπέρματος χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης κι έπειτα, ακολούθησε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και χρώση ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της έκφρασης του mRNA του *DNAH9* και της θέσης της πρωτεΐνης DNAH9. Τελικά, μειωμένη κινητικότητα και φυσιολογικά ποσοστά μορφολογίας σπέρματος και ζωτικότητα παρατηρήθηκαν και στα δύο άτομα. Επιπλέον, η έκφραση του mRNA του *DNAH9* μειώθηκε σημαντικά στο σπέρμα του ασθενούς F1 II-1, όπως προκύπτει στην παρακάτω εικόνα. Επίσης, σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά DNAH9 βρέθηκαν στο μαστίγιο του σπέρματος του F1 II-1 σε σύγκριση με άτομα χωρίς πρόβλημα γονιμότητας. Ωστόσο, με ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection), ο F1 II-1 και η σύντροφός του πέτυχαν επιτυχώς κλινική εγκυμοσύνη (Tang et al., 2021).

Συνεπώς, το γονίδιο *DNAH9* πράγματι προσδιορίστηκε ως νέο γονίδιο που μπορεί να οφείλεται για μη συνδρομική σοβαρή ασθενοσπερμία και η μέθοδος ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI) μπορεί να συμβάλει σε ευνοϊκά αποτελέσματα εγκυμοσύνης για αυτούς τους ασθενείς (Tang et al., 2021).

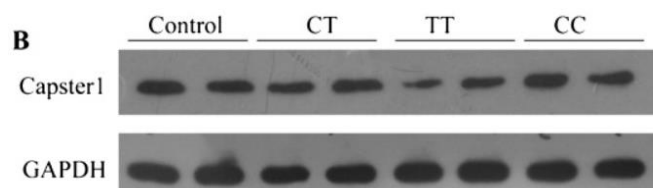


Εικόνα 3: Οι δύο οικογένειες που επηρεάζονται από τις παραλλαγές στο DNAH9. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν μεταλλαγμένες θέσεις στα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger (Tang et al., 2021).

2.1.3. CATSPER

Οι μηχανισμοί που προκαλούν την ασθενοσπερμία είναι πολύπλοκοι, καθώς μπορεί να περιλαμβάνουν ανώμαλη δομή και κινητικότητα του σπέρματος ή ελαττώματα στον ενεργειακό μεταβολισμό που συνδέονται στενά με την κινητικότητα του σπέρματος ή τις μη φυσιολογικές οδούς μεταγωγής σήματος. Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει εξειδικευμένες πρωτεΐνες διαύλου ασβεστίου (Ca^{2+}) που εκφράζονται στο μαστίγιο του σπέρματος και εμπλέκονται στην υπερενεργοποίηση του σπέρματος, επηρεάζοντας την κινητικότητα του σπέρματος, την ικανότητα διείσδυσης των ωαρίων και τη γονιμοποίηση. Αυτές οι πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών του καναλιού κατιόντων του σπέρματος (CATSPER), η οποία περιλαμβάνει τέσσερα μέλη, τα CATSPER1–4. Τα CATSPER είναι ιονικοί δίαυλοι ειδικοί για τα γεννητικά κύτταρα των όρχεων που εντοπίζονται στο κύριο τμήμα του μαστιγίου του σπέρματος. Τα CATSPER 1 και 2 εντοπίζονται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη του μαστιγίου και ρυθμίζουν την κίνησή του που μοιάζει με μαστίγιο. Επιπλέον, αρκετές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοκατακρήμνισης, του υβριδισμού *in situ* και Southern blot, έχουν αποκαλύψει ότι τα CATSPER 3 και 4 εντοπίζονται, επίσης, στο κύριο τμήμα του μαστιγίου του σπέρματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανδρική γονιμότητα (Shu et al., 2015).

Μια μελέτη που χρησιμοποίησε δείγματα σπέρματος ασθενών με ιδιοπαθή ασθενοσπερμία προσπάθησε να αποδείξει αυτή τη συσχέτιση μέσω του προσδιορισμού του γονότυπου των ασθενών και του εντοπισμού SNPs που συσχετίζονται με το φαινότυπο. Από τα 16 SNPs που εντοπίστηκαν τελικά, βρέθηκε ότι ένα μοναδικό SNP [rs1893316 (C > T)] εμφάνιζε στατιστική σημαντικότητα και συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ασθενοσπερμίας σε σύγκριση με τα δείγματα control. Τα άλλα 15 SNP δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενοσπερμίας. Το SNP rs1893316 είναι μία συνώνυμη μετάλλαξη κι επομένως δεν αλλάζει τη δομή της πρωτεΐνης CATSPER1. Ωστόσο, το SNP rs1893316 βρίσκεται στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου *CATSPER1*, το οποίο συνήθως περιέχει νησίδες CpG ή θέσεις δέσμευσης ρυθμιστών. Η μετάλλαξη SNP rs1893316 μεταβάλλει την νουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία μπορεί να καταστρέψει τις θέσεις δέσμευσης ορισμένων ρυθμιστών, επηρεάζοντας έτσι τη μεταγραφή. Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη, κλινικά δείγματα με τον γονότυπο SNP rs1893316 ομαδοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε το mRNA του *CATSPER1* και η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης με RT-PCR και ανάλυση Western blot, αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι η έκφραση mRNA και της πρωτεΐνης του *CATSPER1* ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε ασθενείς με γονότυπο TT από ότι σε μάρτυρες και ασθενείς με γονότυπους CC και CT. Ωστόσο, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο mRNA του *CATSPER1* και στην έκφραση της πρωτεΐνης μεταξύ των μαρτύρων και των ασθενών με CC και CT γονότυπο. Συνεπώς, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το SNP rs1893316 συσχετίζεται με την ιδιοπαθή ασθενοσπερμία και μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη ιδιοπαθούς ασθενοσπερμίας μειώνοντας την έκφραση του *CATSPER1* τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο (Shu et al., 2015).



Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών από τα διαφορετικά αλληλόμορφα των γονιδίων (Shu et al., 2015).

2.1.4. Υποκινητής του γονιδίου *GRP78*

Η GRP78 (78 kDa ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη πρωτεΐνη), επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 kDa 5 (HSPA5) ή πρωτεΐνη δέσμευσης της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (BiP), είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 και σημαντικός μοριακός συνοδός του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), που εμπλέκεται στην αναδίπλωση και τη συναρμολόγηση πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη GRP78 εκτός από τον εντοπισμό στα σπερματογόνια κύτταρα του ανθρώπινου επιδιδυμικού επιθηλίου και των όρχεων, παραμένει στη μέση περιοχή των σπερματοζωαρίων (midpiece) που εκσπερματίζονται. Η ίδια ρυθμίζει την αλληλεπίδραση δέσμευσης του σπέρματος και της διαφανούς ζώνης μέσω μιας σηματοδοτικής οδού που εξαρτάται από το ασβέστιο και η οποία μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα γονιμοποίησης του ανθρώπινου σπέρματος (Qin et al., 2018).

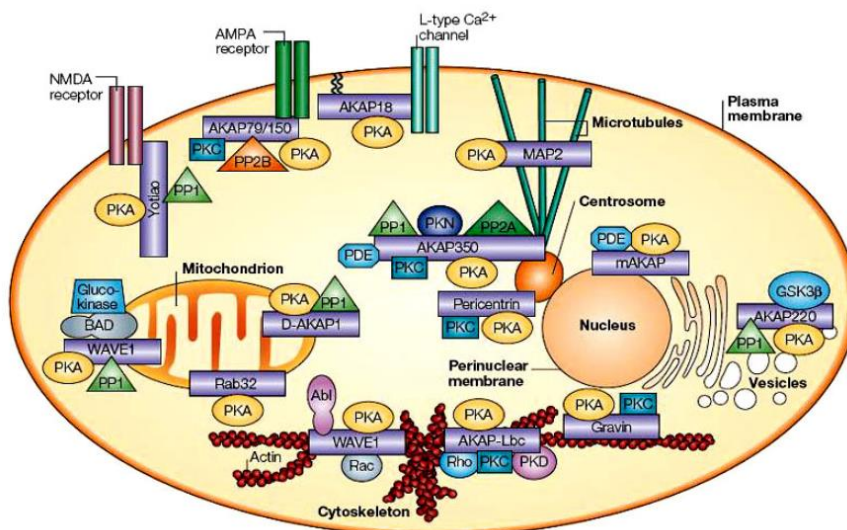
Για τη μελέτη αυτού του γονιδίου δείγμα σπέρματος ανδρών με ασθενοσπερμία αναλύθηκε και επιλέχθηκαν για μελέτη τρία κατάλληλα SNPs (rs3216733 Gd/GG, rs17840761 και rs17840762). Το γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από λευκοκύτταρα αίματος. Έπειτα, ακολούθησε PCR και ELISA για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των επιπέδων της πρωτεΐνης GRP78 στον ορό. Η συγκέντρωση του GRP78 στον ορό των ασθενών με ασθενοσπερμία ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη των μαρτύρων. Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που φέρουν γονότυπους rs3216733 Gd/GG είχαν χαμηλότερα επίπεδα GRP78 από αυτούς που φέρουν το γονότυπο dd. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου GRP78 στον ορό και των rs17840761 και rs17840762. Ακόμη, από τη συσχέτιση των κινητικών παραμέτρων του σπέρματος βρέθηκε ότι οι κινητικές παράμετροι του σπέρματος ήταν σημαντικά χαμηλότερες στον γονότυπο Gd έναντι του γονότυπου dd όσον αφορά την προοδευτική κινητικότητα, την καμπυλόγραμμη ταχύτητα, την ευθεία γραμμική ταχύτητα και τη γραμμικότητα. Επιπλέον, οι ασθενείς με τους γονότυπους Gd/GG είχαν σημαντικά χαμηλότερη ένταση στην κίνηση του σπέρματος από τον γονότυπο dd (Qin et al., 2018).

Επομένως, οι επιστήμονες καταλήγουν ότι το rs3216733 μπορεί να αλλάξει τη μεταγραφική δραστηριότητα και να επηρεάσει την έκφραση της πρωτεΐνης GRP78 του ορού, μειώνοντας τα επίπεδά της, με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο ασθενοσπερμίας (Qin et al., 2018).

2.1.5. AKAP4

Το σπέρμα είναι ένα εξαιρετικά πολωμένο κύτταρο και η κινητικότητά του εξαρτάται πλήρως από το μαστίγιο. Η ικανότητα του σπέρματος να κινείται προς τα εμπρός είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή γονιμοποίηση ενός ωαρίου. Η μείωση της κινητικότητας του σπέρματος στους ασθενοσπερμικούς άνδρες έχει αποδοθεί σε παράγοντες όπως δομικά ελαττώματα στα συστατικά της πρωτεΐνης της ουράς του σπέρματος. Το μαστίγιο του σπέρματος αποτελείται από μια δομή που καλείται **αξόνημα** και περιβάλλεται από βοηθητικές δομές, όπως το ινώδες περίβλημα και η εξωτερική πυκνή ίνα (ODF: Outer Dense Fiber). Οι πρωτεΐνες αγκυροβόλια της Α-κινάσης 3 και Α-κινάσης 4 (AKAP3, AKAP4) είναι οι πιο άφθονες δομικές πρωτεΐνες στο ινώδες περίβλημα και έχουν θέσεις πρόσδεσης για την εξαρτώμενη από κυκλικό AMP (cAMP) κινάση, μια πρωτεΐνη που αυξάνει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του σπέρματος με τυροσίνη και ρυθμίζει τη λειτουργία των μαστιγίων (X. Cao et al., 2018).

Η απουσία του γονιδίου *AKAP4* σε αρσενικά ποντίκια προκάλεσε δυσπλασία του ινώδους ελύτρου (DFS: Dysplasia of the Fibrous Sheath) που οδηγεί σε ελαττωματική κινητικότητα του σπέρματος. Η απουσία της AKAP4 είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της αποτελεσματικής κίνησης του σπέρματος, επειδή οι διαδικασίες σηματοδότησης που εξαρτώνται από το cAMP δεν λαμβάνουν χώρα με το ινώδες περίβλημα (X. Cao et al., 2018).



Εικόνα 5: Μονοπάτι σηματοδότησης AKAP4 (X. Cao et al., 2018).

2.1.6. TUBB2C

Η τουμπουλίνη είναι γνωστό ότι παίζει βασικό ρόλο στο σχηματισμό μικροσωληνίσκων του μαστιγίου. Η TUBB2C είναι μια κύρια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που υπάρχει στην κεφαλή και στο μαστίγιο των σπερματοζωαρίων και φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την κινητικότητα του σπέρματος. Πιο συγκεκριμένα, εκφράζεται σε μεταμιτωτικά κύτταρα σε αρσενικά γεννητικά κύτταρα, είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των μειωτικών ατράκτων και κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων και επίσης συμμετέχει στην οργάνωση του αξονικού μικροσωληνίσκου στην ουρά του σπέρματος (X. Cao et al., 2018).

Μελέτες δείχνουν ότι το σπέρμα ασθενών με ασθενοσπερμία είναι ελαττωματικό στην κινητικότητα λόγω της χαμηλότερης έκφρασης τουμπουλίνης που προκαλεί δομικά ελαττώματα στο μαστίγιο του σπέρματος, όπως η δυσπλασία του ινώδους ελύτρου (DFS: Dysplasia of the Fibrous Sheath) και η πλήρης παραμόρφωση του αξονήματος (X. Cao et al., 2018).

2.2. Μονοπάτια – Μηχανισμοί που πιθανόν εμπλέκονται στην ασθενοσπερμία

2.2.1. Πρωτεασώματα

Η κύρια λειτουργία του πρωτεασώματος είναι η αποικοδόμηση των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών. Πρωτεασώματα έχουν ανιχνευθεί σε σπερματοζωάρια από διάφορα είδη ωστόσο, η χαμηλή έκφρασή τους σε ασθενοσπερμικούς ασθενείς μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση υψηλότερων ουβικιτινωμένων μορίων και να επηρεάσει την κινητικότητα του σπέρματος. Μελέτες για το πρωτεάσωμα του σπέρματος σε ασθενοσπερμικά δείγματα έχουν αποκαλύψει ότι η σχετική έκφραση ορισμένων συστατικών του συμπλέγματος πρωτεασώματος είναι διαφορετική. Χαρακτηριστικά, στη μελέτη των (Zhao et al., 2007) αναφέρθηκε ότι η ρυθμιστική υπομονάδα 7 της πρωτεάσης 26S (MSS1) είναι μειωμένη σε ασθενοσπερμικούς ασθενείς, σε αντίθεση με τη μελέτη των (Martinez-Heredia et al., 2008) που έδειξε ότι το PSMB3 (Proteasome subunit beta type-3) είναι αυξημένο στην ασθενοσπερμία. Όπως προκύπτει, τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών δεν είναι ξεκάθαρα και η διαφορά τους μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Επομένως, απαιτείται μελέτη σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του πρωτεασώματος στην ασθενοσπερμία (X. Cao et al., 2018).

2.2.2. Μεταφορά - ροή ιόντων

Μεταξύ των ρυθμιστικών οδών και των λειτουργικών μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία ωρίμανσης και γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων αξιοσημείωτο ρόλο παίζουν οι ροές ιόντων και ο ρόλος τους στην ομοιόσταση. Αυτό αποδεικνύεται, για παράδειγμα, με την ευέλικτη ρύθμιση του κυτταροπλασματικού όγκου των σπερματοζωαρίων ως απόκριση στο υποωσμωτικό στρες που συναντάται κατά τη μετάβασή τους από τους όρχεις στην επιδιδυμίδα. Ένας άλλος σημαντικός ρόλος της ροής ιόντων στη λειτουργία του σπέρματος παρατηρείται κατά την ωρίμανση μετά

τους όρχεις, η οποία συμβαίνει εντός της επιδιδυμίδας και της γυναικείας γεννητικής οδού, προσδίδοντας τελικά κινητικότητα και δυνατότητα γονιμοποίησης στα σπερματοζώαρια. Κατά συνέπεια, η απορρύθμιση της ροής ιόντων στα σπερματοζώαρια έχει αποδειχθεί από καιρό, τόσο σε μοντέλα ανθρώπων όσο και σε ζώα, ότι βλάπτει τη ρύθμιση του όγκου του σπέρματος και τη συνολική προοδευτική κίνηση και ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος (Cavarocchi et al., 2022a).

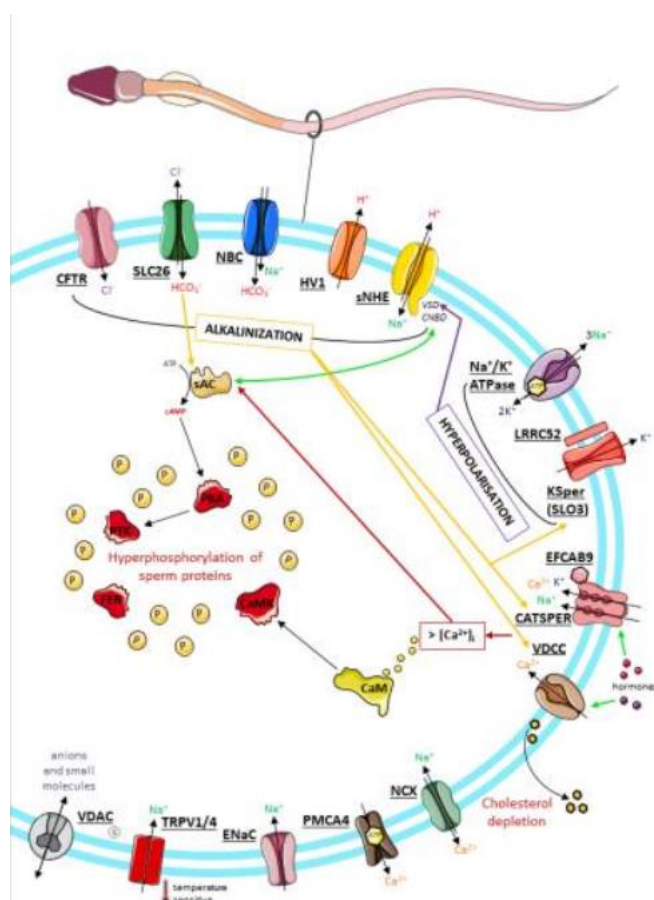
Χαρακτηριστικά, η λειτουργική ωρίμανση των σπερματοζωαρίων βασίζεται σε σημαντικό βαθμό στο μικρο-περιβάλλον των γεννητικών οδών, αρσενικού και θηλυκού, και ελέγχεται αυστηρά από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το pH και τη συνολική περιεκτικότητα ιόντων. Συγκεκριμένα, εντός της επιδιδυμίδας, η δημιουργία χαμηλής συγκέντρωσης διττανθρακικών (HCO_3^-) συμβάλλει στη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ωρίμανση του σπέρματος και την επακόλουθη αποθήκευση του και διατήρηση σε κατάσταση ηρεμίας. Μετά την εκσπερμάτιση, τα σπερματοζώαρια εκτίθενται στο βασικό pH της γυναικείας γεννητικής οδού και υφίστανται βιοχημικές και ηλεκτροφυσιολογικές αλλαγές που είναι απαραίτητες για την υπερενεργοποίηση, δηλαδή την κινητικότητα του σπέρματος και την απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης (Cavarocchi et al., 2022a).

Στη συνέχεια, μια πλειάδα μεταφορέων ιόντων που βρίσκονται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων έχει χαρακτηριστεί και αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε μια σύνθετη διαδικασία ανταλλαγών ιόντων που ρυθμίζουν τη γονιμοποίηση. Ο ρόλος τους σε αυτή τη διαδικασία έχει αποδειχθεί από πολυάριθμες μελέτες κυρίως σε μοντέλα μεταλλαγμένων ποντικών. Έχει, επίσης, ανακαλυφθεί ένα μέρος της σηματοδοτικής οδού που ρυθμίζει τη διαδικασία υπερενεργοποίησης κατά τη διάρκεια της διέλευσης του σπέρματος από την επιδιδυμίδα. Μεταξύ αυτών παρατηρείται ενεργοποίηση καταρρακτών φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών και ενεργοποίηση των φωσφατασών PPP1 και PPP2 (Cavarocchi et al., 2022a).

Ως απόκριση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ιόντων των γεννητικών οδών, η λειτουργική συνεργασία μεταξύ διαύλων ιόντων και μεταφορέων έχει αποδειχθεί ότι επάγει την αύξηση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης, την αλκαλοποίηση του κυτταροπλάσματος και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών καταρρακτών φωσφορυλίωσης που είναι απαραίτητες για την υπερενεργοποίηση του σπέρματος και την ικανότητα γονιμοποίησης (Cavarocchi et al., 2022a).

Μεταξύ αυτών των γεγονότων φωσφορυλίωσης, το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της διαδικασίας υπερενεργοποίησης του σπέρματος σε πολλά είδη. Ως εκ τούτου, το Ca^{2+} και το HCO_3^- αποδείχθηκε ότι συνδέονται άμεσα με τη διαλυτή αδενυλική κυκλάση (ADCY) και διεγείρουν την παραγωγή cAMP. Η προκύπτουσα αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση cAMP επιτρέπει την ενεργοποίηση της PKA και των επακόλουθων καταρρακτών φωσφορυλίωσης που είναι απαραίτητοι για την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος (Cavarocchi et al., 2022a).

Τα μονοπάτια ενεργοποίησης της οδού PKA επάγουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης. Αυτά εντοπίζονται τόσο στις αξονικές όσο και στις περιαξονικές πρωτεΐνες του μαστιγίου του σπέρματος, όπως είναι οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς AKAP, ένζυμα που εντοπίζονται στο ινώδες περίβλημα του μαστιγίου του σπέρματος και εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό (πυροσταφυλική αφυδρογονάση, αλδολάση), καθώς και αξονικές πρωτεΐνες, οι οποίες ενορχηστρώνουν το χτύπημα των μαστιγίων (τουμπουλίνη και αλυσίδες δυνεΐνης) (Cavarocchi et al., 2022b).



Εικόνα 6: Κανάλια ιόντων που εντοπίζονται στο μαστίγιο του σπέρματος (Cavarocchi et al., 2022a).

2.3. Μεθοδολογία μελέτης της ασθenoσπερμίας

Όπως προκύπτει, υπάρχουν αρκετές μελέτες που προσπαθούν να αποσαφηνίσουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ασθenoσπερμία και μπορούν να διακριθούν στις εξής κατηγορίες:

- Μελέτη σε επίπεδο DNA
- Μελέτη σε επίπεδο RNA (μεταγράψωμα)
- Μελέτη σε επίπεδο πρωτεϊνών (πρωτέωμα)
- Μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων

2.3.1. Διερεύνηση της ασθενοσπερμίας σε επίπεδο DNA – NGS (Next Generation Sequencing)

Η ανάλυση DNA αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στις σύγχρονες ιατρικές επιστήμες. Οι τεχνολογίες προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA είναι ισχυρά εργαλεία που εμπλουτίζουν τις μοριακές επιστήμες και ρίχνουν φως στην αποσαφήνιση διαφόρων μηχανισμών.

Με τα συστήματα αλληλούχησης επόμενης γενιάς το πεδίο της γονιδιωματικής αλλάζει εκ νέου. Για πρώτη φορά μπορεί να γίνει μαζική και παράλληλη αλληλούχηση του γονιδιώματος. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, τα οποία απαιτούν υπολογιστική ισχύ χρησιμοποιείται η βιοπληροφορική μεγάλων δεδομένων. Οι πλατφόρμες αλληλούχησης επόμενης γενιάς προϋποθέτουν 1) την κατασκευή βιβλιοθηκών DNA με γνωστά άκρα και πολυπλεξία 2) την ενίσχυση της βιβλιοθήκης με μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό 3) την αλληλούχηση της βιβλιοθήκης και 4) ευθυγράμμιση στο γονιδίωμα και βιοπληροφορική ανάλυση. Συνεπώς, το βασικό στοιχείο αυτής της μεθόδου αλληλούχησης είναι ο τρόπος κατασκευής των βιβλιοθηκών που επιτρέπουν την πολυπλεξία των δειγμάτων και η έννοια παραλληλοποίησης για να επιτρέψει την de novo ταυτόχρονη ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος. Ακόμη, σημαντικά πλεονεκτήματα της NGS σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης DNA είναι ότι επιτρέπεται η ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα (Aly & Sabri, 2015).

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι εξ ορισμού μια ασθένεια που επηρεάζει σημαντικά την αναπαραγωγική ικανότητα, διασφαλίζοντας έτσι τις μεταλλάξεις που προκαλούν σημαντικές αλλαγές να παραμένουν σε χαμηλή συχνότητα στον πληθυσμό. Ωστόσο, μια σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των μεταλλάξεων και εκείνων που προκαλούν άλλες σπάνιες, σοβαρές διαταραχές είναι ότι αυτές μπορεί να μεταφέρονται και να μεταδίδονται από γυναίκες και επομένως, η συχνότητά τους μπορεί να είναι υψηλότερη από ό,τι συνήθως αναμενόταν για σπάνιες ασθένειες. Επιπλέον, η πρόοδος στην εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε επιτυχή μετάδοση μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες εάν τυχαίνει να μεταφέρονται στο σπέρμα που χρησιμοποιείται για τη γονιμοποίηση. Μια άλλη ουσιαστική πρόκληση είναι ο εντοπισμός κατάλληλων ελέγχων για ερευνητικές μελέτες. Χωρίς λεπτομερή ανάλυση σπέρματος, οι γόνιμοι άνδρες (με ιστορικό πατέρα που απέκτησε τουλάχιστον ένα παιδί) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή ως κοντρόλ για τους διαφορετικούς τύπους ανδρικής υπογονιμότητας (Robay et al., 2018).

Ίσως οι πιο μελετημένοι υπότυποι ανδρικής υπογονιμότητας που χρησιμοποιούν NGS είναι οι ποσοτικές ανωμαλίες: η μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA: Non-Obstructive Azoospermia) και η ολιγοσπερμία. Η παλαιότερη από αυτές ήταν μια μελέτη το 2013, στην οποία οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν τη NGS για να βελτιώσουν ένα αποτέλεσμα από ανάλυση συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) που είχαν ανακαλύψει προηγουμένως. Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήθηκαν πέντε γονίδια γύρω από σήματα αιχμής της συσχέτισης στα χρωμόσωμα 12 [παράγοντας βιογένεσης υπεροξειδιοσωμάτων 10 (PEX10: peroxisomal biogenesis

factor 10), μεθυλτρανσφεράση της πρωτεΐνης της αργινίνης 6 (PRMT6: protein arginine methyltransferase 6) και SRY-box 5 (SOX5)] και στο χρωμόσωμα 20 [ρυθμιστική πρωτεΐνη του σήματος α (SIRPA: signal regulatory protein α) και ρυθμιστική πρωτεΐνη του σήματος γ (SIRPG: signal regulatory protein γ)]. Έπειτα, ακολούθησε αλληλούχηση πρώτης γενιάς Illumina σε 96 άτομα με μη αποφρακτική αζωοσπερμία και 96 υγιείς μάρτυρες. Οι συγγραφείς εντόπισαν έξι μεταλλάξεις σε τρία γονίδια (SIRPA, SIRPG και SOX5) που εμφανίζονταν σε διαφορετικές συχνότητες μεταξύ των περιπτώσεων και των κοντρόλ. Για να επαληθεύσουν ποιο από αυτά θα μπορούσε να είναι αιτιολογικό του φαινοτύπου, οι συγγραφείς στη συνέχεια εξέτασαν μόνο αυτούς τους έξι μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) σε επιπλέον 520 άτομα με μη αποφρακτική αζωοσπερμία και 477 μάρτυρες. Αυτή η ανάλυση αναπαρήγαγε μόνο δύο SNV (Single Nucleotide Variants), μια προστατευτική (ασήμαντη για το φαινότυπο;) μετάλλαξη στο SIRPA (rs199733185) και μια μετάλλαξη που αυξάνει τον κίνδυνο για μη αποφρακτική αζωοσπερμία στο SIRPG (rs1048055)(Lu et al., 2014). Σε μια ξεχωριστή μελέτη, οι (Xu et al., 2013) βρήκε επίσης μια συσχέτιση μεταξύ ενός SNV στο SIRPA(rs3197744) με στοχευμένη αλληλούχηση πάνελ ασθενών περιπτώσεων και μαρτύρων, υποστηρίζοντας τον πιθανό ρόλο αυτού του γονιδίου στην ανδρική υπογονιμότητα (Robay et al., 2018).

2.3.2. Διερεύνηση της ασθενοσπερμίας σε επίπεδο DNA – GWAS (Genome-Wide Association Studies)

Μια νέα μέθοδος που ανθίζει τα τελευταία χρόνια και βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη πολυπαραγοντικών διαταραχών, όπως είναι στην παρούσα περίπτωση η ανδρική υπογονιμότητα, σε επίπεδο γονιδιώματος είναι η ανάλυση συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος GWAS (Genome-Wide Association Studies). Αυτού του είδους οι μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για πολλές διαφορετικές ασθένειες και μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Ειδικότερα, οι μελέτες GWAS βασίζονται στη συλλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων DNA από άτομα που φέρουν μια ασθένεια ή διαταραχή αλλά και από υγιή άτομα (case-control analysis). Έπειτα, η πραγματοποίηση της γονοτύπησης για χιλιάδες SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) που πιθανόν να οδηγήσουν σε εσφαλμένη συσχέτιση, ανάλογα με τα κατώφλια περιορισμού που ορίζονται για κάθε ανάλυση. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων (association analysis) με σκοπό να βρεθούν οι πολυμορφισμοί που έχουν σχέση με την ασθένεια ή διαταραχή που μελετάται. Ουσιαστικά, εφαρμόζονται στατιστικές δοκιμές που συγκρίνουν συχνότητες αλληλομόρφων στα μελετούμενα δείγματα και στα κοντρόλ, εντοπίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές. Όταν βρεθεί ένας τέτοιος πολυμορφισμός SNP μπορεί να προβεί σε περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση, για να μελετηθεί η περιοχή εύρεσής του και άλλα SNPs που βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με το πρώτο και ενδεχομένως να σχετίζονται με το φαινότυπο. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα μετα-ανάλυσης όλων των δεδομένων. (Uitterlinden, 2016).

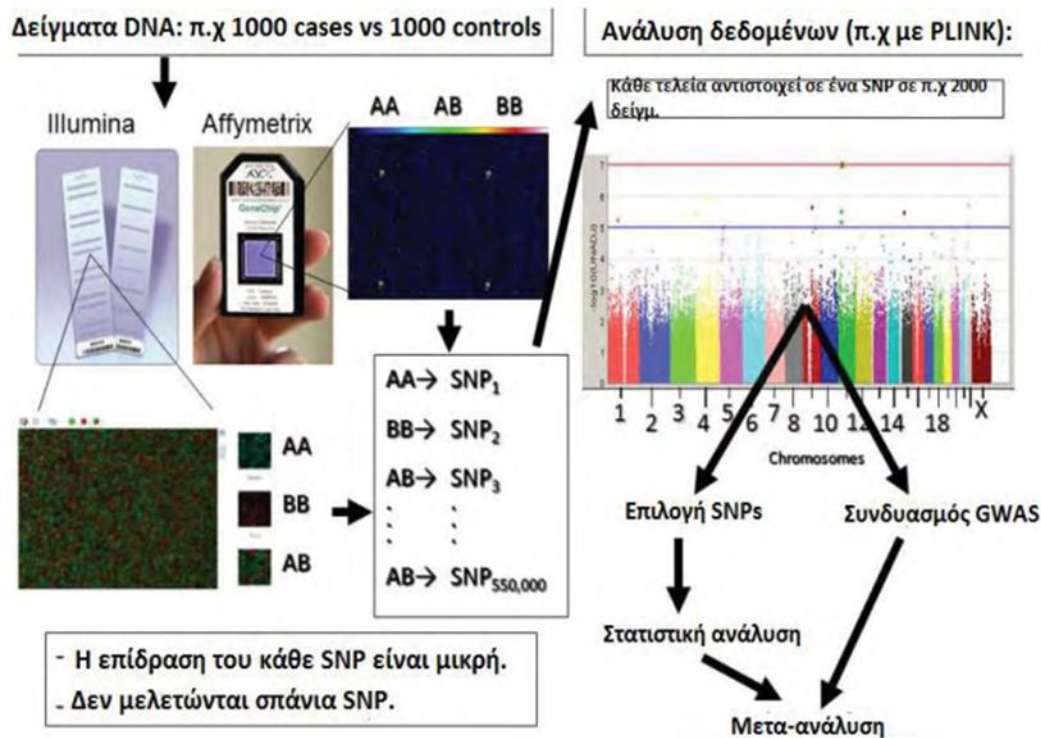
Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες συσχέτισης μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) σε όλο το γονιδίωμα (GWAS) για την αζωοσπερμία ή/και την ολιγοζωοσπερμία σε διαφορετικούς πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων δύο GWAS σε μη αποφρακτική αζωοσπερμία στην Κίνα. Ωστόσο, η συσχέτιση των SNPs με την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα, ιδιαίτερα την ασθενοσπερμία και την ολιγοσπερμία, και η συσχέτισή τους με τις παραμέτρους του σπέρματος δεν είναι ακόμη σαφής. Για τη διερεύνηση γενετικών μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ιδιοπαθή ανδρική στειρότητα (ασθενοσπερμία, ολιγοσπερμία και ολιγοασθενοσπερμία) σε ανθρώπους των Κινέζων Χαν, επιλέχθηκαν 20 υποψήφια SNP από τα αποτελέσματα GWAS. Συνολικά στρατολογήθηκαν 136 υπογόνιμοι άνδρες και 456 υγιείς γόνιμοι άνδρες (S.-Y. Liu et al., 2017).

Μεταξύ των συμμετεχόντων, 136 άνδρες αναγνωρίστηκαν ως ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα, οι οποίοι δεν είχαν γνωστές κλινικές και γενετικές αιτίες υπογονιμότητας, όπως δυσπλασία όρχεων, ορμονικές ανωμαλίες, λοιμώξεις, ιστορικό ασθενειών που επηρεάζουν τη γονιμότητα (π.χ. κισσοκήλη), παθήσεις των γεννητικών οργάνων, ανωμαλίες καρυότυπου, ή διαγραφές του χρωμοσώματος Y. Οι άνδρες με άλλους παράγοντες που θα μπορούσαν να προκαλέσουν στειρότητα (πχ πυρετός, κάπνισμα, έκθεση σε τοξίνες, αλκοολισμός και εθισμός στα ναρκωτικά) αποκλείστηκαν. Οι επιλέξιμες περιπτώσεις χωρίστηκαν στις ακόλουθες κατηγορίες: ασθενοζωοσπερμία (<32% προοδευτικά κινητικά σπερματοζωάρια και φυσιολογική συγκέντρωση, $n = 96$), ολιγοασθενοζωοσπερμία (< 15×10^6 ml⁻¹ σπερματοζωάρια και <32% προοδευτικά κινητικά σπερματοζωάρια, $n = 22$), και ολιγοζωοσπερμία (< 15×10^6 ml⁻¹ σπερματοζωάρια, $n = 18$). Αζωοσπερμικοί και σοβαρά ολιγοζωοσπερμικοί ασθενείς αποκλείστηκαν. Όλοι οι γόνιμοι (κοντρόλ) είχαν φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (αριθμός σπερματοζωαρίων > 15×10^6 ml⁻¹, συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων > 39×10^6 , συνολική κινητικότητα >40% κινητικό σπέρμα, προοδευτική κινητικότητα >32% κινητικό σπέρμα, ζωτικότητα >58% ζωντανό σπέρμα, σπέρμα με φυσιολογική μορφολογία >4% και αριθμό λευκοκυττάρων < $1,0 \times 10^6$ ml⁻¹). Άνδρες που εμφάνισαν φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος αλλά με άγνωστη κατάσταση γονιμοποίησης δεν συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη (S.-Y. Liu et al., 2017).

Για τη γονοτύπηση γονιδιωματικό DNA εκχυίστηκε από το σπέρμα κάθε ανδρός και επεξεργάστηκε ώστε να αποκτήσει την καλύτερη δυνατή ποιότητα. Για τη διερεύνηση πιθανών SNP που σχετίζονται με την κινεζική ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα, χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία Sequenom MassARRAY. Τα υποψήφια SNP ήταν 20 και επιλέχθηκαν με βάση την ταυτοποίησή τους, δηλαδή αυτά που ήταν θετικά συσχετισμένα με την ανδρική υπογονιμότητα σε άλλους πληθυσμούς σε προηγούμενες μελέτες GWAS (S.-Y. Liu et al., 2017).

Από τα 20 SNP που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι τα rs6476866 και rs10129954 συσχετίστηκαν ισχυρά με την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα. Το rs6476866 στο SLC1A1 (γονίδιο που κωδικοποιεί ένα μέλος νευρωνικών και επιθηλιακών μεταφορέων γλουταμινικού με υψηλή συγγένεια) έδειξε την υψηλότερη συσχέτιση

καθώς επίσης και το rs6476866 έδειξε μια ελαφρά συσχέτιση με την ασθενοσπερμία. Ακόμη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανομή αλληλόμορφων του rs10129954 στο γονίδιο DPF3 (γονίδιο που κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών D4, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που φέρουν δάχτυλα ψευδαργύρου) ήταν σημαντικά αυξημένη στους υπογόνιμους σε σχέση με τους γόνιμους άνδρες (S.-Y. Liu et al., 2017).



Εικόνα 7: Τα στάδια GWAS και οι πλατφόρμες αλληλούχησης.

2.3.3. Μελέτες μεταγραφωμικής

Η μεταγραφωμική είναι ο κλάδος της γονιδιωματικής που ασχολείται με τη δυναμική μελέτη του RNA, καθώς το μεταγράφημα αναφέρεται στο σύνολο του RNA μέσα σε ένα κύτταρο. Στο στάδιο της μεταγραφής εντοπίζονται πολλά στάδια ελέγχου πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από την παραγωγή του RNA. Τα τελευταία χρόνια η μεταγραφωμική αναπτύσσει νέες πειραματικές προσεγγίσεις για τη μελέτη αυτών των σταδίων ελέγχου. Με αυτή δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης κάθε σταδίου της γονιδιακής έκφρασης ακόμη από την αρχική φάση παραγωγής πρόδρομου RNA έως την ωρίμανση που επιτυγχάνεται μέσω του ματίσματος.

Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετές μελέτες μεταγραφωμικής που διερευνούν τη μοριακή βάση της ασθενοσπερμίας. Σε μία από αυτές, για τη μελέτη των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα του σπέρματος συλλέχθηκαν δείγματα σπέρματος από 8 υγιείς νεαρούς ενήλικες άνδρες (ηλικίας 28-36 ετών) και 8 ασθενοσπερμικούς ασθενείς (ηλικίας 25-36 ετών, με προοδευτική κινητικότητα <32%). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε RT-PCR για τη μελέτη της διαφορετικής έκφρασης γονιδίων μεταξύ των υπό μελέτη δειγμάτων. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από μικροσυστοιχίες τα οποία

ελήφθησαν από το GDS DataSet του αποθετηρίου GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo). Αφού εντοπίστηκαν τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας (Gene Ontology, GO)(X. X. Liu et al., 2018).

Τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια (DEGs: Differentially Expressed Genes) του σπέρματος μεταξύ ασθενοσπερμικών και νορμοσπερμικών μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος. Έτσι, η σύγκριση της έκφρασης γονιδίων μεταξύ νορμοσπερμικών και ασθενοσπερμικών αποκάλυψε 1323 διαφορετικά εκφρασμένα μετάγραφα. Τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια σχετίζονται με διάφορες μοριακές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια που εμφανίζουν μειωμένη έκφραση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σχετίζονται κυρίως με τη μεταφορά μορίων και την ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών και χρωματίνης. Μάλιστα, φαίνεται να καθορίζουν σημαντικές βιολογικές διεργασίες, όπως η βιογένεση μορίων και η ρύθμιση βιολογικών διαδικασιών. Μια ομάδα από αυτά τα γονίδια βρέθηκε να σχετίζονται με ενδιαφέρουσες αναπαραγωγικές διεργασίες όπως αυτές του μιτωτικού κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης των σπερματίδων και της αναγνώρισης και δέσμευσης σπέρματος-ωαρίου (X. X. Liu et al., 2018).

2.3.4. Πρωτέωμα και μελέτες πρωτεωμικής

Η λέξη πρωτέωμα αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε έναν ζωντανό οργανισμό, ιστό, κύτταρο ή ένα σύνολο κυττάρων από ορισμένες συνθήκες. Το πρωτέωμα είναι εξαιρετικά πολύπλευρο λόγω του ματίσματος και των τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό ενισχύεται περαιτέρω από τη διασύνδεση των πρωτεϊνών σε σύμπλοκα και δίκτυα σηματοδότησης που διαφέρουν εξαιρετικά σε χρόνο και χώρο (Altelaar et al., 2013).

Οι μελέτες πρωτεωμικής περιλαμβάνουν τις εφαρμογές τεχνολογιών για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου πρωτεϊνών που υπάρχει σε ένα κύτταρο, έναν ιστό ή έναν οργανισμό. Οι τεχνολογίες που βασίζονται στην πρωτεωμική χρησιμοποιούνται σε διάφορες μελέτες για διαφορετικά ερευνητικά περιβάλλοντα, όπως η ανίχνευση διαγνωστικών δεικτών, υποψηφίων για παραγωγή εμβολίων, η κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας, η αλλαγή των μοτίβων έκφρασης ως απόκριση σε διαφορετικά σήματα και η συσχέτιση λειτουργικών πρωτεϊνικών μονοπατιών με διάφορες ασθένειες (Aslam et al., 2017).

Μία από τις μελέτες πρωτεωμικής που ασχολείται με τη διερεύνηση της ασθενοσπερμίας είναι η μελέτη των (Siva et al., 2010) στην οποία χρησιμοποιήθηκε ανάλυση 2D PAGE MALDI MS/MS για τη σύγκριση του πρωτεώματος του σπέρματος ασθενοσπερμικών και νορμοσπερμικών ασθενών. Η σύγκριση αποκάλυψε οκτώ πρωτεΐνες που έδειχναν αλλαγές στα επίπεδα μεταξύ των δύο ομάδων ανθρώπων και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 ομάδες ανάλογα με τη λειτουργία τους:

1) Πρωτεΐνες σχετικές με την ενέργεια και το μεταβολισμό των σπερμοκυττάρων [ισομεράσες των φωσφορικών τριοζών (TPIS)], κίνηση γλυκερόλης, ειδική για τους όρχεις 2 (GPK2) και ηλεκτρουλο-CoA:3-κετοξύ CoA τρανσφεράση 1 (SCOT1),

- 2) πρωτεΐνες σχετικές με την κίνηση και την οργάνωση [αλυσίδα βήτα-2C τουμπουλίνης (TUBB2C) και τεκτίνη 1] και
- 3) πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ανακύκλωση, αναδίπλωση και απόκριση στο στρες [υπομονάδα πρωτεασώματος άλφα τύπου 3 (PSMA3) και HSPA2] (Cao et al., 2018).

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες που εμπίπτουν στην ομάδα «ενέργεια και μεταβολισμός» είναι υψηλότερες στα ασθενοσπερμικά άτομα και η υψηλή έκφρασή τους μπορεί να οφείλεται στο επιπλέον κυτταρόπλασμα που περιέχεται στα ανώριμα σπερματοζωάρια, ενώ οι πρωτεΐνες στις άλλες δύο λειτουργικές ομάδες είναι υψηλότερες σε νορμοσπερμικούς δότες. Οι TUBB2C, TPIS, HSPA2 και PSMA3 έχει αναφερθεί ότι υπόκεινται σε S-νιτροζυλίωση στο ανθρώπινο σπέρμα στο στάδιο της υπερενεργοποίησης, υποδεικνύοντας μια εμπλοκή αυτών των πρωτεϊνών σε διάφορες λειτουργίες του σπέρματος που σχετίζονται με τη κινητικότητα του σπέρματος. Η HSPA2 έχει αποδειχθεί ακόμη, ότι είναι δείκτης της ωρίμανσης του σπέρματος με χαμηλότερες ποσότητες στους ολιγοτεροζωοσπερμικούς άνδρες (X. Cao et al., 2018).

2.3.5. Επιγενετικές τροποποιήσεις

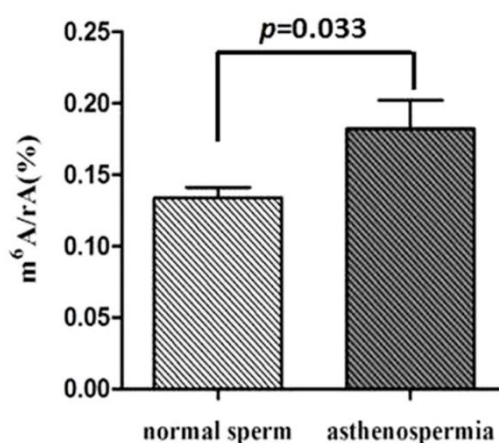
Οι επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την ανθρώπινη γονιμότητα. Η επιγενετική ορίζεται ως μια κληρονομική αλλαγή που επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση που δεν προκαλείται από αλλαγές της αλληλουχίας του DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών έχει επιβεβαιωθεί ότι έχουν σημαντικούς ρόλους σε όλη τη σπερματογένεση. Υπάρχουν δύο χαρακτηριστικά γνωρίσματα των προγραμματισμένων επιγενετικών τροποποιήσεων του σπέρματος. Το πρώτο χαρακτηριστικό είναι η σημαντική αφαίρεση των επιγενετικών δεικτών που εμφανίζονται στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι η αναδιοργάνωση και η συμπύκνωση του γονιδιώματος των γεννητικών κυττάρων κατά τη μεταμειωτική ωρίμανση, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA και των τροποποιήσεων ιστόνης κατά τη διάρκεια της σπερμιόγένεσης. Τα μη φυσιολογικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA του σπέρματος σχετίζονται με τις αλλοιωμένες παραμέτρους του σπέρματος. Επιπλέον, πολλά συγκεκριμένα RNA, mRNA, miRNAs και RNA που αλληλεπιδρούν με Piwi πρωτεΐνες (piRNAs) στο σπέρμα είναι ζωτικής σημασίας για την ανδρική γονιμοποίηση (Yang et al., 2016).

Πιο συγκεκριμένα, *in vivo*, η δυναμική ρύθμιση της τροποποίησης m⁶A (N⁶-μεθυλαδενοσίνη) παίζει σημαντικούς ρόλους μέσω της λειτουργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των m⁶A μεθυλοτρανσφερασών και των απομεθυλασών. Το σύμπλεγμα μεθυλοτρανσφεράσης, το οποίο αποτελείται από μεθυλοτρανσφεράση όπως 3 (METTL3), μεθυλοτρανσφεράση όπως η 14 (METTL14) και πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον όγκο Wilms 1 (WTAP), έχει αναγνωριστεί ως ένας κρίσιμος παράγοντας που καταλύει το σχηματισμό m⁶A με S-αδενοσυλ- ή L-μεθειονίνη (SAM) ως δότης μεθυλίου. Σε αντίθεση με τις μεθυλοτρανσφεράσες, δύο απομεθυλάσες, η

άλφα-κετογλουταρική και η Fe^{2+} -εξαρτώμενη διοξυγενάση της λιπώδους μάζας και η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την παχυσαρκία (FTO) και η πρωτεΐνη 5 μέλος της οικογένειας AlkB (ALKBH5), έχουν παρόμοιες λειτουργίες με το ένζυμο TET στην απομεθυλίωση του DNA. Δηλαδή, τόσο το FTO όσο και το ALKBH5 μπορούν να αφαιρέσουν την ομάδα μεθυλίου από m^6A στο RNA. Σε αυτή τη δυναμική τροποποίηση, οι μεθυλοτρανσφεράσες δρουν ως «συγγραφείς», οι απομεθυλάσες χρησιμεύουν ως «γόμες» και οι πρωτεΐνες επιλεκτικής δέσμησης m^6A (YTHDF) αντιπροσωπεύουν «αναγνώστες» του m^6A στο mRNA. Πιο πρόσφατα, η πρωτεΐνη της οικογένειας 2 της περιοχής YTHDF (YTHDF2) έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη σταθερότητα του RNA, τη μετάφραση, το μάτισμα, τη μεταφορά και τον εντοπισμό μέσω επιλεκτικής αναγνώρισης του μεθυλιωμένου RNA (Yang et al., 2016).

Ο συσχετισμός του m^6A με την ανθρώπινη γονιμότητα μπορεί να ανιχνευθεί από το 1997, όταν ο Bokar και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν για πρώτη φορά, χρησιμοποιώντας ανάλυση Northern blot, ότι το mRNA του METTL3 (MT-A70) εκφραζόταν σε μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων ιστών, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στους όρχεις. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη σε ζώα τεκμηρίωσε ότι τα αρσενικά ποντίκια με έλλειψη Alkbh5 εμφάνισαν αυξημένο m^6A στο mRNA και μειωμένη γονιμότητα. Με βάση αυτά τα πειραματικά αποτελέσματα, υποθέτουμε ότι η τροποποίηση m^6A σχετίζεται με την ανθρώπινη ασθenoσπερμία και παίζει ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα (Yang et al., 2016).

Επιπλέον, για την επιβεβαίωση των παραπάνω εντοπίστηκαν οι m^6A τροποποιήσεις στο RNA του σπέρματος από ασθενείς με ασθenoσπερμία και υγιείς μάρτυρες. Σε σύγκριση με τους υγιείς, η περιεκτικότητα σε m^6A σε ασθενείς με ασθenoσπερμία ήταν σημαντικά αυξημένη, γεγονός που αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ασθenoσπερμία. Για να κατανοηθεί καλύτερα αυτό το φαινόμενο, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου για να εξετασθεί η έκφραση mRNA των βασικών γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση m^6A . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση mRNA των METTL3 και METTL14 ήταν υψηλότερη από εκείνη των μαρτύρων. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε m^6A συσχετίστηκε στενά με την έκφραση mRNA του METTL3 και τις κλινικές παραμέτρους του σπέρματος (Yang et al., 2016).



Εικόνα 8: Ποσοστό παρουσίας m^6A σε φυσιολογικά και ασθenoσπερμικά δείγματα σπέρματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΣΚΟΠΟΣ

Όπως προκύπτει, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν τα ζευγάρια στις μέρες μας είναι αυτό της υπογονιμότητας. Είτε αυτή αφορά την ενδυνάμει μητέρα, είτε τον πατέρα η επιστήμη πρέπει να είναι σύμμαχος του ζευγαριού στην επίλυση τέτοιων προβλημάτων. Για το λόγο αυτό, έχουν αυξηθεί οι μελέτες που σχετίζονται με την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία της υπογονιμότητας. Στο 50% των περιπτώσεων, η αιτία είναι διαταραχές στη γονιμότητα των ανδρών και η πλειοψηφία των ζευγαριών καταφεύγει σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής προκειμένου να αποκτήσει τον δικό του βιολογικό απόγονο. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη και ο εντοπισμός των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν την ικανότητα γονιμοποίησης του ζευγαριού. Η ανάλυση σπέρματος θεωρείται ως το πρώτο βήμα για τη διερεύνηση της ποιότητας του σπέρματος ωστόσο, η διαταραχή αυτή, ως πολυπαραγοντική, υποδηλώνει ότι μεγάλος αριθμός γονιδίων συνεισφέρει στην εμφάνιση του φαινοτύπου.

Έτσι, όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την χρήση της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) με σκοπό την εύρεση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα αλλά και συνολικά του γενετικού προφίλ υπογονίμων ανδρών. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών έχει βρεθεί ότι μεταξύ άλλων συμμετέχουν σε διάφορα σημαντικά μονοπάτια, όπως αυτό της σπερματογένεσης, του μεταβολισμού, του σωστού σχηματισμού του μαστιγίου και του κυτταροσκελετού.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο εντοπισμός σημαντικών πολυμορφισμών και η μελέτη του γενετικού προφίλ των ασθενών με ασθενοσπερμία στον ελληνικό πληθυσμό αξιοποιώντας την αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από ασθενοσπερμικούς και νορμοσπερμικούς άνδρες. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση νέας γενιάς και στη συνέχεια βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να εντοπιστούν οι πολυμορφισμοί που παρατηρούνται μόνο σε ασθενοσπερμικούς ασθενείς και χαρακτηρίζονται ως υψηλής και μέτριας επίδρασης με την εφαρμογή μιας σειράς φίλτρων. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν αυτοί οι πολυμορφισμοί και να αναδειχθούν μονοπάτια που πιθανόν εμπλέκονται στην εμφάνιση ασθενοσπερμίας. Με αυτό τον τρόπο, έγινε μια προσπάθεια να δημιουργηθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με το γενετικό προφίλ του ασθενή και να εντοπιστούν διαφορές που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στη διευκόλυνση και βελτίωση της διάγνωσης και πρόγνωσης της ανδρικής υπογονιμότητας και ιδιαίτερα του συγκεκριμένου υποτύπου της, της ασθενοσπερμίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή των ασθενών και βιολογικό υλικό

Για τη μελέτη αυτή, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, καθώς και δείγματα σπέρματος από εθελοντές σε συνεργασία με το Κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης «Embryolab». Ακόμη, όλοι οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους και δόθηκε έγκριση για τη διεξαγωγή της μελέτης από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Όλοι οι εθελοντές υποβλήθηκαν σε ανδρολογική εξέταση και έγινε ανάλυση σπέρματος σε όλους. Θα πρέπει να σημειωθεί ακόμη, ότι τα δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν μετά από τουλάχιστον δύο έως τρεις ημέρες αποχής από σεξουαλική επαφή.

Στη συνέχεια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος, τα άτομα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Τα νορμοσπερμικά άτομα χαρακτηρίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (όγκος > 1,5 mL, συγκέντρωση σπέρματος > 39 εκατομμύρια/mL, συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων > 15 εκατομμύρια, συνολική κινητικότητα > 40%, προοδευτική κινητικότητα > 32% και βιωσιμότητα > 58 %), ενώ τα ασθενοσπερμικά άτομα έχουν σπερματοζωάρια με ποσοστό προοδευτικής κινητικότητας μικρότερο της φυσιολογικής τιμής (<32%). Πιο συγκεκριμένα, συμπεριελήφθησαν 10 νορμοσπερμικοί ασθενείς και 5 ασθενοσπερμικοί.

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη περιλάμβανε μόνο Έλληνες ασθενείς με βάση τον τόπο γέννησης και τα σχετικά δεδομένα που προέκυψαν κατά τη συμπλήρωση των ερωτηματολογίων από τους ασθενείς.

2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος

Γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από δείγματα αίματος από ασθενοσπερμικούς και νορμοσπερμικούς άνδρες χρησιμοποιώντας το PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και η συσκευή φωτομέτρησης Qubit.

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν 3 διαφορετικά pools δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το DNA που απομονώθηκε από δέκα νορμοσπερμικά άτομα χρησιμοποιήθηκε για τα δύο πρώτα pools (πέντε άτομα για κάθε pool) και ομοίως, το τρίτο περιείχε DNA από πέντε ασθενοσπερμικά άτομα.

Μόλις ολοκληρώθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων, αυτά στάλθηκαν στην Novogene (Cambridge, UK) όπου πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση με Illumina HiSeq 3000.

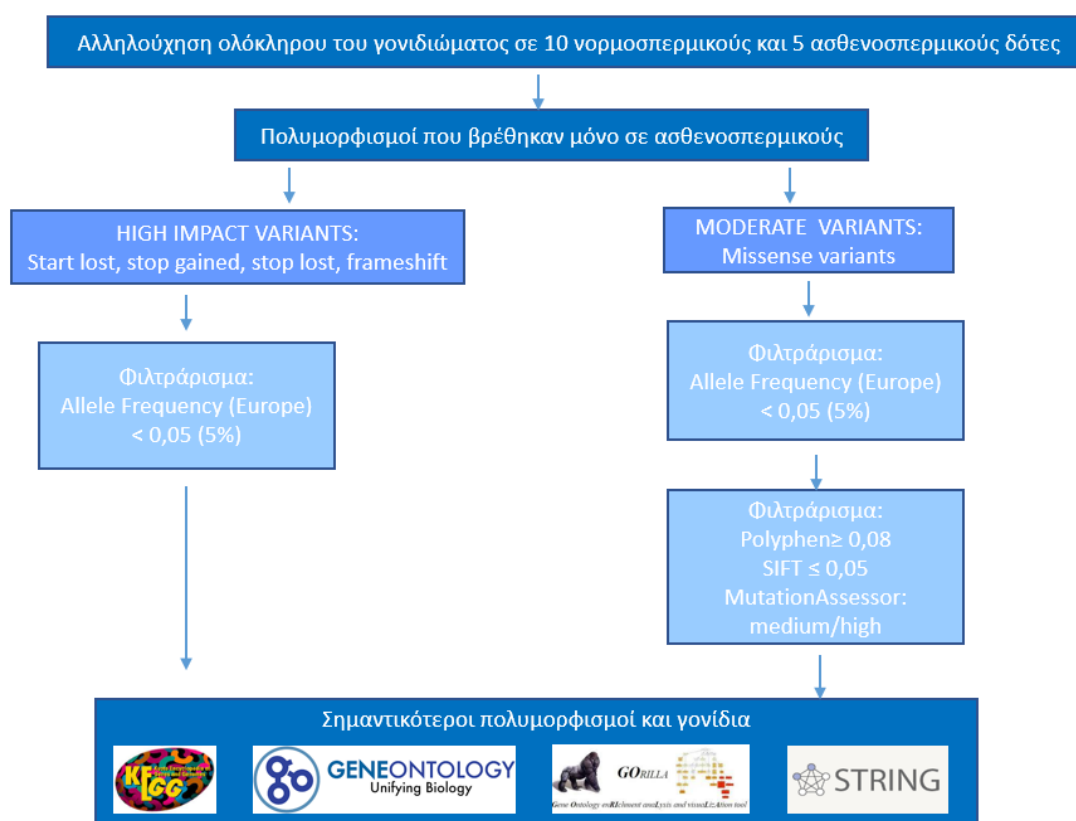
3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός των πιο σημαντικών πολυμορφισμών

Έπειτα από την ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχηση έγινε σύγκριση της αλληλουχίας των νορμοσπερμικών ατόμων με αυτή των ασθενοσπερμικών ώστε να εντοπιστούν πολυμορφισμοί οι οποίοι

εντοπίζονται μόνο στους ασθενείς και άρα είναι πιο πιθανό να συνεισφέρουν στην εμφάνιση του υπό μελέτη φαινοτύπου, δηλαδή της ασθενοσπερμίας.

Σε αυτό το σημείο, αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι όλα τα βήματα που περιγράφονται παραπάνω δεν πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αλλά στο πλαίσιο του προγράμματος «Ανδρική γονιμότητα: γονιδιωματική, πρωτεωμική και διάγνωση - Από τον εργαστηριακό πάγκο στον ασθενή», το οποίο πραγματοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης «ΕΡΕΥΝΩ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» και υλοποιείται από το BIOZ - Εργαστήριο Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής Embryolab.

Στη συνέχεια, στην παρούσα μελέτη, οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν μόνο σε ασθενοσπερμικά άτομα φιλτραρίστηκαν ώστε να εντοπιστούν εκείνες που είναι πιο πιθανό να εμπλέκονται στην εμφάνιση του συγκεκριμένου υποτύπου ανδρικής υπογονιμότητας στον Ελληνικό πληθυσμό ή έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στο φαινότυπο. Το φιλτράρισμα πραγματοποιήθηκε ως εξής (Εικόνα 9):



Εικόνα 9: Μεθοδολογία για τον εντοπισμό των πιο σημαντικών πολυμορφισμών που εντοπίζονται μόνο σε ασθενοσπερμικούς.

- **Πολυμορφισμοί υψηλής επίδρασης (High Impact Variants):** Αρχικά, επιλέχθηκαν πολυμορφισμοί οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως υψηλής επίδρασης καθώς επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης οδηγώντας μερικές φορές ακόμη και στην πλήρη έλλειψή της λόγω της καταστροφής κωδικονίων έναρξης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν πολυμορφισμοί που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου έναρξης (start lost), σε δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop gained), σε καταστροφή του φυσιολογικού κωδικονίου λήξης (stop lost) και στην αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της

τριπλέτας (frameshift). Στη συνέχεια, έγινε φιλτράρισμα με βάση τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου (allele frequency) > 0.05 σύμφωνα με δεδομένα που προκύπτουν από το 1000 Genome Project για τον πληθυσμό της Ευρώπης, καθώς επίσης και από τη βάση δεδομένων gnomAD.

- **Πολυμορφισμοί μέτριας επίδρασης (Moderate Impact Variants):** Επιπλέον, επιλέχθηκαν παρανοηματικές μεταλλάξεις που τροποποιούν το κωδικόνιο με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί ένα διαφορετικό αμινοξύ. Για να εξακριβωθεί η επίδρασή αυτών των μεταλλάξεων στη λειτουργία, τη δομή και τη συντήρηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν βιοπληροφορικά εργαλεία που κάνουν πρόβλεψη με βάση συγκεκριμένους αλγόριθμους. Πιο συγκεκριμένα, στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο πολυμορφισμοί με SIFT Score ≤ 0.05 , PolyPhen Score ≥ 0.08 και με επίπεδα επίδρασης μέτρια ή υψηλά όπως προκύπτει από το MutationAssessor. Επιπλέον, τα κριτήρια που αφορούν την συχνότητα του αλληλομόρφου (allele frequency) εφαρμόστηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και στις μεταλλάξεις υψηλής επίδρασης (high impact variants).

Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη αντλήθηκαν από την βάση δεδομένων Ensembl Genome Browser.

4. Βάσεις δεδομένων

4.1. Ensembl Genome Browser

Είναι γεγονός ότι ο αριθμός των βάσεων δεδομένων στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Υπάρχουν χιλιάδες διαφορετικές βάσεις δεδομένων όπου η κάθε μια παρέχει δωρεάν διαδικτυακές πληροφορίες σε διαφορετική μορφή.

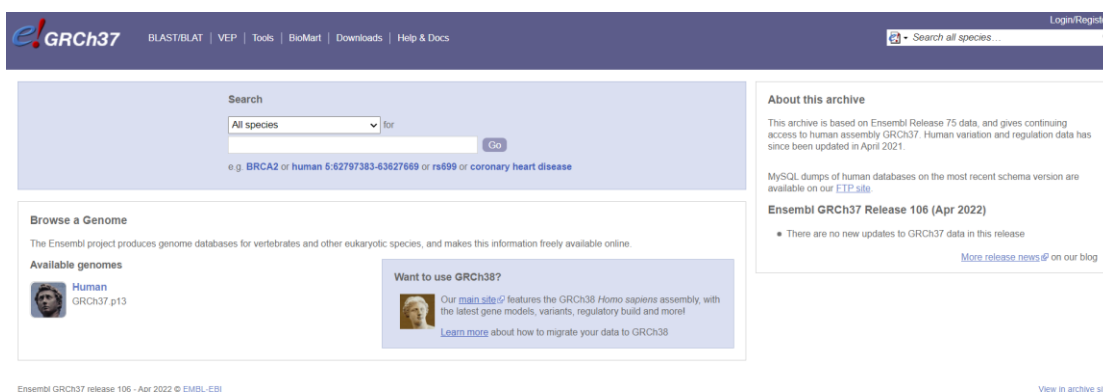
Η Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) αποτελεί μια βάση δεδομένων που ξεκίνησε το 1999, λίγα χρόνια πριν ολοκληρωθεί η αποκρυπτογράφηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έχει την έδρα της στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute: EMBL-EBI). Σκοπός του project ήταν η μελέτη ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (3 δισεκατομμυρίων ζευγών βάσεων) και η δημοσιοποίηση αυτής της μελέτης, ενώ από τον Ιούλιο του 2000 και μετά, πληθώρα γονιδιωμάτων διαφορετικών ειδών προστέθηκαν στη βάση αυτή. Η Ensembl Genome Browser περιλαμβάνει δεδομένα για πάνω από 30 είδη, η πλειονότητα των οποίων είναι σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, του ποντικού, του αρουραίου, του zebrafish, καθώς και μια μεγάλη γκάμα οργανισμών που χρησιμοποιούνται ευρέως σε ερευνητικές μελέτες (π.χ. η *Drosophila Melanogaster* και ο *Caenorhabditis elegans*).

Η Ensembl Genome Browser διαθέτει πολλούς ιστότοπους και αρχεία από όπου μπορεί να γίνει η αναζήτηση διάφορων δεδομένων. Ο Ensembl GRCh37 (γνωστός επίσης και ως hg19) είναι ένας από τους ιστότοπους που παρέχει δεδομένα σχετικά με το ανθρώπινο γονιδίωμα. Μεταξύ των δεδομένων που μπορούν να αναζητηθούν είναι και αυτά των πολυμορφισμών και πιο συγκεκριμένα των SNPs ενός γονιδίου.

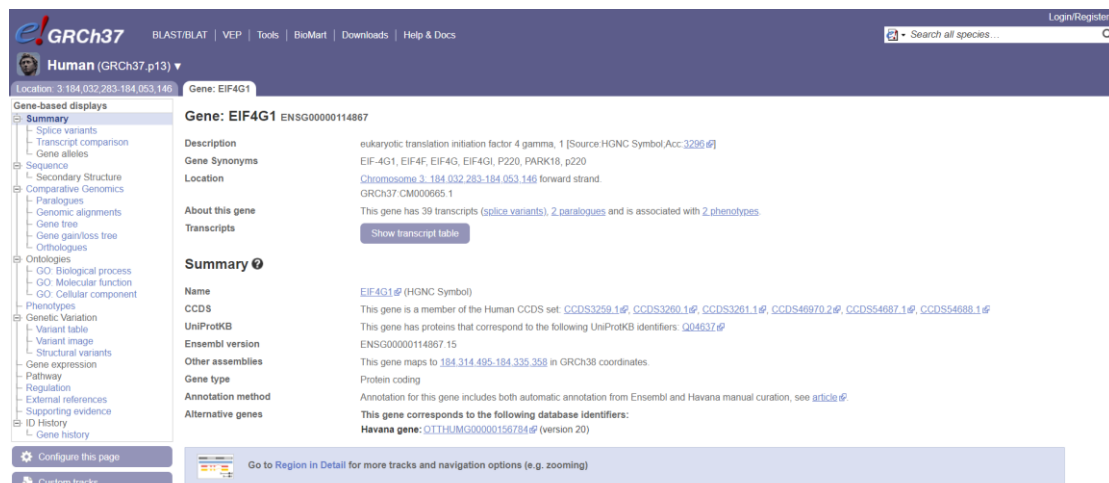
Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο Ensembl GRCh37 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>) για να γίνει εντοπισμός των SNPs που

βρίσκονται σε γονιδιακές περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτοκίνες IL1, IFN γ , TNF- α και IL8. Ο συγκεκριμένος ιστότοπος (GRCh37/hg19) επιλέχθηκε, επειδή τα plates γονοτυπήθηκαν σε αυτό το assembly της Ensembl.

Στην αρχική σελίδα του Ensembl GRCh37 (Εικόνα) δηλώνεται η επιλογή για όλα τα είδη (all species) και για το γονίδιο που θέλουμε π.χ. TNF α . Η επόμενη σελίδα οδηγεί στα αποτελέσματα του γονιδίου που δηλώσαμε (Εικόνα 13). Η σελίδα όπου φαίνεται το γονίδιο δίνει διάφορες πληροφορίες σχετικά με αυτό όπως, το Ensembl Gene ID, περιγραφή των γονιδίων, συνώνυμα κωδικόνια, μετάγραφα, την τοποθεσία του στο χρωμόσωμα κτλ.



Εικόνα 10: Αρχική σελίδα της ENSEMBL GRCh37.

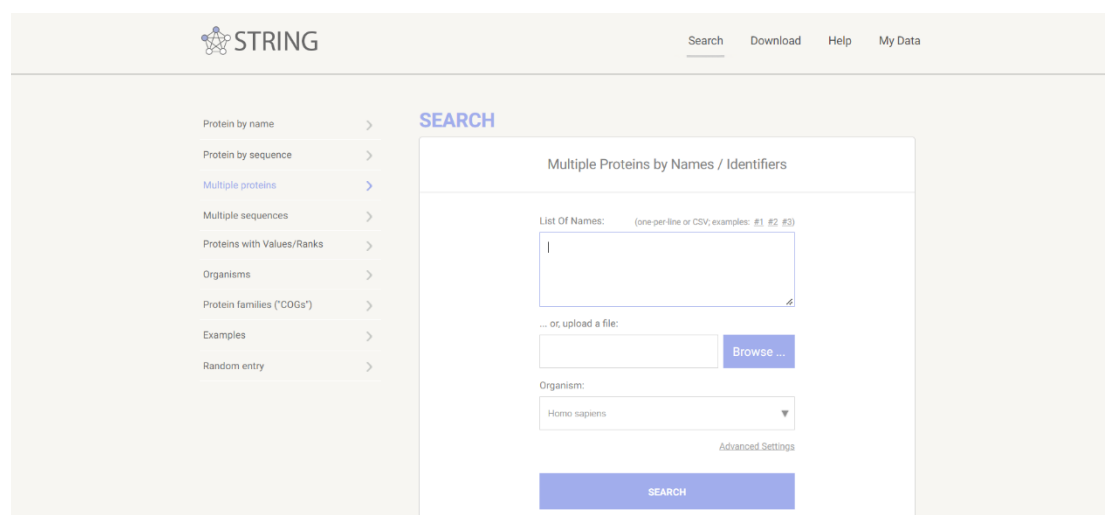


Εικόνα 11: Παράδειγμα εμφάνισης αποτελεσμάτων στην ENSEMBL GRCh37.

4.2. STRING DATABASE

Η βάση δεδομένων STRING είναι ένας από τους πολλούς διαδικτυακούς πόρους που είναι αφιερωμένη σε δίκτυα συσχέτισης πρωτεϊνών σε ολόκληρο τον οργανισμό. Οι βασικότεροι στόχοι που προσπαθεί να επιτύχει η STRING είναι η έμφαση στην κάλυψη (εφαρμογή σε χιλιάδες οργανισμούς με αλληλούχηση γονιδιώματος), στην πληρότητα των πηγών των αποδεικτικών στοιχείων και σε χαρακτηριστικά της χρηστικότητας (όπως προσαρμογή, ανίχνευση εμπλουτισμού και πρόσβαση μέσω προγραμματισμού). Αυτή επιτρέπει στους χρήστες να συνδεθούν και να αναζητήσουν οποιαδήποτε συσχέτιση και προσφέρει την ευκολία επιθεώρησης των υποκείμενων στοιχείων που υποστηρίζουν κάθε συσχέτιση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Szkarczyk et al., 2021).

Το περιεχόμενο της βάσης δεδομένων του STRING έχει υπολογιστεί εκ των προτέρων, έχει αποθηκευτεί σε μια βάση δεδομένων και είναι διαθέσιμο για λήψη. Όλα τα στοιχεία αλληλεπίδρασης που συμβάλλουν σε ένα δεδομένο δίκτυο συγκρίνονται και βαθμολογούνται. Οι βαθμοί αυτοί ενσωματώνονται σε μια τελική «συνδυασμένη βαθμολογία», η οποία κλιμακώνεται μεταξύ του μηδέν και του ένα. Έτσι, παρέχεται μια εκτίμηση της εμπιστοσύνης του STRING σχετικά με το εάν μια προτεινόμενη συσχέτιση είναι βιολογικά σημαντική, δεδομένων όλων των στοιχείων που συνεισφέρουν σε αυτή. Κάθε συσχέτιση αναφέρεται στη σύνδεση μεταξύ δύο μη πανομοιότυπων πρωτεϊνών, η καθεμία από διαφορετικό γονίδιο. Το STRING δεν διαφοροποιεί τις παραλλαγές που οφείλονται στο μάτισμα ή τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι πρωτεΐνες και παράγουν ποικίλες ισομορφές. Αντίθετα, όλες αυτές οι ισομορφές καταρρέουν και αντιπροσωπεύονται από μια μοναδική, κανονική πρωτεΐνη, δηλαδή μια μεμονωμένη πρωτεΐνη αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο (Szkarczyk et al., 2021).



Εικόνα 12: Αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων STRING

4.3. ShinyGO 0.76

Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/GO>) και KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), για να μελετηθούν τα μονοπάτια που εμπλέκονται και ο ρόλος των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί που επιλέχθηκαν

Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων ShinyGO, η οποία βασίζεται και αξιοποιεί δεδομένα από τις GO και KEGG. Η ShinyGO μπορεί να συνδέσει μεγάλες λίστες γονιδίων με ποικίλες μοριακές οδούς.

Η ShinyGO χαρακτηρίζεται από ορισμένες αξιοσημείωτες ιδιότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν την εμφάνιση των προς μελέτη γονιδίων σε διαγράμματα μονοπατιών και δίκτυα, καθώς έχει πρόσβαση στο KEGG και το STRING, την οπτικοποίηση των επικαλύψεων μεταξύ εμπλουτισμένων μονοπατιών χρησιμοποιώντας ιεραρχική ομαδοποίηση και τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών στον τύπο του γονιδίου, το μήκος, την περιεκτικότητα σε GC και τη χρωμοσωμική κατανομή μεταξύ των ενδιαφέροντων γονιδίων (Ge et al., 2020).

The screenshot displays the ShinyGO 0.76 web interface. On the left, there is a search and filter panel with a 'Demo genes' list containing genes like ABC2, CTBP2, TTC40, CDHR1, RNF26, MUC5B, AP003062.1, and IGSP22. Below this, there are settings for 'Pathway database' (GO Biological Process), 'FDR cutoff' (0.05), and '# pathways to show' (20). On the right, the main panel shows enrichment results grouped by high-level GO terms. A table lists three categories: 'Cellular process' (156 genes), 'Biological regulation' (106 genes), and 'Regulation of biological process' (98 genes). Each category lists a set of gene symbols.

N	High level GO category	Genes
156	Cellular process	CFTR TRPM5 GPATCH1 GOLGA3 CMTM6 C1NP SLC04A1 LBP GUCY2F USP31 TG LIN7B CYP3A5 KRT32 CD38 IRF2BPL CAT SLC10A2 PEX1 ACTR3C NDUF10 DEF8118 NUPL2 DNAH3 ICE2 SPG11 MSR1 NLRCS PRDX1 SCARF1 PLEKHA4 KDR PKP1 TUBB4A LOXL3 CNTNAP1 CASQ3 FASTKD3 ICAM1 DGKG VCAN NDUFB10 PFKL LRR256 WNT9A ANO7 ARL11 RSPH1 FBXO17 ARPC5 PKDCC ZSWIM2 LDHALB6 MUC17 DCXR FASN SOSTDC1 LCM2 TUBB88 FAM134C APOBEC4 RTP1 CTBP2 SNX3 RNF26 EXD2 STAT2 LIMCH1 SPTBN5 CEP57 ASB4 OR4A16 WDR33 MED16 SLC41A3 FRAS1 JAG2 GLRX5 GALT2 TCEB3B OR13F1 ATP13A5 HOXA9 FBXO2 ALDH9A1 AKAP9 PI3R UBE2D3 SYNE2 COL6A6 OR13G1 SERAC1 NAV1 CFAP46 ABCC2 ALG6 NDC1 CEL MCU CHD6 COL16A1 P2RY4 TEX10 IRG1 SLC36A3 BPHL GGT6 LSP1 SDCBP2 OR5K3 LOXL2 KRTAP4-4 PTPRZ1 ANKLE1 CPT1B HAGH MED13 GPR98 MAST4 SDSL ZC3H12D NSG1 ACAD10 RELN TRIM51 CHAC1 SPATA13 CCBL1 DTHD1 LAPTM4B STXB2 CALML4 NEDD4 EXOC3 ERBB2IP C14orf159 RIMS1 FAM83A PCDHGB1 TPD52 PCDHGA6 UOQRB C12orf55 MUC5B MYCBP2 FAM63B CCDC64B POLI C17orf75 TTN CNTNAP3B RIMBP3B IQSEC1 POM121C NEB CDHR1
106	Biological regulation	CFTR TRPM5 CMTM6 SLC04A1 LBP GUCY2F TG LIN7B CYP3A5 CD38 IRF2BPL CAT ACTR3C NUPL2 ICE2 MSR1 NLRCS PRDX1 SCARF1 PLEKHA4 KDR PKP1 TUBB4A LOXL3 CNTNAP1 CASQ3 FASTKD3 ICAM1 DGKG PFKL WNT9A ANO7 FRMD1 ARPC5 PKDCC ZSWIM2 MUC17 FASN SOSTDC1 FAM134C CTBP2 RNF26 STAT2 LIMCH1 SPTBN5 CEP57 ASB4 CRIPAK OR4A16 MED16 JAG2 CD300C GALT2 TCEB3B HOXB2 OR13F1 ATP13A5 HOXA9 ZNF587 FBXO2 ALDH9A1 AKAP9 PI3R UBE2D3 SYNE2 OR13G1 ABCC2 NDC1 CEL MCU CHD6 TFAP2E COL16A1 P2RY4 IRG1 LSP1 SDCBP2 OR5K3 LOXL2 PTPRZ1 FAM122A ANKLE1 MED13 GPR98 MAST4 ZC3H12D NSG1 RELN CHAC1 SPATA13 DTHD1 LAPTM4B STXB2 CALML4 NEDD4 ERBB2IP RIMS1 FAM83A MUC5B MYCBP2 TTN ZNF226 IQSEC1 POM121C NEB CDHR1
98	Regulation of biological process	CFTR TRPM5 LBP GUCY2F TG CD38 IRF2BPL CAT ACTR3C NUPL2 ICE2 MSR1 NLRCS PRDX1 SCARF1 PLEKHA4 KDR PKP1 TUBB4A LOXL3 CNTNAP1 CASQ3 FASTKD3 ICAM1 DGKG PFKL WNT9A FRMD1 ARPC5 PKDCC ZSWIM2 MUC17 FASN SOSTDC1 FAM134C CTBP2 RNF26 STAT2 LIMCH1 SPTBN5 CEP57 ASB4 CRIPAK OR4A16 MED16 JAG2 CD300C GALT2 TCEB3B HOXB2 OR13F1 HOXA9 ZNF587 FBXO2 AKAP9 PI3R UBE2D3 SYNE2 OR13G1 ABCC2 NDC1 CEL MCU CHD6 TFAP2E COL16A1 P2RY4 IRG1 LSP1 SDCBP2 OR5K3 LOXL2 PTPRZ1 FAM122A ANKLE1 MED13 GPR98 MAST4 ZC3H12D NSG1 RELN CHAC1 SPATA13 DTHD1 LAPTM4B STXB2 CALML4 NEDD4

Εικόνα 13: Παράδειγμα εμφάνισης αποτελεσμάτων στη βάση δεδομένων Shiny GO.

4.4. GORILLA: Gene Ontology enRIchment analysis and visualiZation tool

Το GOrilla είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο για τον εντοπισμό και την οπτικοποίηση εμπλουτισμένων αποτελεσμάτων GO μιας λίστας γονιδίων. Ομοίως και αυτό αναλύει λίστες γονιδίων και εντοπίζει στατιστικά σημαντικές ομάδες αυτών που συμμετέχουν σε μονοπάτια βιοχημικών διαδικασιών και λειτουργιών ενός φυσιολογικού συστήματος.



GORilla is a tool for identifying and visualizing enriched GO terms in ranked lists of genes.

It can be run in one of two modes:

1. Searching for enriched GO terms that appear densely at the top of a ranked list of genes or
2. Searching for enriched GO terms in a target list of genes compared to a background list of genes.

For further details see [References](#).

[Running example](#) [Usage instructions](#) [GORilla News](#) [References](#) [Contact](#)

Step 1: Choose organism

Homo sapiens

Step 2: Choose running mode

- Single ranked list of genes Two unranked lists of genes (target and background lists)

Step 3: Paste a ranked list of gene/protein names

Names should be separated by an <ENTER>. The preferred format is gene symbol. Other supported formats are: gene and protein RefSeq, Uniprot, Unigene and Ensembl.

Εικόνα 14: Αρχική σελίδα Gorilla Gene Ontology enRIchment anaLysis and visualiZation tool.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών υψηλής επίδρασης

Οι μεταλλάξεις υψηλής επίδρασης συχνά οδηγούν σε περικομμένη πρωτεΐνη ή πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης αυτής. Έτσι, είναι πιο πιθανό να επηρεάζουν τη λειτουργία της κι επομένως να εμπλέκονται στην παθογένεση της ανδρικής υπογονιμότητας και συγκεκριμένα της ασθενοσπερμίας. Στην παρούσα μελέτη, στις μεταλλάξεις υψηλής επίδρασης συμπεριελήφθησαν αυτές που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου έναρξης (start lost), δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop gained), καταστροφή του φυσιολογικού κωδικονίου λήξης (stop lost) και αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της τριπλέτας (frameshift). Έτσι, 155 μεταλλάξεις χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως υψηλής επίδρασης και έπειτα έγινε κατηγοριοποίησή τους κι εφαρμόστηκαν περαιτέρω φίλτρα για τον εντοπισμό των πιο σημαντικών που είναι πιο πιθανό να συνεισφέρουν στον υπό μελέτη φαινότυπο.

Από τις 155 μεταλλάξεις υψηλής επίδρασης που εντοπίστηκαν αρχικά, αποκλείστηκαν τα μεταλλάγματα με συχνότητα αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό μεγαλύτερη του 5%. Έτσι, ταυτοποιήθηκαν 77 μεταλλάγματα. Τελικά, ταυτοποιήθηκαν 48 μεταλλάξεις, οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια.

- Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου έναρξης (start lost): Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν αρχικά μόνο στους ασθενοσπερμικούς και χαρακτηρίστηκαν ως (αγγλική ονομασία) ήταν 9. Με εφαρμογή του φίλτρου της συχνότητας αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, περιορίστηκαν σε 5. Αυτά χρησιμοποιήθηκαν τελικά και για περαιτέρω αξιολόγηση και μελέτη.

Πίνακας 3: Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου έναρξης και εντοπίστηκαν μόνο σε ασθενοσπερμικούς ασθενείς. Variant: μετάλλαγμα, Location: τοποθεσία εντοπισμού της μετάλλαξης πάνω στο γονιδίωμα, Gene: γονίδιο στο οποίο εφαρμόζεται η μετάλλαξη, Transcripts: μετάγραφα του γονιδίου που επηρεάζονται από τη μετάλλαξη, Ref (Reference): αρχικό αλληλόμορφο, Obs (Observed): παρατηρούμενο αλληλόμορφο, Frequency (Europe): συχνότητα εμφάνισης του παρατηρούμενου αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό

Variant	Location	Gene	Ref/Obs	Frequency (Europe)
rs144154094	10:134671148-134671148	TTC40	C/T	0.013
rs148181302	10:134671150-134671150	TTC40	T/C	0.013
rs144396749	11:55653617-55653617	TRIM51	A/C	0.030
rs3732619	3:153202348-153202348	C3orf79	G/A	0.022
rs141551402	6:150346607-150346607	RAET1L	T/C	0.000

- **Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop gained):** Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν αρχικά σε αυτή την κατηγορία ήταν 57. Έπειτα, με εφαρμογή του περιορισμού της συχνότητας αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (<5%) περιορίστηκαν σε 13. Αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για περαιτέρω αξιολόγηση και μελέτη του ρόλου τους στην ασθενοσπερμία.

Πίνακας 4: Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που οδηγούν σε δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης και παρατηρήθηκαν μόνο στους ασθενοσπερμικούς. Variant: μετάλλαγμα, Location: τοποθεσία εντοπισμού της μετάλλαξης πάνω στο γονιδίωμα, Gene: γονίδιο στο οποίο εφαρμόζεται η μετάλλαξη, Transcripts: μετάγραφα του γονιδίου που επηρεάζονται από τη μετάλλαξη, Ref (Reference): αρχικό αλληλόμορφο, Obs (Observed): παρατηρούμενο αλληλόμορφο, Frequency (Europe): συχνότητα εμφάνισης του παρατηρούμενου αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό

Variant	Location	Gene	Ref/Obs	Frequency (Europe)
rs116924453	11:55110903-55110903	OR4A16	C/A	0.010
rs199809991	11:60609622-60609622	CCDC86	C/T	0.0004203 (gnomAD)
rs117647993	11:66130847-66130847	RP11-867G23.8	G/A	0.009
rs34301344	13:50205029-50205029	ARL11	G/A	0.013
rs1331040573	14:77493769-77493769	IRF2BPL	G/A	-
rs11071990	15:68497597-68497597	CALML4	G/A	0.011
rs200894283	19:58370687-58370687	ZNF587	A/T	0.002
rs118169148	21:45725746-45725746	PFKL	C/T	0.047
rs370918329	22:23047145-23047145	IGLV3-22	-/TGATATA	-
rs371466267	5:462459-462459	EXOC3	C/T	0.003
rs112780453	6:158571611-158571611	SERAC1	A/T	0.012
rs148011353	8:124195352-124195352	FAM83A	G/T	0.005
rs41310667	X:69478432-69478432	P2RY4	C/T	0.020

- **Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου λήξης (stop lost):** Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν αρχικά σε αυτή την κατηγορία ήταν 11 και με εφαρμογή του περιορισμού συχνότητας αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (<5%) περιορίστηκαν σε 6. Όπως και παραπάνω, αυτά χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση και μελέτη.

Πίνακας 5: Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου λήξης και σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενοσπερμίας. Variant: μετάλλαγμα, Location: τοποθεσία εντοπισμού της μετάλλαξης πάνω στο γονιδίωμα, Gene: γονίδιο στο οποίο εφαρμόζεται η μετάλλαξη, Transcripts: μετάγραφα του γονιδίου που επηρεάζονται από τη μετάλλαξη, Ref (Reference): αρχικό αλληλόμορφο, Obs (Observed): παρατηρούμενο αλληλόμορφο, Frequency (Europe): συχνότητα εμφάνισης του παρατηρούμενου αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό

Variant	Location	Gene	Ref/Obs	Frequency (Europe)
rs34737621	11:47182742-47182743	11orf49	T/TT	0.000
rs202220073	17:71241321-71241328	C17orf80	GTAAGTA/GTA	0.016
rs16861256	1:183592594-183592594	ARPC5	G/A	0.032
rs1800051	4:15835844-15835844	CD38	A/C	0.032
rs757029594	7:95167070-95167070	ASB4	A/T	0.0002031
rs6977165	7:99269397-99269397	CYP3A5	T/C	0.031

- Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της τριπλέτας (**frameshift**). Οι μεταλλάξεις αυτής της κατηγορίας ήταν αρχικά 78 και με εφαρμογή του περιορισμού της συχνότητα αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (<5%) περιορίστηκαν σε 24.

Πίνακας 6: Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της τριπλέτας και σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενοσπερμίας. Variant: μετάλλαγμα, Location: τοποθεσία εντοπισμού της μετάλλαξης πάνω στο γονιδίωμα, Gene: γονίδιο στο οποίο εφαρμόζεται η μετάλλαξη, Transcripts: μετάγραφα του γονιδίου που επηρεάζονται από τη μετάλλαξη, Ref (Reference): αρχικό αλληλόμορφο, Obs (Observed): παρατηρούμενο αλληλόμορφο, Frequency (Europe): συχνότητα εμφάνισης του παρατηρούμενου αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό

Variant	Location	Gene	Ref/Obs	Frequency (Europe)
rs574687582	10:74452626-74452630	MCU	CTCT/CT	0.002
rs34737621	11:47182742-47182743	C11orf49	T/TT	-
rs573188148	12:113874567-113874569	SDSL	CC/C	0.009
rs370093235	12:11420332-11420333	PRB3	A/-	-
rs758165531	14:91681960-91681962	C14orf159	CC/C	0.001 (gnomAD)
rs1466289773	15:20739978-20739980	GOLGA6L6	CC/C	0.02141 (gnomAD)
rs765480707	15:23685225-23685226	GOLGA6L2	G/GG	-
rs774819361	16:2011653-2011667	NDUFB10	CCCCCAACCCCCCA/CCCCCA	0.0001495 (gnomAD)
rs147446323	17:38297453-38297456	CASC3	CTT/TT	0.032
-	17:71241320-71241324	C17orf80	CGTA/-	-
rs66906990	17:74073447-74073465	GALR2	GTCCTGGCCCGTCCTGGC/ GTCCTGGC	0.012
-	17:79995492-79995493	DCXR	T/TGT	-
-	19:17397501-17397501	ANKLE1	-/GGTG	-
rs529143735	19:24115405-24115416	ZNF726	ATAAGATAAGA/ATAAGA	0.000
rs66858778	19:49619102-49619103	LIN7B	A/-	0.000 (gnomAD)
-	19:56125164-56125165	ZNF865	G/GG	-
rs60985508	2:242163365-242163367	ANO7	CA/-	0.002
-	3:125725266-125725271	SLC41A3	CAATC/C	-

-	3:12942848-12942850	<i>IQSEC1</i>	GG/G	-
rs148224926	3:193081961-193081963	<i>ATP13A5</i>	CC/C	0.005
rs536915148	4:103789884-103789887	<i>UBE2D3</i>	TTT/TT	0.001
rs558358960	4:1388593-1388654	<i>CRIPAK</i>	CACGTGCCCATGTGGAGTG CCCGCCTG, CTCACGTGCCCATGTGGAGT GCCCCGCT, GCTCAC/CACGTGCCCATGT G, GAGTGCCCGCCTGCTCAC	0.022 (gnomAD)
rs554609300	7:16502201-16502202	<i>SOSTDC1</i>	T/-	0.003
-	8:98788168-98788183	<i>LAPTM4B</i>	GGGCTCCAGGCGAGG/GGG CTCCA, GGCGAGGAGGGCTCCAGGC GAGG	-

2. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών μέτριας επίδρασης

Οι προσθέσεις και οι αφαιρέσεις βάσεων, η αντικατάσταση βάσης και οι παρανοϊκές μεταλλάξεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως μεταλλάξεις μέτριας επίδρασης, διότι δυνητικά μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης (McLaren et al., 2010). Στην παρούσα έρευνα, μεταξύ άλλων μεταλλάξεων που βρέθηκαν μόνο σε ασθενοσπερμικούς άνδρες, ταυτοποιήθηκαν 715 μεταλλάξεις μέτριας επίδρασης και συγκεκριμένα παρανοηματικές. τη συνέχεια, εφαρμόστηκαν περαιτέρω φίλτρα για τον εντοπισμό των πιο σημαντικών από αυτές.

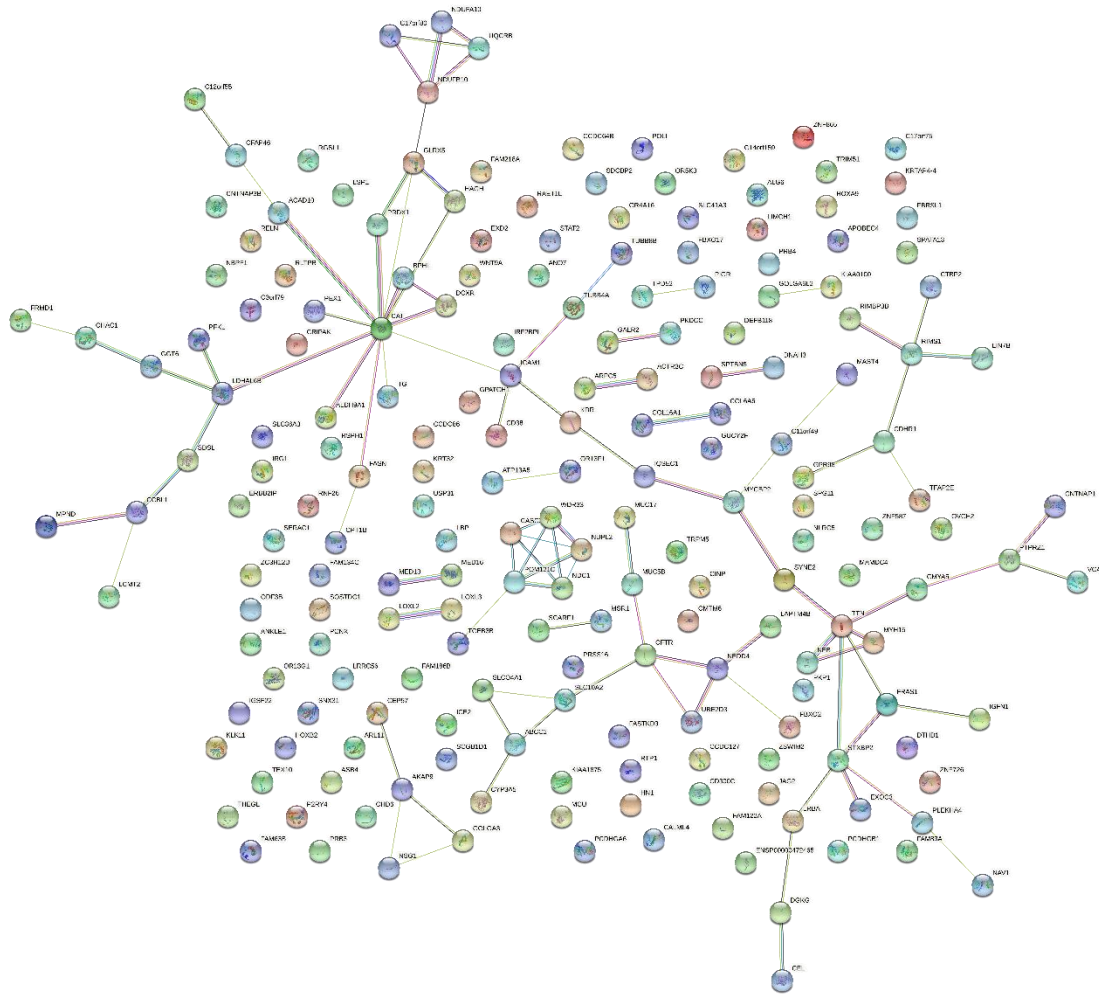
Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε και για τις μεταλλάξεις υψηλής επίδρασης. Μεταλλάξεις με συχνότητα αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό μεγαλύτερη του 5% αποκλείστηκαν. Έτσι, ταυτοποιήθηκαν 361 μεταλλάξεις και με την εφαρμογή των φίλτρων SIFT Score ≤ 0.05 , Polyphen Score ≥ 0.08 και MutationAssessor μετρίων ή υψηλών επιπέδων τελικά απομονώθηκαν 169 γονίδια. Ο πίνακας που παρουσιάζει τις παραπάνω μεταλλάξεις βρίσκεται στο παράρτημα ([Συμπληρωματικός Πίνακας 1](#)).

3. Μελέτη του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί μέτριας και υψηλής επίδρασης

Έπειτα από την επιλογή των πιο σημαντικών μεταλλάξεων (68 υψηλής + 169 μέτριας επίδρασης = 217), όπως εξηγείται παραπάνω, το επόμενο βήμα ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται αυτές οι μεταλλάξεις. Πιο συγκεκριμένα, η πλήρης λίστα των γονιδίων παρουσιάζεται στο παράρτημα ([Συμπληρωματικός Πίνακας 2](#)).

Η βάση δεδομένων STRING χρησιμοποιήθηκε ακόμη για μελέτη του δικτύου των αντίστοιχων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια που εντοπίστηκαν παραπάνω. Η συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιήθηκε καθώς τα δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη μοριακή

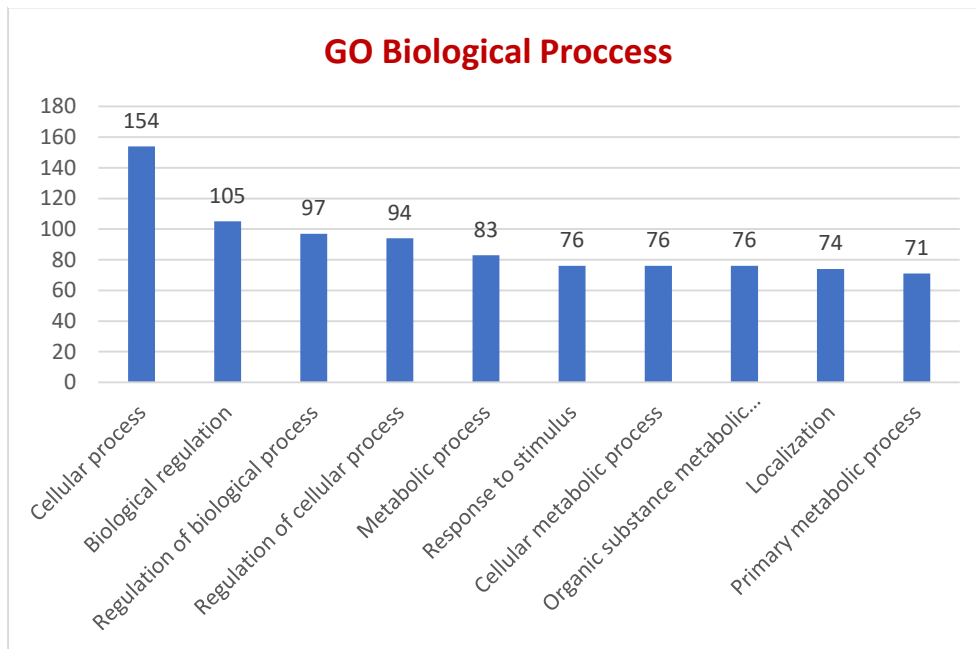
βάση πολύπλοκων ασθενειών (Farooq et. Al., 2021), όπως η ανδρική υπογονιμότητα. Το δίκτυο περιείχε 198 κόμβους/αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 15).



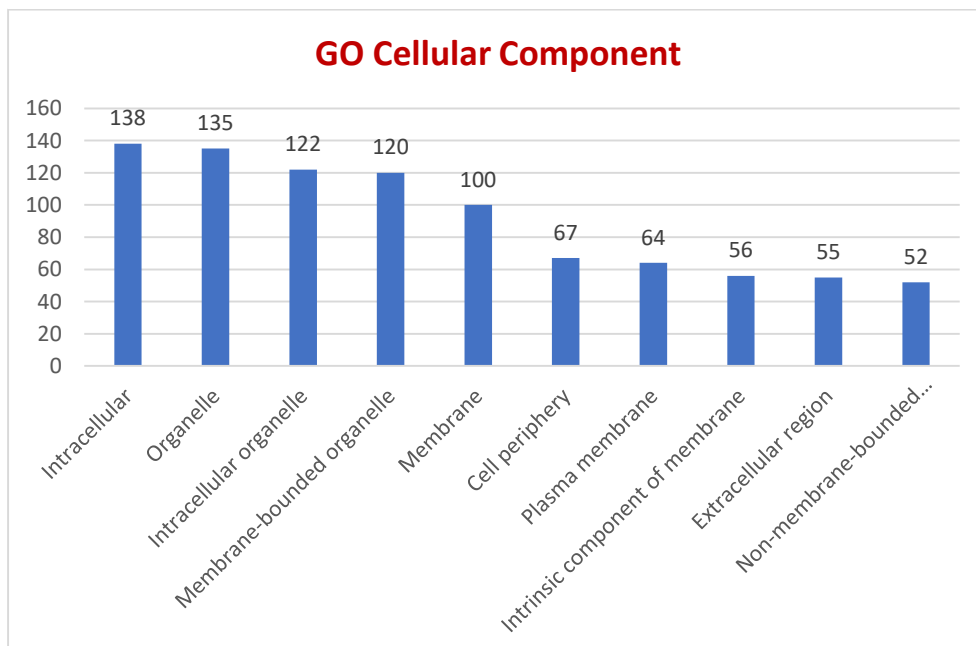
Εικόνα 15: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα σημαντικότερα γονίδια που βρέθηκαν παραπάνω.

Ακόμη, με την εισαγωγή των γονιδίων στη βάση δεδομένων ShinyGo 0.76 έγινε προσπάθεια να εντοπιστούν ομάδες γονιδίων που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα όσον αφορά τη μοριακή λειτουργία, τη βιολογική διαδικασία και τη θέση τους στο κύτταρο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες παρακάτω:

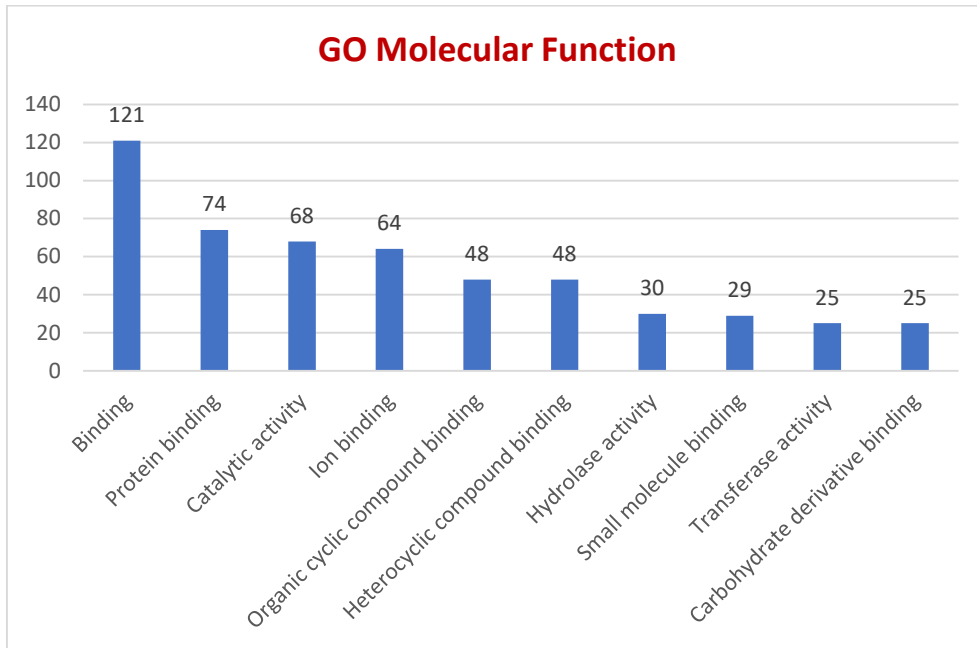
Διάγραμμα 1: Ομαδοποίηση γονιδίων με βιολογικές διεργασίες



Διάγραμμα 2: Ομαδοποίηση γονιδίων με συστατικά του κυττάρου

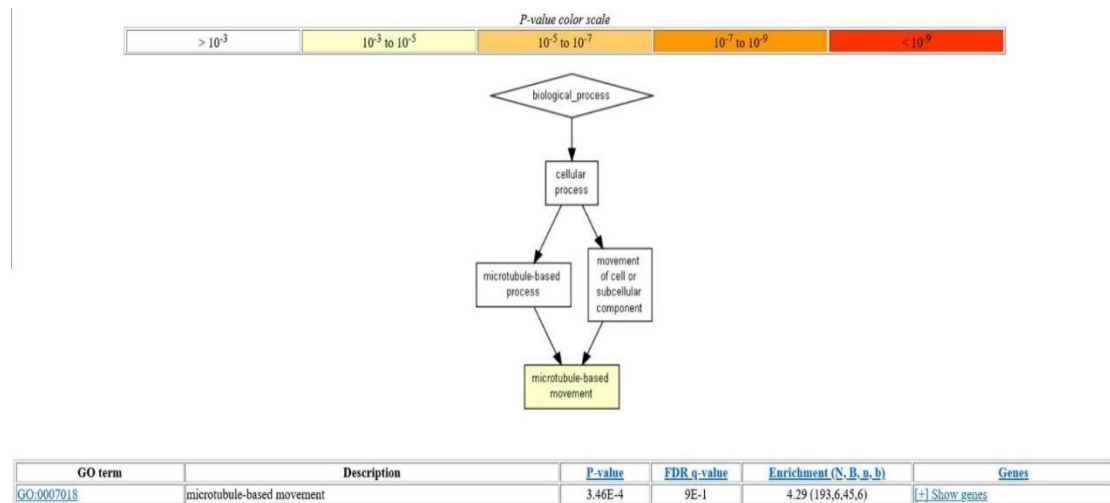


Διάγραμμα 3: Ομαδοποίηση γονιδίων με μοριακές λειτουργίες



Τέλος, για την οπτικοποίηση των εμπλουτισμένων αποτελεσμάτων από τη ShinyGO χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Gorilla της βάσης δεδομένων GO.

Πίνακας 7: Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων από τη ShinyGO με τη Gorilla



ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπογονιμότητα αποτελεί πράγματι ένα σημαντικό πρόβλημα τα τελευταία χρόνια, καθώς περίπου ένα στα έξι ζευγάρια έρχεται αντιμέτωπο με αυτή ενώ ταυτόχρονα υπολογίζεται ότι το 50% αυτών των περιπτώσεων οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Ειδικότερα, εκτιμάται ότι το 30% των περιπτώσεων οφείλεται μόνο στον ανδρικό παράγοντα, ενώ το 20% αποτελεί συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα. Στην Ελλάδα έχει βρεθεί πως το ποσοστό των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία και αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας αγγίζει το 10-15%. Συνεπώς, το ενδιαφέρον για έγκαιρη και αποτελεσματική πρόληψη, διάγνωση και αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας έχει αυξηθεί σημαντικά (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή που επηρεάζεται από γενετικούς, αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Είναι γεγονός εξάλλου, ότι η διαδικασία της σπερματογένεσης, ως πολύπλοκη διαδικασία, ρυθμίζεται και ελέγχεται από πλήθος γονιδίων και παραγόντων, οι οποίοι πρέπει να εκφράζονται σε συγκεκριμένα επίπεδα κάθε στιγμή. Οι βασικότερες αιτίες που φαίνεται να ευθύνονται για την εκδήλωση της ανδρικής υπογονιμότητας είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί του γονιδιώματος τόσο σε φυλετικά, όσο και σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Έτσι, η αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS) προτείνεται τα τελευταία χρόνια ως μια νέα πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, η οποία παρέχει ένα μεγάλο πλήθος δεδομένων, τα οποία μπορούν να φιλτραριστούν και στη συνέχεια να επιλεγθούν λειτουργικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε εμφάνιση παθολογικών φαινοτύπων. Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην περίπτωση της ανδρικής γονιμότητας ώστε να διερευνηθεί το γενετικό προφίλ υπογόνιμων ανδρών.

Στην παρούσα μελέτη, η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό και τη διερεύνηση μεταλλάξεων που ταυτοποιούνται μόνο σε ασθενοσπερμικούς ασθενείς και όχι σε νορμοσπερμικούς άνδρες και οι οποίες είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην εμφάνιση του φαινοτύπου.

Ειδικότερα, δείγματα σπέρματος και αίματος λήφθηκαν από εθελοντές σε συνεργασία με το κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης «Embryolab». Στη συνέχεια, έπειτα από σχετική εξέταση, τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: νορμοσπερμικά και ασθενοσπερμικά, σύμφωνα με την προοδευτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Ακολούθησε απομόνωση DNA και μετά την προετοιμασία των δειγμάτων αυτά στάλθηκαν για αλληλούχηση. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν μόνο σε ασθενοσπερμικά άτομα φιλτραρίστηκαν ώστε να εντοπιστούν εκείνες που είναι πιο πιθανό να εμπλέκονται στην εμφάνιση του συγκεκριμένου υποτύπου ανδρικής υπογονιμότητας στον ελληνικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μεταλλάξεις υψηλής και μέτριας επίδρασης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν οι παραπάνω μεταλλάξεις με σκοπό την διασαφήνιση της μοριακής βάσης της ασθενοσπερμίας.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον μάλιστα είναι το γεγονός ότι μεταξύ των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις, πολλά από αυτά έχει βρεθεί σε σχετικές μελέτες ότι συσχετίζονται με την ασθενοσπερμία ή την ανδρική υπογονιμότητα γενικότερα.

Πιο συγκεκριμένα, για τις μεταλλάξεις υψηλής επίδρασης, φαίνεται να ευθύνονται κυρίως τα παρακάτω γονίδια, των οποίων η λειτουργία περιγράφεται σύμφωνα με το GeneCards:

SERAC1: Serine Active Site Containing 1, πρωτεΐνη που περιέχει ενεργή θέση σερίνης. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο είναι μια πρωτεΐνη αναδιαμόρφωσης της φωσφατιδυλογλυκερόλης που υπάρχει στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων και των ενδοπλασματικών δικτύων, στα οποία πραγματοποιείται η ανταλλαγή φωσφολιπιδίων.

DCXR: Dicarboxyl And L-Xylulose Reductase, αναγωγή δικαρβονυλίου/L-ξυλουλόξης. Συμμετέχει στο μεταβολισμό της γλυκόζης μετατρέποντας την L-ξυλουλόξη σε ξυλιτόλη, η οποία αποτρέπει την εμφάνιση ωσμολυτικού στρες στα νεφρικά σωληνάρια. Η πρωτεΐνη DCXR μειώνει, επίσης, τις εξαιρετικά αντιδραστικές α-δικαρβονυλικές ενώσεις, εκτελώντας έτσι διπλό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και την αποτοξίνωση.

ARPC5: Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 5, 2/3 του συμπλόκου πρωτεΐνης που σχετίζεται με ακτίνη, υποσύνολο 5. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία από τις επτά υπομονάδες του συμπλόκου ανθρώπινης πρωτεΐνης Arp2/3. Το σύμπλοκο αυτό συμμετέχει στη ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης.

UBE2D3: Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D3, ένζυμο σύζευξης της ουβικιτίνης E2. Το ένζυμο σύζευξης της ουβικιτίνης συντελεί στην ουβικιτίνωση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53.

SOSTDC1: Sclerostin Domain Containing 1, πρωτεΐνη που περιέχει Sclerostin domain 1. Το γονίδιο αυτό είναι μέλος της οικογένειας σκληροστίνης. Κωδικοποιεί μια N-γλυκοζυλιωμένη εκκρινόμενη πρωτεΐνη, η οποία έχει μια C-τελική περιοχή που μοιάζει με κόμβο κυστεΐνης. Αυτή λειτουργεί ως ανταγωνιστής της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP), ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση.

Ορισμένες μελέτες που αποδεικνύουν τη συσχέτιση αυτών των γονιδίων υψηλής επίδρασης εμφανίζονται παρακάτω:

- **SERAC1**: Στην έρευνα (Schimenti et al., 2005) αποδείχθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο Serac1 προκαλούν στειρότητα σε αρσενικά ποντίκια. Με ανάλυση RT-PCR επιβεβαιώθηκε ότι το γονίδιο εκφράζεται στον όρχι και μπορεί να δεχθεί πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις. Βρέθηκε ότι σε knock-out ποντίκια για το γονίδιο αυτό, δημιουργούνται ελαττώματα στην ωρίμανση του ADAM2, ενός μορίου που καθορίζει τη φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος.
- **DCXR**: Η μελέτη (Lee et al., 2013) υποστηρίζει ότι το γονίδιο DCXR, επίσης γνωστό ως P34H, είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται από την επιδιδυμίδα στον άνθρωπο, εκκρίνεται στον αυλό της και προστίθεται στην επιφάνεια του σπέρματος κατά τη διέλευση του από την επιδιδυμίδα. Έτσι, η απώλεια αυτού του γονιδίου από το σπέρμα έχει συσχετιστεί με την ανδρική ιδιοπαθή υπογονιμότητα.

- **ARPC5**: Το γονίδιο Arpc5 αλληλεπιδρά με τα micro RNA και την πρωτεΐνη που σχετίζεται με την ακτίνη και ρυθμίζει τη μεταφραστική καταστολή κατά τη διαφοροποίηση των ανδρικών γεννητικών κυττάρων. Επίσης, εκφράζεται αποκλειστικά στα στρόγγυλα σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της μείωσης συμμετέχοντας στη φυσιολογική πορεία της σπερματογένεσης και στην ανδρική γονιμότητα σύμφωνα με την έρευνα (Pandey et al., 2019).
- **UBE2D3**: Το γονίδιο αυτό φαίνεται να μεταγράφεται εντονότερα στους όρχεις και στην επιδιδυμίδα. Σύμφωνα με την έρευνα πάνω σε αρουραίους (Tengowski et al., 2007) η χορήγηση θεοφυλλίνης και 1,3-δινιτροβενζολίου, ουσιών που προκαλούν στειρότητα στα αρσενικά μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης UBE2D3. Οι ουσίες που χορηγήθηκαν ευθύνονται για την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων στο σπερματοφόρο επιθήλιο. Γι' αυτό τα επίπεδα της UBE2D3 μετά την είσοδο αυτών των ουσιών στον οργανισμό αρχίζουν να μειώνονται, αφού ο οργανισμός δεν ήδη υφίσταται μεγάλο αριθμό αποπτώσεων.
- **SOSTDC1**: Η έρευνα (Pradhan et al., 2019) απέδειξε ότι η μείωση του Sostdc1 στα κύτταρα Sertoli των όρχεων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της ισχυρής σπερματογένεσης που σηματοδοτεί την εφηβεία. Η πρωτεΐνη SOSTDC1 είναι ένας διπλός ρυθμιστής BMP/Wnt και εκφράζεται κυρίως στους βρεφικούς όρχεις, από τους οποίους απουσιάζει η σπερματογένεση. Με την επιβολή της αύξησης της πρωτεΐνης SOSTDC1 προκλήθηκε μειωμένος αριθμός σπερματοζωαρίων. Έτσι, αποδείχθηκε ότι η αρνητική ρύθμιση του γονιδίου *SOSTDC1* είναι απαραίτητη στην εφηβεία για την φυσιολογική σπερματογένεση τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Αν το γονίδιο αυτό απορρυθμιστεί τότε πολύ πιθανό η γονιμότητα του ανδρός να επηρεαστεί.

Ακόμη, πολλά από αυτά τα γονίδια που εντοπίστηκαν παραπάνω εκφράζονται στους όρχεις, με ορισμένα να εμφανίζουν ακόμη και ιστοειδική έκφραση. Πιο συγκεκριμένα, μερικά από τα γονίδια που εμφανίζουν ιστοειδική έκφραση είναι τα εξής: *GOLGA6L2*, *C17orf80*.

GOLGA6L2: Golgin A6 Family Like 2, αυτοαντιγόνο Golgi, μέλος της οικογένειας Golgin, αντιγόνο καρίνου/όρχεων. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο δίκτυο cis-Golgi. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με το αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα και το βουβωνικό κοκκίωμα.

C17orf80: Chromosome 17 Open Reading Frame 80, ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 80 του χρωμοσώματος 17. Παράγει μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μετανάστευση των κυττάρων και σχετίζεται με ασθένειες όπως η μεταπολιομυελίτιδα και το σύνδρομο της ιππουρίδας, το οποίο χαρακτηρίζεται από εμφάνιση δισκοκήλης στην συνέχεια του μυελού τον οστών, την ιππουρίδα.

Όσον αφορά τα γονίδια στα οποία εντοπίστηκαν παρανοηματικές μεταλλάξεις στους ασθενοσπερμικούς ασθενείς πολλά γονίδια επίσης έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την ασθενοσπερμία ή την ανδρική υπογονιμότητα. Ορισμένα από αυτά είναι:

CAT: Catalase, καταλάση, πρωτεΐνη που εκκρίνεται από την επιδιδυμίδα και συνδέεται με το σπέρμα. Η καταλάση είναι ένα βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο και βοηθά στην άμυνα του οργανισμού έναντι στο οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες παίζει ρόλο στην ανάπτυξη πολλών χρόνιων ή ασθενειών όψιμης έναρξης όπως ο διαβήτης, το άσθμα, η νόσος Alzheimer, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι καρκίνοι.

GOLGA3: Golgin A3, Golgi Complex-Associated Protein, πρωτεΐνη που σχετίζεται με το σύμπλεγμα Golgi, αυτοαντιγόνο του Golgi. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Golgi και των μικροσωληνίσκων πιστεύεται ότι είναι σημαντικές για την αναδιοργάνωση του Golgi μετά τη θραύση του κατά τη μίτωση. Η πρωτεΐνη golgin που εντοπίζεται στο Golgi παίζει ρόλο στην πυρηνική μεταφορά και τον εντοπισμό της συσκευής Golgi.

ICAM1: Intercellular Adhesion Molecule 1, μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης 1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια και εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η γλυκοπρωτεΐνη συνδέεται με ιντεγκρίνες. Οι ασθένειες που σχετίζονται με το ICAM1 περιλαμβάνουν την ελονοσία και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

PRDX1: Peroxiredoxin 1, υπεροξειρεδοξίνη. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο είναι μια αναγωγάση του υπεροξειδίου που εξαρτάται από τη θειορεδοξίνη 2. Είναι μέλος της οικογένειας των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπεροξειρεδοξίνης. Μπορεί να έχει αντιοξειδωτικό προστατευτικό ρόλο στα κύτταρα και μπορεί να συμβάλλει στην αντι-ική δράση των CD8⁽⁺⁾ T-κυττάρων. Μπορεί, επίσης, να προκαλέσει πολλαπλασιασμό, συντελώντας στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου.

DEFB118: Defensin Beta 118, βήτα ντιφενσίνη. Οι βήτα-ντιφενσίνες είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια. Προστατεύουν τους ιστούς και τα όργανα από μόλυνση από πλήθος μικροοργανισμών. Η έκφραση αυτού του γονιδίου ρυθμίζεται από το ανδρογόνο και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί συνδέεται με το σπέρμα και επιδεικνύει αντιβακτηριακή δράση κατά του E. coli. Αυτό το γονίδιο βρίσκεται σε ένα σύμπλεγμα με άλλα γονίδια β-ντιφενσίνης στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 20.

RSPH1: Radial Spoke Head Component 1, συστατικό της κεφαλής των ακτινωτών ακτίνων 1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια όξινη πρωτεΐνη που σχετίζεται με το μειωτικό μεταφασικό χρωμόσωμα στους άνδρες. Εκφράζεται σε ιστούς με κινητές βλεφαρίδες ή μαστίγια συμπεριλαμβανομένης της τραχείας, των πνευμόνων, των τριχιδίων των αεραγωγών και των όρχεων. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο οδηγούν σε πρωτοπαθή βλεφαριδική δυσκινησία-24.

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, ρυθμιστής της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας του καναλιού που ευθύνεται για την κυστική ίνωση. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί ανήκει στα μέλη της υπεροικογένειας πρωτεϊνών που φέρουν κασέτα σύνδεσης ABC (ATP-Binding Cassette) και λειτουργεί σαν κανάλι χλωρίου. Ελέγχει, λοιπόν, την έκκριση και απορρόφηση ιόντων και νερού στους

επιθηλιακούς ιστούς. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο προκαλούν κυστική ίνωση και συγγενή αμφοτερόπλευρη απλασία του Vas Deferens.

Κάποιες ενδεικτικές μελέτες που αποδεικνύουν τη συσχέτιση αυτών των γονιδίων μέτριας επίδρασης εμφανίζονται παρακάτω:

- **CAT**: Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η συγκέντρωση καταλάσης στο σπέρμα εμφανίζεται διαφορετική του φυσιολογικού στους υπογόνιμους άνδρες με ασθenoσπερμία ή μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Bousnane et al., 2017). Η μείωση αυτής της πρωτεΐνης οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση ROS, τα οποία ευθύνονται για μειωμένη λειτουργία του σπέρματος. Επίσης, ο πολυμορφισμός CAT SNP C-262T συνδέεται δυνητικά με αυξημένο κίνδυνο ανδρικής υπογονιμότητας σύμφωνα με την έρευνα (García Rodríguez et al., 2019).
- **GOLGA3**: Σε πείραμα με διαγονιδιακούς ποντικούς που παρήγαγαν πρωτεΐνη GOLGA3 μειωμένου μεγέθους η πρωτεΐνη εντοπίστηκε έντονα στους όρχεις, όπως συμβαίνει και φυσιολογικά. Ωστόσο, τα παχυτενικά σπερματοκύτταρα που δε μπορούσαν να εκφράσουν την τροποποιημένη πρωτεΐνη οδηγούνταν σε απόπτωση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το γονίδιο GOLGA3 ευθύνεται για την επιβίωση και σωστή λειτουργία των σπερματοκυττάρων και συνεπώς καθορίζουν τη γονιμότητα (Banu et al., 2002).
- **ICAM1**: Η μετάλλαξη στο γονίδιο ICAM-1 rs5498 (1462A>G) βρέθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Το ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης ICAM-1 που παράγεται από το προς μελέτη γονίδιο διευκολύνει την προσκόλληση της αιμοσφαιρίνης πάνω στα κύτταρα και βρίσκεται στο φραγμό μεταξύ αίματος-όρχεων, προστατεύοντας τους όρχεις από βλαβερά στοιχεία. Η μετάλλαξη που προαναφέρθηκε φαίνεται να αλλάζει σημαντικά τη λειτουργία του μορίου ICAM-1, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης υπογονιμότητας (Bayoumy et al., 2020).
- **PRDX1**: Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ROS στο σπέρμα εξασθενεί τη λειτουργία του. Σε μελέτη ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα βρέθηκε ότι τα επίπεδα πρωτεϊνών PRDX1 είναι μειωμένα, με υψηλά ποσοστά οξειδωσης τηςθειόλης, αφού δεν επαρκούν οι PRDX1 για να τις ανάγουν. Έτσι, τα σπερματοζώαρια μένουν εκτεθειμένα στο οξειδωτικό στρες και υπολειτουργούν υποθάλποντας την εμφάνιση οποιασδήποτε μορφής υπογονιμότητας (Gong et al., 2012).
- **DEFB118**: Η ανθρώπινη βήτα-ντεφενσίνη 118 είναι ρυθμιζόμενη από ανδρογόνα πρωτεΐνη, βρίσκεται στην επιδιδυμίδα και παίζει ρόλο στη δέσμευση του σπέρματος. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το σπέρμα εμπλέκονται κυρίως στην προετοιμασία του σπέρματος για γονιμοποίηση. Ελέγχουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών, τη συγκέντρωση αλάτων και ιόντων και προσφέρουν άμυνα κατά των ξενιστών για την άρτια λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Συνεπώς, μειωμένα επίπεδα αυτής της

πρωτεΐνης επηρεάζουν άμεσα την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος.(Yenugu et al., 2004)

- **RSPH1**: Το γονίδιο *RSPH1* κωδικοποιεί ένα συστατικό της κεφαλής των ακτινωτών ακτίνων 1 του σπέρματος. Το συστατικό αυτό αν εκλείπει αρχίζει να εκδηλώνεται ο φαινότυπος της πρωτοπαθούς βλεφαροειδούς δυσκινησίας, η οποία χαρακτηρίζεται από ανώμαλη κινητικότητα των βλεφαρίδων και των μαστιγίων, Οι δυσκίνητες βλεφαρίδες της σάλπιγγας και τα μαστίγια του σπέρματος δυσχεραίνουν τη μεταφορά των σπερματοκυττάρων προκαλώντας υπογονιμότητα που μπορεί να επηρεάσει και τα δύο φύλα αντίστοιχα στην ενήλικη ζωή (Οπουfriadis et al., 2014).
- **CFTR**: Το CFTR ευθύνεται για την προοδευτική κινητικότητα του σπέρματος και συντελεί στη φυσιολογική διαδικασία σπερματογένεσης, καθώς συμμετέχει στο μονοπάτι απόκρισης στο σηματοδοτικό μόριο cAMP (Jiang et al., 2014). Ακόμη, η μελέτη (C.-Y. Li et al., 2010) απέδειξε ότι το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που εκφράζουν το CFTR σε γόνιμους άνδρες ήταν σημαντικά υψηλότερο από υπογόνιμους άνδρες με διαγνωσμένη τερατοσπερμία, ασθενοτερατοσπερμία, ασθενοσπερμία και ολιγοσπερμία.

Ακόμη, πολλά από αυτά τα γονίδια παρατηρείται ότι εκφράζονται στους όρχεις. Πολλά από αυτά εμφανίζουν επίσης ιστοειδική έκφραση. Η ιστοειδική αυτή έκφραση εντοπίζεται κυρίως στα γονίδια: *LRRC56*, *FAM186B*, *LDHAL6B*, *RGSL1*, *APOBEC4*, *OR13G1*, *DEFB118*, *FAM230A*, *RIMBP3B*, *ZSWIM2*, *THEGL*, *SLC36A3*.

FAM186B: Family With Sequence Similarity 186 Member B, οικογένεια με ομοιότητα αλληλουχίας 186, μέλος B. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και παράγει πολλά διαφορετικά μετάγραφα χάρη στο εναλλακτικό μάτισμα. Η ακριβής λειτουργία του δεν έχει βρεθεί ακόμη.

RGSL1: Regulator Of G Protein Signaling Like 1, ρυθμιστής σαν αυτό της σηματοδότησης της πρωτεΐνης G 1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που φαίνεται να είναι αναπόσπαστο συστατικό της μεμβράνης και συμμετέχει στη σηματοδότηση GPCR (G protein coupled Receptor) και γενικά τη μεταγωγή σήματος. Οι ασθένειες που σχετίζονται με αυτό το γονίδιο αφορούν την οικογενή υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια 2.

APOBEC4: Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Polypeptide Like 4, ένζυμο επεξεργασίας του mRNA της απιλοποπρωτεΐνης B (πιθανόν το καταλυτικό πεπτιδίο του ενζύμου αυτού). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται είναι μέλος της οικογένειας των απαμινασών πολυνουκλεοτιδίων (δεοξυ)κυτιδίνης και μετατρέπει την κυτιδίνη σε ουριδίνη.

OR13G1: Olfactory Receptor Family 13 Subfamily G Member 1, οικογένεια οσφρητικών υποδοχέων 13, υποοικογένεια G, μέλος 1. Η πρωτεΐνη που παράγει το γονίδιο αυτό είναι διαμεμβρανικός υποδοχέας οσφρητικών σημάτων και συνήθως είναι συνδεδεμένος με μια G πρωτεΐνη (GPCR).

FAM230A: Family With Sequence Similarity 230 Member A, οικογένεια με ομοιότητα αλληλουχίας 230, μέλος A. Το γονίδιο αυτό παράγει RNA το οποίο συγκαταλέγεται στα lncRNAs. Η ακριβής λειτουργία του δεν έχει βρεθεί ακόμη.

RIMBP3B: RIMS Binding Protein 3B, πρωτεΐνη που συνδέεται με το RIMS. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο προβλέπεται ότι ενεργοποιεί την ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα βενζοδιαζεπίνης. Πιθανολογείται, μάλιστα, να συμμετέχει στη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη σπερματιδίων. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο, είναι ενεργή μέσα στον πυρήνα.

ZSWIM2: Zinc Finger SWIM-Type Containing 2, πρωτεΐνη που περιέχει Zinc-Finger SWIM, τύπος 2. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό φαίνεται να ενεργοποιεί τη δράση μεταφοράς της ουβικιτίνης. Έτσι, συμμετέχει στην αποπτωτική διαδικασία και την πολυουβικιτινίωση πρωτεϊνών.

SLC36A3: Solute Carrier Family 36 Member 3, οικογένεια φορέων διαλυτών ουσιών 36, μέλος 6. Το γονίδιο αυτό παράγει μια πρωτεΐνη που φαίνεται να ενεργοποιεί τη δράση διαμεμβρανικού μεταφορέα των αμινοξέων και εμπλέκεται στη διαμεμβρανική μεταφορά πρωτονίων.

Παρόλα αυτά, σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι η παρούσα μελέτη έχει κάποιους περιορισμούς. Ένας από αυτούς αφορά τον περιορισμένο αριθμό ατόμων που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 10 δείγματα από νορμοσπερμικούς και 5 από μη νορμοσπερμικούς άνδρες και δεν έγινε validation για μελλοντικές προοπτικές.

Με την εισαγωγή όλων των γονιδίων είτε υψηλής είτε μέτριας επίδρασης που φαίνονται στον [Συμπληρωματικό πίνακα 2 και 3](#) στη βάση δεδομένων STRING βρέθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν αυτά τα γονίδια. Ο αριθμός των αλληλεπιδράσεων φτάνει τους 198 και μπορεί να χαρακτηριστεί ως αξιοσημείωτος σε σύγκριση με το συνολικό αριθμό σημαντικών γονιδίων που εισήχθησαν στη βάση δεδομένων και είναι 216. Συνεπώς, φαίνεται να υπάρχουν έντονες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί.

Έπειτα, τα ίδια γονίδια εισήχθησαν στη βάση δεδομένων ShinyGO με σκοπό την διερεύνηση της συμμετοχής τους σε ποικίλες μοριακές οδούς. Συγκεκριμένα, οι κατηγορίες οι οποίες μελετήθηκαν είναι οι βιολογικές διεργασίες, τα συστατικά των κυττάρων και οι μοριακές λειτουργίες. Πράγματι βρέθηκε ότι πολλά από αυτά συμμετείχαν σε βιολογικές διεργασίες, καθώς 154 από τα 216 συμμετέχουν στην κυτταρική πρόοδο, 105 στη βιολογική ρύθμιση, 97 στη ρύθμιση της βιολογικής προόδου, 94 στη ρύθμιση της κυτταρικής προόδου, 83 στην πρόοδο του μεταβολισμού και 76 πρωτεΐνες κάθε φορά ανιχνεύθηκαν σε μονοπάτια απόκρισης σε διεγερτικά ερεθίσματα, στην πρόοδο του μεταβολισμού του κυττάρου και στην πρόοδο του μεταβολισμού οργανικών ουσιών. Συνεχίζοντας, μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών ταυτοποιήθηκαν και ως συστατικά των κυττάρων. Ειδικότερα, 138 εντοπίστηκαν ενδοκυτταρικά, 135 σε διάφορα οργανίδια, 122 μέσα σε υποκυτταρικά

οργανίδια, 120 σε οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη, 100 εντός διαφόρων μεμβρανών και μερικά χαμηλότερα ποσοστά όπως 67 στην περιφέρεια του κυττάρου και 64 αποκλειστικά στην πλασματική μεμβράνη. Η τελευταία κατηγορία που εξετάστηκε, δηλαδή η μοριακές λειτουργίες, συγκεντρώνει τις περισσότερες πρωτεΐνες στην κατηγορία των συνδετικών μορίων και περιέχει 121 από τις 216. Έπειτα, 74 εμφανίζονται να έχουν ρόλο σύνδεσης με άλλες πρωτεΐνες, 68 να έχουν καταλυτική ενεργότητα, ενώ 64 να συνδέονται με ιόντα. Συνεπώς, τεράστιο ποσοστό των γονιδίων που μελετήθηκαν συνολικά φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική διεκπεραίωση των βιολογικών διεργασιών, τη σύνθεση του κυττάρου και τις λειτουργίες που αυτό επιτελεί. Επομένως, τα γονίδια αυτά πράγματι αν αλλοιωθούν μπορούν να διαστρεβλώσουν τη λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού και να οδηγήσουν σε έναν πολύ διαφορετικό φαινότυπο, όπως αυτό της ασθenoσπερμίας.

Τέλος, για να φανούν τα αποτελέσματα της έρευνας, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη ShinyGO εισήχθησαν σε ένα εργαλείο της βάσης δεδομένων GO, το Gorilla: Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool το οποίο ανέδειξε το σημαντικό ρόλο των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν οι μεταλλάξεις στη λειτουργία των μικροσωληνίσκων.

Γενικά, η μεταφορά διαμέσου του βραχίονα (intra-manchette transport) και εντός των μαστιγίων (intra-flagellar transport) είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και είναι ζωτικής σημασίας για την ανδρική γονιμότητα, καθώς απουσιάζει στο ώριμο σπέρμα. Σε αυτή τη διαδικασία μεταφέρονται μέσω των μικροσωληνίσκων δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν την ουρά του σπέρματος περιοχή του βασικού σώματος όπου αποθηκεύονται. Οι μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τις δομές των μικροσωληνίσκων που συμμετέχουν στην ενδομαστιγική μεταφορά είναι υπεύθυνες για ανωμαλίες της κεφαλής και της ουράς του σπέρματος, επειδή μπορούν να διαταράξουν την παροχή πρωτεϊνών στη σωστή θέση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και έτσι να οδηγήσουν σε ανωμαλίες στο ώριμο σπέρμα.

Ακόμη, το αξόνημα είναι μια βασική δομή που παίζει σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα του σπέρματος. Αποτελεί το εσωτερικό του πυρήνα των βλεφαρίδων και των μαστιγίων και δημιουργείται από μικροσωληνίσκους. Η ρύθμιση της ακτινωτής κίνησης ελέγχεται από τη δυνεΐνη. Οι δομές των αξονημάτων παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη μορφολογία και τη λειτουργία του μαστιγίου. Οποιαδήποτε αλλαγή στην υπερδομή τους μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στην ουρά του σπέρματος και να αλλάξει τη μορφολογία του, προκαλώντας σοβαρές διαταραχές της κινητικότητας και άρα ασθenoσπερμία.

Συσσωρεύοντας όλα αυτά τα δεδομένα προκύπτει το συμπέρασμα πως οι μικροσωληνίσκοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανδρική γονιμότητα και διασφαλίζουν την επιτυχή κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Ο συνολικός αριθμός μικροσωληνίσκων στη μιτωτική άτρακτο είναι ένας κρίσιμος παράγοντας ελέγχου στην κυτταρική διαίρεση. Εάν ο αριθμός των

μικροσωληνίσκων αλλάζει σημαντικά, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση της κυτταρικής διαίρεσης με επακόλουθες παθολογικές εξελίξεις. Κατά τον σχηματισμό της ουράς του σπέρματος ακόμη, το βασικό σώμα (το οποίο είναι συναρμολογημένο μέσα στο κεντρόσωμα της σπερματίδας) συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους. Οι μικροσωληνίσκοι που υπάρχουν σε αυτή την περιοχή είναι υπεύθυνοι για τη διακίνηση κυστιδίων από τη συσκευή Golgi στο ακροσωμάτιο.

Επιπλέον, η ουρά είναι ένα μακρύ μαστίγιο και ο κεντρικός άξονας αυτού του μαστιγίου αναδύεται από ένα βασικό σώμα που βρίσκεται πίσω από τον πυρήνα. Για την κινητικότητα του σπέρματος απαιτείται η ολίσθηση των εξωτερικών διπλών μικροσωληνίσκων στο μαστίγιο του σπέρματος.

Μεταλλάξεις αρκετών γονιδίων που απαιτούνται για την ανάπτυξη του σπέρματος ή η απουσία των αντίστοιχων πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με την ανδρική γονιμότητα διαταράσσοντας τις μικροσωληνιακές λειτουργίες κατά τον σχηματισμό της κεφαλής του σπέρματος ή/και του βραχίονα (manchette) και επηρεάζοντας τη φυσιολογική κινητικότητα του σπέρματος.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία έχει μελετηθεί και εξακριβωθεί ο ρόλος πολλών γονιδίων, τα οποία δημιουργούν ένα γενετικό προφίλ που ευθύνεται για την εμφάνιση της ασθενοσπερμίας στους άνδρες. Τα γονίδια αυτά βρέθηκαν μέσω αλληλούχησης νέας γενιάς, μιας πολλά υποσχόμενης μεθόδου στην προσπάθεια γρήγορης, οικονομικής και αποτελεσματικής χαρτογράφησης του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Έχει πραγματοποιηθεί πρόοδος στον χαρακτηρισμό του ρόλου σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με την ασθενοσπερμία. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση στο γενετικό υπόβαθρο των ανδρών, καθώς αρκετές από τις έρευνες αποκλείουν, παρά ταυτοποιούν γονίδια που να σχετίζονται με την υπογονιμότητα. Η αλληλούχηση γονιδιωμάτων περισσότερων ασθενοσπερμικών ανδρών με τη χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς και μελέτη των επιμέρους γονιδίων θα μπορούσε να δώσει ισχυρότερα αποτελέσματα, καθώς το δείγμα θα είναι στατιστικά πιο σημαντικό. Η ανάλυση των γονιδίων που καθορίζουν την γονιμότητα στους άνδρες θα συμβάλει στην προσπάθεια προσδιορισμού των αιτιών της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και συγκεκριμένα της ασθενοσπερμίας. Επίσης, θα δώσει τη δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης και χρήσιμες πληροφορίες για τη δημιουργία θεραπειών, ώστε να περιοριστεί το πρόβλημα της υπογονιμότητας των ζευγαριών. Έτσι, η επιστήμη θα σταθεί επάξιος υποστηρικτής της κοινωνίας βοηθώντας στην επίλυση των προβλημάτων που διατρέχουν τα μέλη που την απαρτίζουν.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συμπληρωματικός πίνακας 1: Πολυμορφισμοί μέτριας επίδρασης

Variant	Location	Gene	Ref/ Obs	Frequency (Europe)	Mutation Assessor
rs147566977	10:101591492- 101591492	ABCC2	G/T	0.000	high
rs183080326	10:126715412- 126715412	CTBP2	G/A	0.000	-
rs151247898	10:134663933- 134663933	TTC40	A/G	0.010	-
rs45584033	10:85974231- 85974231	CDHR1	C/T	0.037	medium
-	11:119206997- 119206997	RNF26	A/G	-	
rs12363494, COSV71597196	11:1262189- 1262189	MUC5B	C/T	0.018	medium
rs376486492	11:134856406- 134856406	AP0030 62.1	G/C	0.000 (gnomAD)	-
rs111397851	11:18735480- 18735480	IGSF22	G/A	0.026	-
rs144778074	11:1901454- 1901454	LSP1	T/C	0.0004208 (gnomAD)	medium
rs201710397	11:2432686- 2432686	TRPM5	G/A	0.000	medium
rs549239410,COSV 53812523	11:34473702- 34473702	CAT	G/T	0.0001056 (gnomAD)	medium
rs573973826	11:51435628- 51435628	OR4A8P	G/T	0.001	-
rs116866926	11:541601- 541601	LRRC56	G/C	0.027	medium
rs2232940	11:61959531- 61959531	SCGB1D 1	A/C	0.001	-
rs61759818	11:7721974- 7721974	OVCH2	C/T	0.031	-
rs368273217	11:95546119- 95546119	CEP57	C/G	6.16e-05 (gnomAD)	medium
rs34245489	12:112186274- 112186274	ACAD10	C/T	0.034	medium
rs757874200,COSV 54394900	12:11461583- 11461583	PRB4	C/G	0.000 (gnomAD)	-
rs11146955	12:133158097- 133158097	FBRSL1	T/C	0.009	medium
rs148310828	12:133354313- 133354313	GOLGA3	T/C	0.039	medium

rs141974060	12:49998097-49998097	FAM186B	C/G	0.001	medium
rs143159503	12:56748338-56748338	STAT2	G/T	0,04395 (gnomAD)	medium
rs144682418	12:97137814-97137814	C12orf55	A/G	0.0004816 (gnomAD)	-
rs56398830, CM952446	13:103701690-103701690	SLC10A2	G/A	0.020	medium
rs80073311	13:24823928-24823928	SPATA13	T/C	0.022	medium
rs116855637	13:77531179-77531179	IRG1	A/G	0.012	medium
rs34474844	13:77699596-77699596	MYCBP2	T/C	0.043	-
rs11544426	14:102825773-102825773	CINP	G/C	0.032	medium
rs34728766	14:105609400-105609400	JAG2	G/A	0.010	medium
rs1271943806	14:22111791-22111791	TRAV1-2	T/C	0.000 (gnomAD)	-
-	14:22386683-22386683	TRAV13-2	T/G	-	-
rs764521226	14:64483308-64483308	SYNE2	T/C	0.0001443	medium
rs142445480, COSV57280400	14:69695782-69695782	EXD2	C/T	0,03526 (gnomAD)	medium
-	14:71514622-71514622	PCNX	T/G	-	No info
rs577438813	14:96001611-96001611	GLRX5	C/T	0.000	high
rs1360257158	15:41247763-41247763	CHAC1	G/C	0,008807 (gnomAD)	-
rs200163654	15:42148796-42148796	SPTBN5	T/A	0.007	medium
rs189031579, COSV59789517	15:43622341-43622341	LCMT2	G/C	0.003	medium
rs78183930, CM150174	15:44918690-44918690	SPG11	C/T	0.011	medium
-	15:56208494-56208494	NEDD4	C/A	-	-
rs182620597	15:59063905-59063905	FAM63B	G/A	0.002	-
rs148423958	15:59499575-59499575	LDHAL6B	G/A	0.001 (gnomAD)	medium
-	15:60734698-60734698	NARG2	T/C	-	-
-	16:1872352-1872352	HAGH	G/T	-	-
rs148202152	16:21042438-21042438	DNAH3	T/A	0.003	medium

rs750241188	16:23080680-23080680	USP31	G/A	0.000 (gnomAD)	medium
rs71386699	16:3085326-3085326	CCDC64B	C/T	0.026	-
rs117950337	16:57093436-57093436	NLRC5	G/T	0.023	medium
rs118040419	16:67683449-67683449	RLTPR	A/G	0.017	-
rs61738531	17:1538714-1538714	SCARF1	T/G	0.015	medium
-	17:26960325-26960325	KIAA0100	T/G	-	-
rs1211337706	17:30651775-30651775	C17orf75	G/A	0.000 (gnomAD)	-
rs111435962	17:39316930-39316930	KRTAP4-4	C/A	0.005	high
rs11078993,COSV56786810	17:39619193-39619193	KRT32	C/T	0.047	high
rs546909587	17:40761183-40761183	FAM134C	T/G	0.000	-
rs751722877	17:40840609-40840609	CNTNAP1	G/T	8.79e-06 (gnomAD)	medium
rs62066362	17:4463713-4463713	GGT6	A/G	0.014	medium
rs1204484247	17:46620458-46620458	HOXB2	A/G	0,06496 (gnomAD)	medium
rs764340739	17:60045499-60045499	MED13	T/C	8.83e-06 (gnomAD)	medium
rs11870245	17:72540936-72540936	CD300C	G/A	0.012	medium
rs117208625	17:73144665-73144665	HN1	C/A	0.006	-
rs1033326712	17:80049188-80049188	FASN	G/A	0.000 (gnomAD)	high
rs61743415	18:44559844-44559844	TCEB3B	G/A	0.021	medium
rs200370756	18:48190-48190	RP11-683L23.1	C/T	0.0002501 (gnomAD)	-
rs781161881	18:51820755-51820755	POLI	A/G	0.000 (gnomAD)	medium
rs146134321	19:10395141-10395141	ICAM1	G/A	0.002	medium
rs779820798,COSV50113935	19:33602732-33602732	GPATCH1	C/T	0,06154 (gnomAD)	medium
rs199622732	19:39439286-39439286	FBXO17	C/G	0.002	medium
rs199622732	19:39439286-39439286	CTC-360G5.8	C/G	0.002	medium
rs34522164	19:4359191-4359191	MPND	C/T	0.041	medium

rs766593638,COS V54363328	19:49356995- 49356995	PLEKHA4	G/A	0.000 (gnomAD)	medium
rs921664821	19:51527565- 51527565	KLK11	G/A	0.000 (gnomAD)	medium
rs61741669	19:6496168- 6496168	TUBB4A	G/A	0.001	-
rs35490401	19:7712287- 7712287	STXBP2	G/C	0.002 (gnomAD)	medium
-	19:891083- 891083	MED16	A/G	-	-
rs749821736	1:11710125- 11710125	FBXO2	A/G	8,81E-03	medium
rs1143660,COSV6 1340420	1:165648710- 165648710	ALDH9A1	G/A	0.032	-
rs9730080	1:16918457- 16918457	NBPF1	G/C	0.009 (gnomAD)	-
rs61759906	1:182440473- 182440473	RGSL1	G/C	0.006	-
rs16861394	1:183617693- 183617693	APOBEC4	G/A	0.032	medium
rs11584104	1:201174215- 201174215	IGFN1	C/A	0.043	medium
rs61818256	1:201294910- 201294910	PKP1	C/T	0.013	medium
rs144676054	1:201779182- 201779182	NAV1	G/A	8.79e-06 (gnomAD)	medium
rs145781175	1:207108056- 207108056	PIGR	C/T	0.002	medium
rs145836311	1:228109247- 228109247	WNT9A	C/T	0.001	medium
rs768400566,COS V99069603	1:247836117- 247836117	OR13G1	G/A	0.000 (gnomAD)	medium
rs770736773,COS V54714760	1:32148545- 32148545	COL16A1	G/C	0,02653 (gnomAD)	medium
rs145119239	1:36060035- 36060035	TFAP2E	C/T	0.008	medium
rs745633010	1:45980209- 45980209	PRDX1	C/T	8,79E-03	high
rs139068522	1:54273432- 54273432	NDC1	C/T	0,01764 (gnomAD)	medium
rs41285372	1:63902524- 63902524	ALG6	C/G	0.016	medium
rs764916315	20:1293016- 1293016	SDCBP2	A/G	0,02669 (gnomAD)	medium
rs140456274	20:29960701- 29960701	DEFB118	T/C	0.003	medium
rs5744204	20:36982811- 36982811	LBP	G/A	0.013	medium
rs61752057	20:40040870- 40040870	CHD6	G/A	0.005	medium

rs752778758	20:61299458-61299458	SLCO4A1	C/A	0.0001055 (gnomAD)	medium
rs138007679	21:43897478-43897478	RSPH1	A/C	0.006	medium
rs79754221,COSV 71607824	22:20710850-20710850	FAM230A	C/T	0.002	-
rs1167635212	22:21741520-21741520	RIMBP3B	G/A	0.000 (gnomAD)	medium
rs139023197	22:50969647-50969647	ODF3B	C/G	0.044	-
rs141953471	22:50970068-50970068	ODF3B	C/T	0.049	medium
rs2269383	22:51012775-51012775	CPT1B	C/T	0.005	high
rs62621432	2:128522189-128522189	WDR33	T/C	0.010	-
rs187343008	2:152536299-152536299	NEB	T/C	0.009	medium
rs144135510	2:179640598-179640598	TTN	C/T	0.000	-
rs149540467	2:187702055-187702055	ZSWIM2	G/A	0.001	medium
rs35462421	2:240951071-240951071	NDUFA10	C/T	0.011	medium
rs1339999687	2:42281376-42281376	PKDCC	C/G	0,009757 (gnomAD)	medium
rs1017236072	2:74762837-74762837	LOXL3	C/T	0,02775 (gnomAD)	medium
rs76478083	3:108117612-108117612	MYH15	G/A	0.009	medium
rs114511272,COS V62017869	3:130282383-130282383	COL6A6	C/A	0.019	medium
rs59021909,COSV 62019437	3:130285929-130285929	COL6A6	C/T	0.020	medium
-	3:185979522-185979522	DGKG	C/T	-	-
rs57195580	3:186917586-186917586	RTP1	C/T	0.010	medium
rs35574803	3:32533246-32533246	CMTM6	T/C	0.024	medium
rs80178587	3:98109529-98109529	OR5K3	C/T	0.001	medium
rs114784912	3:98110287-98110287	OR5K3	C/T	0.001	medium
rs35879351	4:151520216-151520216	LRBA	G/A	0.033	medium
-	4:165878552-165878552	FAM218A	G/T	-	-
rs56412718	4:36340755-36340755	DTHD1	C/A	0.042	medium

rs28622470	4:41631718-41631718	LIMCH1	C/T	0.048	-
rs142822048	4:4389432-4389432	NSG1	C/T	0.002	medium
rs34231037,CM087498,COSV55778415	4:55972946-55972946	KDR	A/G	0.031	medium
rs189562677	4:57467227-57467227	THEGL	A/C	0.003	medium
rs149692526	4:79421055-79421055	FRAS1	G/A	0.001	-
rs147767080,COSV53919093	5:140731769-140731769	PCDHGB1	C/G	0.021	high
rs367639660	5:140754878-140754878	PCDHGA6	C/G	5.32e-05 (gnomAD)	high
rs182768240	5:150663633-150663633	SLC36A3	T/A	0.000	medium
rs145153903	5:205939-205939	CCDC127	C/T	0.006	medium
rs3805466	5:65350481-65350481	ERBB2IP	C/T	0.042	-
rs55969676	5:66441069-66441069	MAST4	G/A	0.008	-
rs139537580	5:7861279-7861279	FASTKD3	C/T	5.32e-05 (gnomAD)	high
rs191897488	5:79033460-79033460	CMYA5	G/T	0.000	medium
-	5:82789718-82789718	VCAN	A/C	0.000	medium
rs148097083	5:89943581-89943581	GPR98	G/A	0.018	-
rs61997220	6:149783095-149783095	ZC3H12D	T/C	0.047	medium
rs112780453	6:158571611-158571611	SERAC1	A/T	0.012	medium
rs41266313	6:168467448-168467448	FRMD1	A/T	0.013	medium
rs5030965	6:27216699-27216699	PRSS16	G/T	0.031	medium
rs2231370	6:3152760-3152760	BPHL	T/C	0.005	medium
rs41265501	6:72984123-72984123	RIMS1	C/T	0.036	medium
rs114262718	7:100677645-100677645	MUC17	C/A	0.012 (gnomAD)	medium
rs78008536	7:103292201-103292201	RELN	G/A	0.017	medium
rs1800120,CM014892,CM021555	7:117267592-117267592	CFTR	G/T	0.003	medium
rs142694766	7:121682702-121682702	PTPRZ1	A/G	0.001	medium

rs117425825	7:149981856-149981856	ACTR3C	G/A	0.046	high
rs1637215	7:23236797-23236797	NUPL2	C/G	0.043	-
rs759996173	7:27204982-27204982	HOXA9	G/A	0,02214 (gnomAD)	medium
rs200091244	7:75052362-75052362	POM121C	T/G	0.035	-
rs139046510	7:91727479-91727479	AKAP9	A/T	0.003	-
-	7:92147562-92147562	PEX1	T/C	-	-
rs756419093	8:101642591-101642591	SNX31	A/C	-	medium
rs778353394,COSV55065560	8:134108510-134108510	TG	C/T	0,03518 (gnomAD)	medium
rs1268323424	8:145163442-145163442	KIAA1875	G/A	-	-
-	8:15967664-15967664	MSR1	C/T	-	-
rs138761125	8:23225572-23225572	LOXL2	C/T	0.0001685 (gnomAD)	medium
rs1333636962	8:42013500-42013501	AP3M3	T/A	2.1e-05 (gnomAD)	-
rs35099105,COSV66951670	8:80976814-80976814	TPD52	C/A	0.026	medium
rs139283183	8:97244060-97244060	UQCRB	A/T	0.001	medium
rs200607155	9:103109301-103109301	TEX10	T/C	0.001	medium
rs79177442,COSV58252742	9:107266833-107266833	OR13F1	G/A	0.013	high
rs1370747086	9:131595903-131595903	CCBL1	G/A	0.000 (gnomAD)	medium
rs657704	9:135946948-135946948	CEL	T/G	0.000 (gnomAD)	-
rs997868037,COSV60827582	9:135946954-135946954	CEL	G/C	0.0002554 (gnomAD)	-
rs116891320	9:139686439-139686439	RP11-216L13.17	G/C	0.011	-
rs117950285	9:139750819-139750819	MAMDC4	C/T	0.001	-
rs587604741,COSV66412285	9:43915500-43915500	CNTNAP3B	G/C	0.007	-
rs200554338	9:71395834-71395834	FAM122A	G/A	0.000	-
-	X:108631883-108631883	GUCY2F	T/C	-	-

Συμπληρωματικός πίνακας 2: Γονίδια στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί υψηλής επίδρασης

Start lost	Stop gained	Stop lost	Frameshift	
TTC40	OR4A16	C11orf49	MCU	ZNF726
TRIM51	CCDC86	C17orf80	C11orf49	LIN7B
C3orf79	RP11-867	ARPC5	SDSL	ZNF865
RAET1L	ARL11	CD38	PRB3	ANO7
	IRF2BPL	ASB4	C14orf159	SLC41A3
	CALML4	CYP3A5	OLGA6L5.639	IQSEC1
	ZNF587		GOLGA6L2	ATP13A5
	PFKL		NDUFB10	UBE2D3
	IGLV3-22		CASC3	CRIPAK
	EXOC3		C17orf80	SOSTDC1
	SERAC1		GALR2	LAPTM4B
	FAM83A		DCXR	
	P2RY4		ANKLE1	

Συμπληρωματικός πίνακας 3: Γονίδια στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί μέτριας επίδρασης

Missense				
ABCC2	PCNX	GPATCH1	ODF3B	CMYA5
CTBP2	GLRX5	FBXO17	ODF3B	VCAN
TTC40	CHAC1	CTC-360G5.8	CPT1B	GPR98
CDHR1	SPTBN5	MPND	WDR33	ZC3H12D
RNF26	LCMT2	PLEKHA4	NEB	SERAC1
MUC5B	SPG11	KLK11	TTN	FRMD1
AP003062.1	NEDD4	TUBB4A	ZSWIM2	PRSS16
IGSF22	FAM63B	STXBP2	NDUFA10	BPHL
LSP1	LDHAL6B	MED16	PKDCC	RIMS1
TRPM5	NARG2	FBXO2	LOXL3	MUC17
CAT	HAGH	ALDH9A1	MYH15	RELN
OR4A8P	DNAH3	NBPF1	COL6A6	CFTR
LRRC56	USP31	RGSL1	COL6A6	PTPRZ1
SCGB1D1	CCDC64B	APOBEC4	DGKG	ACTR3C
OVCH2	NLRC5	IGFN1	RTP1	NUPL2
CEP57	RLTPR	PKP1	CMTM6	HOXA9
ACAD10	SCARF1	NAV1	OR5K3	POM121C
PRB4	KIAA0100	PIGR	OR5K3	AKAP9
FBRSL1	C17orf75	WNT9A	LRBA	PEX1
GOLGA3	KRTAP4-4	OR13G1	FAM218A	SNX31
FAM186B	KRT32	COL16A1	DTHD1	TG
STAT2	FAM134C	TFAP2E	LIMCH1	KIAA1875
C12orf55	CNTNAP1	PRDX1	NSG1	MSR1
SLC10A2	GGT6	NDC1	KDR	LOXL2
SPATA13	HOXB2	ALG6	THEGL	AP3M3

<i>IRG1</i>	<i>MED13</i>	<i>SDCBP2</i>	<i>FRAS1</i>	<i>TPD52</i>
<i>MYCBP2</i>	<i>CD300C</i>	<i>DEFB118</i>	<i>PCDHGB1</i>	<i>UQCRB</i>
<i>CINP</i>	<i>HN1</i>	<i>LBP</i>	<i>PCDHGA6</i>	<i>TEX10</i>
<i>JAG2</i>	<i>FASN</i>	<i>CHD6</i>	<i>SLC36A3</i>	<i>OR13F1</i>
<i>TRAV1-2</i>	<i>TCEB3B</i>	<i>SLCO4A1</i>	<i>CCDC127</i>	<i>CCBL1</i>
<i>TRAV13-2</i>	<i>RP11-683L23.1</i>	<i>RSPH1</i>	<i>ERBB2IP</i>	<i>CEL</i>
<i>SYNE2</i>	<i>POLI</i>	<i>FAM230A</i>	<i>MAST4</i>	<i>CEL</i>
<i>EXD2</i>	<i>ICAM1</i>	<i>RIMBP3B</i>	<i>FASTKD3</i>	<i>RP11-216L13.17</i>
<i>MAMDC4</i>	<i>CNTNAP3B</i>	<i>FAM122A</i>	<i>GUCY2F</i>	

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. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10271, pp. 319–333). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Altelaar, A. F. M., Munoz, J., & Heck, A. J. R. (2013). Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nature Reviews Genetics*, *14*(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrg3356>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, *55*(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., & Khodadadian, A. (2020). Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. In *International Journal of General Medicine* (Vol. 13, pp. 29–41). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S241099>
- Banu, Y., Matsuda, M., Yoshihara, M., Kondo, M., Sutou, S., & Matsukuma, S. (2002). Golgi matrix protein gene, Golga3/Mea2, rearranged and re-expressed in pachytene spermatocytes restores spermatogenesis in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*, *61*(3), 288–301. <https://doi.org/10.1002/mrd.10035>
- Bayoumy, N., El-Shabrawi, M., & Nada, H. (2020). Association of ICAM-1 gene variant rs5498 (1462A>G) with non-obstructive azoospermia. *Human Fertility*, *23*(4), 234–238. <https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1566646>
- Bousnane, N. E. H., May, S., Yahia, M., & Abu Alhaija, A. A. (2017). Association of CAT–262C/T with the concentration of catalase in seminal plasma and the risk for male infertility in Algeria. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *63*(5), 303–310. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1318187>
- Cao, X., Cui, Y., Zhang, X., Lou, J., Zhou, J., Bei, H., & Wei, R. (2018). Proteomic profile of human spermatozoa in healthy and asthenozoospermic individuals. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0334-1>
- Cavarocchi, E., Whitfield, M., Saez, F., & Touré, A. (2022a). Sperm Ion Transporters and Channels in Human Asthenozoospermia: Genetic Etiology, Lessons from Animal Models, and Clinical Perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073926>
- Donkin, I., & Barrès, R. (2018). Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular Metabolism*, *14*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006>
- García Rodríguez, A., la Casa, M., Johnston, S., Gosálvez, J., & Roy, R. (2019). Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. *Annals of Human Genetics*, *83*(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/ahg.12286>
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, *36*(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>

- Gong, S., Gabriel, M. C. S., Zini, A., Chan, P., & O'Flaherty, C. (2012). Low Amounts and High Thiol Oxidation of Peroxiredoxins in Spermatozoa From Infertile Men. *Journal of Andrology*, *33*(6), 1342–1351. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.016162>
- Jiang, L.-Y., Shan, J.-J., Tong, X.-M., Zhu, H.-Y., Yang, L.-Y., Zheng, Q., Luo, Y., Shi, Q.-X., & Zhang, S.-Y. (2014). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is correlated closely with sperm progressive motility and normal morphology in healthy and fertile men with normal sperm parameters. *Andrologia*, *46*(8), 824–830. <https://doi.org/10.1111/and.12155>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. <https://doi.org/10.1038/s41585>
- Lee, S.-K., Son, L. T., Choi, H.-J., & Ahnn, J. (2013). Dicarboxyl/l-xylulose reductase (DCXR): The multifunctional pentosuria enzyme. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(11), 2563–2567. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.010>
- Li, C.-Y., Jiang, L.-Y., Chen, W.-Y., Li, K., Sheng, H.-Q., Ni, Y., Lu, J.-X., Xu, W.-X., Zhang, S.-Y., & Shi, Q.-X. (2010). CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Human Reproduction*, *25*(2), 317–327. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep406>
- Li, L., & Chen, S. (2021). Screening, identification and interaction analysis of key microRNAs and genes in asthenozoospermia. *International Journal of Medical Sciences*, *18*(7), 1670–1679. <https://doi.org/10.7150/ijms.54460>
- Liu, S.-Y., Zhang, C.-J., Peng, H.-Y., Sun, H., Lin, K.-Q., Huang, X.-Q., Huang, K., Chu, J.-Y., & Yang, Z.-Q. (2017). Strong association of SLC1A1 and DPF3 gene variants with idiopathic male infertility in Han Chinese. *Asian Journal of Andrology*, *19*(4), 486. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.178850>
- Liu, X. X., Cai, L., & Liu, F. J. (2018). An in silico analysis of human sperm genes associated with asthenozoospermia and its implication in male infertility. *Medicine (United States)*, *97*(49). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013338>
- Lu, C., Xu, M., Wang, R., Qin, Y., Wang, Y., Wu, W., Song, L., Wang, S., Shen, H., Sha, J., Miao, D., Hu, Z., Xia, Y., & Wang, X. (2014). Pathogenic variants screening in five non-obstructive azoospermia-associated genes. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, *20*(2), 178–183. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat071>
- Martinez-Heredia, J., de Mateo, S., Vidal-Taboada, J. M., Balleca, J. L., & Oliva, R. (2008). Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction*, *23*(4), 783–791. <https://doi.org/10.1093/humrep/den024>
- Onoufriadis, A., Shoemark, A., Schmidts, M., Patel, M., Jimenez, G., Liu, H., Thomas, B., Dixon, M., Hirst, R. A., Rutman, A., Burgoyne, T., Williams, C., Scully, J., Bolard, F., Lafitte, J.-J., Beales, P. L., Hogg, C., Yang, P., Chung, E. M. K., ... Mitchison, H. M. (2014). Targeted NGS gene panel identifies mutations in RSPH1 causing primary ciliary dyskinesia and a common mechanism for ciliary central pair agenesis due to radial spoke defects. *Human Molecular Genetics*, *23*(13), 3362–3374. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu046>

- Pandey, A., Yadav, S. K., Vishvkarma, R., Singh, B., Maikhuri, J. P., Rajender, S., & Gupta, G. (2019). The dynamics of gene expression during and post meiosis sets the sperm agenda. *Molecular Reproduction and Development*, *86*(12), 1921–1939. <https://doi.org/10.1002/mrd.23278>
- Pradhan, B. S., Bhattacharya, I., Sarkar, R., & Majumdar, S. S. (2019). Downregulation of *Sostdc1* in Testicular Sertoli Cells is Prerequisite for Onset of Robust Spermatogenesis at Puberty. *Scientific Reports*, *9*(1), 11458. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47930-x>
- Qin, H., Wang, R., Pang, X., Wei, Y., Yang, F., & Wang, J. (2018). Association of GRP78 promoter polymorphisms and serum GRP78 level with risk of asthenozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *35*(12), 2223–2231. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1316-0>
- Robay, A., Abbasi, S., Akil, A., El-Bardisi, H., Arafa, M., Crystal, R. G., & Fakhro, K. A. (2018). A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing. *Arab Journal of Urology*, *16*(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.003>
- Schimenti, J. C., Reynolds, J. L., & Planchart, A. (2005). Mutations in *Serac1* or *Synj2* cause proximal *t* haplotype-mediated male mouse sterility but not transmission ratio distortion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(9), 3342–3347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407970102>
- Sha, Y., Liu, W., Huang, X., Li, Y., Ji, Z., Mei, L., Lin, S., Kong, S., Lu, J., Kong, L., Zhu, X., Lu, Z., & Ding, L. (2019). EIF4G1 is a novel candidate gene associated with severe asthenozoospermia. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *7*(8). <https://doi.org/10.1002/mgg3.807>
- Shu, F., Zhou, X., Li, F., Lu, D., Lei, B., Li, Q., Yang, Y., Yang, X., Shi, R., & Mao, X. (2015). Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic asthenospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(11), 1643–1649. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0548-5>
- Siva, A. B., Kameshwari, D. B., Singh, V., Pavani, K., Sundaram, C. S., Rangaraj, N., Deenadayal, M., & Shivaji, S. (2010). Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, *16*(7), 452–462. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq009>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Takasaki, N., Tachibana, K., Ogasawara, S., Matsuzaki, H., Hagiuda, J., Ishikawa, H., Mochida, K., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Noce, T., Ito, C., Toshimori, K., & Narimatsu, H. (2014). A heterozygous mutation of *GALNTL5* affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(3), 1120–1125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310777111>

- Tang, D., Sha, Y., Gao, Y., Zhang, J., Cheng, H., Zhang, J., Ni, X., Wang, C., Xu, C., Geng, H., He, X., & Cao, Y. (2021). Novel variants in DNAH9 lead to nonsyndromic severe asthenozoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00709-0>
- Tengowski, M. W., Feng, D., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2007). Differential Expression of Genes Encoding Constitutive and Inducible 20S Proteasomal Core Subunits in the Testis and Epididymis of Theophylline- or 1,3-Dinitrobenzene-Exposed Rats1. *Biology of Reproduction*, *76*(1), 149–163. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053173>
- Tsai, Y. H., Wang, T. W., Wei, H. J., Hsu, C. Y., Ho, H. J., Chen, W. H., Young, R., Liaw, C. M., & Chao, J. C. J. (2013). Dietary intake, glucose metabolism and sex hormones in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with women with non-PCOS-related infertility. *British Journal of Nutrition*, *109*(12), 2190–2198. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004369>
- Xu, M., Qin, Y., Qu, J., Lu, C., Wang, Y., Wu, W., Song, L., Wang, S., Chen, F., Shen, H., Sha, J., Hu, Z., Xia, Y., & Wang, X. (2013). Evaluation of Five Candidate Genes from GWAS for Association with Oligozoospermia in a Han Chinese Population. *PLoS ONE*, *8*(11), e80374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080374>
- Yang, Y., Huang, W., Huang, J. T., Shen, F., Xiong, J., Yuan, E. F., Qin, S. S., Zhang, M., Feng, Y. Q., Yuan, B. F., & Liu, S. M. (2016). Increased N6-methyladenosine in Human Sperm RNA as a Risk Factor for Asthenozoospermia. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep24345>
- Yenugu, S., Hamil, K. G., Radhakrishnan, Y., French, F. S., & Hall, S. H. (2004). The Androgen-Regulated Epididymal Sperm-Binding Protein, Human β -Defensin 118 (DEFB118) (Formerly ESC42), Is an Antimicrobial β -Defensin. *Endocrinology*, *145*(7), 3165–3173. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1698>
- Zhao, C., Huo, R., Wang, F.-Q., Lin, M., Zhou, Z.-M., & Sha, J.-H. (2007). Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertility and Sterility*, *87*(2), 436–438. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.057>