



ΠΑΝΕΠΗΣΤΙΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Λάρισα
2020



Διερεύνηση μεταλλάξεων της οικογένειας γονιδίων DNAH στην ανδρική υπογονιμότητα

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΙΑΛΙΝΑΚΗ ΕΛΕΝΑ

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
Εισαγωγή	7
Το αναπαραγωγικό σύστημα του άντρα.....	7
Σπερματογένεση	9
.....	11
Φυσιολογικός ρόλος και δομή του σπέρματος	11
.....	12
Ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων (capacitation)	12
Ακροσωμική αντίδραση	14
Παθολογικές καταστάσεις του αναπαραγωγικού συστήματος του άντρα/υπογονιμότητα.....	15
Τα γονίδια DNAH / δυνεΐνες	17
.....	19
Πειραματικό μέρος.....	20
Υλικά και μεθοδοι	20
Συλλογή δειγμάτων	20
Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA.....	23
Γονοτύπηση δειγμάτων DNA	25
Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK	26
Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης.....	27
Quality control.....	28
Βάσεις δεδομένων	30
Βιοπληροφορική ανάλυση / Αποτελέσματα.....	33
Εξαγωγή SNPs.....	33
Υπολογισμός ποσοστών	41
Σύγκριση δεδομένων διαφορετικών πληθυσμών	50
Συζήτηση	64
Βιβλιογραφία	67

Τριμελής Επιτροπή

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

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

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

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

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

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

Ευχαριστίες

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

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

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

Επίσης Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής , συγκριτικής και εξελικτικής βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας , για το ευχάριστο κλίμα το οποίο δημιουργήσαν για μένα , μέσα στο οποίο μπόρεσα να εμβαθύνω τις γνώσεις μου αλλά και να βιώσω και να εγκλιματιστώ με τον καλύτερο τρόπο στο περιβάλλον ενός ερευνητικού εργαστηρίου.

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

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε έρευνα στην πιθανή επιρροή μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) των γονιδίων DNAH και συγκεκριμένα του γονιδίου DNAH5 (το οποίο είναι γονίδιο της βαριάς αλυσίδας της δυνεΐνης) στο φαινόμενο της ανδρικής υπογονιμότητας.

η υπογονιμότητα στους άντρες είναι ένα φαινόμενο το οποίο επηρεάζει την ζωή πολλών ανθρώπων και ζευγαριών . Η αδυναμία τεκνοποίησης μπορεί να επηρεάσει την ζωή ενός ζευγαριού με πολλούς τρόπους. Ψυχολογικά και κοινωνικά λόγω του κοινωνικού στίγματος που υπάρχει σχετικά με το θέμα αυτό , σωματικά λόγω των πιθανών εναλλακτικών μεθόδων που μπορεί να επιλέξει το ζευγάρι πχ εξωσωματική γονιμοποίηση , χορήγηση ορμονών και οικονομικά για τον ίδιον λόγο.

Για τους λογούς αυτούς έχει ενδιαφέρον η μελέτη και διασαφήνιση των παραγόντων που συνεισφέρουν στην ανδρική υπογονιμότητα.

Η οικογένεια γονιδίων DNAH επιλέχθηκε διότι οι δυνεΐνες και συγκεκριμένα οι βαριές αλυσίδες των δυνεΐνων , σχετίζονται με την κίνηση των μαστίγιων και συνεπώς με την σωστή κίνηση των σπερματοζωαρίων .

Στο στάδιο της ανάλυσης δεδομένων έγινε χρήση σε μεγάλο βαθμό βιοπληροφορικών εργαλείων ,τα οποία αποτελούν μεγάλο προτέρημα για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης και την εύρεση δεδομένων καθώς παρέχουν την δυνατότητα επεξεργασίας μεγάλου όγκου δεδομένων σε μικρό χρονικό διάστημα καθώς και την παράληψη άλλων ακριβών και χρονοβόρων διαδικασιών.

Abstract

In this thesis, an examination was conducted on the possible correlation of Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the DNAH genes and more specifically in the DNAH5 gene (which is a dynein heavy chain gene) and male infertility.

Infertility in men is a phenomenon that affects the lives of many people and couples. The inability to procreate can affect the life of a couple in a lot of ways. Mentally and socially due to the social stigma attached to this issue, physically due to the possible alternative routes that might be chosen such as In vitro fertilization or hormone therapy, and economically for the same reason.

The DNAH gene family was chosen due to the fact that dyneins and dynein heavy chains in particular play an important role in the proper mobility of flagella and thus the proper movement of the spermatozoa tail.

During Data Analysis, bioinformatic tools were utilized which hold great potential for the exploration of any potential association and the discovery of further information, since these tools provide the possibility of processing a great volume of data in a very small time frame as well as bypassing other expensive and time consuming approaches

Εισαγωγή

Η υπογονιμότητα και συνεπώς η αδυναμία τεκνοποίησης είναι ένα φαινόμενο του οποίου τα ποσοστά έχουν αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες . Εκτιμάται ότι παγκοσμίως το 15% των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν συναντούν προβλήματα υπογονιμότητας , το οποίο τελικά αντιστοιχεί σε 48,5 εκατομμύρια ζευγάρια. Στο 20-30 % αυτών των ζευγαριών θεωρείται ότι ευθύνεται μόνο ο άντρας ενώ ότι συμβάλει στα προβλήματα γονιμότητας στο 50% των περιπτώσεων αυτών. Όμως το φαινόμενο της αντρικής υπογονιμότητας έχει διερευνηθεί ενδελεχώς σε πολύ μικρό βαθμό και σε συνάρτηση με το παγκόσμιο πρόβλημα το οποίο αποτελεί αλλά και με τον βαθμό της ερευνάς που έχει γίνει και γίνεται για το θέμα της γυναικείας υπογονιμότητας. Η ερευνά στον τομέα της αντρικής υπογονιμότητας είναι αρκετά σημαντική και , λόγω του γεγονότος ότι μέχρι τώρα υπάρχουν διάφορες ανεξερεύνητες πτυχές στο πεδίο, υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω διερεύνησης και εφαρμογής νέων τεχνολογιών.

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άντρα

Το αναπαραγωγικό σύστημα των αντρών αποτελείται από τις γονάδες (ένα ζεύγος όρχεων) , την γεννητική οδό μέσω της οποίας μεταφέρεται το σπέρμα μέσω του πέους στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας και τους επικουρικούς φυλετικούς αδένες των οποίων οι εκκρίσεις έχουν βοηθητικό ρολό στην αναπαραγωγή.

Οι όρχεις βρίσκονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα, και αποτελούνται από ένα εξωτερικό δερματικό περίβλημα και εσωτερικά από πολλά συσπειρωμένα σπερματικά σωληνάρια . Τελούν διπλό ρολό πρώτον την σπερματογένεση και δεύτερον την παραγωγή και έκκριση της τεστοστερόνης μέσω των κυττάρων Leydig.

Η γενετική οδός στον άνδρα αποτελείται από την επιδιδυμίδα τον σπερματικό πόρο (ductus vas deferens) και τον εκσπερματικό πόρο (ejaculatory duct) . Η αναπαραγωγική οδός τελικά καταλήγει την ουρήθρα , η οποία είναι ο αγωγός που διατρέχει το πέος σε όλο του το μήκος, και μέσω αυτής οδηγούνται τα ούρα και το σπέρμα στο εξωτερικό περιβάλλον . Η επιδιδυμίδα, προσκολλάται χαλαρά στην οπίσθια επιφάνεια του κάθε όρχι και μέσω αυτής, το σπέρμα μεταφέρεται τελικά από τους όρχεις στον σπερματικό πόρο και στην ουρήθρα.

Συγκεκριμένα τα σπερματοζωάρια προωθούνται στην επιδιδυμίδα λόγω πίεσης η οποία προέρχεται από την έκκριση σωληναριακού υγρού από τα κύτταρα Sertoli . Τελικά οι εκφορητικοί πόροι της επιδιδυμίδας του κάθε όρχι καταλήγουν σε έναν μεγαλύτερο πόρο με παχύ μυϊκό τοίχωμα, τον σπερματικό πόρο, ο οποίος τελικά εισέρχεται μέσω του βουβωνικού πόρου στην κοιλιακή κοιλότητα και καταλήγει στην προστατική μοίρα της ουρήθρας.

Η επιδιδυμίδα και ο σπερματικός πόρος εμπλέκονται στην διαδικασία της γονιμοποίησης όχι μόνο μέσω της προώθησης του σπέρματος αλλά επιπρόσθετα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, αφού τα σπερματοζωάρια αποκτούν την τελική τους ικανότητα για γονιμοποίηση και κίνηση εισερχόμενα στην επιδιδυμίδα Αυτή η ωρίμανση επιτελείται εν μέρει από την τεστοστερόνη η οποία διατηρείται σε υψηλά επίπεδα στην

επιδιδυμίδα μέσω της συγκράτησης της από την πρωτεΐνη δέσμευσης των ανδρογόνων. Στην επιδιδυμίδα γίνεται επίσης σε μεγάλο βαθμό συμπύκνωση του σπέρματος. Αυτό επιτρέπει την διατήρηση των σπερματοζωαρίων στον σπερματικό πόρο για μέχρι και 2 μήνες, αφού οι μεταβολικές τους ανάγκες είναι περιορισμένες λόγω της αφαίρεσης των περισσότερων οργανιδίων των προώρων σπερματοζωαρίων.

Όσον αφορά στους επικουρικούς φυλετικούς αδένες, οι κύριοι στους άντρες είναι οι σπερματοδόχες κύστες, ο προστάτης και οι βολβοουρηθραίοι αδένες και μέσω αυτών γίνεται η έκκριση του μεγαλύτερου όγκου του σπερματικού υγρού. Παρόλο που θεωρητικά και χωρίς τις λειτουργίες των επικουρικών αδένων τα σπερματοζωάρια είναι λειτουργικά και ικανά για γονιμοποίηση και κίνηση, οι εκκρίσεις των επικουρικών φυλετικών αδένων παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της γονιμοποίησης.

Συγκεκριμένα οι λειτουργίες των σπερματοδόχων κυστών είναι οι εξής :

1) Η παραγωγή φρουκτόζης, η οποία λειτουργεί ως κυρία πηγή ενέργειας των σπερματοζωαρίων.

2) Η έκκριση προσταγλαδινών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών στην γενετική οδό του άνδρα και βοηθάει στην προώθηση του σπέρματος στην αναπαραγωγική οδό.

3) Οι εκκρίσεις τους αποτελούν το 60% του συνολικού όγκου του σπέρματος. Αυτό είναι σημαντικό τόσο για την αραιώση του σπέρματος όσο και για την έκπλυση του σπέρματος από την ουρήθρα.

4) Εκκρίνουν το ινωδογόνο, ένα πρόδρομο μόριο του ινώδους, το οποίο αυξάνει το ιξώδες του σπέρματος.

Επίσης, οι λειτουργίες του αδένου του προστάτη είναι οι εξής :

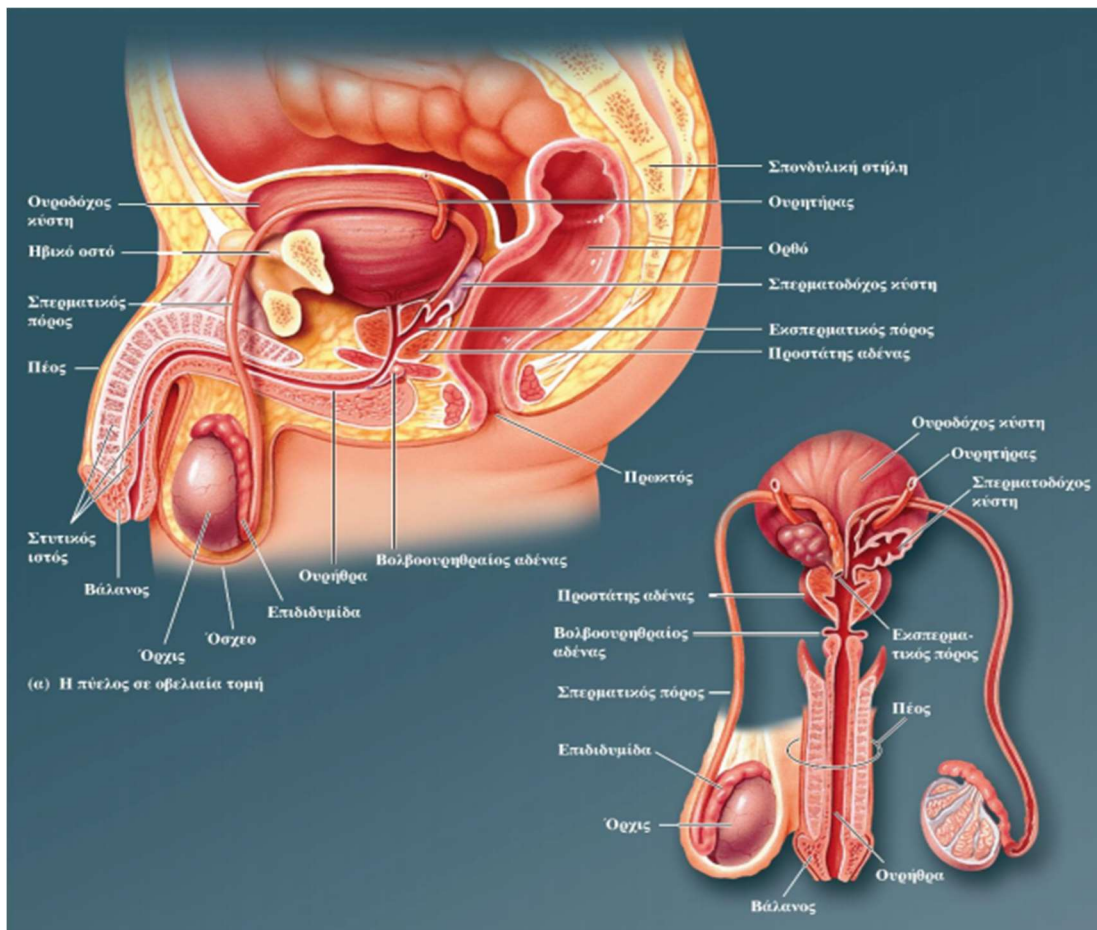
1) εκκρίνει ένα υγρό το οποίο εξουδετερώνει τις όξινες εκκρίσεις του κόλπου. Αυτό είναι σημαντικό διότι το περιβάλλον του κόλπου είναι συνήθως ελαφρώς όξινο, ενώ το ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωση των σπερματοζωαρίων είναι ελαφρώς αλκαλικό.

2) παράγει ένζυμα πήξης.

3) απελευθερώνει το PSA, το ειδικό προστατικό αντίγονο το οποίο αποικοδομεί το ινώδες και έτσι απελευθερώνει τα σπερματοζωάρια για να μπορούν να κινηθούν προς τις σάλπιγγες.

Οι βολβοουρηθραίοι αδένες έχουν ως κύριο ρόλο την έκκριση υγρών κατά την σεξουαλική διέγερση που βοηθούν στην λίπανση των γενετικών οργάνων κατά την συνουσία.

(Sherwood, 2016)



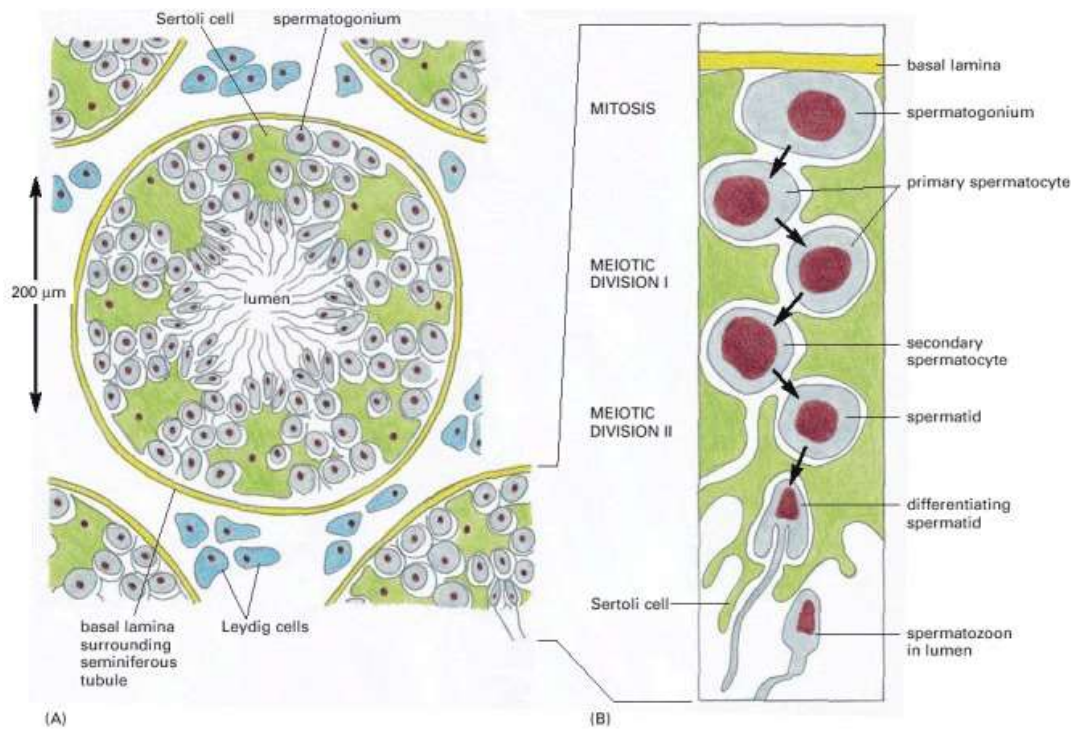
Εικόνα 1: το αναπαραγωγικό σύστημα του άντρα (Sherwood L. , 2016)

Σπερματογένεση

Κατά την σπερματογένεση γίνεται πολλαπλασιασμός και επεξεργασία των διπλοειδών σπερματογονίων και παράγονται τελικά τα εξειδικευμένα απλοειδή σπερματοζώαρια. Αυτή η διαδικασία διαρκεί συνολικά 64 μέρες όμως διαφορετικά σπερματικά σωληνάκια βρίσκονται συνέχεια σε διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης με αποτέλεσμα να ωριμάζουν καθημερινά πολλές εκατοντάδες εκατομμύρια σπερματοζώαρια.

Όπως προαναφέρθηκε, στο εσωτερικό των όρχεων βρίσκονται τα σπερματικά σωληνάκια τα οποία συσπειρώνονται και περιτυλίσσονται σε τέτοιο βαθμό ώστε τελικά να στοιβάζονται περίπου 250 μετρά σπερματικών σωληνάρων στους όρχεις.

Τα λιγότερο εξειδικευμένα πρόδρομα σπερματοκύτταρα βρίσκονται στις εξωτερικές στιβάδες των σπερματικών σωληνάρων, ενώ όσο αυξάνεται ο βαθμός εξειδίκευσης μετακινούνται προς τον αυλό των σωληνάρων.



H

Εικόνα 2 εγκάρσια τομή σπερματικού σωληνάριου (Alberts B., Johnson A. et al, 2002)

σπερματογένεση διακρίνεται σε 3 κύρια στάδια: 1) τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό 2) τη μείωση και 3) Το πακετάρισμα

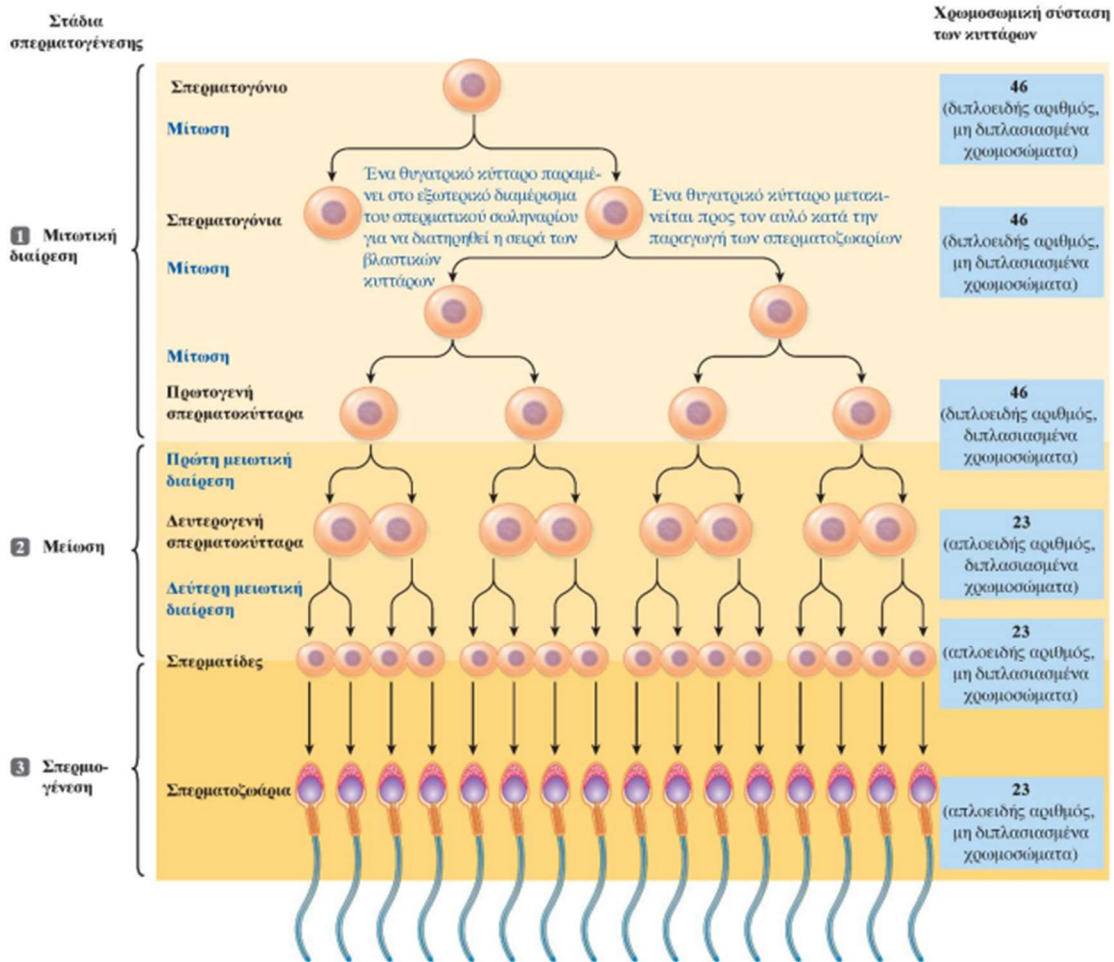
Μιτωτικός πολλαπλασιασμός: Τα σπερματογόνια που βρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα κοντά στα τοιχώματα των σωληναρίων πολλαπλασιάζονται συνεχώς μιτωτικά . Τα κύτταρα που παράγονται από αυτές τις διαιρέσεις είναι διπλοειδή και φέρουν μια πλήρη σειρά 46 χρωμοσωμάτων . Μετα από κάθε διαίρεση ένα από τα κύτταρα παραμένει στην εξωτερική στιβάδα του σωληνάριου και δεν διαφοροποιείται. Συνεπώς μπορεί να ξαναδιαιρευθεί και να ξεκινήσει εκ νέου η διαδικασία της σπερματογένεσης. Το άλλο κύτταρο μετακινείται σταδιακά προς το εσωτερικό του σωληνάριου , και κατά την πορεία του διαιρείται μιτωτικά 2 φορές με αποτέλεσμα να προκύπτουν τελικά 4 θυγατρικά κύτταρα τα οποία ονομάζονται πρωτόγενη σπερματοκύτταρα.

Ακολουθεί μια φάση ηρεμίας κατά την οποία τα χρωμοσώματα των πρωτογενών σπερματοκυττάρων διπλασιάζονται και δεν διαχωρίζονται, προετοιμάζοντας τα έτσι για την πρώτη μειωτική διαίρεση.

Μείωση: Κατά την μειωτική διαίρεση των πρωτογενών σπερματοκυττάρων , από κάθε διπλοειδές κύτταρο προκύπτουν δυο απλοειδή δευτερογενή σπερματοκύτταρα, κάθε ένα από τα οποία φέρει 23 διπλασιασμένα χρωμοσώματα. Από κάθε ένα από αυτά τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα προκύπτουν μέσω της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης 2 απλοειδές σπερματίδες η κάθε μια από τις οποίες φέρει 23 μη διπλασιασμένα χρωμοσώματα. Οι σπερματίδες δεν διαιρούνται περεταίρω αλλά μετατρέπονται τελικά σπερματοζώαρια. Συνεπώς από κάθε σπερματογόνιο παράγονται τελικά 16 σπερματίδες και στην πορεία σπερματοζώαρια.

Πακετάρισμα: Οι σπερματίδες ακόμα δεν μοιάζουν δομικά με σπερματοζώαρια και για να

μπορούν να γίνουν λειτουργικά, στην μια άκρη της σπερματίδας σχηματίζεται η κεφαλή , ενώ στην άλλη σχηματίζεται ένα πιο πλατύ κομμάτι στο οποίο μαζεύονται τα μιτοχόνδρια και στην συνέχεια θα σχηματιστεί η ούρα. Αυτά γίνονται με βοήθεια του σωματίου Golgi. Τέλος ένα από τα κεντριόλια του κυττάρου επιμηκύνεται και σχηματίζει την ουρά. Επίσης αφαιρείται η μεγαλύτερη ποσότητα του κυτταροπλάσματος καθώς και τα κυτταρικά οργανίδια τα οποία δεν είναι απολύτως απαραίτητα, μια διαδικασία που επιτελείται μέσω των κυττάρων Sertoli . Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή και ως σπερμιογένεση. (Sherwood, 2016)

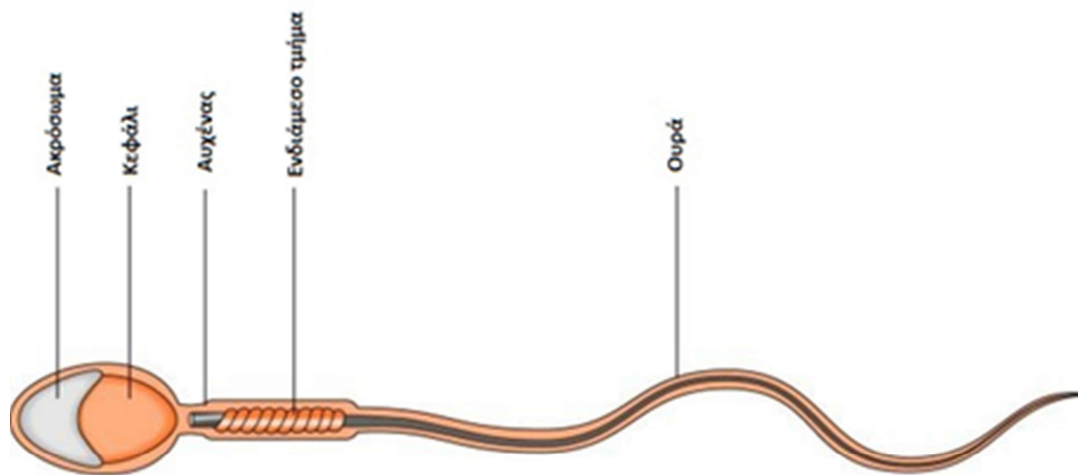


Εικόνα 3: σπερματογένεση, (Sherwood, 2016)

Φυσιολογικός ρόλος και δομή του σπέρματος

Το σπέρμα το οποίο αποτελείται από τα σπερματοζωάρια και το σπερματικό υγρό, είναι ο μεταφορέας της απλοειδούς γενετικής πληροφορίας του άντρα στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας έτσι ώστε να μπορεί να γίνει γονιμοποίηση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα σπερματοζωάρια αποτελούν περίπου το 2-5% του συνολικού όγκου του σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση, παρόλο που στα 2-5 ml σπέρματος που παράγεται κατά την εκσπερμάτωση εμπεριέχονται 20 – 100 εκατομμύρια σπερματοζωάρια. Αυτό τονίζει τον βαθμό πακεταρίσματος που συμβαίνει στα πρόωρα σπερματοζωάρια κατά την σπερματογένεση, καθώς καταλήγουν να είναι τα μικρότερα λειτουργικά κύτταρα του ανθρωπίνου οργανισμού.

Το σπερματικό υγρό αποτελείται από εκκρίσεις των επικουρικών φυλετικών αδένων οι λειτουργίες των οποίων αναλυθήκαν παραπάνω. Οι εκκρίσεις αυτές προσδίδουν στο σπέρμα όγκο και είναι πολύ σημαντικές καθώς παίζουν καθοριστικό ρολό στην επιβίωση των σπερματοζωαρίων στις κατά τα αλλά αντίξοες συνθήκες της γυναίκειας γενετικής οδού. Το σπερματοζωάριο αποτελείται από 3 κυρία δομικά χαρακτηριστικά: την κεφαλή, το μεσαίο τμήμα και την ουρά. Η κεφαλή είναι το κομμάτι του σπερματοζωαρίου που περιέχει το γενετικό υλικό. Καλύπτεται επίσης από το ακρόσωμα, ένα κυστίδιο γεμάτο ένζυμα, το οποίο επιτρέπει τελικά στο σπερματοζωάριο να διεισδύσει στο ωάριο. Η κίνηση του σπερματοζωαρίου γίνεται μέσω της ουράς η οποία είναι ένα επιμήκες τμήμα στην άκρη του σπερματοζωαρίου με σχήμα μαστίγιου, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες κινείται ρυθμικά με την βοήθεια μιτοχονδρίων που βρίσκονται στο μεσαίο τμήμα. (Sherwood, 2016)



Εικόνα 4: Δομή σπερματοζωαρίου (Διαγνωστική Αθηνών, 2014)

Ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων (capacitation)

Τα σπερματοζωάρια που βρίσκονται αποθηκευμένα στην επιδιδυμίδα, ενώ έχουν υποστεί όλες τις απαραίτητες διαδικασίες ωρίμανσης, δεν είναι ακόμα πλήρως ικανά για γονιμοποίηση. Η τελική ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων λαμβάνει χώρα στην αναπαραγωγική οδό της γυναίκας (Okabe M. et al, 2013).

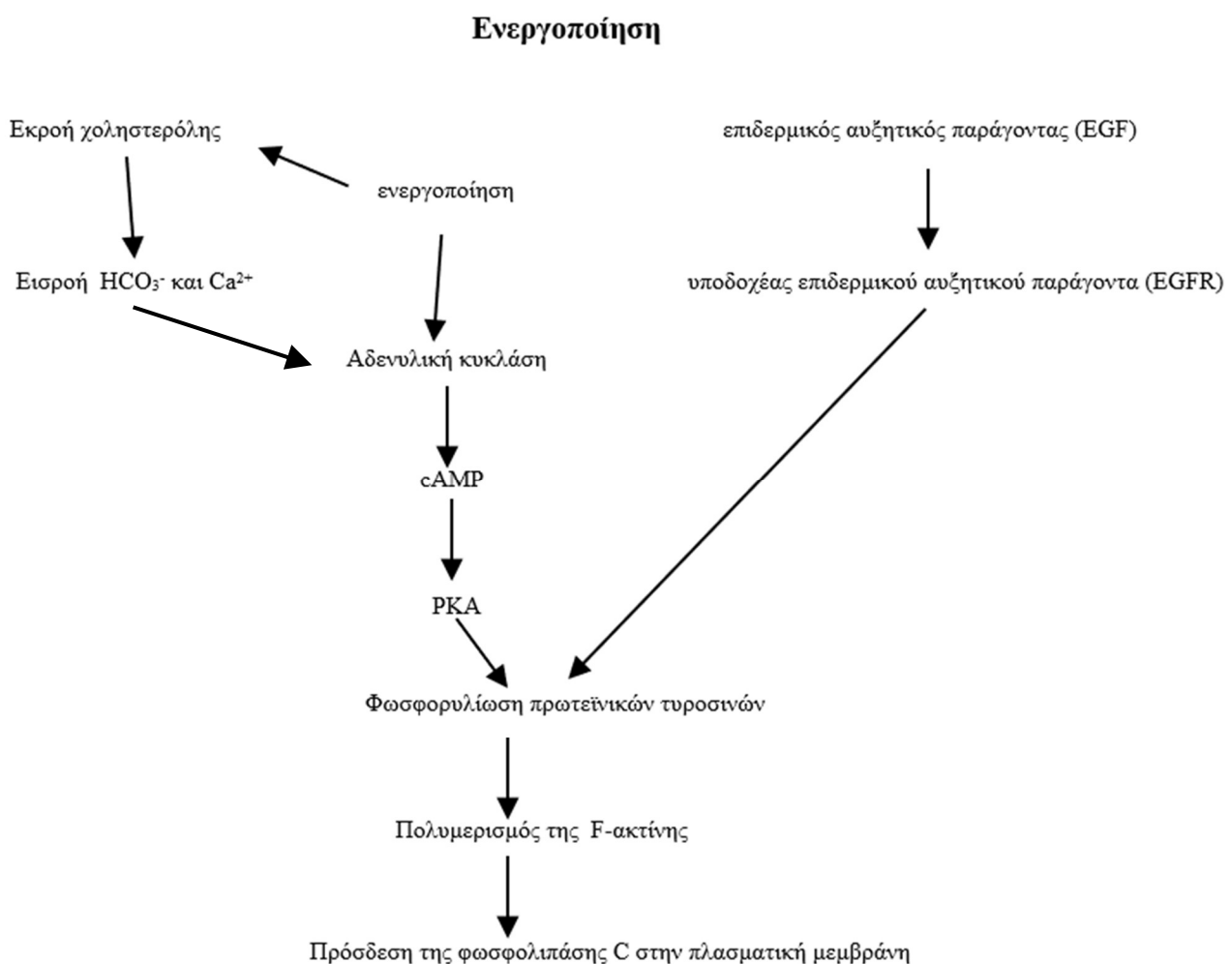
Οι διεργασίες της ενεργοποίησης δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένοι, όμως φαίνεται να εμπλέκονται οι πρωτεϊνικές κινήσεις οι οποίες ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο κατά την ενεργοποίηση καθώς και μετέπειτα κατά την ακροσωμική αντίδραση.

Κατά την διαδικασία της ενεργοποίησης η κίνηση των φωσφοϊνοσιτιδίων 3 (PI3-K) φωσφορυλιώνεται και συνεπώς ενεργοποιείται μέσω της πρωτεϊνικής κίνησης A (PKA) ενώ αναστέλλεται από την πρωτεϊνική κίνηση Ca (PKCa)

Η ενεργοποίηση αποτελείται από πολλαπλές φυσιολογικές και βιοχημικές αντιδράσεις. Στις βιοχημικές αντιδράσεις συμπεριλαμβάνεται η εκροή χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη που οδηγεί σε αύξηση της ελαστικότητας και ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης καθώς και την διαπερατότητα της σε διττανθρακικά ιόντα (HCO_3^-)

και ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}), αυξάνει το pH και τα επίπεδα κυκλικού AMP (cAMP). Οδηγεί επίσης στην υπερπόλωση της πλασματικής μεμβράνης και αλλαγές στην δράση των πρωτεϊνικών κινασών (Ickowicz D. Et al, 2012).

Οι συνθήκες με τις οποίες έρχονται αντιμέτωπα τα σπερματοζώαρια στην αναπαραγωγική οδό της γυναίκας, είναι διαφορετικές από τις συνθήκες που υπάρχουν στην επιδιδυμίδα από την οποία εξέρχονται. Στον αυλό της επιδιδυμίδας υπάρχουν χαμηλότερα επίπεδα Na^+ , υψηλότερα επίπεδα K^+ και χαμηλότερα επίπεδα Cl^- σε σχέση με τα υπόλοιπα υγρά του σώματος. Επίσης τα υγρά της επιδιδυμίδας διατηρούνται σε ένα χαμηλό pH μέσω αυστηρά ρυθμισμένης πρόσληψης H^+ απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και απομάκρυνση HCO_3^- από την επιδιδυμίδα και πρόσληψη του από τα επιθηλιακά κύτταρα. Στην αναπαραγωγική οδό της γυναίκας η συγκέντρωση του K^+ είναι μειωμένη και οι συγκεντρώσεις των Na^+ και HCO_3^- είναι αυξημένη σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στον αυλό της επιδιδυμίδας (Visconti P. et al, 2011).



Εικόνα 5 συνοπτικό διάγραμμα της διαδικασίας της ενεργοποίησης (Breitbart H., 2002)

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται συγκεκριμένες διαδικασίες και μόρια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση.

Ακροσωμική αντίδραση

Τα πλέον ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια , για να μπορέσουν τελικά να φτάσουν στο ωάριο και να συντηχθούν με αυτό θα πρέπει πρώτα να διαπεράσουν τα κοκκιώδη κύτταρα και την διαφανή ζώνη (zona pellucida) (Sherwood,2016).

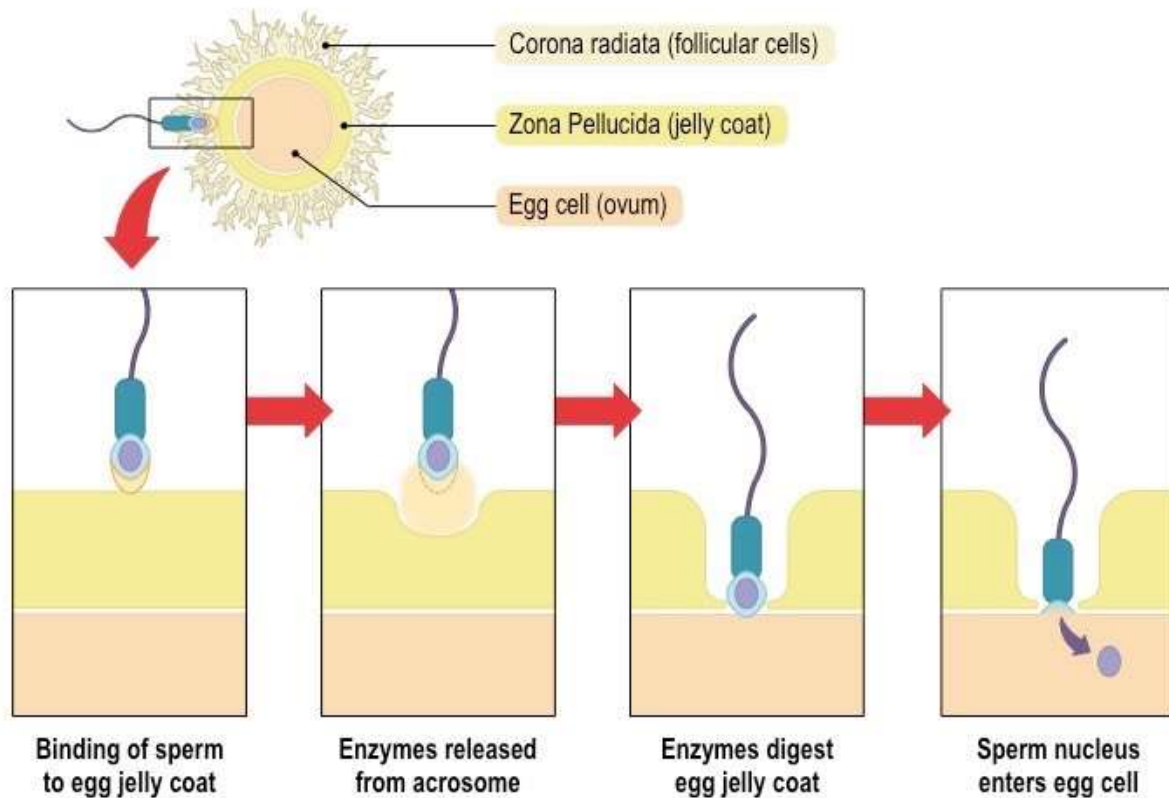
Η ακροσωμική αντίδραση συμπεριλαμβάνει πολλαπλές συγχωνεύσεις της εξωτερικής ακροσωμικής μεμβράνης με την σπερματική πλασματική μεμβράνη που την επικαλύπτει . αυτό επιτρέπει την ελευθέρωση των περιεχομένων του ακροσώματος στο εξωτερικό του σπερματικού κυττάρου .

Λυτικά ακροσωμικά υλικά πέπτουν το γλυκοπρωτεϊνικό περίβλημα του ωοκυττάρου , δημιουργώντας ένα άνοιγμα μέσα από το οποίο η κεφαλή του σπερματοζωαρίου μπορεί να φτάσει την επιφάνεια του ωαρίου και στην συνέχεια να συντηχθεί με αυτό. Στα θηλαστικά τα ώριμα ωοκύτταρα τα οποία είναι έτοιμα για γονιμοποίηση περιτριγυρίζονται το κάθε ένα από μια παχιά στρώση που ονομάζεται διαφανή ζώνη (zona pellucida) η οποία επίσης περιτριγυρίζεται από πολλά κοκκιώδη κύτταρα (Yanagimacgi R., 2011)

Η σύνδεση του σπερματοζωαρίου στην διαφανή ζώνη του ωοκυττάρου συμβαίνει μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων που βρίσκονται στην εμπρόσθια περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου . Η σύνδεση με την διαφανή ζώνη οδηγεί στην ακροσωμική αντίδραση το οποίο οδηγεί στην απελευθέρωση των υδρολυτικών ενζύμων .

Η διαφανή ζώνη συνδέεται σε τουλάχιστον δυο υποδοχείς στην πλασματική μεμβράνη . Ο ένας (R) είναι ένας υποδοχέας G_i ο οποίος ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C ($PLC_{\beta 1}$) . Ο άλλος (TK) είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης συνδεδεμένο με την PLC_{γ} . Η σύνδεση στον R ρυθμίζει την Αδενυλική κυκλάση το οποίο οδηγεί στην αύξηση των επίπεδων του κυκλικού AMP και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A . Η PKA ενεργοποιεί ένα τασεοεξαρτώμενο κανάλι ασβεστίου στην εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη και ελευθερώνεται ασβέστιο από το εσωτερικό του ακροσώματος στο κυτταρόπλασμα .

Αυτή είναι η πρώτη σχετικά μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου που οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLC_{γ} . Αυτό τελικά οδηγεί στο άνοιγμα ενός τασεοεξαρτωμένου καναλιού ασβεστίου (L) στην πλασματική μεμβράνη και συμβαίνει η δεύτερη υψηλότερη αύξηση επίπεδων ασβεστίου (Breitbart H. et al, 1997).



Εικόνα 6 ακροσωμική αντίδραση (Cornell B. , 2016)

Παθολογικές καταστάσεις του αναπαραγωγικού συστήματος του άντρα/υπογονιμότητα

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άντρα είναι ένα περίπλοκο σύστημα που αποτελείται από μεγάλο αριθμό οργάνων αδένων και ορμονών . Συνεπώς η λανθασμένη λειτουργία έστω και ενός από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο γονιμοποιητικό δυναμικό.

Ο πιο βασικός τρόπος προσδιορισμού των παραγόντων οι οποίοι καθορίζουν το προφίλ γονιμότητας του κάθε άνδρα είναι το σπερμοδιάγραμμα. Στην εξέταση αυτήν συλλέγεται δείγμα σπέρματος και αναλύεται μέσω μικροσκοπίας.

Ο εξεταζόμενος θα πρέπει να μην έχει εκσπερματίσει τις τελευταίες 2 μέρες όμως η αποχή να μην είναι μεγαλύτερη από 7 μέρες. Επίσης δεν γίνεται να γίνει σπερμοδιάγραμμα εάν το άτομο έχει παρουσιάσει υψηλούς πυρετούς τους προηγούμενους μήνες ή αν το άτομο έχει λάβει φαρμακευτικές ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργία και σύσταση του σπέρματος.

Κατά την ανάλυση του δείγματος εξετάζονται οι εξής παράγοντες :

- Φυσικά χαρακτηριστικά (όψη, οσμή, χροιά, ρευστοποίηση, ιξώδες, pH)
- Ποσοτικά στοιχεία (όγκος σπέρματος, συγκέντρωση και ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων)
- Κινητικότητα σπερματοζωαρίων σε 4 κατηγορίες (ταχεία προωθητική, νωθρή προωθητική, επιτόπια, ακινησία)
- Ζωτικότητα σπερματοζωαρίων
- Καταγραφή μικροσκοπικών ευρημάτων (στρογγυλά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, ερυθρά κύτταρα, βακτήρια)
- Ανοσολογικά στοιχεία (συγκολλήσεις)

Όσο αναφορά τον αριθμός των σπερματοζωαρίων και την ποσότητα του σπέρματος τα κύρια μη φυσιολογικά αποτελέσματα είναι τα εξής :

- Ασπερμία : Η απουσία υλικού ύστερα από εκσπερμάτιση.
- Αζωοσπερμία : Η απουσία σπερματοζωαρίων στο δείγμα του σπέρματος.
- Κρυπτοαζωοσπερμία : Η παρουσία μερικών σπερματοζωαρίων μόνο ύστερα από φυγοκέντριση του δείγματος.
- Υποσπερμία : Ο μικρός όγκος σπέρματος.
- Ολιγοσπερμία : η μικρή ποσότητα σπερματοζωαρίων (< 20 εκατ./ml)

(Σαλμάς Ι.,2016)

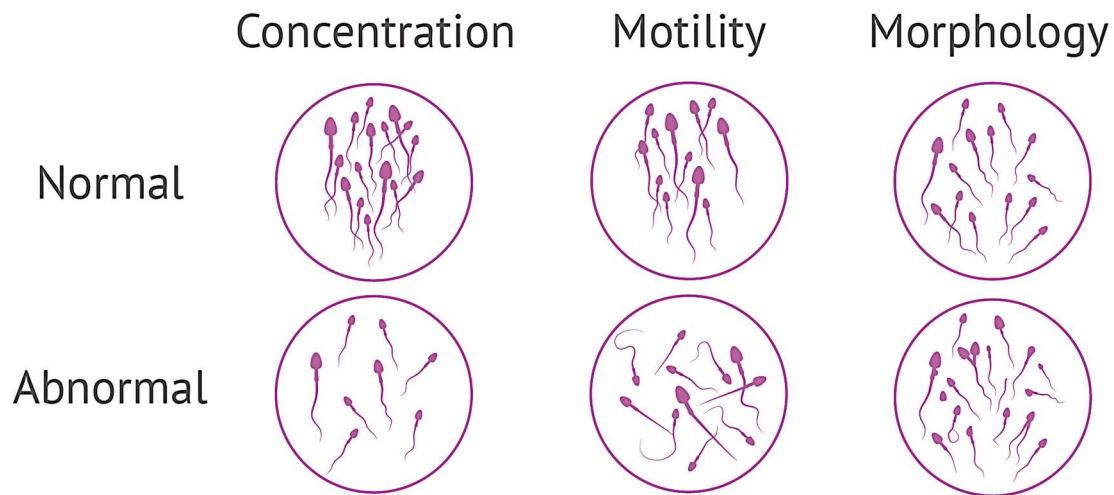
Επιπρόσθετα εξετάζεται και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων καθώς και η μορφολογία τους. Οι χαρακτηρισμοί που μπορούν να λάβουν τα δείγματα εξαρτώμενα από αυτούς τους παράγοντες είναι οι εξής :

- Ασθενοσπερμία: όταν τα σπερματοζωάρια του δείγματος έχουν μειωμένη κινητικότητα
- Τερατοσπερμία: όταν στο δείγμα υπάρχει μεγάλος αριθμός δύσμορφων σπερματοζωαρίων.

Καθώς η παρούσα εργασία βασίζεται στην εξαγωγή και την αλληλούχηση σπερματικού DNA των ατόμων , δεν μπορέσαν να χρησιμοποιηθούν δείγματα από άντρες με καθόλου σπέρμα ή σπερματοζωάρια . Οι τρεις κατηγορίες χαρακτηρισμών των σπερματοζωαρίων οι οποίες ανιχνεύονται μέσω του σπερμοδιαγράμματος που μελετήθηκαν είναι οι εξής :

- Ποσότητα σπερματοζωαρίων : Φυσιολογική / Ολιγοσπερμία
- Ταχύτητα σπερματοζωαρίων : Φυσιολογική / Ασθενοσπερμία
- Μορφολογία σπερματοζωαρίων : Φυσιολογική /Τερατοσπερμία

Ένα δείγμα μπορεί να έχει οποιονδήποτε συνδυασμό των 3 αυτών χαρακτηρισμών, πχ ένα άτομο μπορεί να είναι ολιγοσπερμικό και ασθενοσπερμικό δηλαδή να έχει μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων με μειωμένη κινητικότητα τα οποία όμως έχουν φυσιολογική μορφολογία.



Εικόνα 7 σπερμοδιάγραμμα (Salvador Z. , Fernandez A. , 2018)

Τα γονίδια DNAH / δυνεΐνες

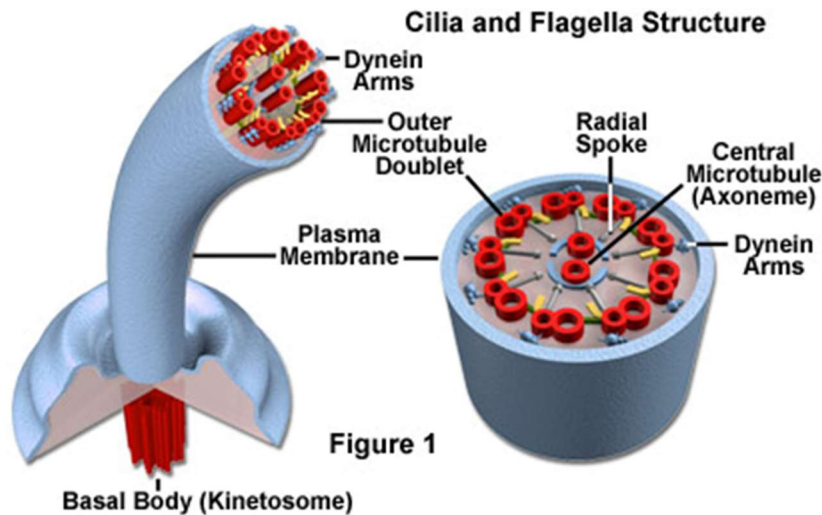
Η ομάδα γονιδίων η οποία αναλύθηκε στα πλαίσια της εργασίας αυτής είναι η DNAH και πιο συγκεκριμένα το γονίδιο DNAH5. Τα γονίδια DNAH είναι γονίδια δυνεΐνης.

Οι δυνεΐνες είναι σύμπλοκα πρωτεΐνης που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους , τα οποία μετακινούν μόρια ή κυστίδια και μπορούν να διαχωριστούν σε 2 ομάδες: αξονηματικές και κυτταροπλασματικές δυνεΐνες . Τα γονίδια DNAH κωδικοποιούν αξονηματικές δυνεΐνες (Milisav I, 1998).

Οι αξονηματικές δυνεΐνες μετακινούν βλεφαρίδες και μαστίγια , τα οποία είναι κινητές κυτταρικές αποφύσεις και υπάρχουν στους περισσότερους μικροοργανισμούς και ζώα . Είναι υψηλά συντηρημένα οργανίδια τα οποία είναι βασικά για την μεταγωγή σήματος και την κινητικότητα σε πολλούς οργανισμούς (Viswanadha R. , 2017).

Στους πολυκυττάρους οργανισμούς οι βλεφαρίδες λειτουργούν μετακινώντας ένα κύτταρο ή ομάδες κυττάρων ή υποβοηθώντας την μεταφορά υγρών ή ουσιών πέρα από αυτά. Στα ζώα τα μαστίγια βρίσκονται κατά κύριο λόγο στους γαμέτες.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι βλεφαρίδες και τα μαστίγια περιέχουν την κινητήρια πρωτεΐνη δυνεΐνη και μικροσωληνίσκους που αποτελούνται από γραμμικά πολυμερή της πρωτεΐνης τουμπουλίνη. Το κέντρο των δομών αυτών ονομάζεται αξόνημα και περιέχει δυο κεντρικούς μικροσωληνίσκους γύρω από το οποίο σχηματίζεται μια κυκλική δομή από 9 διμερή μικροσωληνίσκων , το κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από έναν ολόκληρο μικροσωληνίσκο και ένα τμήμα ενός μικροσωληνίσκου ο οποίος μοιράζεται το τοίχωμα του με τον προηγούμενο. Τα διμερή μικροσωληνίσκων ενώνονται από μόρια δυνεΐνης.



Εικόνα 8 δομή των μαστίγιων και βλεφαρίδων (Davidson Michael W., 2015)

Το αξόνημα περιβάλλεται ολοκλήρως από μια πλασματική μεμβράνη η οποία συνδέεται με το κύτταρο σε μια δομή γνωστή ως βασικό σωματίο. Οι αξονηματικές δυνεΐνες σχηματίζουν δυο δομές, μια εσωτερική και μια εξωτερική οι οποίες συνδέονται με το Α διμερές μικροσωληνίσκων. (Davidson Michael W., 2015)

Οι κυτταροπλασματικές δυνεΐνες εμπλέκονται στην μεταφορά κυστίτιδων σε μεσοφασικά κύτταρα, στην οπισθοδρομική αξονική μεταφορά σε νευρικά κύτταρα κ.α. (Milisav I, 1998)
Τα σύμπλοκα δυνεινών, τόσο αξονηματικές όσο και κυτταροπλασματικές έχουν μοριακό βάρος περισσότερο από 1 εκατομμύριο Da και αποτελούνται από πολλαπλές βαριές, μεσαίες και ελαφριές αλυσίδες. Τα γονίδια της οικογένειας DNAH (Dynein axonemal heavy chain) κωδικοποιούν τις βαριές αλυσίδες των αξονηματικών δυνεινών.

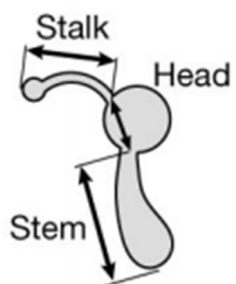
Οι βαριές αλυσίδες μοιράζονται τα εξής χαρακτηριστικά:

- 1) αποτελούνται από ~ 4.500 κατάλοιπα αμινοξέων
- 2) 4 μοτίβα Ρ-βρόχου υπάρχουν στο μεσαίο τμήμα της αλληλουχίας με κενό μεταξύ τους περίπου 300 κατάλοιπα αμινοξέων.
- 3) η αμινοξική αλληλουχία της θέσης δέσμευσης ATP είναι GPAGTGKT,
- 4) Η αλληλουχία που βρίσκεται αναμεσα στον 4^ο Ρ-βρόχο και το καρβοξυτελικό άκρο προβλέπει μια δομή «coiled coil» η οποία είναι πιθανόν η θέση αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες και
- 5) Η αμινοξική αλληλουχία των αξονηματικών και κυτοπλασματικών δυνεινών είναι όμοιες εκτός από τα αμινοξέα προς το αμινοξυτελικό άκρο όπου διαφοροποιούνται (Milisav I, 1998).

Οι βαριές αλυσίδες των δυνεινών αναδιπλώνονται και σχηματίζουν μια σφαιρική κεφαλή με δυο επιμηκυνόμενες μακρόστενες δομές, σαν μίσχοι (stalk, stem).

Η μικρότερη επιμήκης δομή (stalk) έχει μήκος μέχρι 15 nm και είναι κατά πάσα πιθανότητα μια αντιπαράλληλη δομή coiled coil (μια δομή δυο α-ελίκων που περιτυλίσσονται η μια γύρω από την άλλη). Η δομή αυτή έχει μια μικρή σφαιρική απόφυση που είναι ευαίσθητη στο ATP και συνδέεται στους μικροσωληνίσκους.

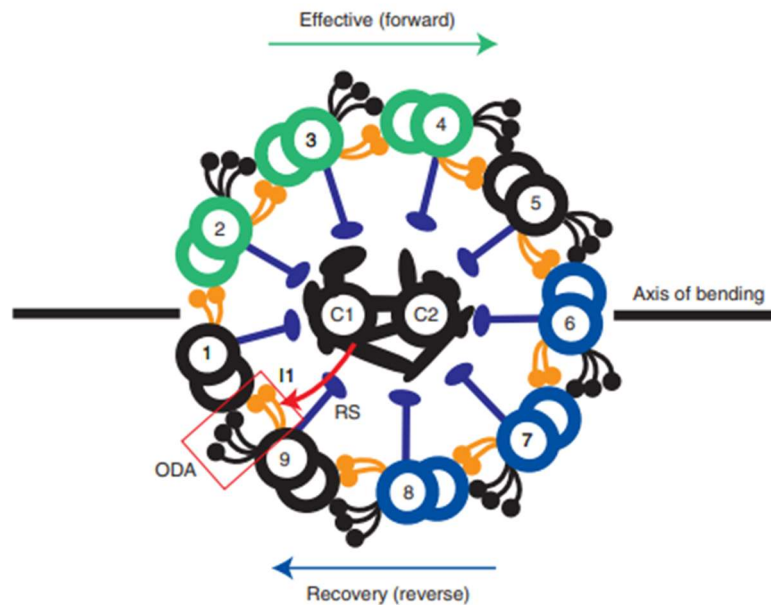
Οι βαριές αλυσίδες των δυνεινών ανήκουν στην υπεροικογενεια AAA των μηχανοενζυμων (ATPases Associated with diverse cellular Activities). Κάθε βαριά αλυσίδα περιέχει έξι μονάδες AAA συνδεδεμένες η μια μετά την άλλη στην σφαιρική κεφαλή, όμως η μονή από



Εικόνα 9 Δομή των βαρίων αλυσίδων της δυνεΐνης (Burgess A., 2003)

αυτές η οποία φαίνεται να υδρολυει ATP σε αξιόλογο βαθμό είναι η AAA1 που βρίσκεται πιο κοντά στο αμινοτελικό άκρο (Burgess Stan A., 2003) .

Για να συμβεί η κίνηση των οργανιδίων δεν πρέπει να είναι ενεργές οι δυνεΐνες σε όλα τα ζεύγη μικροσωληνίσκων ταυτόχρονα . Αντιθέτως πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που ελέγχει την ενεργότητα των διαφορετικών ζευγών , για να επιτευχθεί η κάμψη του μαστίγιου οι βαριές αλυσίδες της μιας πλευράς της κυκλικής δομής να είναι ενεργές και οι απέναντι αλυσίδες να είναι ανενεργές (Viswanadha R. , 2017).



Εικόνα 10 Μοτίβο κίνησης του αξονηματος (Viswanadha R. , 2017)

Πειραματικό μέρος

Υλικά και μεθοδοι

Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα τα οποία αναλυθήκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής συλλέχθηκαν μέσω του προγράμματος Spermogene , ένα ερευνητικό πρόγραμμα στο οποίο το Embryolab , μια Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Θεσσαλονίκης συνεργάζεται με το Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστήμιου Θεσσαλίας, με σκοπό την μελέτη των γενετικών παραγόντων της ανδρικής υπογονιμότητας και τελικά τον σχεδιασμό εξειδικευμένων διαγνωστικών μέσων .

Υλικά

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

Μεθοδολογία

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο "Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm" (Weyrich, 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα. Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζωάρια. Το σπερματικό υγρό περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Για το λόγο αυτό συνιστάται η απομάκρυνση του σπερματικού υγρού με τη χρήση αιθανόλης. Από την άλλη πλευρά, τα σπερματοζωάρια περιβάλλονται από μια λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δομή της μεμβράνης εμποδίζει τη λύση των κυττάρων και δυσχεραίνει την απομόνωση του γενετικού υλικού. Προκειμένου

να παρακαμφθεί αυτό το εμπόδιο χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DDT. Επιπλέον, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει την ρήξη των κυτταρικών /πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Ακόμα, το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει EDTA έναν χηλικό υποκαταστάτη, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα αποτελούν συμπαράγοντα για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επίσης, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή. Τέλος, το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Όμως, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο, ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

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

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen).

Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Μεθοδολογία

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

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

Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

Υλικά

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

Μεθοδολογία

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα

των νουκλεϊκών οξέων και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na^+ , τα οποία συνδέονται με αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων.

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

Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA

Με χρήση φασματοφωτόμετρου

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

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

Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά

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

Μεθοδολογία

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

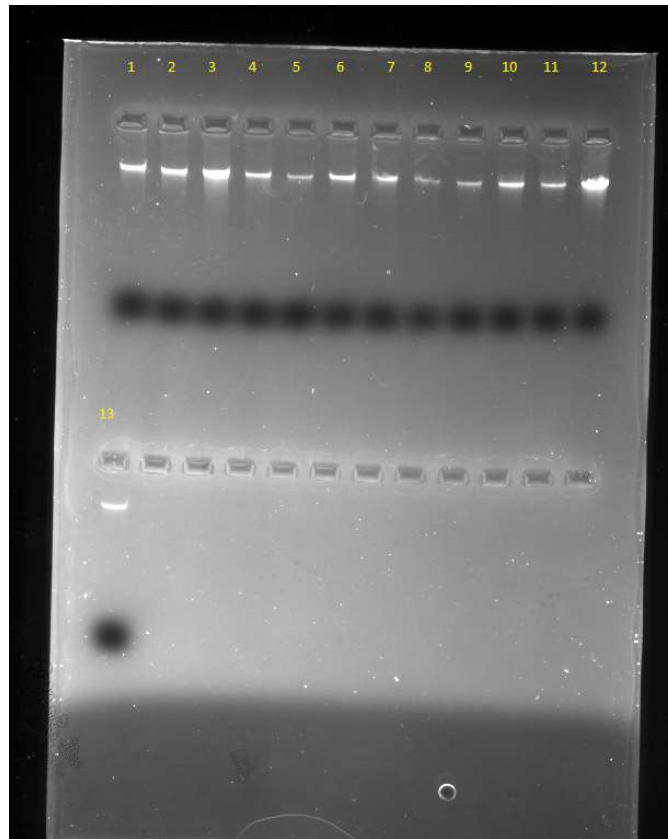
Εκτός από τον ποιοτικό προσδιορισμό του DNA, η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει πληροφορίες και για τη φυσική κατάσταση του DNA, δηλαδή αν είναι ακέραιο (μακρομοριακό) ή κατακεραματισμένο. Ενδείκνυται ακόμη σε περιπτώσεις χαμηλής καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Η διακριτική δυνατότητα του πηκτώματος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

Για την προετοιμασία του πηκτώματος χρησιμοποιείται αγαρόζη που αποτελεί έναν ευθύγραμμο πολυσακχαρίτη ο οποίος εκχυλίζεται σε μεγάλες ποσότητες από αρκετά είδη ερυθροφύκων και σχηματίζει πήκτωμα με πόρους που κυμαίνονται από 100 έως 300 nm διάμετρο. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει συνεπώς το εύρος των τμημάτων DNA που μπορούν να διαχωριστούν. Τέλος, η χρωστική SERVA αποτελεί μια πιο ασφαλή εναλλακτική έναντι της χρήσης βρωμιούχου αιθιδίου. Συγκεκριμένα, προσδέεται σε DNA και RNA προκαλώντας την εμφάνιση φθορισμού και είναι εξίσου ευαίσθητη με το βρωμιούχο αιθίδιο αλλά είναι μη καρκινογόνος και σύμφωνα με το τεστ AMES προκαλεί πολύ λιγότερες μεταλλάξεις.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης:

1. 1% w/v αναμειγνύεται αγαρόζη σε σκόνη (0,3 γραμ.) με 45 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές και να διαλυθεί η αγαρόζη.
2. Προσθήκη 3 ml χρωστικής SERVA και ήπια ανάδευση.
3. Το μίγμα προστίθεται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται ειδικά εξαρτήματα που ονομάζονται «χτενάκια». Το κάθε «χτενάκι» αποτελείται από έναν οριζόντιο άξονα κατά μήκος του οποίου ξεκινούν 12 κάθετοι άξονες -θέσεις και χρησιμοποιείται για την δημιουργία θέσεων («πηγαδάκια») στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα DNA.
4. Το μίγμα αφήνεται να κρυώσει ώστε να δημιουργηθεί το πήκτωμα (πολυμερισμός αγαρόζης).

5. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται σε αυτή TAE buffer 1x.
6. Προκειμένου να είναι εφικτή η παρατήρηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιούνται 3 μl Agarose Loading buffer για κάθε δείγμα DNA (4 μl). Έπειτα, γίνεται προσθήκη των δειγμάτων στις θέσεις («πηγαδάκια») του πηκτώματος.
7. Ακολουθεί εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης και ηλεκτροφόρηση για περίπου 15 λεπτά.
8. Τέλος, Το πήκτωμα παρατηρείται κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός.



Εικόνα 11 παράδειγμα πηκτώματος αγαρόζης κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός

Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

Η αλληλούχιση των δειγμάτων DNA έγινε μέσω γονοτύπησης και πραγματοποιήθηκε από το κέντρο HuGeF στην Ολλανδία. Πιο συγκεκριμένα, η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του chip της Illumina, Infinium® Global Screening Array. Το συγκεκριμένο chip προσφέρει πληροφορίες για 642.824 δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (SNPs), και ως εκ τούτου προσφέρει μια αρκετά μεγάλη κάλυψη του γονιδιώματος και ιδιαίτερως των περιοχών των ιντρονίων, καθώς οι 256.673 δείκτες ανήκουν σε αυτές τις περιοχές. Έτσι, αναδεικνύεται πιο αντιπροσωπευτικά ο πολυμορφισμός των non-coding περιοχών. Η γονοτύπηση με τέτοια chips βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για μια συγκεκριμένη περιοχή, περίπου 50 bp γύρω από τα SNPs, τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε γυάλινη πλάκα. Αρχικά, γίνεται πολλαπλασιασμός και προετοιμασία του DNA-

στόχου και ακολουθεί υβριδοποίηση και επιμήκυνση με νουκλεοτιδικές βάσεις οι οποίες είναι σημασμένες με διαφορετικές φθορίζουσες. Έπειτα από διαδοχικά στάδια πλύσης πραγματοποιείται ανίχνευση των φθορίζοντων προϊόντων που προκύπτουν με ειδικό laser. Διαφορετικά χρώματα φθορισμού οδηγούν στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης.

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

Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK

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

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

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

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

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

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

Εικόνα 12 παράδειγμα αρχείου MAP

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

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

Εικόνα 13 παράδειγμα αρχείου PED

Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση φαινοτύπων και γονοτύπων απαιτείται η δημιουργία ενός αρχείου που προκύπτει από την ένωση των δύο επιμέρους αρχείων που αντιστοιχούν σε αποτελέσματα αλληλούχισης δύο διαφορετικών plates. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση τόσο μεγαλύτερη είναι η στατιστική δύναμη των αποτελεσμάτων καθώς μελέτες που γίνονται σε μικρό αριθμό δειγμάτων μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα και λανθασμένες συσχετίσεις. Τα αποτελέσματα από το 1ο plate ονομάζονται gsa1pheno και ουσιαστικά πρόκειται για δύο αρχεία (gsa1pheno.map, gsa1pheno.ped).

```
C:\Users\elena>plink --file gsa1pheno
@-----@
          PLINK!          |          v1.07          |          10/Aug/2009          |
          (C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
          -----
          For documentation, citation & bug-report instructions:
          http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
          @-----@

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

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Wed Oct 02 21:17:36 2019

Options in effect:
  --file gsa1pheno

692368 (of 692368) markers to be included from [ gsa1pheno.map ]
96 individuals read from [ gsa1pheno.ped ]
96 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
52 cases, 44 controls and 0 missing
96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 692368 SNPs
96 founders and 0 non-founders found
14961 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
10 SNPs with no founder genotypes observed
Warning, MAF set to 0 for these SNPs (see --nonfounders)
Writing list of these SNPs to [ plink.nof ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.992454
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 692368 SNPs
After filtering, 52 cases, 44 controls and 0 missing
After filtering, 96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
```

Εικόνα 14 δημιουργία αρχείου ανάλυσης PLINK

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

```
C:\Users\elena>plink --file gsa2pheno
@-----@
| PLINK! | v1.07 | 10/Aug/2009 |
|-----|-----|-----|
| (C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2 |
|-----|-----|-----|
| For documentation, citation & bug-report instructions: |
| http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/ |
|-----|-----|-----|
@

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

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Wed Oct 02 21:22:24 2019

Options in effect:
  --file gsa2pheno

692366 (of 692366) markers to be included from [ gsa2pheno.map ]
96 individuals read from [ gsa2pheno.ped ]
96 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
48 cases, 48 controls and 0 missing
96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
96 founders and 0 non-founders found
19228 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
7 SNPs with no founder genotypes observed
Warning, MAF set to 0 for these SNPs (see --nonfounders)
Writing list of these SNPs to [ plink.nof ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.99018
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
After filtering, 48 cases, 48 controls and 0 missing
After filtering, 96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
```

Εικόνα 15 δημιουργία αρχείου ανάλυσης PLINK

Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα χειρισμού γενετικών δεδομένων μέσω μια σειράς εντολών με τις οποίες ο χρήστης μπορεί να αναδιατάξει, αποκωδικοποιήσει και συγχωνεύσει δεδομένα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι: `plink - - file gsa1pheno - -merge gsa2pheno.ped gsa2pheno.map - - recode - - out merged`

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

Quality control

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

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

```
plink - - geno 0.01
```

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

Στο επόμενο στάδιο του quality control χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - mind 0.01
```

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

Τέλος, χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - maf 0.05
```

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

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

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

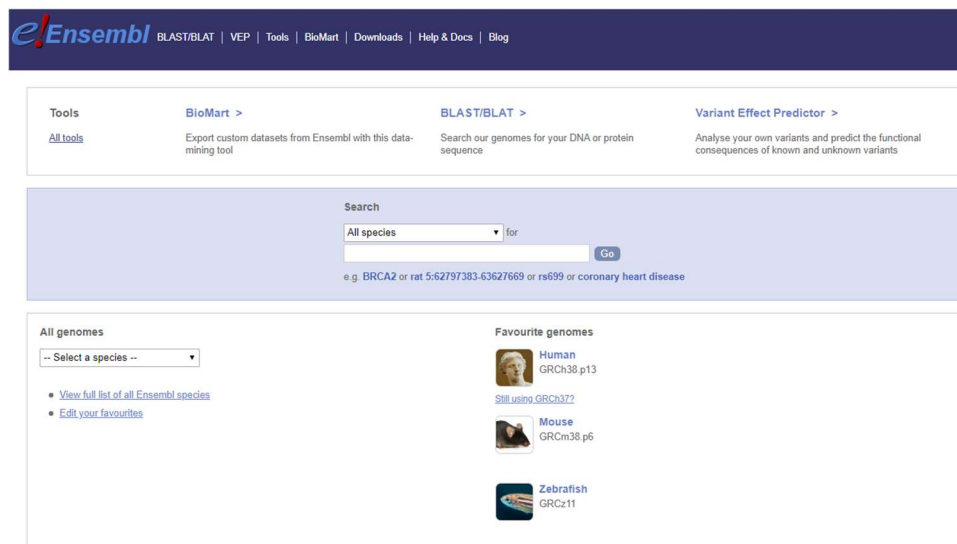
```
plink - - file merged - - geno 0.01 - - mind 0.01 - - maf 0.05 - - tab - - recode - - out GSAQC
```

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

Βάσεις δεδομένων

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

- Ensembl GrCh37



Εικόνα 16 αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων ensembl

Ο σκοπός της οποίας είναι η παροχή μιας κεντρικής πηγής για γενετιστές, μοριακούς βιολόγους και άλλους ερευνητές που μελετούν το γονιδίωμα του είδους μας αλλά και άλλων σπονδυλωτών και οργανισμών μοντέλων. Η Ensembl είναι μια από τις γνωστές βάσεις δεδομένων για ανάκτηση γονιδιωματικών πληροφοριών και αποτελεί πρακτικά μια μηχανή αναζήτησης του γονιδιώματος διάφορων οργανισμών . Αυτό στην συγκεκριμένη εργασία ήταν πολύ χρήσιμο για την εύρεση πληροφοριών για τα SNPs στα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση , αφού παρέχονται πληροφορίες για την θέση τους , τους φαινοτύπους που έχουν συσχετιστεί με αυτό και τα ποσοστά μετάλλαξης τους σε διάφορους πληθυσμούς .

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

- Snp nexus

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

Οι πολυμορφισμοί DNA αποτελούν εναλλακτικές μορφές ενός χρωμοσωμικού τόπου που διαφέρουν ως προς την αλληλουχία τους. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs)

αφορούν την αλλαγή σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων σε μια θέση του γονιδιώματος (Russell, 2006). Συναντώνται με μεγάλη συχνότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα και αποτελούν μια σημαντική πηγή για τη διερεύνηση της γενετικής βάσης πολλών ασθενειών. Είναι πλέον αποδεκτό ότι συγκεκριμένα SNPs αυξάνουν την προδιάθεση για την εμφάνιση συγκεκριμένων ασθενειών, όπως είναι ο διαβήτης και ο καρκίνος, ή επηρεάζουν την εξέλιξη της ασθένειας. Επομένως, πολυμορφισμοί που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, όταν βρίσκονται σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και οδηγούν σε αλλαγή των αμινοξέων, πολυμορφισμοί που επηρεάζουν θέσεις εναλλακτικού ματίσματος ή βρίσκονται σε ρυθμιστικά στοιχεία ή συντηρημένες non-coding περιοχές, αποτελούν στόχους μελέτης για διάφορες ασθένειες.

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

Συγκεκριμένα, με την αναζήτηση κάθε SNP η βάση δεδομένων προσφέρει πληροφορίες που αφορούν την επίδραση του SNP σε επίπεδο μεταγράφου ή πρωτεϊνικό επίπεδο, δεδομένα HarMap, βιβλιογραφία που συσχετίζει τους πολυμορφισμούς με συγκεκριμένο φαινότυπο ή ασθένεια, επίπεδα συντήρησης της περιοχής του γονιδιώματος μεταξύ διαφορετικών οργανισμών αλλά και πληροφορίες που αφορούν την πιθανή επίδραση του SNP στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της παροχής δεδομένων που αφορούν ανίχνευση υποκινητών, ενισχυτών και άλλων ρυθμιστικών στοιχείων (Dayem Ullah et al., 2012).

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

Στη συνέχεια, από την υποενότητα Annotation categories επιλέγεται η έκδοση γονιδιώματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά και ορίζονται οι διάφοροι παράμετροι που θέλει να αναζητήσει ο χρήστης. Για την έναρξη της αναζήτησης χρησιμοποιείται η επιλογή RUN.

Στη συγκεκριμένη ανάλυση επιλέχθηκε η έκδοση GRCh37/hg19 και οι παράμετροι miRBASE 20.0 και microRNAs (miRNA Registry) / snoRNAs and scaRNAs (snoRNA-LBME-DB) από την ενότητα Regulatory elements και Genetic Association of Complex Diseases and Disorders (GAD) από την ενότητα Phenotype and Disease Association. Η συγκεκριμένη έκδοση (GRCh37/hg19) επιλέχθηκε επειδή τα plates γονοτυπήθηκαν σε αυτό το assembly της Ensembl ενώ η υποενότητα Regulatory elements χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστεί αν κάποιο από τα SNPs επιδρά στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων.

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

User details

Email address (optional):

Dataset name (optional):

Query Options

Query Type:

Batch Query
[\[?out format\]](#) [\[Load Example\]](#)

Paste in your query (upto 100K SNPs/InDels)

– OR –
Please specify a file (upto 100K SNPs/InDels): Keine ausgewählt

Εικόνα 16 αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων SNPnexus

Βιοπληροφορική ανάλυση / Αποτελέσματα

Κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους , έγιναν κατά βάση οι εξής διεργασίες :

1) λήψη δειγμάτων 2) απομόνωση σπερματικού DNA 3) αποστολή δειγμάτων DNA για αλληλούχηση 4) επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αλληλούχησης με βιοπληροφορικές μεθόδους σε ότι αναφορά : α) την σύγκριση των ποσοτήτων SNPs στο γονίδιο DNAH5 στα controls και Cases , β) την σύγκριση των συνολικών συχνοτήτων μεταλλάξεων στο γονίδιο DNAH5 στα δείγματα του εργαστήριου (τα οποία αποτελούνται αποκλειστικά από Έλληνες) με τις συχνότητες μετάλλαξης σε άλλους πληθυσμούς.

Εξαγωγή SNPs

Αρχικά έγινε εξαγωγή των SNPs που βρίσκονται στα γονίδια DNAH συγκεκριμένα , αυτό έγινε μέσω αναζήτησης των θέσεων των γονιδίων της οικογένειας DNAH στην βάση δεδομένων Ensembl και στην συνέχεια εξαγωγή των SNPs που βρίσκονται στις θέσεις αυτές μέσω του PLINK ως εξής :

Για το γονίδιο DNAH1 :

αναζήτηση στην Ensembl

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. At the top, there are navigation links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. Below this is a search bar with 'DNAH1' entered, showing '732 results match DNAH1'. On the left, there are filters for 'Restrict category to:' (Gene: 157, Transcript: 309, Phenotype: 1, GeneTree: 126, ProbeFeature: 13, Protein Family: 126) and 'Restrict species to:' (Human: 12, Mouse: 35, Zebrafish: 5, Abingdon island giant tortoise: 4, Agassiz's desert tortoise: 9, Algerian mouse: 4, and 125 more species). At the bottom left, there are options for 'Per page:' (10, 25, 50, 100) and 'Layout:' (Standard, Table). The main content area displays search results for 'DNAH1 (Human Gene)', which is highlighted with a red box. The highlighted result includes the gene symbol ENSG00000114841, coordinates 3:52316319-52400491:1, and a description: 'Dynein axonemal heavy chain 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2940]'. Below the description, there are links for 'Variant table', 'Phenotypes', 'Location', 'External Refs', 'Regulation', 'Orthologues', and 'Gene tree'. Other results for transcripts (DNAH1-202, DNAH1-203, DNAH1-204, DNAH1-205, DNAH1-206) are also visible.

Εικόνα 17 το γονίδιο DNAH1 στην ensembl

Εύρεση συγκεκριμένης θέσης στο γονιδίωμα :

Gene: DNAH1

Gene: DNAH1 ENSG00000114841

Description: dynein, axonemal, heavy chain 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2940]

Gene Synonyms: DHC7, DNAHC1, HDHC7, HI_11, HI_11, KIAA1410, XLHSRF-1

Location: **Chromosome 3: 52,350,335-52,434,507 forward strand.**
GRCh37:CM000665.1

About this gene: This gene has 8 transcripts (splice variants), 52 orthologues, 12 paralogues, is a member of 1 Ensembl protein family

Transcripts: [Show transcript table](#)

Summary

Name: [DNAH1](#) (HGNC Symbol)

CCDS: This gene is a member of the Human CCDS set: [CCDS46842.1](#)

UniProtKB: This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: [Q9P2D7](#)

Ensembl version: ENSG00000114841.13

Other assemblies: This gene maps to [52,316,319-52,400,491](#) in GRCh38 coordinates.

Gene type: Protein coding

Annotation method: Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and [Havana](#) manual curation, see [article](#).

Alternative genes: This gene corresponds to the following database identifiers:
Havana gene: [OTTHUMG00000158378](#) (version 1)

Εικόνα 18 το γονίδιο DNAH1 στην ensembl

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι το γονίδιο DNAH1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3, ξεκινάει στην θέση 52.350.335 και εκτείνεται μέχρι την θέση 52.434.507 και συνεπώς έχει μήκος 84,172 βάσεων.

Η εξαγωγή των SNPs έγινε με τις εξής εντολές :

```
--file GSA3ultimate --chr 3 --from-bp 52350335 --to-bp 52434507 --write-snpelist --out DNAH1
```

Όπου πάρθηκε το αρχείο GSA3ultimate και εξαχθηκαν τα SNPs από την θέση 52350335 μέχρι την θέση 52434507 και εισάχθηκαν σε ένα νέο αρχείο Snplist (το οποίο περιέχει μόνο τα rs# των SNPs) με όνομα DNAH1.SNPLIST

```

C:\Users\elena>plink --file GSA3ultimate --chr 3 --from-bp 52350335 --to-bp 52434507 --write-snp1ist --out DNAH1

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

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

Writing this text to log file [ DNAH1.log ]
Analysis started: Fri Oct 04 16:21:02 2019

Options in effect:
--file GSA3ultimate
--chr 3
--from-bp 52350335
--to-bp 52434507
--write-snp1ist
--out DNAH1

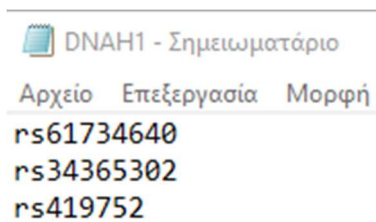
308495 (of 308495) markers to be included from [ GSA3ultimate.map ]
Scan region on chromosome 3 from [ rs61734640 ] to [ rs419752 ]
159 individuals read from [ GSA3ultimate.ped ]
159 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
83 cases, 76 controls and 0 missing
159 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 3 SNPs
159 founders and 0 non-founders found
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 3 SNPs
After filtering, 83 cases, 76 controls and 0 missing
After filtering, 159 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Writing list of SNPs to [ DNAH1.snp1ist ]

```

Εικόνα 19 εξαγωγή SNPs στο PLINK

Στα κόκκινα πλαίσια της παραπάνω εικόνας φαίνονται κάποιες πληροφορίες οι οποίες είναι χρήσιμες για την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων καθώς και την επαλήθευση της ανάλυσης μέσω PLINK . Συγκεκριμένα βλέπουμε από ποιες θέσεις του γονιδιώματος έγινε η εξαγωγή των SNPs καθώς και τον αριθμό των συνολικών ατόμων (159) , τον αριθμό των cases και controls (83 cases και 76 controls) και το φύλο των ατόμων (159 αρσενικά άτομα και 0 θηλυκά άτομα).

Τέλος βλέπουμε ότι η ανάλυση έδωσε 3 SNPs στο τελικό αρχείο .



Εικόνα 20 τα SNPs του γονιδίου DNAH1

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα γονίδια της οικογένειας DNAH : DNAH1 , DNAH2 , DNAH3 , DNAH5 , DNAH6 ,DNAH7 , DNAH8 , DNAH9 , DNAH10 , DNAH11 , DNAH12 , DNAH14 , DNAH17

Η περαιτέρω ανάλυση έγινε με βάση τα αρχεία αυτά.

Στην συνέχεια τα SNPs των αρχείων αυτών αναλυθήκαν με βοήθεια του SNPnexus Με τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν προηγουμένως . Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα ανάλυσης μέσω του SNPnexus για τα γονίδια DNAH3 και DNAH5 , για να φανεί η διαφορά

ανάμεσα στα αποτελέσματα , καθώς τα SNPs του DNAH5 είναι αυτά τα οποία τελικά επιλέχθηκαν για ανάλυση.

Για το DNAH3:

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

SNP	GAD Id	Association	Phenotype	Disease Class	Gene	Reference
rs113247391	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs113247391	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs113247391	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs113247391	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs11644828	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs11644828	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs11644828	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs11644828	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs11865952	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs11865952	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs11865952	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs11865952	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs12102923	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs12102923	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12102923	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12102923	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs12185176	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs12185176	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12185176	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12185176	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs12924551	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs12924551	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12924551	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12924551	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs12929546	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs12929546	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12929546	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12929546	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs12934547	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs12934547	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12934547	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs12934547	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs2301620	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs2301620	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs2301620	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs2301620	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs3103810	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs3103810	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs3103810	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs3103810	741022	Y	Diabetes Mellitus, Type 1	IMMUNE	TNP2	Jason D Cooper et al. Nature genetics 2008
rs33928718	683150		Tobacco Use Disorder	CHEMDEPENDENCY	DNAH3	Rose J et al. 2010
rs33928718	733316	Y	Apolipoproteins B	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007
rs33928718	734693	Y	Cholesterol, LDL	METABOLIC	HPR	Sekar Kathiresan et al. BMC medical genetics 2007

Εικόνα 21 αποτελέσματα της SNPnexus για το γονίδιο DNAH3

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

Για το DNAH5 τα αποτελέσματα σχετικά με την αντρική υπογονιμότητα είναι τα εξής :

SNP	GAD Id	Phenotype	Disease Class	Gene	Reference
rs10061803	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs10070196	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs10462590	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs10462713	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs10513151	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs10513155	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs10866502	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs11133764	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs114999381	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs115542432	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs115730612	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs11738619	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs11750327	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs12186615	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs12653156	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs13156044	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs13180591	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs1354185	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs1354187	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs1373976	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs1530498	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs16902953	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs17203442	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs17206424	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs17263496	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs17265718	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs1827408	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs30168	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs339447	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs35551776	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs3734109	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs4701984	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs57268322	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs6554809	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs6859484	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs7703349	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs7704926	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs7710301	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs7733137	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs795526	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs795542	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs795543	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs895319	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62
rs983649	573149	Asthenozoospermia Kartagener Syndrome	REPRODUCTION	DNAH5	D Zuccarello , et al. Human reproduction 2008 23(8):1957-62

Εικόνα 22αποτελέσματα SNPnextus για το γονίδιο DNAH5

Στα κόκκινα πλαίσια φαινόνταν τα SNPs στα οποία βρέθηκε μέσω του SNPnexus συσχετισμένος φαινότυπος που επηρεάζει την ανδρική γονιμότητα.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα γονίδια DNAH , για να βρεθεί τυχόν σχετικός φαινότυπος , όμως τελικά βρέθηκε μόνο για το γονίδιο DNAH5 και συνεπώς η ανάλυση συνεχίστηκε με αυτά τα SNPs και επιλεχθηκαν τα SNPs τα οποία βρισκονται σε συμφωνια με τα δεδομενα της ensembl.

Τα SNPs αυτά είναι τα εξής :

Πίνακας 1 SNPs του γονιδίου DNAH5

rs30168	rs17203442	rs115542432	rs17263496
rs17265718	rs17206424	rs114999381	rs7704926
rs35551776	rs7733137	rs12186615	rs10513155
rs10061803	rs115730612	rs10462713	rs10462590
rs10866502	rs10513151	rs7710301	rs6554809
rs11738619	rs11133764	rs7703349	rs13156044
rs1354187	rs4701984	rs795543	rs795542
rs57268322	rs6859484	rs13180591	rs16902953
rs10070196	rs12653156	rs339447	rs11750327

Κατόπιν συλλέχθηκαν κάποιες επιπλέον πληροφορίες για τα επιμέρους SNPs μέσω της Ensembl σχετικές με τις πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων του SNP αυτού .

Variant: rs30168

rs30168 SNP

Most severe consequence **missense variant** | [See all predicted consequences](#)

Alleles **G/A/C/T** | Ancestral: A | MAF: 0.47 (A) | Highest population MAF: 0.49

Location **Chromosome 5:13719089** (forward strand) | VCF: 5 13719089 rs30168 G A,C,T

Evidence status 

Clinical significance 

Εικόνα 23 το rs30168 στην ensembl

Παραπάνω φαίνεται για το SNP : rs30168 το οποίο φαίνεται να κατηγοριοποιείται ως παρανοηματική μετάλλαξη , δηλαδή ότι η μετάλλαξη στην θέση αυτή , προκαλεί την παραγωγή προϊόντος με διαφορετική αμινοξική αλληλουχία , χωρίς να επηρεάζει το μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας.

Οι πληροφορίες αυτές δίνονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 2 περαιτέρω πληροφορίες απο την ensembl

SNPs		SNPs	
rs10061803	Ιντρονική μετάλλαξη	rs17203442	Ιντρονική μετάλλαξη
rs10070196	Ιντρονική μετάλλαξη	rs17206424	Ιντρονική μετάλλαξη
rs10462590	Ιντρονική μετάλλαξη	rs17263496	παρανοηματική μετάλλαξη
rs10462713	Ιντρονική μετάλλαξη	rs17265718	Ιντρονική μετάλλαξη
rs10513151	Ιντρονική μετάλλαξη	rs1827408	Ιντρονική μετάλλαξη
rs10513155	παρανοηματική μετάλλαξη	rs30168	παρανοηματική μετάλλαξη
rs10866502	Ιντρονική μετάλλαξη	rs339447	Ιντρονική μετάλλαξη
rs11133764	Ιντρονική μετάλλαξη	rs35551776	Ιντρονική μετάλλαξη
rs114999381	Ιντρονική μετάλλαξη	rs3734109	Ιντρονική μετάλλαξη
rs115542432	Ιντρονική μετάλλαξη	rs4701984	Ιντρονική μετάλλαξη
rs115730612	Ιντρονική μετάλλαξη	rs57268322	Ιντρονική μετάλλαξη
rs11738619	Ιντρονική μετάλλαξη	rs6554809	Ιντρονική μετάλλαξη
rs11750327	Ιντρονική μετάλλαξη	rs6859484	Ιντρονική μετάλλαξη
rs12186615	Ιντρονική μετάλλαξη	rs7703349	συνώνυμη μετάλλαξη
rs12653156	Ιντρονική μετάλλαξη	rs7704926	Ιντρονική μετάλλαξη
rs13156044	Ιντρονική μετάλλαξη	rs7710301	Ιντρονική μετάλλαξη
rs13180591	Ιντρονική μετάλλαξη	rs7733137	Ιντρονική μετάλλαξη
rs1354185	Ιντρονική μετάλλαξη	rs795526	Ιντρονική μετάλλαξη
rs1354187	Ιντρονική μετάλλαξη	rs795542	Ιντρονική μετάλλαξη
rs1373976	Ιντρονική μετάλλαξη	rs795543	Ιντρονική μετάλλαξη
rs1530498	παρανοηματική μετάλλαξη	rs895319	Ιντρονική μετάλλαξη
rs16902953	Ιντρονική μετάλλαξη	rs983649	Ιντρονική μετάλλαξη

Όπου ως ιντρονικές μεταλλάξεις, αναφέρονται τα SNP τα οποία βρίσκονται σε περιοχή ιντρονίου, ως παρανοηματικές μεταλλάξεις αναφέρονται τα SNP η μετάλλαξη στην θέση των οποίων οδηγεί στην αλλαγή ενός αμινοξέος αλλά δεν επηρεάζει το μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας και ως συνώνυμη μετάλλαξη αναφέρεται το SNP, η μετάλλαξη στην θέση του οποίου δεν αλλάζει την αμινοξική αλληλουχία.

Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να φανούν χρήσιμες στην εκτίμηση της επίδρασης που θα μπορούσε να έχει μια μετάλλαξη των SNPs αυτών στον φαινότυπο. Για παράδειγμα αναμένεται η μετάλλαξη σε ένα SNP που βρίσκεται σε περιοχή ιντρονίου να έχει μικρότερη επίδραση στον φαινότυπο σε σχέση με μια μετάλλαξη που να επηρεάζει το τελικό πρωτεϊνικό προϊόν.

Για να μελετηθεί πιο εις βάθος η επίδραση των συγκεκριμένων SNPs στον φαινότυπο, πρέπει να γίνει εξαγωγή των αλληλουχιών των συγκεκριμένων 36 SNPs από το αρχείο GSA3ultimate το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες όλων των γονοτυπημένων SNPs για όλα τα άτομα. Αυτό έγινε μέσω του PLINK με τις εξής εντολές:

--file GSA3ultimate --extract DNAH5.txt --tab --recode --out DNAH5geno

Το αρχείο που δημιουργείται είναι αρχείο .PED το οποίο περιέχει πληροφορίες για τα άτομα στα οποία έχει γίνει γονοτύπηση , όπως : το φύλο του ατόμου , το αν το άτομο είναι case ή control και τελικά τον γονότυπο του ατόμου για κάθε ένα από τα 36 SNPs του γονιδίου DNAH5.

Στην συνέχεια έγινε ανάλυση των δεδομένων αυτών σε δυο επίπεδα , ως προς :

- 1) Τα ποσοστά μετάλλαξης του κάθε επιμέρους SNP στα δείγματα που έχουν γονοτυπηθεί
- 2) Τα ποσοστά μετάλλαξης των SNPs σε κάθε άτομο

Και για τις δυο διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω έπρεπε πρώτα να βρεθούν οι γονότυποι αγρίου τύπου καθώς και οι μεταλλαγμένοι γονότυποι , έτσι ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν σωστά τα ποσοστά μετάλλαξης.

Τα δεδομένα αυτά βρέθηκαν μέσω της Ensembl ως εξής :

Variant: rs30168

rs30168 SNP

Most severe consequence: missense variant | See

Alleles: G/A/C/T | Ancestral: A

Location: Chromosome 5:13719089

Εικόνα 24 γονοτυποι του rs30168

Γίνεται αναζήτηση του SNP μέσω του rs# του στην Ensembl , και όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα , αναγράφεται ο γονότυπος αγρίου τύπου (ancestral) , ο οποίος στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι Αδενινη για το SNP rs30168 και τα πιθανά αλληλόμορφα του SNP που στην περίπτωση αυτή θα μπορούσε να είναι οποιοδήποτε από τα 4 νουκλεοτιδια του DNA .

Στην περίπτωση του rs30168 οι γονότυποι που υπάρχουν στα γονοτυπημένα άτομα σύμφωνα με το αρχείο DNAH5geno είναι AA , AG και GG και στην περίπτωση αυτήν θα αναφερόταν ως ομόζυγο για τον γονότυπο αγρίου τύπου τα άτομα με γονότυπο AA , ως ετερόζυγα για τον μεταλλαγμένο γονότυπο τα άτομα με γονότυπο AG και ως ομόζυγα για τον μεταλλαγμένο γονότυπο τα άτομα με γονότυπο GG. Οι χαρακτηρισμοί αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια και για τα υπόλοιπα άτομα.

Υπολογισμός ποσοστών

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

Μεταλλάξεις = Γονότυποι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο + γονότυποι ετερόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο

Αγρίου τύπου = γονότυποι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου

Οι ποσότητες αυτές διαιρέθηκαν με το 159 , καθώς αυτός είναι ο αριθμός των ατόμων , και τα αποτελέσματα των διαιρέσεων αυτών πολλαπλασιάστηκαν με το 100 για να βρεθεί το τελικό ποσοστό τις εκατό.

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα :

	rs30168	rs17203442	rs10866502	rs10513151	rs115542432	rs17263496
ancestral genotype frequency	15%	79%	17%	40%	86%	81%
total mutation frequency	85%	21%	81%	60%	14%	19%
heterozygous mutation frequency	55%	18%	53%	48%	14%	17%
homozygous mutation frequency	30%	3%	28%	12%	0%	3%
	rs795543	rs795542	rs11750327	rs17265718	rs17206424	rs11738619
ancestral genotype frequency	28%	51%	15%	86%	59%	71%
total mutation frequency	72%	49%	85%	14%	41%	29%
heterozygous mutation frequency	56%	43%	51%	14%	37%	27%
homozygous mutation frequency	16%	6%	35%	0%	4%	2%
	rs6859484	rs10462713	rs10462590	rs13180591	rs16902953	rs12653156
ancestral genotype frequency	43%	43%	41%	42%	57%	62%
total mutation frequency	57%	57%	59%	58%	43%	38%
heterozygous mutation frequency	47%	45%	48%	46%	36%	32%
homozygous mutation frequency	10%	12%	11%	13%	7%	6%
	rs7710301	rs6554809	rs35551776	rs7733137	rs1354187	rs4701984
ancestral genotype frequency	6%	2%	74%	57%	39%	32%
total mutation frequency	94%	98%	26%	43%	61%	68%
heterozygous mutation frequency	37%	33%	25%	38%	53%	49%
homozygous mutation frequency	57%	65%	2%	5%	8%	19%
	rs11133764	rs114999381	rs7704926	rs7703349	rs13156044	rs10061803
ancestral genotype frequency	72%	67%	38%	14%	87%	30%
total mutation frequency	28%	33%	62%	86%	13%	70%

heterozygous mutation frequency	26%	31%	51%	48%	12%	53%
homozygous mutation frequency	2%	2%	11%	38%	1%	17%
	rs10070196	rs339447	rs12186615	rs10513155	rs115730612	rs57268322
ancestral genotype frequency	8%	48%	67%	38%	88%	86%
total mutation frequency	92%	52%	33%	62%	12%	14%
heterozygous mutation frequency	50%	45%	31%	47%	12%	12%
homozygous mutation frequency	43%	8%	2%	15%	0%	2%

Πίνακας 3 ποσοστά γονοτύπων των SNPs

Για τον υπολογισμό των ποσοστών μετάλλαξης των SNPs σε κάθε άτομο ξεχωριστά έγινε μέτρηση των μεταλλαγμένων και μη γονοτύπων σε κάθε άτομο . Πριν γίνει αυτό όμως , έγινε κατηγοριοποίηση των ατόμων ανάλογα με τον χαρακτηρισμό του σπερμοδιαγράμματος τους .

Συγκεκριμένα από την στιγμή που υπάρχει παρουσία σπερματοζωαρίων στο σπερμοδιάγραμμα (δεν είναι δηλαδή περίπτωση αζωοσπερμίας) , γίνεται αξιολόγηση του δείγματος σύμφωνα με τρεις παράγοντες : ποσότητα σπερματοζωαρίων , ταχύτητα σπερματοζωαρίων , μορφολογία σπερματοζωαρίων .

Τα δείγματα με αριθμό σπερματοζωαρίων μικρότερη από την φυσιολογική αξιολογούνται ως ολιγοσπερμικά .

Τα δείγματα με σπερματοζωάρια μικρότερης από την φυσιολογική ταχύτητα αξιολογούνται ως ασθενοσπερμικά.

Τα δείγματα με σπερματοζωάρια με διαφορετική από την φυσιολογική μορφολογία αξιολογούνται ως τερατοσπερμικά .

Το κάθε δείγμα ενός ατόμου με μη φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα μπορεί να πάρει οποιονδήποτε πιθανό συνδυασμό των τριών παραγόντων αυτών . Συνεπώς τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τους χαρακτηρισμούς αυτούς και χρησιμοποιήθηκαν οι συντομογραφίες : n (normal) , o (oligospermia) , a (asthenospermia) , t (teratospermia).

Έτσι ένας άντρας του οποίου το σπερμοδιάγραμμα χαρακτηρίστηκε ως ασθενοσπερμικό και τερατοσπερμικό , θα γραφόταν με την συντομογραφία n/a/t.

Τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως controls είναι άτομα με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα (n/n/n).

Οι κατηγοριοποιήσεις των ατόμων είναι οι εξής :

Αριθμός δείγματος	Case	Αποτέλεσμα σπερμοδιαγράμματος
59	Case	o/a/t
56	Case	o/a/t
36	Case	o/a/t
30	Case	o/a/t
13	Case	o/a/t
16	Case	o/a/t
71	Case	o/a/t
94	Case	o/a/t
91	Case	o/a/t
77	Case	o/a/t
57	Case	o/a/t
40	Case	o/a/t
3	Case	o/a/t
61	Case	o/a/t
161	Case	o/a/t
122	Case	o/a/t
160	Case	o/a/t

Πίνακας 4 άτομα με σπερμοδιάγραμμα o/a/t

7	Case	o/n/n
50	Case	o/n/n
79	Case	o/n/n
52	Case	o/n/n
75	Case	o/n/n
78	Case	o/n/n
81	Case	o/n/n
155	Case	o/n/n
118	Case	o/n/n
164	Case	o/n/n
184	Case	o/n/n
138	Case	o/n/n
107	Case	o/n/n
98	Case	o/n/n
142	Case	o/n/n
99	Case	o/n/n
166	Case	o/n/n
186	Case	o/n/n

Πίνακας 5 άτομα με σπερμοδιάγραμμα o/n/n

53	Case	n/n/t
65	Case	n/n/t
34	Case	n/n/t
28	Case	n/n/t
80	Case	n/n/t
2	Case	n/n/t
37	Case	n/n/t
46	Case	n/n/t
95	Case	n/n/t
23	Case	n/n/t
14	Case	n/n/t
49	Case	n/n/t
177	Case	n/n/t
143	Case	n/n/t

Πίνακας 6 άτομα με σπερμοδιάγραμμα n/n/t

31	Case	o/a/n
141	Case	o/a/n
121	Case	o/a/n
170	Case	o/a/n
176	Case	o/a/n
156	Case	o/a/n
147	Case	o/a/n
150	Case	o/a/n
153	Case	o/a/n
136	Case	o/a/n
182	Case	o/a/n
119	Case	o/a/n
110	Case	o/a/n
168	Case	o/a/n
165	Case	o/a/n
145	Case	o/a/n
154	Case	o/a/n

Πίνακας 7 άτομα με σπερμοδιάγραμμα o/a/n

64	Case	o/n/t
67	Case	o/n/t
18	Case	o/n/t
47	Case	o/n/t
38	Case	o/n/t
41	Case	o/n/t
96	Case	o/n/t
87	Case	o/n/t
93	Case	o/n/t
106	Case	o/n/t
146	Case	o/n/t
178	Case	o/n/t
132	Case	o/n/t
117	Case	o/n/t
183	Case	n/a/n
24	Case	n/a/t
15	Case	n/a/t

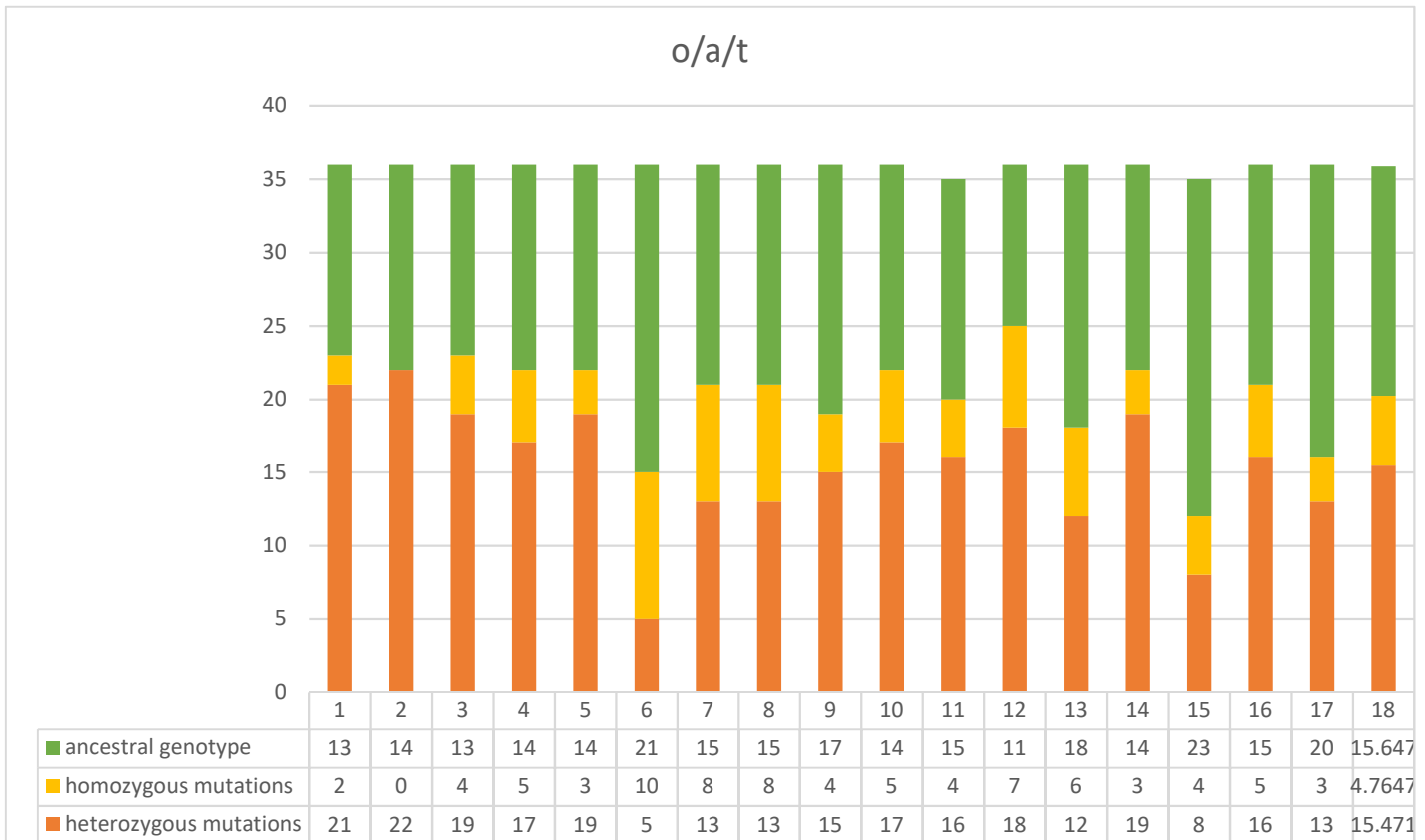
Πίνακας 8 άτομα με σπερμοδιάγραμμα o/n/t, n/a/n και n/a/t

1	Control	n/n/n	100	Control	n/n/n	83	Control	n/n/n	116	Control	n/n/n
10	Control	n/n/n	103	Control	n/n/n	74	Control	n/n/n	159	Control	n/n/n
4	Control	n/n/n	169	Control	n/n/n	11	Control	n/n/n	162	Control	n/n/n
73	Control	n/n/n	172	Control	n/n/n	5	Control	n/n/n	148	Control	n/n/n
76	Control	n/n/n	175	Control	n/n/n	8	Control	n/n/n	151	Control	n/n/n
27	Control	n/n/n	123	Control	n/n/n	60	Control	n/n/n	108	Control	n/n/n
33	Control	n/n/n	115	Control	n/n/n	54	Control	n/n/n	102	Control	n/n/n
22	Control	n/n/n	167	Control	n/n/n	43	Control	n/n/n	105	Control	n/n/n
19	Control	n/n/n	158	Control	n/n/n	86	Control	n/n/n	171	Control	n/n/n
62	Control	n/n/n	181	Control	n/n/n	89	Control	n/n/n	174	Control	n/n/n
68	Control	n/n/n	135	Control	n/n/n	92	Control	n/n/n	157	Control	n/n/n
85	Control	n/n/n	130	Control	n/n/n	17	Control	n/n/n	163	Control	n/n/n
88	Control	n/n/n	124	Control	n/n/n	72	Control	n/n/n	120	Control	n/n/n
39	Control	n/n/n	179	Control	n/n/n	63	Control	n/n/n	111	Control	n/n/n
42	Control	n/n/n	173	Control	n/n/n	66	Control	n/n/n	114	Control	n/n/n
45	Control	n/n/n	104	Control	n/n/n	69	Control	n/n/n	137	Control	n/n/n
25	Control	n/n/n	133	Control	n/n/n	58	Control	n/n/n	189	Control	n/n/n
6	Control	n/n/n	32	Control	n/n/n	55	Control	n/n/n	35	Control	n/n/n
9	Control	n/n/n	97	Control	n/n/n	12	Control	n/n/n	26	Control	n/n/n

Πίνακας 9 άτομα control

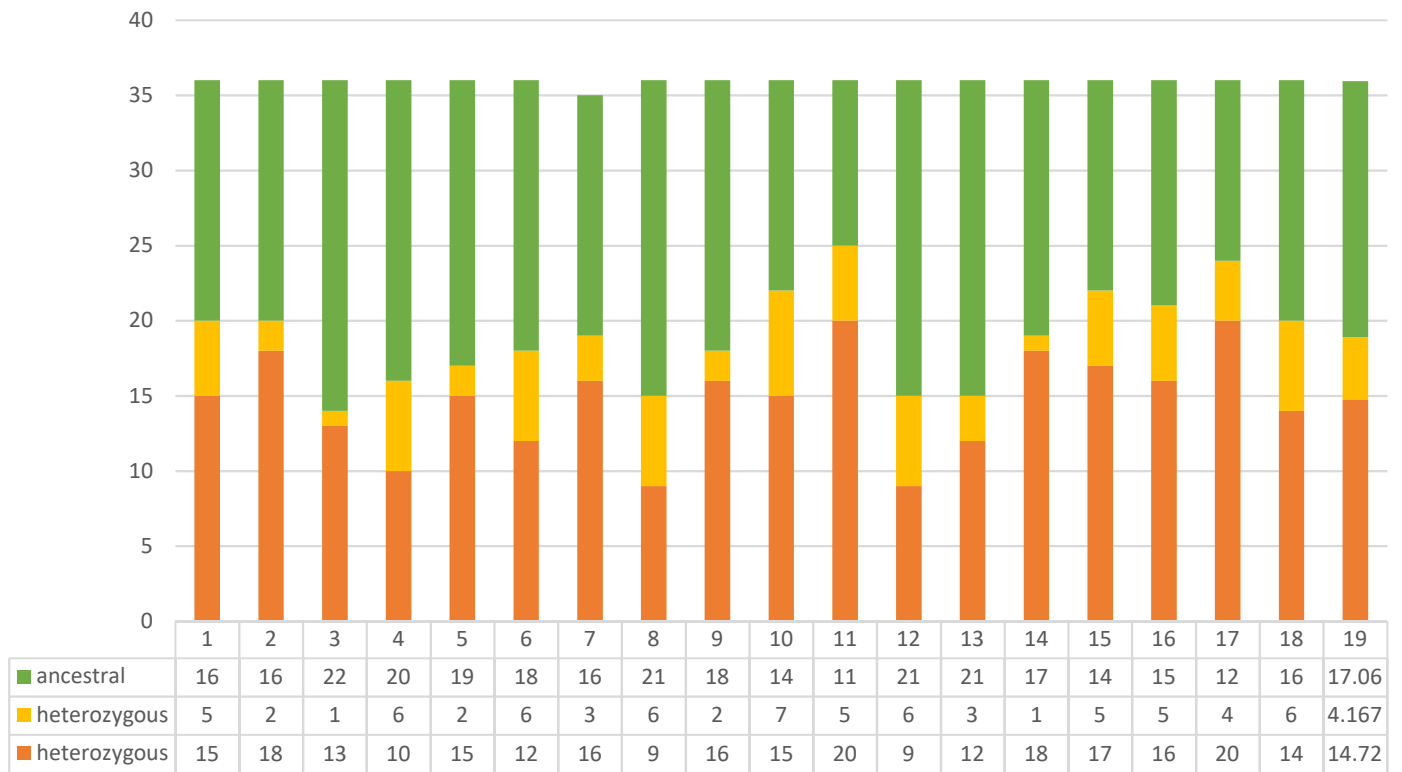
Έπειτα έγινε μέτρηση των μεταλλαγμένων και μη γονοτύπων σε κάθε άτομο ξεχωριστά , δηλαδή σημειώθηκαν οι σχετικοί γονότυποι των 36 SNPs για κάθε ένα από τα 159 άτομα. Επιπρόσθετα έγινε υπολογισμός των μέσων όρων των μεταλλαγμένων γονοτύπων και των γονοτύπων αγρίου τύπου για κάθε μια από τις κατηγορίες φαινοτύπων .

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής γίνεται στα παρακάτω γραφήματα , όπου η τελευταία στήλη κάθε γραφήματος είναι ο μέσος όρος όλων των ατόμων της κατηγορίας αυτής



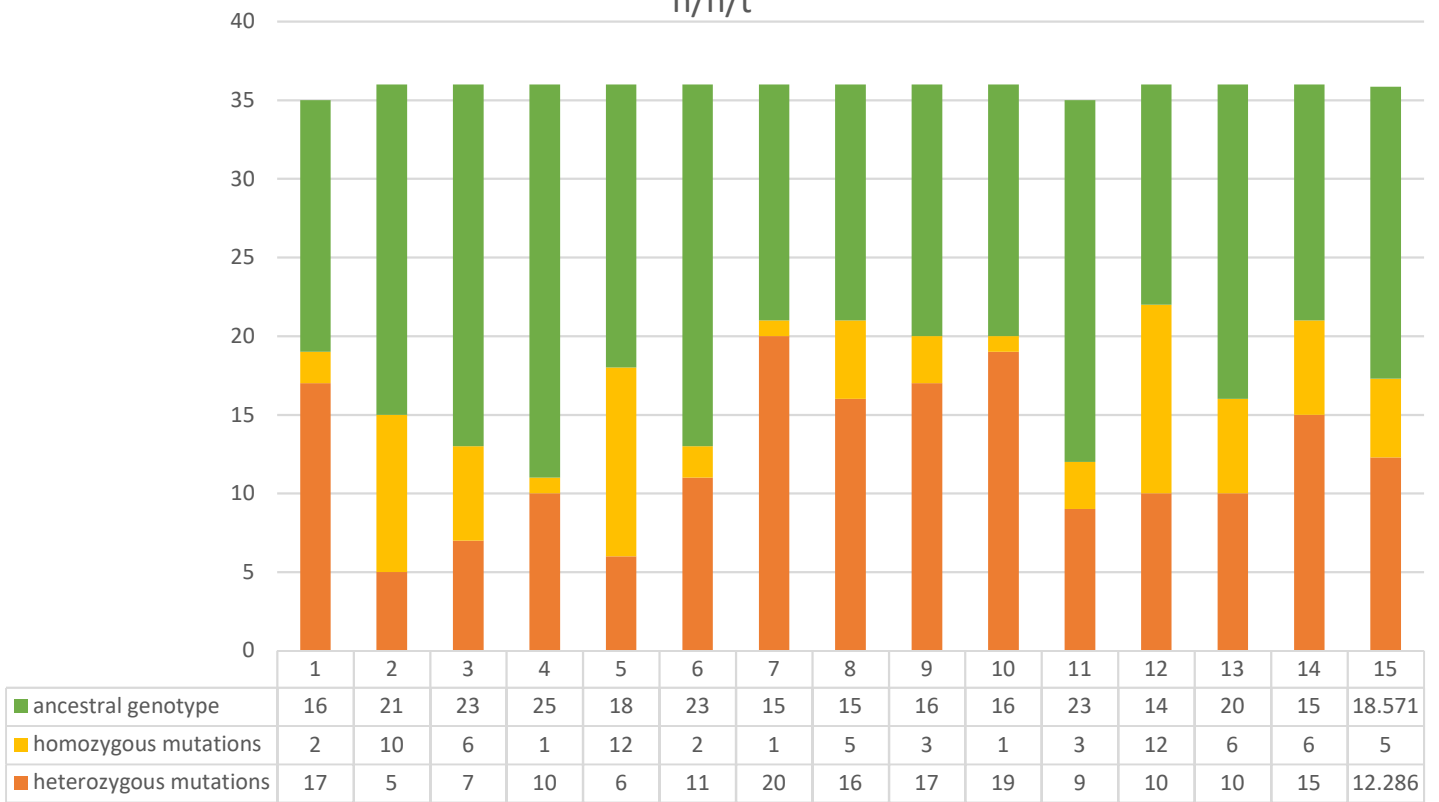
Εικόνα 25 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων o/a/t

o/n/n

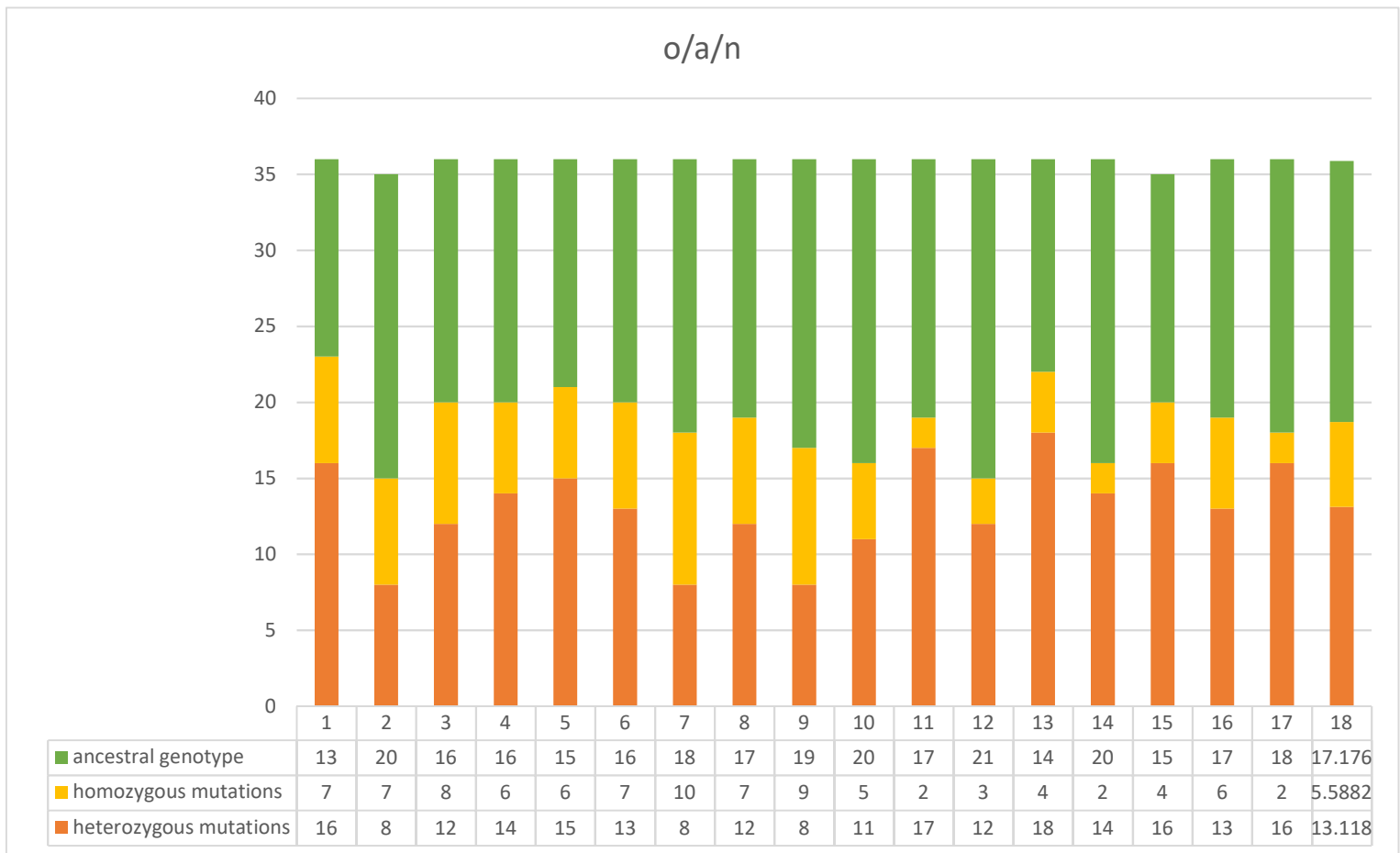


Εικόνα 27 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων o/n/n

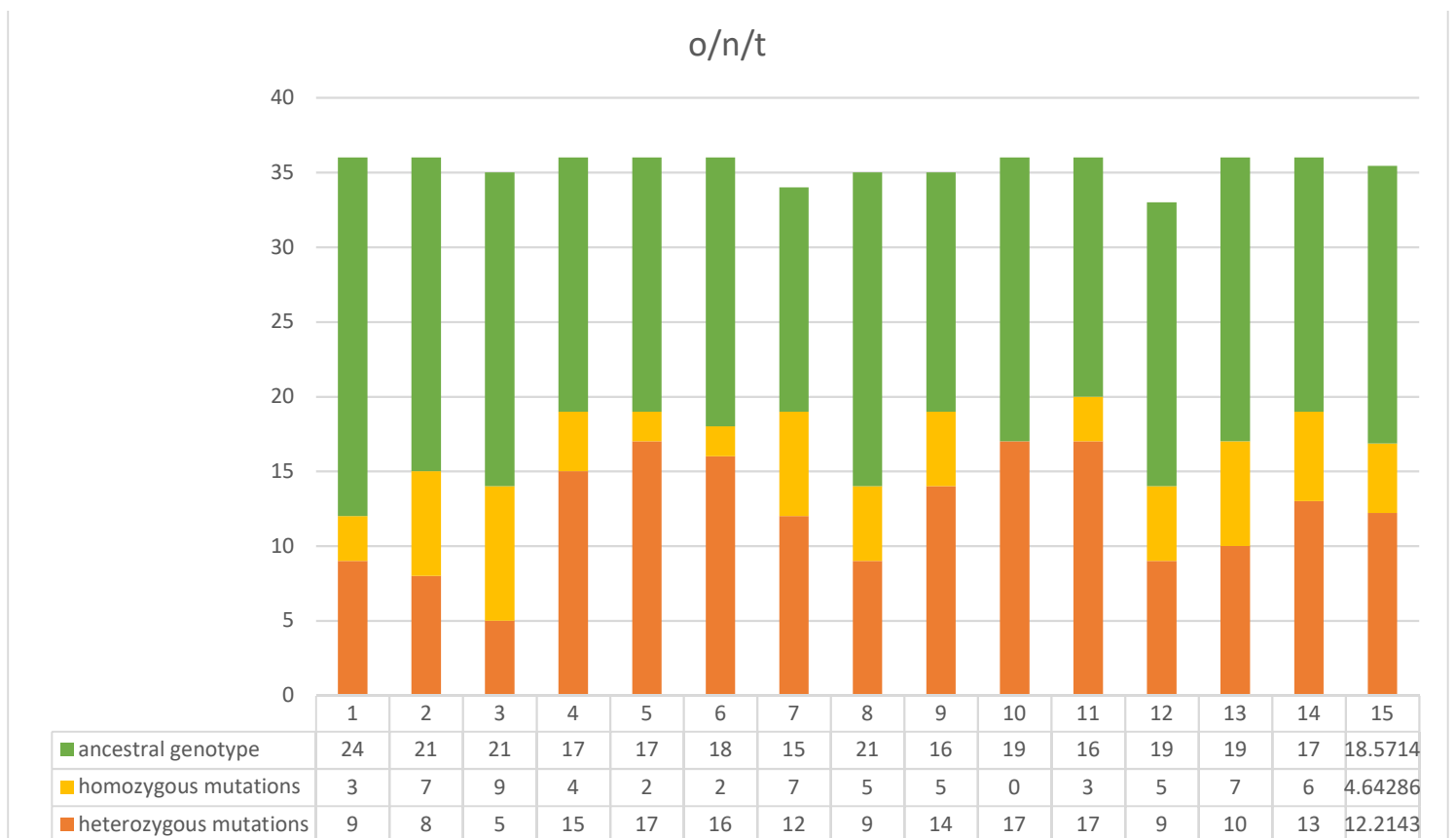
n/n/t



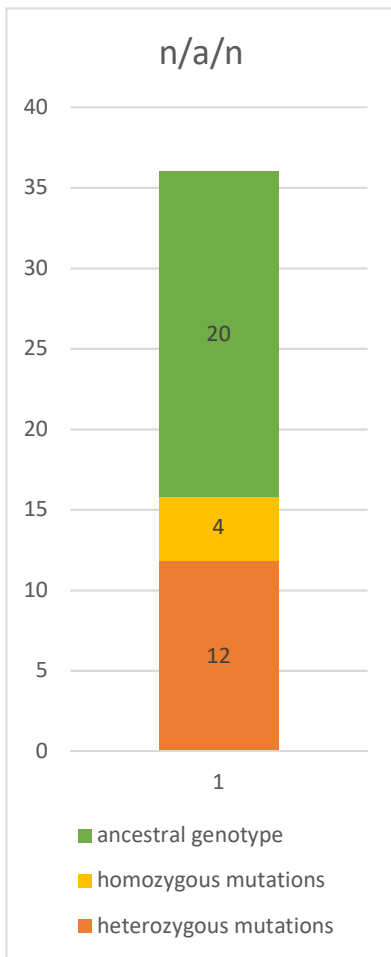
Εικόνα 28 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων n/n/t



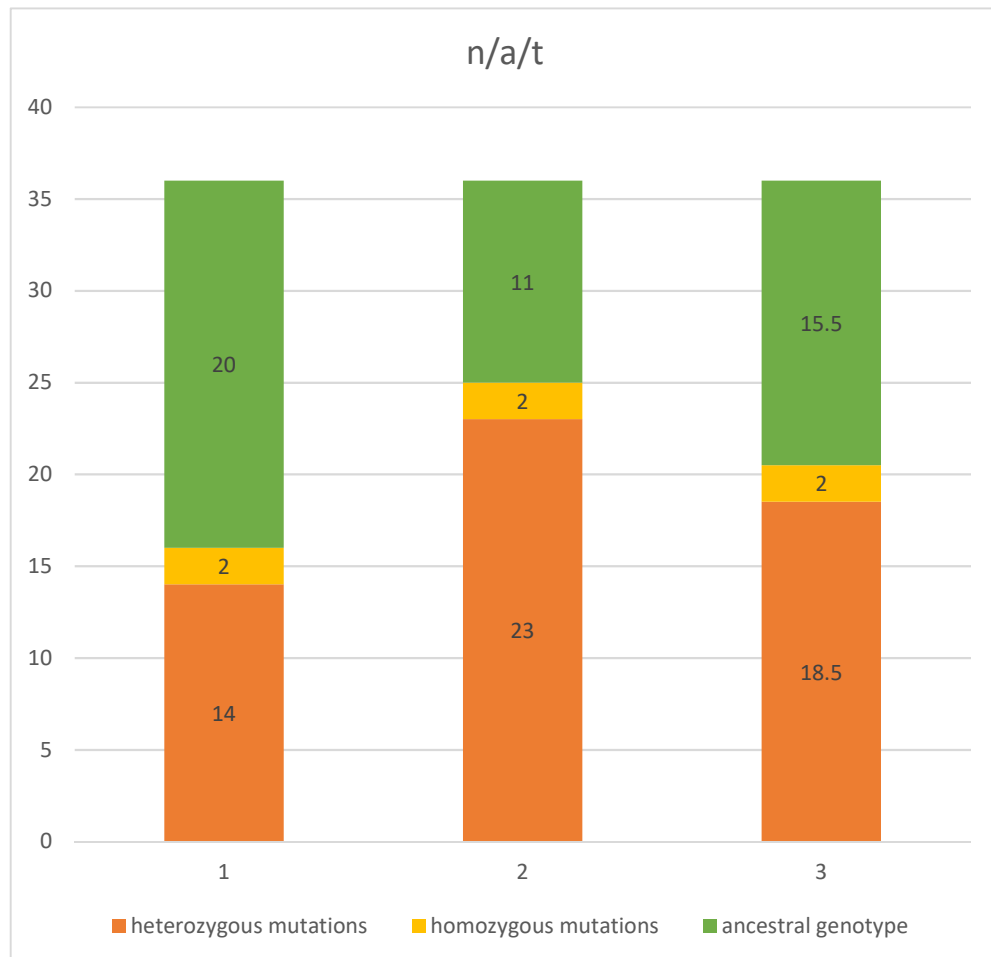
Εικόνα 29 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων o/a/n



Εικόνα 30 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων o/n/t



Εικόνα 31 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων n/a/n



Εικόνα 32 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων n/a/t

Όσο αναφορά τα control τα άτομα με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα είχαν κατά μέσο όρο τις εξής τιμές :

controls			
Total Mutation	Heterozygous mutations	Homozygous mutations	Ancestral genotype
17.9078947	12.9342105	5	17.9342105

Πίνακας 10 ποσοστά γονοτύπων των ατόμων control

Σε ότι αφορά την ποσότητα των μεταλλάξεων των συγκεκριμένων SNPs στις διάφορες κατηγορίες δειγμάτων , ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των μεταλλάξεων των ατόμων Control , δηλαδή των ατόμων με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα. Τα δείγματα που έχουν την μεγαλύτερη απόκλιση από την τιμή αυτή είναι τα δείγματα των ατόμων με σπερμοδιάγραμμα που δείχνει ολιγοσπερμία , Ασθενοσπερμία , Τερατοσπερμία. Πιο συγκεκριμένα στα Controls κατά μέσο όρο υπάρχουν 17,9 μεταλλάξεις και 17,9 με γονότυπο αγρίου τύπου , ενώ στα άτομα o/a/t υπάρχουν κατά μέσο όρο 20,3 μεταλλάξεις και 15,6 με γονότυπο αγρίου τύπου .

Η διαφορά στην ποσότητα των μεταλλάξεων είναι περίπου 2,4 κατά μέσο όρο , περισσότερες μεταλλάξεις στα άτομα με σπερμοδιάγραμμα o/a/t. Η διαφορά αυτή δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη και όχι αρκετή για να μπορεί να συμπεραθεί κάποια συσχέτιση αναμεσα στην ποσότητα των μεταλλάξεων σε SNPs στο γονίδιο DNAH5 και φαινότυπο ανδρικής υπογονιμότητας .

Να σημειωθεί επίσης ότι ένας λόγος για αυτό είναι η σχετικά μικρή ποσότητα δειγμάτων καθώς και μικρή ποσότητα SNPs που αναλυθήκαν.

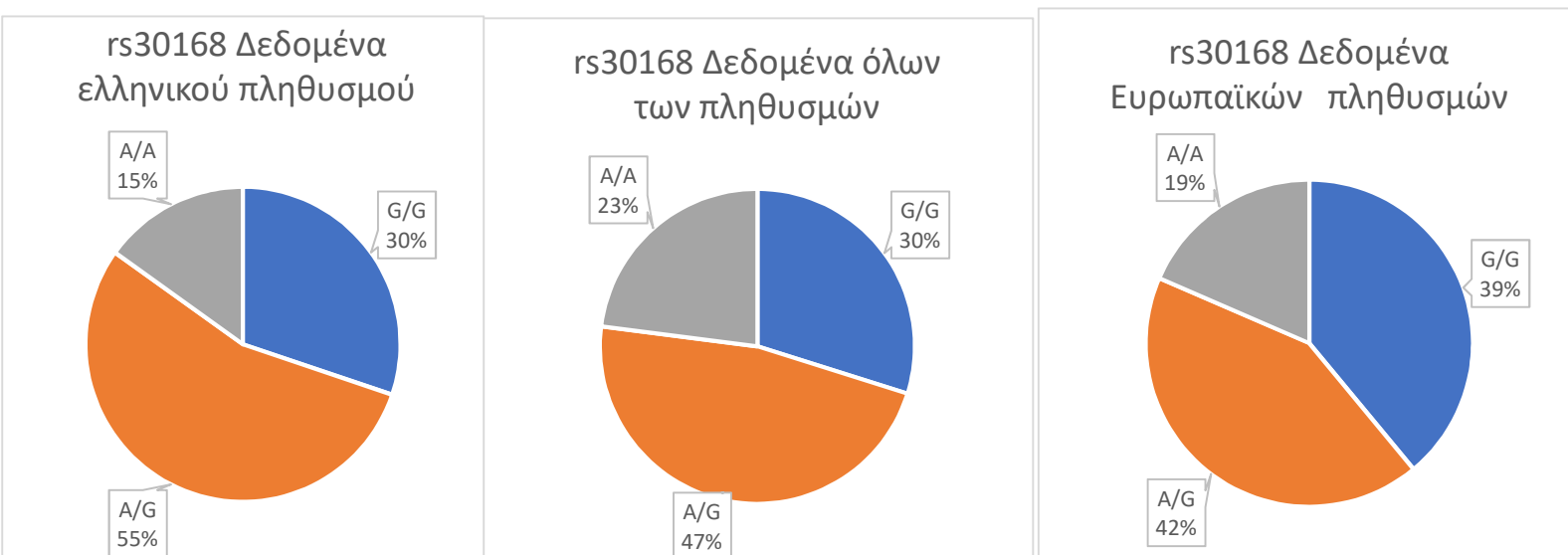
Σύγκριση δεδομένων διαφορετικών πληθυσμών

Ως τελευταίο στάδιο ανάλυσης, έγινε λήψη δεδομένων από την Ensembl σχετικά με τα ποσοστά γονοτύπων στα SNPs του γονιδίου DNAH5. Η Ensembl παρέχει δεδομένα για διάφορους πληθυσμούς, αλλά στην ανάλυση αυτή πάρθηκαν τα δεδομένα για τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς καθώς και τα συνδεδεμένα δεδομένα όλων των πληθυσμών (African, American, East Asian, South Asian, European).

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

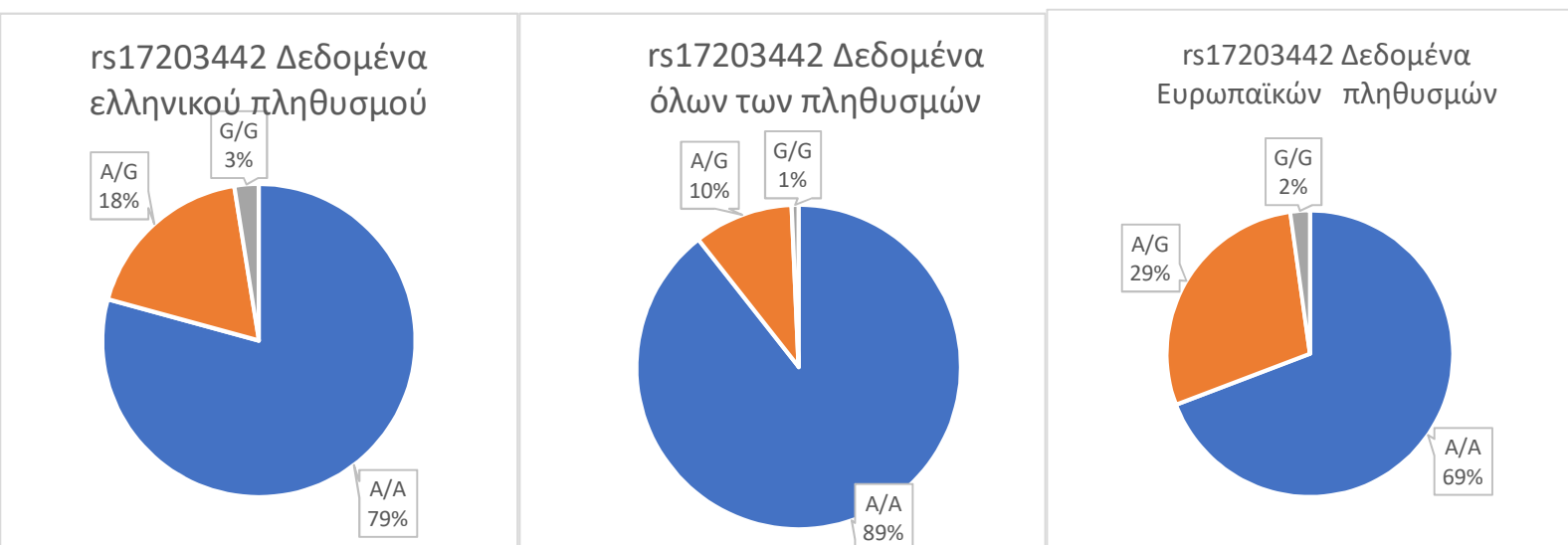
Τα αποτελέσματα της διεργασίας αυτής φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.

rs30168: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



Εικόνα 33 δεδομένα rs30168

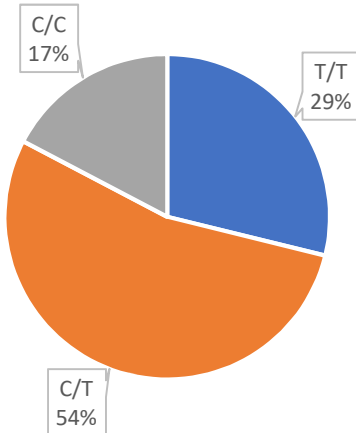
rs17203442: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



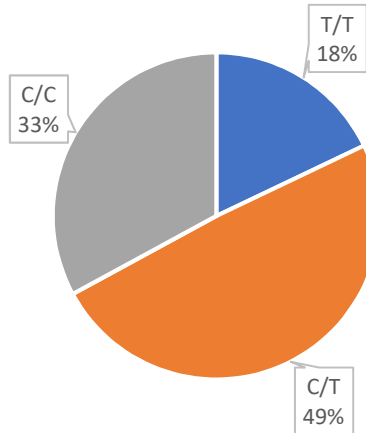
Εικόνα 34 δεδομένα rs17203442

rs10866502: αλληλόμορφο αγρίου τύπου : C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

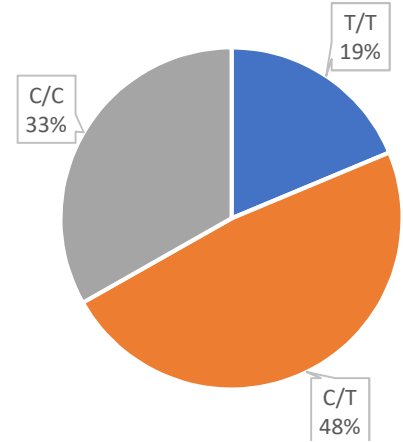
rs10866502 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs10866502 Δεδομένα όλων των πληθυσμών



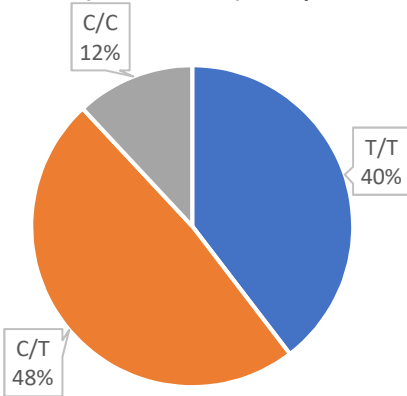
rs10866502 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών



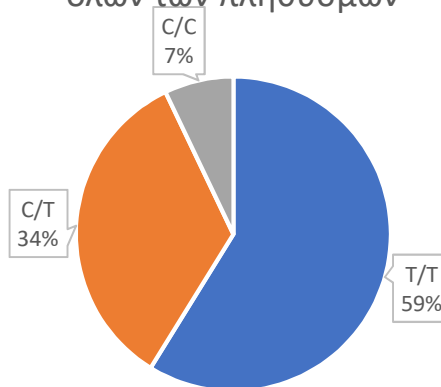
Εικόνα 35 δεδομένα rs10866502

rs10513151 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

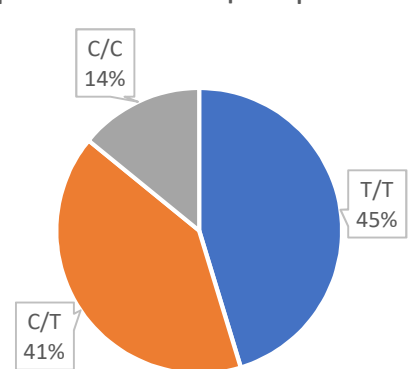
rs10513151 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs10513151 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

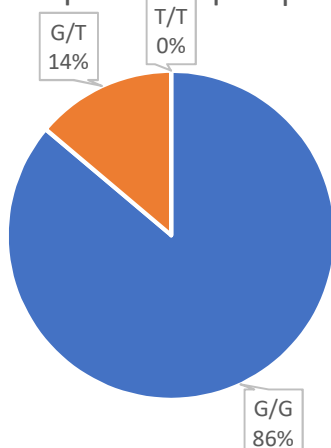


rs10513151 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

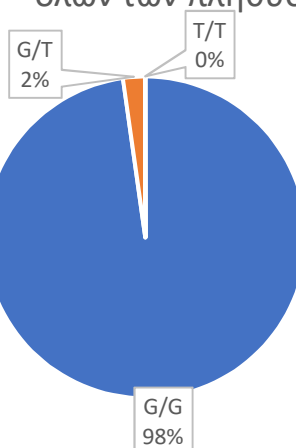


rs115542432: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

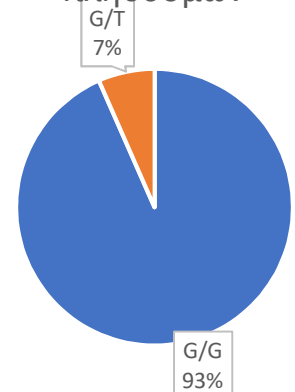
rs115542432 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



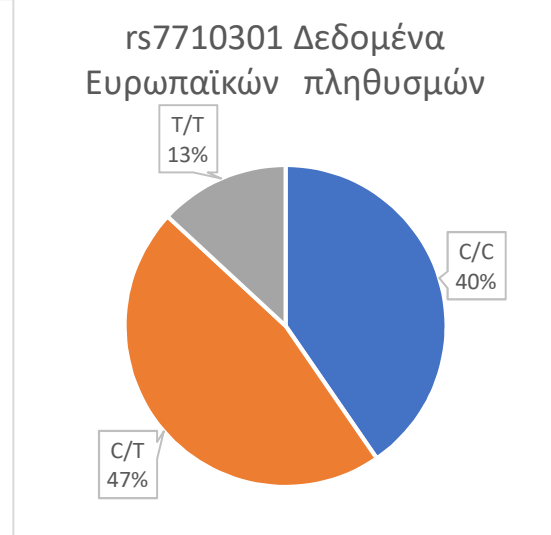
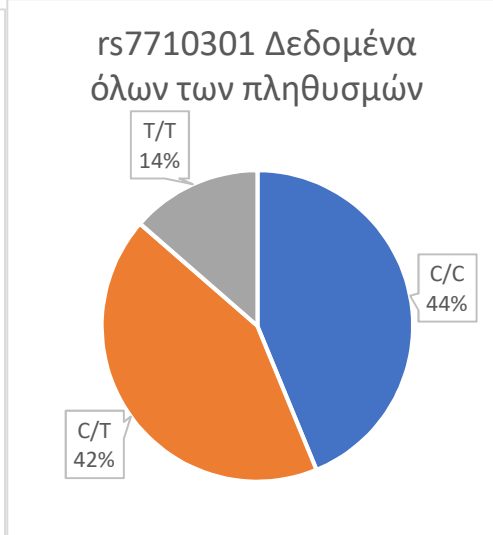
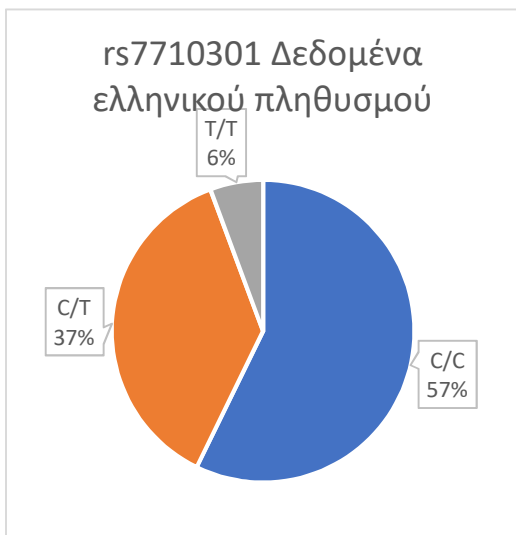
rs115542432 Δεδομένα όλων των πληθυσμών



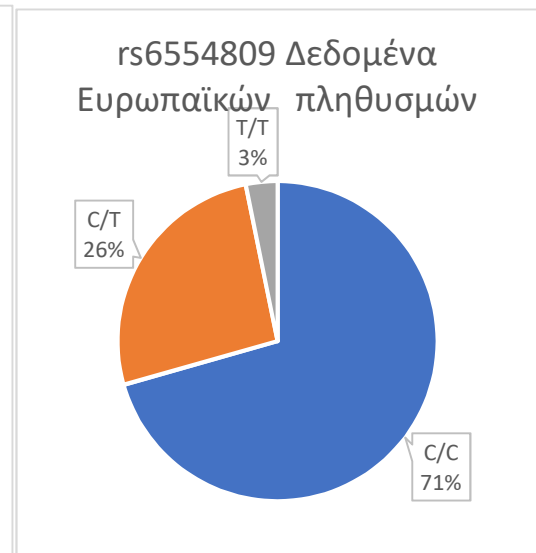
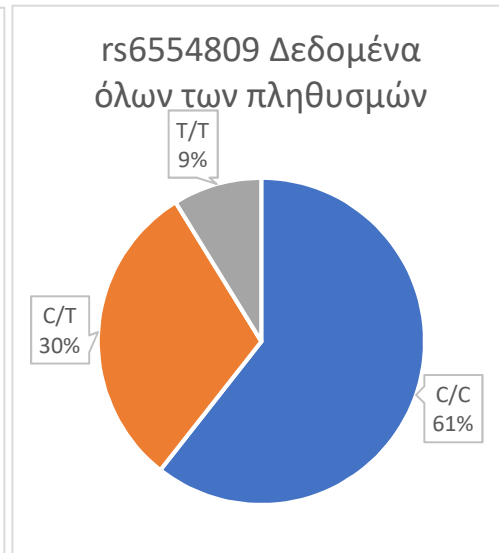
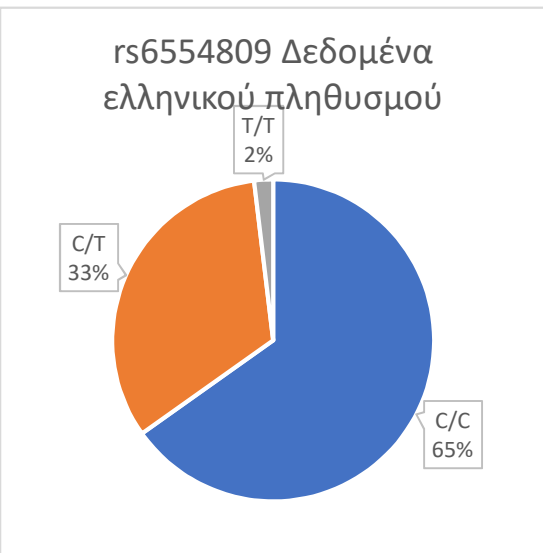
rs115542432 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών



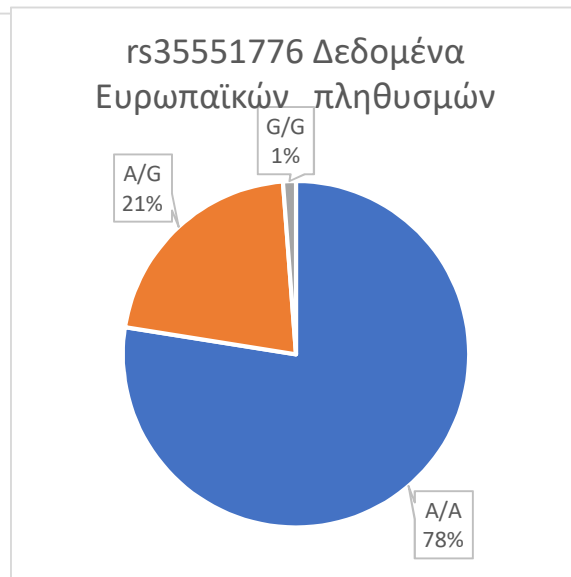
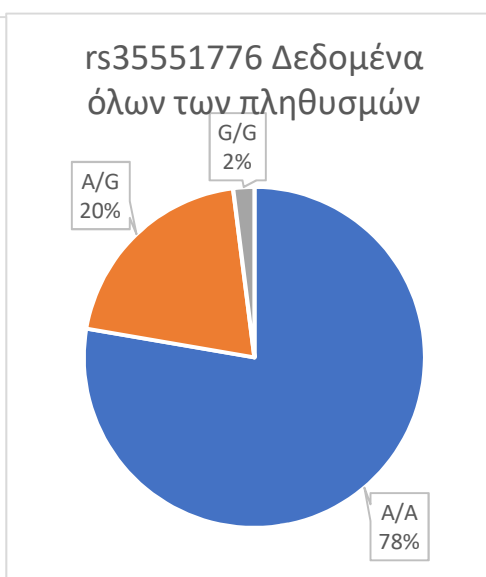
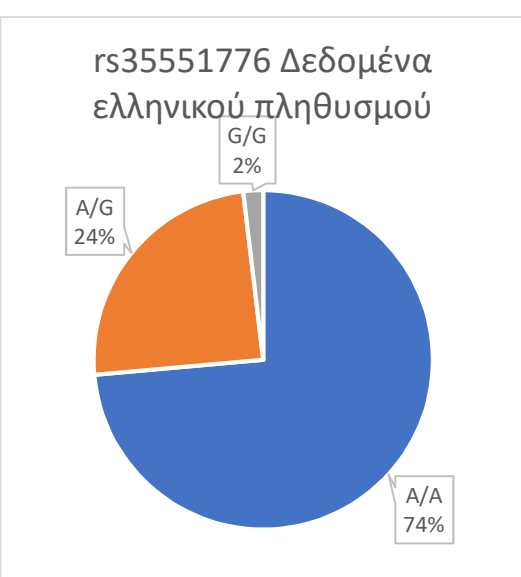
rs7710301 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C



rs6554809 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

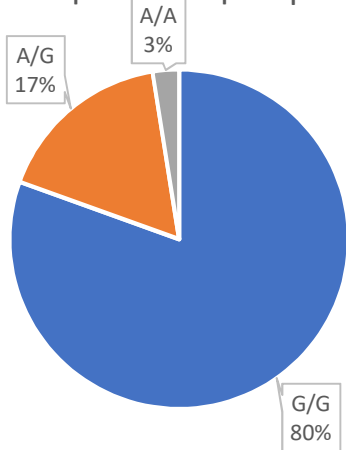


rs35551776 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο

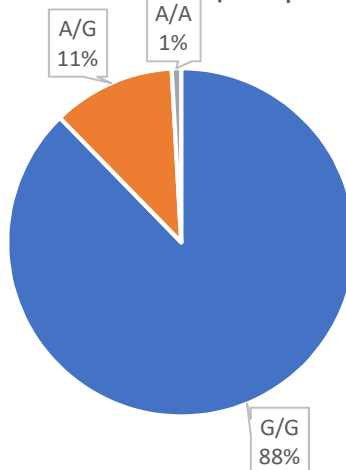


rs17263496 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

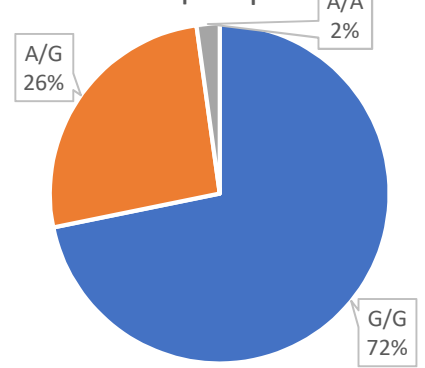
rs17263496 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs17263496 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

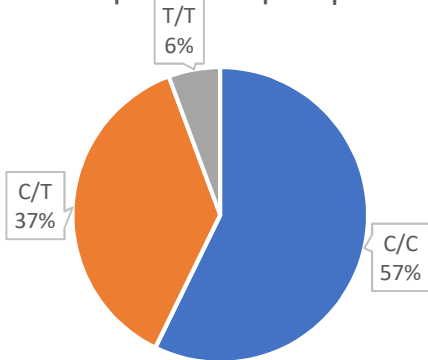


rs17263496 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

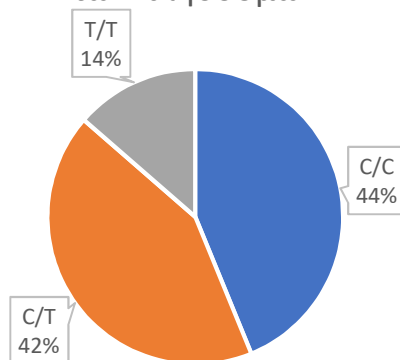


rs7710301 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

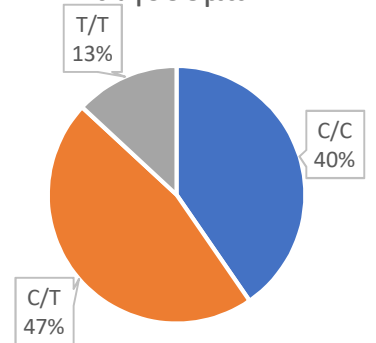
rs7710301 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs7710301 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

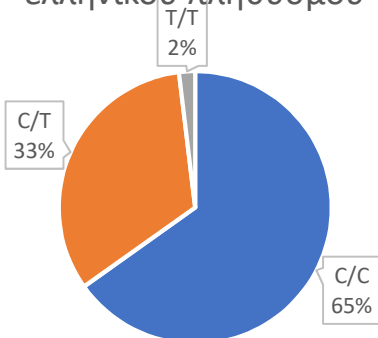


rs7710301 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

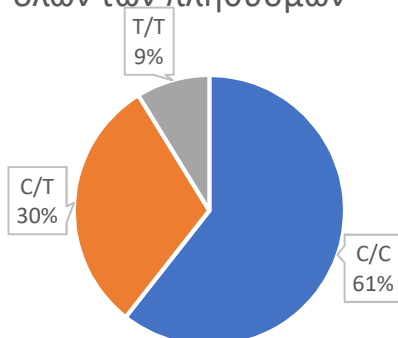


rs6554809 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

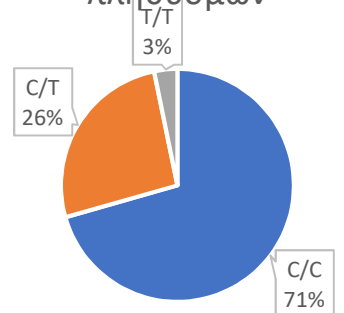
rs6554809 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs6554809 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

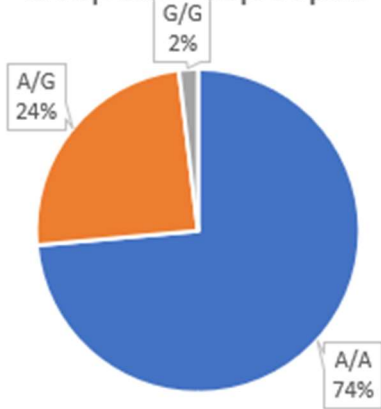


rs6554809 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

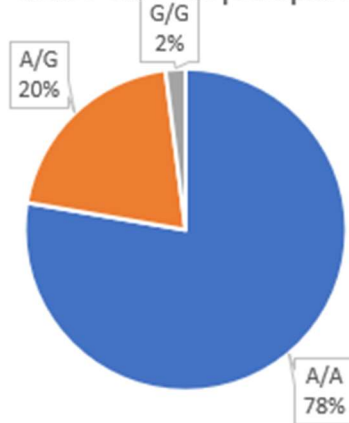


rs35551776 : αλληλόμορφο αγρίου τύπου : A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G

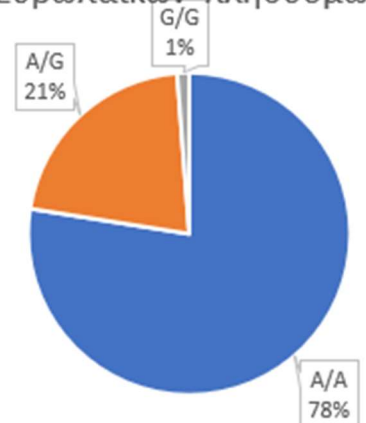
rs35551776 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs35551776 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

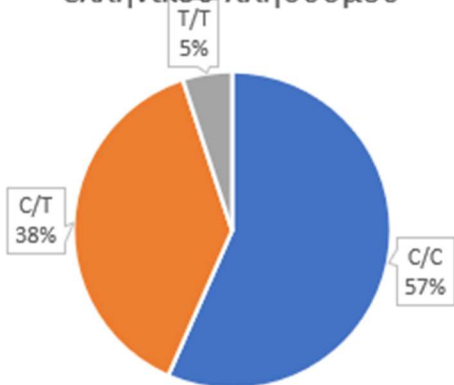


rs35551776 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

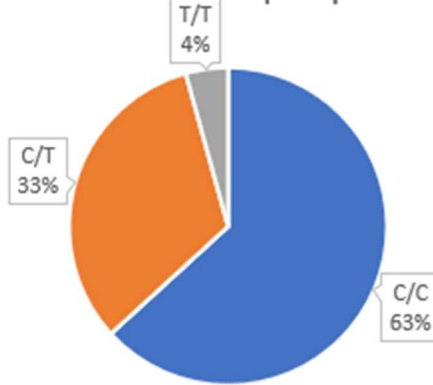


rs7733137: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

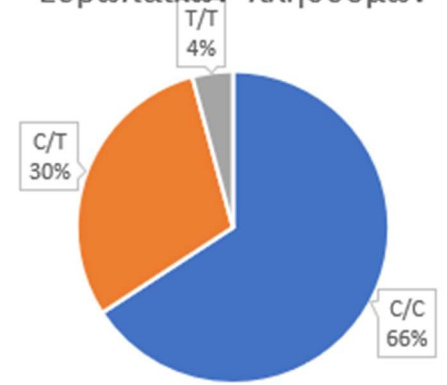
rs7733137 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs7733137 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

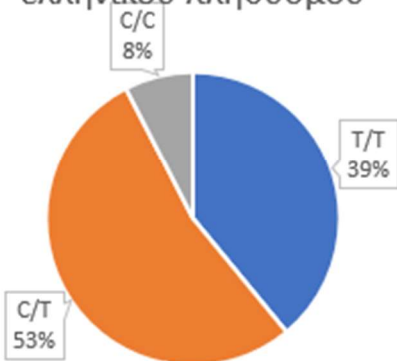


rs7733137 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

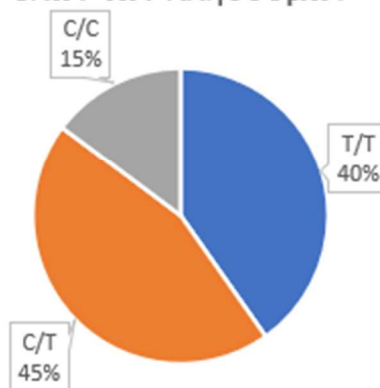


rs1354187: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

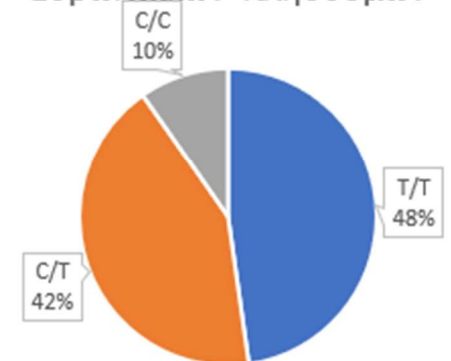
rs1354187 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs1354187 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

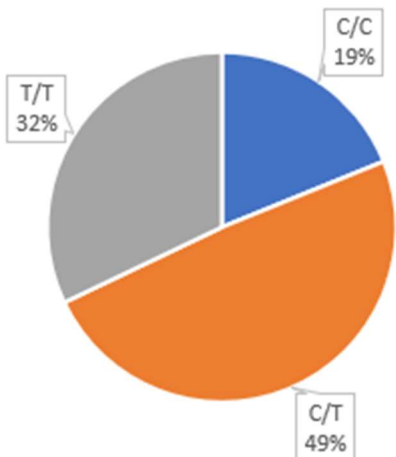


rs1354187 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

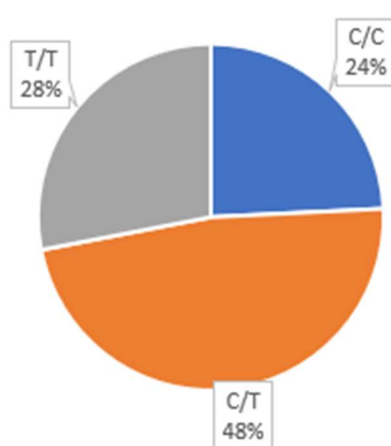


rs4701984: αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

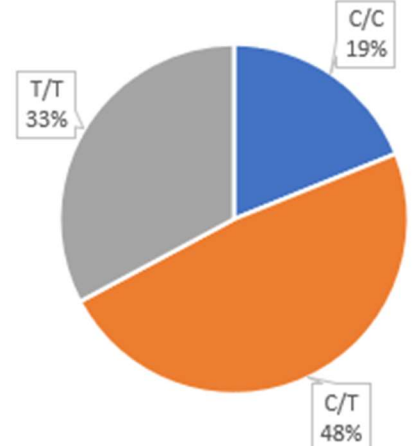
rs4701984 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs4701984 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

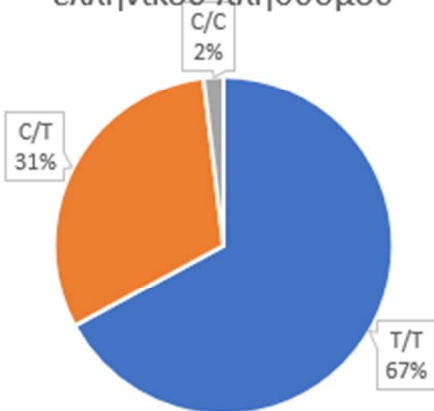


rs4701984 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

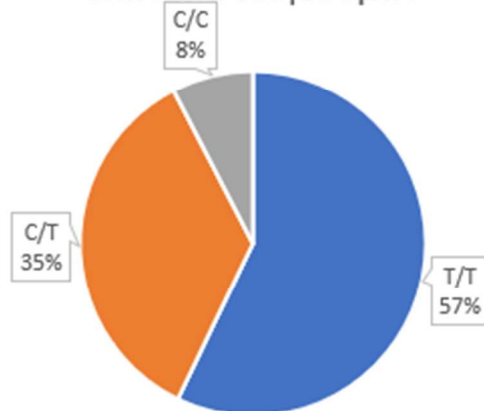


rs12186615: αλληλόμορφο αγρίου τύπου : T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

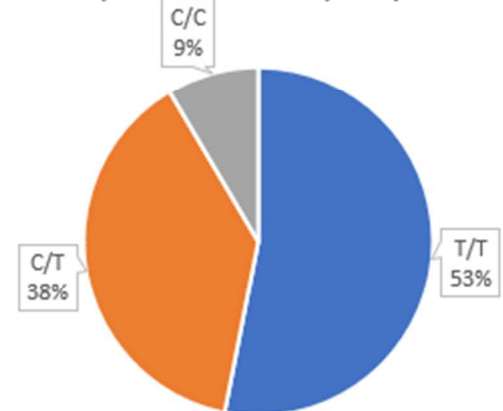
rs12186615 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs12186615 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

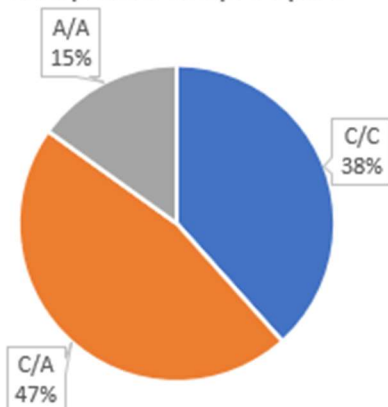


rs12186615 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

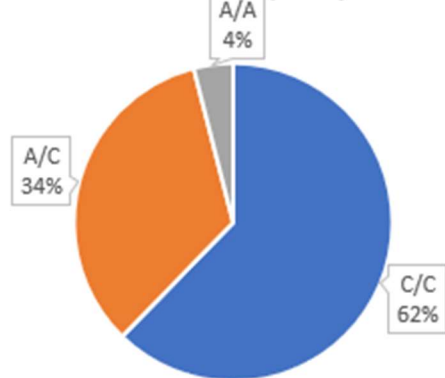


rs10513155: αλληλόμορφο αγρίου τύπου : C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

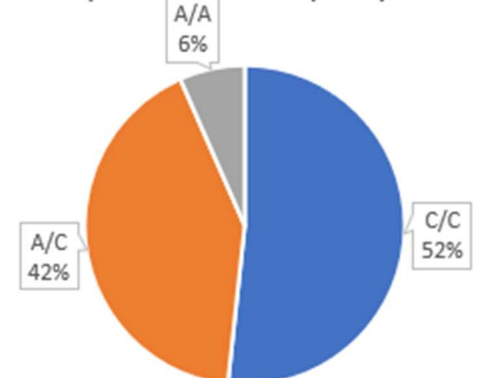
rs10513155 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs10513155 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

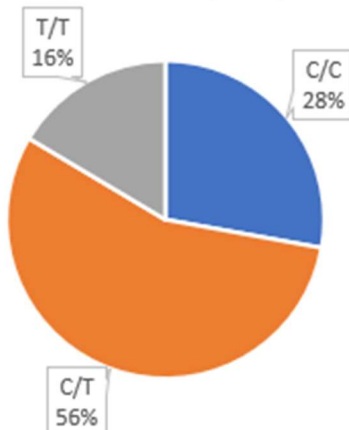


rs10513155 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

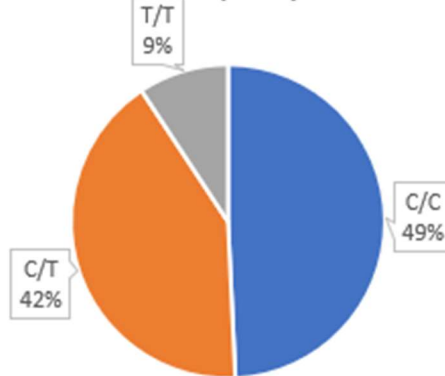


rs795543: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

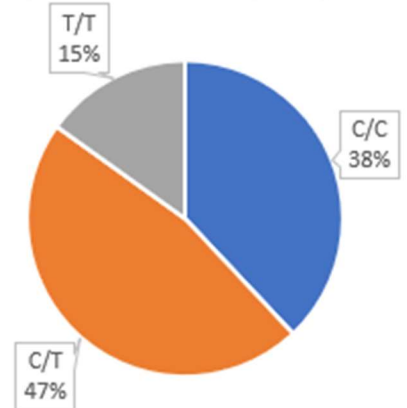
rs795543 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs795543 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

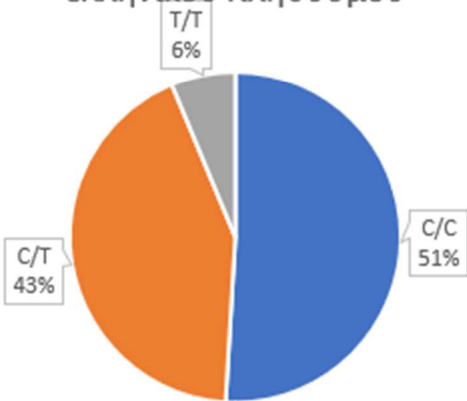


rs795543 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

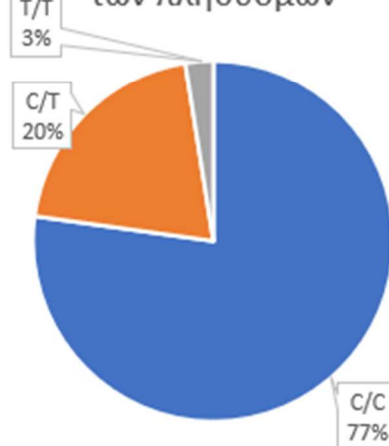


rs795542: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

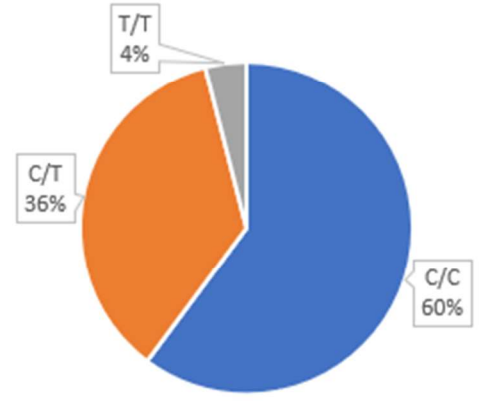
rs795542 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs795542 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

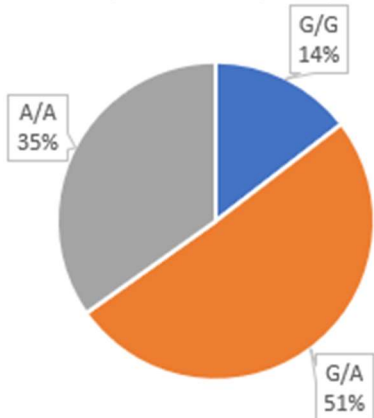


rs795542 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

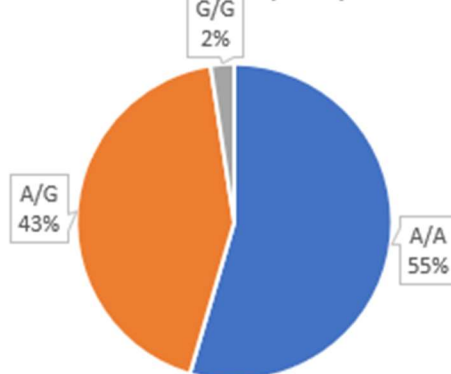


rs11750327: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

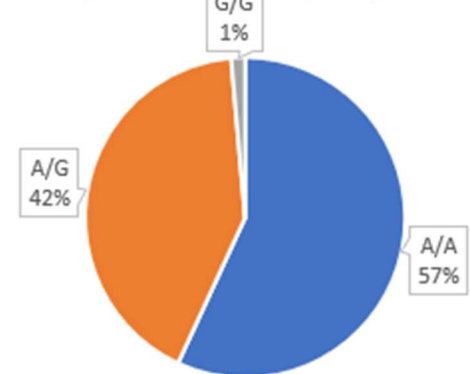
rs11750327 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs11750327 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

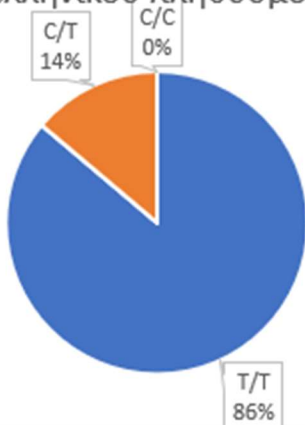


rs11750327 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

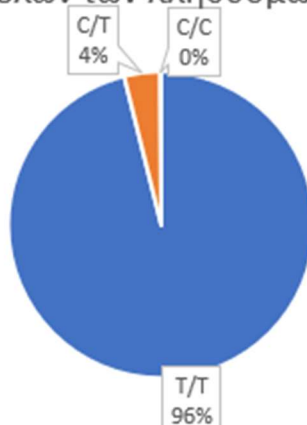


rs17265718: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

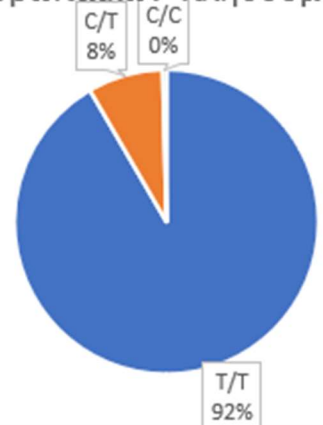
rs17265718 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs17265718 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

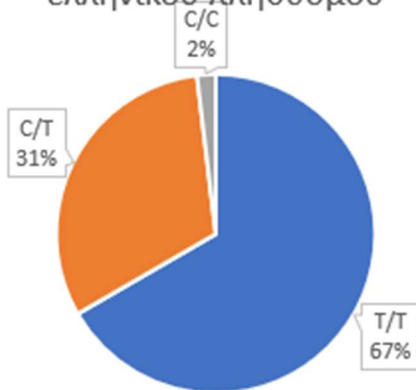


rs17265718 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

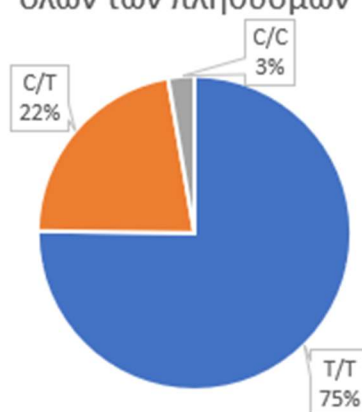


rs114999381: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

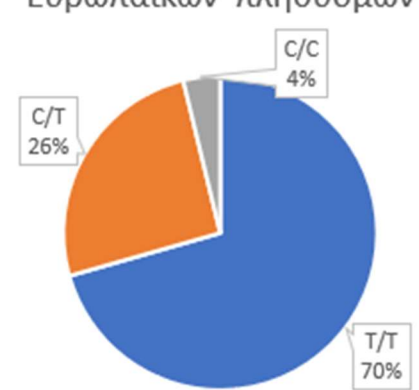
rs114999381 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs114999381 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

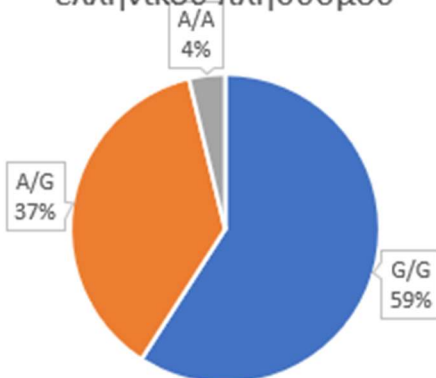


rs114999381 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

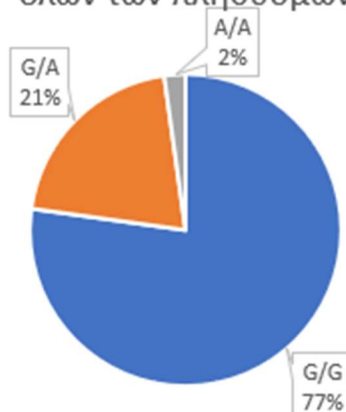


rs17206424: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

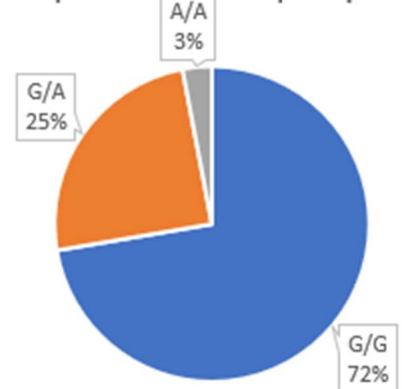
rs17206424 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs17206424 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

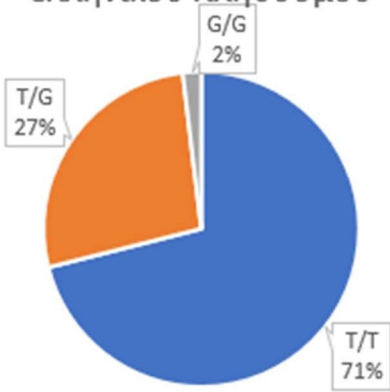


rs17206424 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

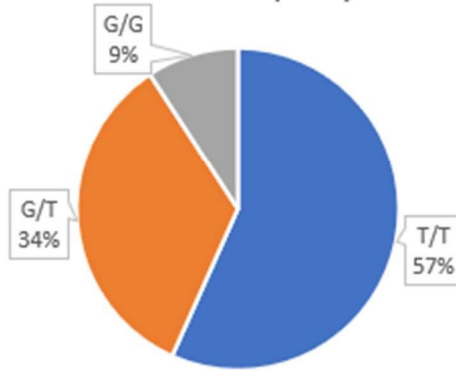


rs11738619: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G

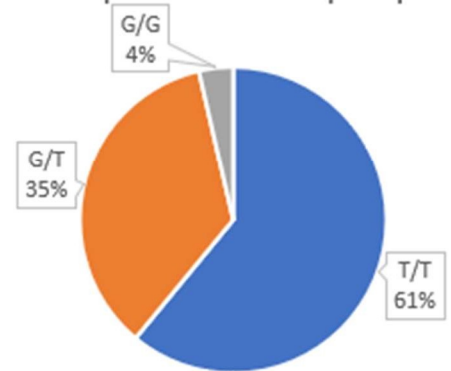
rs11738619 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs11738619 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

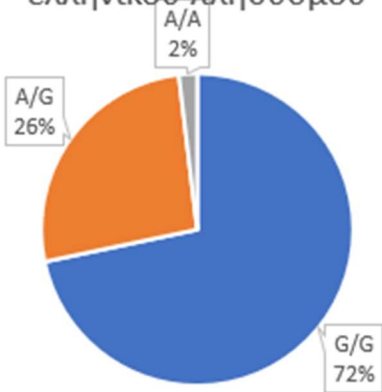


rs11738619 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

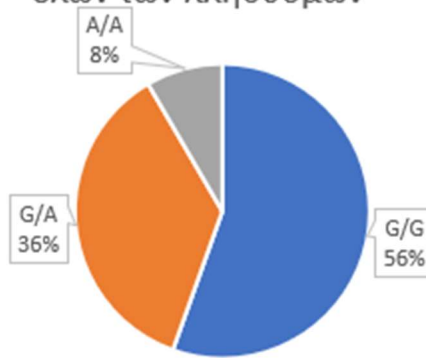


rs11133764: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

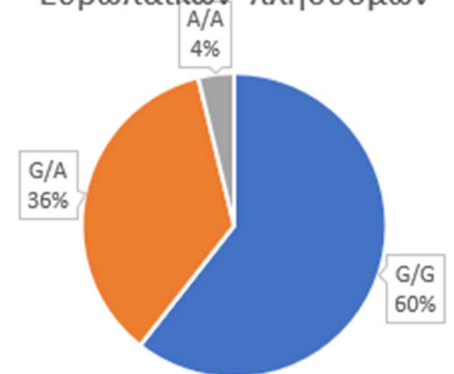
rs11133764 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs11133764 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

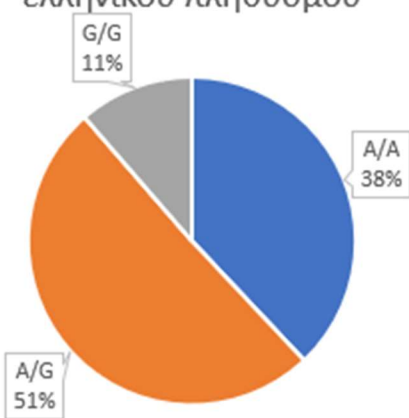


rs11133764 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

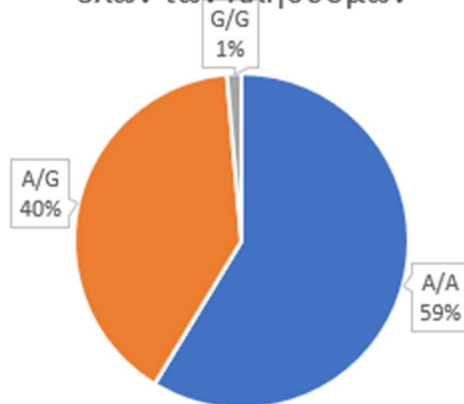


rs7704926: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G

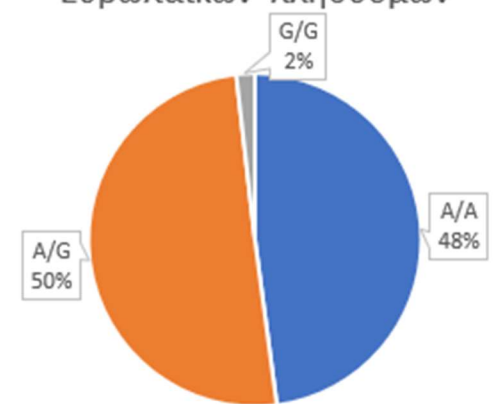
rs7704926 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



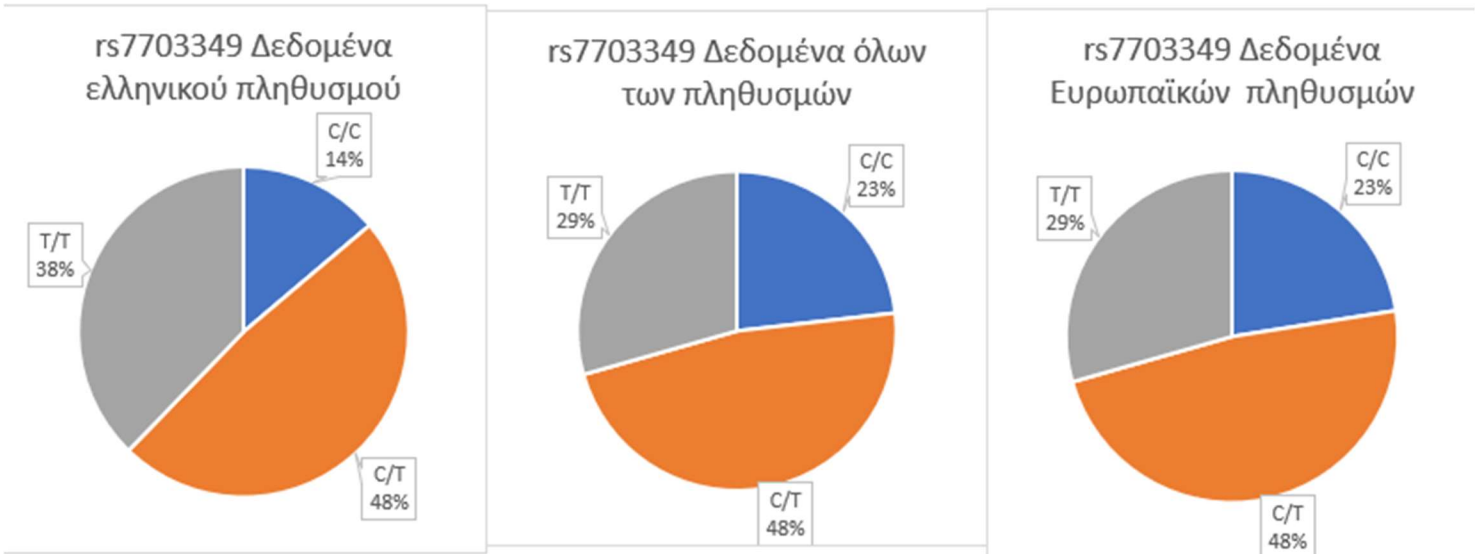
rs7704926 Δεδομένα όλων των πληθυσμών



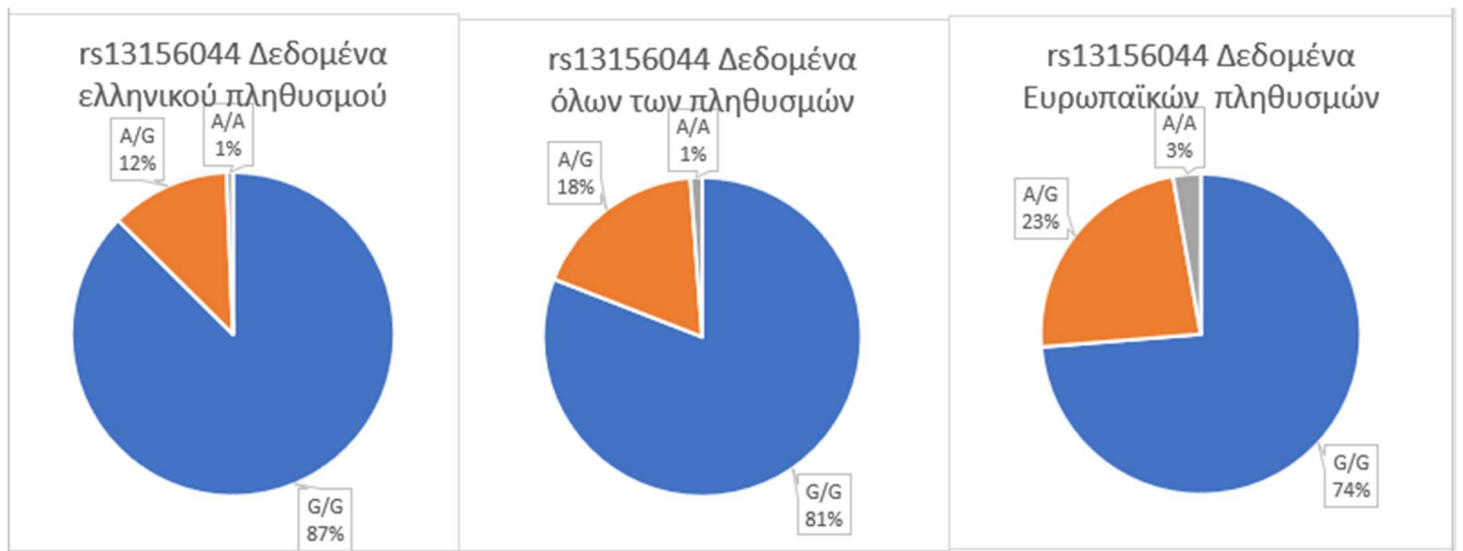
rs7704926 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών



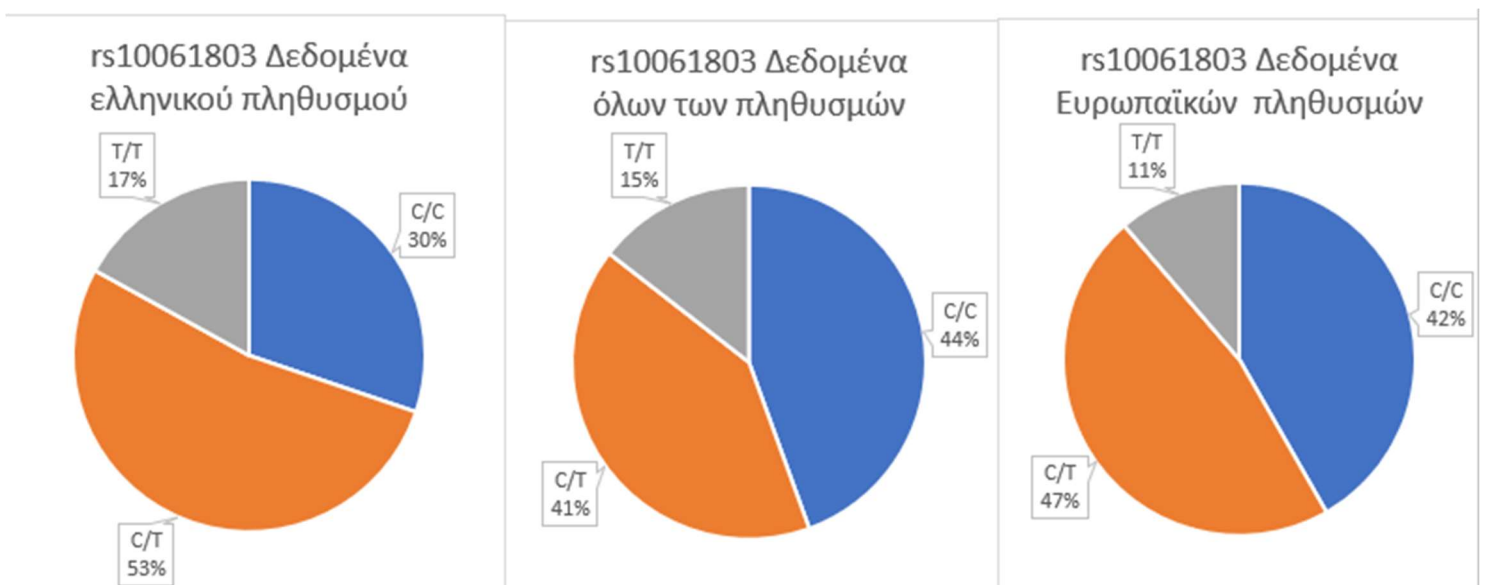
rs7703349: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T



rs13156044: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A



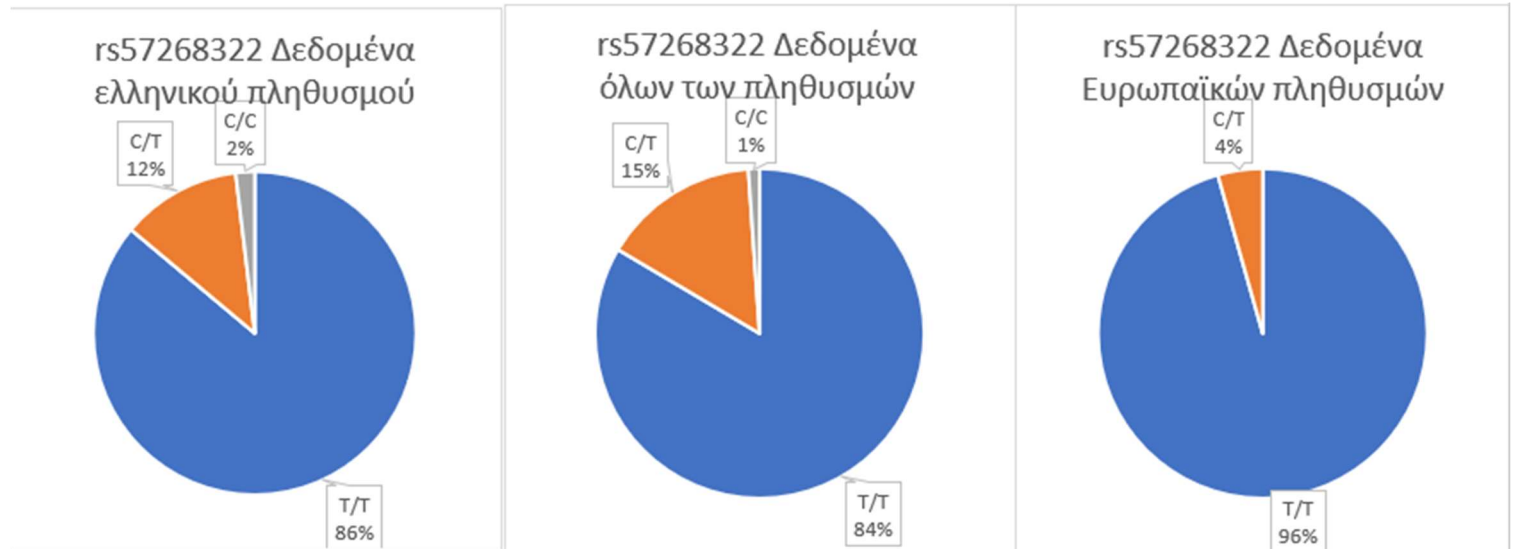
rs10061803: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T



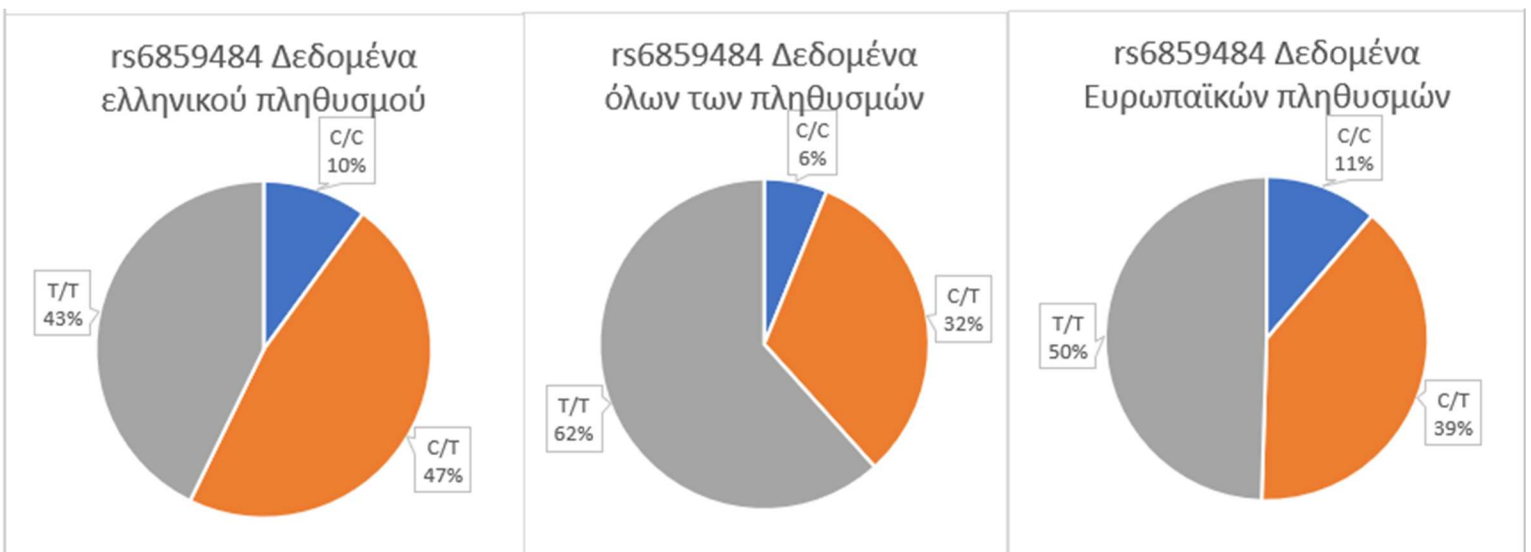
rs115730612: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G



rs57268322: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

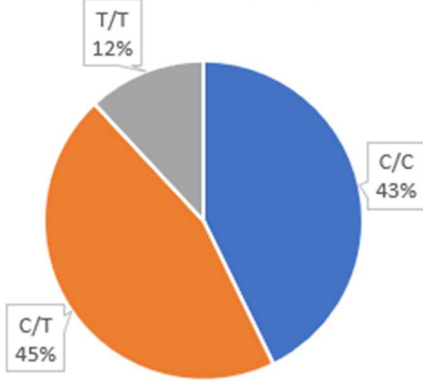


rs6859484: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

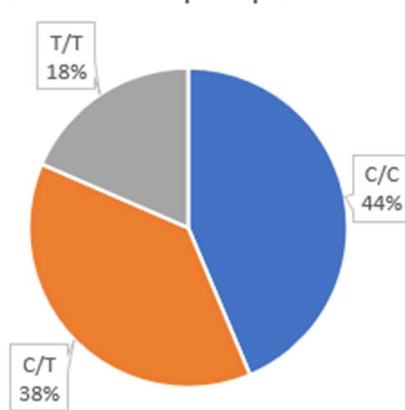


rs10462713: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: C μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

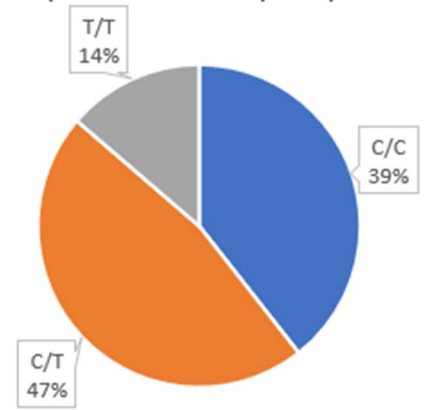
rs10462713 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs10462713 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

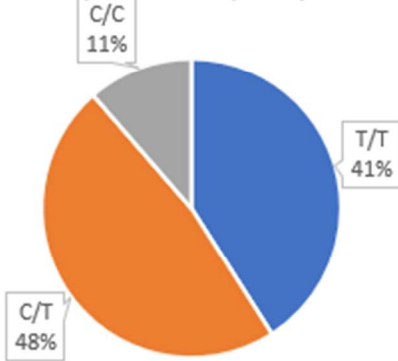


rs10462713 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

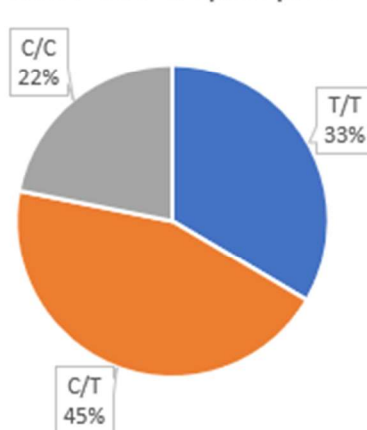


rs10462590: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

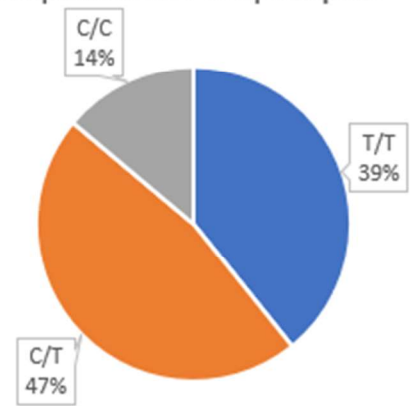
rs10462590 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs10462590 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

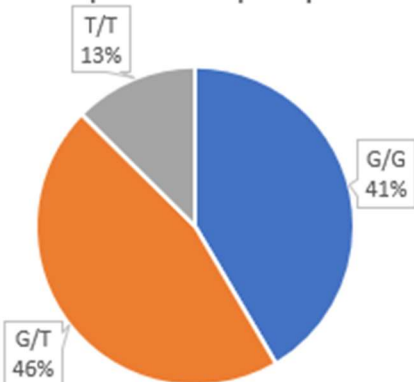


rs10462590 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

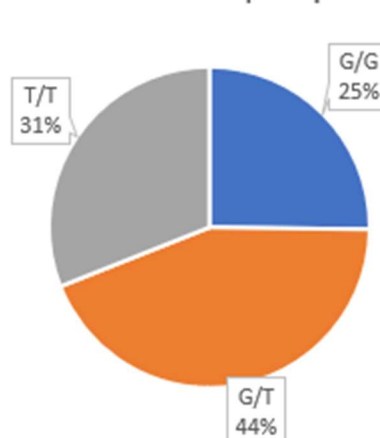


rs13180591: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: T

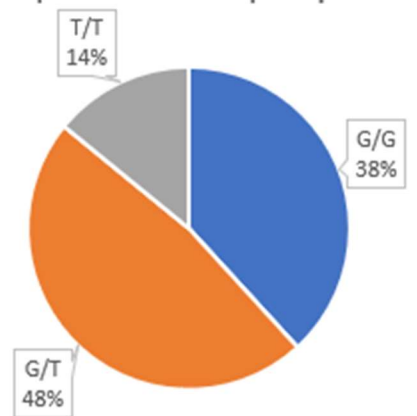
rs13180591 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs13180591 Δεδομένα όλων των πληθυσμών

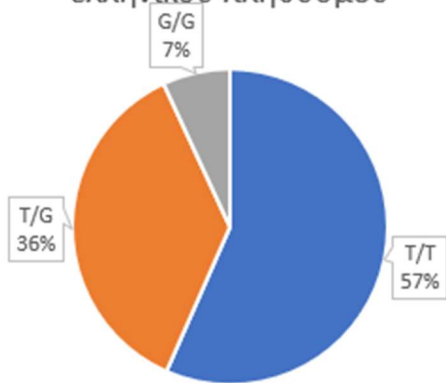


rs13180591 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών

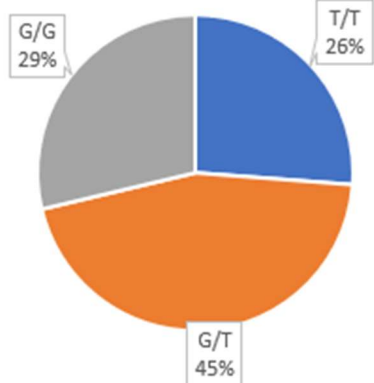


rs16902953: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G

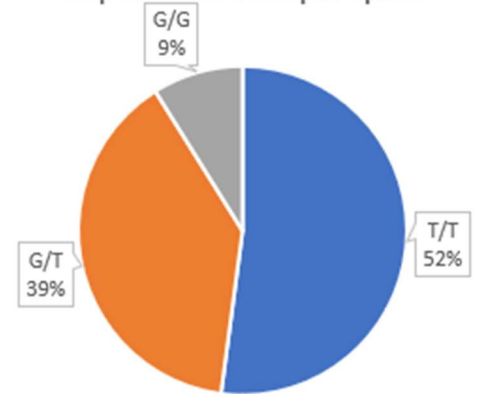
rs16902953 Δεδομένα
ελληνικού πληθυσμού



rs16902953 Δεδομένα
όλων των πληθυσμών

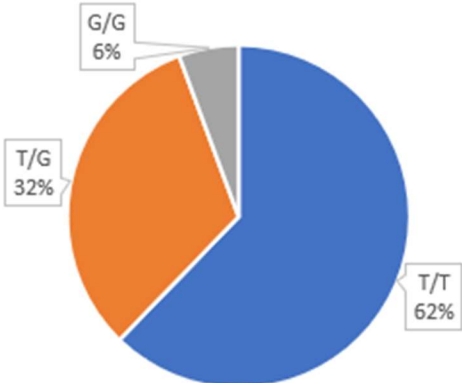


rs16902953 Δεδομένα
Ευρωπαϊκών πληθυσμών

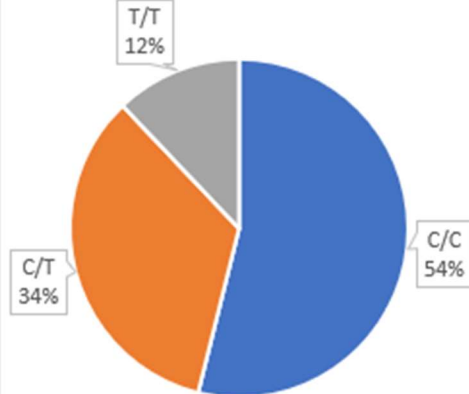


rs12653156: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: T μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: G

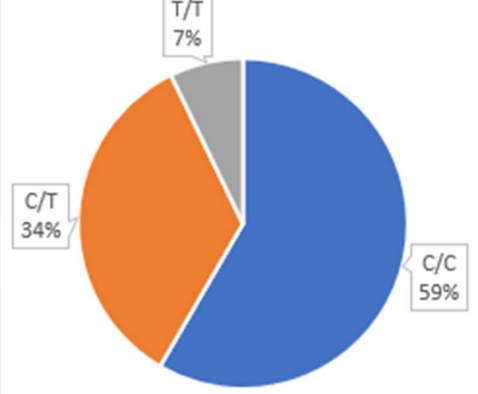
rs12653156 Δεδομένα
ελληνικού πληθυσμού



rs12653156 Δεδομένα
όλων των πληθυσμών

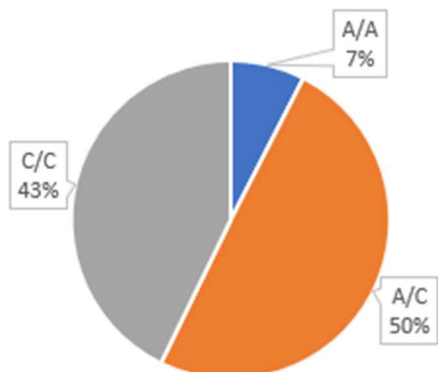


rs12653156 Δεδομένα
Ευρωπαϊκών πληθυσμών

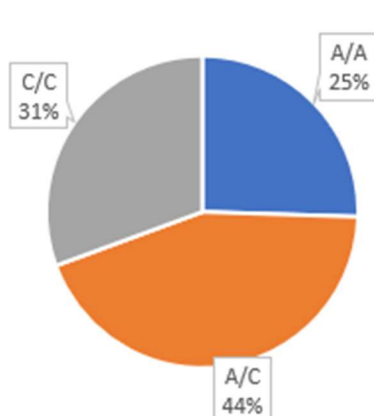


rs10070196: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: A μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: C

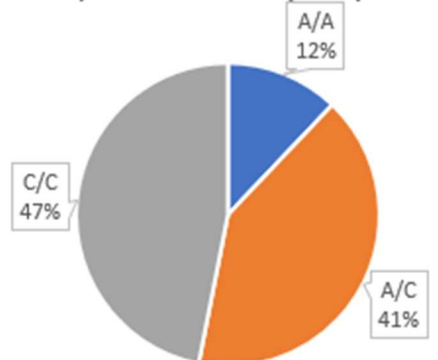
rs10070196 Δεδομένα
ελληνικού πληθυσμού



rs10070196 Δεδομένα
όλων των πληθυσμών

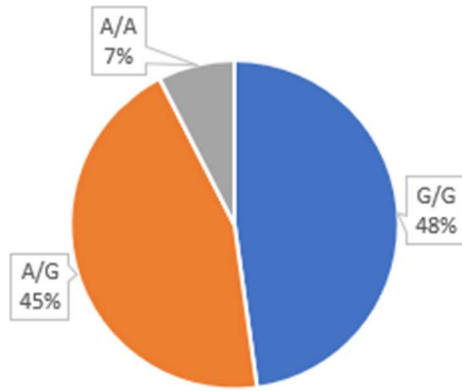


rs10070196 Δεδομένα
Ευρωπαϊκών πληθυσμών

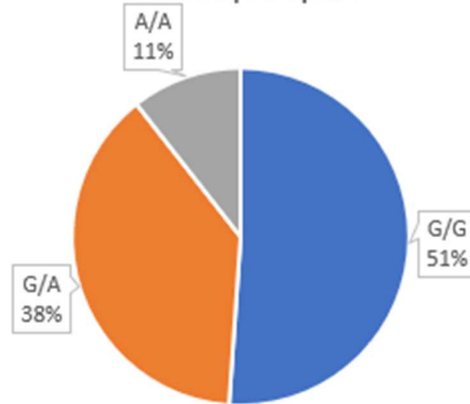


rs339447: αλληλόμορφο αγρίου τύπου: G μεταλλαγμένο αλληλόμορφο: A

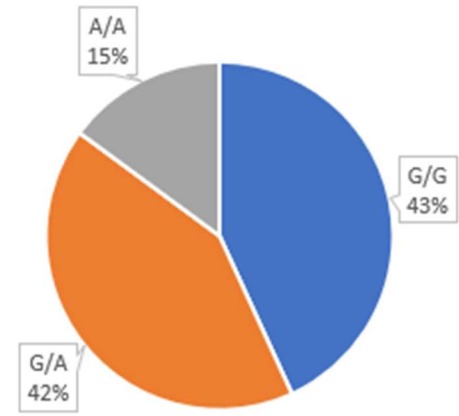
rs339447 Δεδομένα ελληνικού πληθυσμού



rs339447 Δεδομένα όλων των πληθυσμών



rs339447 Δεδομένα Ευρωπαϊκών πληθυσμών



Συζήτηση

Είναι δύσκολο να ληφθούν οριστικά αποτελέσματα από περιορισμένο αριθμό πειραμάτων και διεργασιών και συνεπώς είναι σημαντικό να ληφθεί υπ' όψιν ότι τα πειράματα και οι αναλύσεις έγιναν πάνω σε δεδομένα σχετικά μικρού αριθμού ατόμων (159) και SNPs (36).

Οι τρεις κυρίες αναλύσεις που έγιναν αφορούν τα ποσοστά μεταλλάξεων σε επίπεδο SNP - δηλαδή αναλύοντας τα δεδομένα όλων των ατόμων σε κάθε SNP ξεχωριστά - , τα ποσοστά μεταλλάξεων σε επίπεδο ατόμου - δηλαδή αναλύοντας τα δεδομένα όλων των SNPs σε κάθε άτομο ξεχωριστά - καθώς και την σύγκριση των δεδομένων με αυτά άλλων πληθυσμών.

Όσον αφορά τα ποσοστά μεταλλάξεων σε επίπεδο SNP φαίνεται ότι σε πολλά SNPs το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων έχουν τουλάχιστον ένα μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο (πχ rs6554809 ποσοστό ατόμων ομόζυγα για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου : 2% ενώ ποσοστό ατόμων με τουλάχιστον μια μετάλλαξη : 98%). Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι η ύπαρξη ή όχι ενός μεταλλαγμένου νουκλεοτιδίου δεν επηρεάζει την πιθανότητα εμφάνισης διάφορων ασθενειών και καταστάσεων μεταξύ των οποίων και η υπογονιμότητα στους άντρες. Αυτό συμβαίνει διότι μιλάμε για μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου οι οποίες ενώ μπορούν σε κάποιες περιπτώσεις να ευθύνονται εξ ολοκλήρου για την εμφάνιση μιας ασθένειας (πχ δρεπανοκυτταρική αναιμία), σε πολλές περιπτώσεις όμως δεν υπάρχει η σχέση κληρονόμηση αλληλόμορφου A = εμφάνιση ασθένειας και κληρονόμηση αλληλομόρφου B = μη εμφάνιση ασθένειας. Αντιθέτως υπάρχει μια σχέση συσσώρευσης και αλληλεπίδρασης πολλών μεταλλάξεων.

Συνεπώς δεν μπορεί να ειπωθεί στην συγκεκριμένη εργασία ότι ένα συγκεκριμένο SNP «οδηγεί» στην εμφάνιση υπογονιμότητας σε άντρες. Μπορεί όμως από τα ποσοστά μεταλλάξεων σε επίπεδο ατόμου και την σύγκριση των ποσοστών αυτών με το status των ατόμων ως κοντρόλ ή άτομα με μη φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα, να γίνει εύρεση διάφορων στα ποσοστά μετάλλαξης αναμεσα στις δυο αυτές κατηγορίες. Μεγάλες διαφορές θα υποδείκνυε ότι τα SNPs του DNAH5 είναι τουλάχιστον ένας παράγοντας στο πολυπαραγοντικό παζλ της αντρικής υπογονιμότητας αν και λόγω του μικρού όγκου δειγμάτων, οποιοδήποτε αποτέλεσμα δεν θα μπορέσει να οδηγήσει σε οριστικό συμπέρασμα.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 12 στα άτομα control έχουν κατά μέσο όρο 17,9/36 SNPs με γονότυπο «αγρίου τύπου» και επίσης 17,9/36 SNPs με τουλάχιστον μια μετάλλαξη. Την μεγαλύτερη απόκλιση από αυτές τις τιμές έδειξαν τα άτομα o/a/t (ολιγοσπερμικά, ασθενοσπερμικά και τερατοσπερμικά) που όπως φαίνεται στην εικόνα 26, τα οποία παρουσιάζουν κατά μέσο όρο 15,6/36 SNPs «αγρίου τύπου» και 20,2/36 SNPs με τουλάχιστον μια μετάλλαξη.

Οι διαφορά στις τιμές δεν είναι αρκετά μεγάλη για την συσχέτιση των μεταλλάξεων αυτών με το φαινόμενο της αντρικής υπογονιμότητας. όμως αν γίνει η πράξη :

μ.ό. μεταλλάξεων – μ.ό. αγρίου τύπου, και για τις δυο περιπτώσεις βλέπουμε ότι :

μ.ό. μεταλλάξεων control – μ.ό. αγρίου τύπου control = 0 ενώ

μ.ό. μεταλλάξεων o/a/t – μ.ό. αγρίου τύπου o/a/t = 4.6

Αυτό σημαίνει ότι τα άτομα με σπερμοδιάγραμμα o/a/t έχουν κατά μέσο όρο 4.6

παραπάνω μεταλλάξεις στο γονίδιο DNAH5 από τα άτομα control. Στις άλλες κατηγορίες

ατόμων οι διάφορες στα ποσοστά είναι ή μικρότερα ή σε κάποιες περιπτώσεις όπως αυτές των ατόμων n/n/t (τερατοσπερμικά) (εικόνα 28) και o/n/t (ολιγοσπερμικά και τερατοσπερμικά)(εικόνα 30) τα άτομα έχουν κατά μέσο όρο λιγότερες μεταλλάξεις από τα άτομα control.

Μια εξήγηση που μπορεί να δοθεί σε αυτό είναι ότι το γονίδιο DNAH5, εμπλέκετε την λειτουργία και κίνηση της ουράς και συνεπώς της σωστής κίνησης και ταχύτητας του σπερματοζωαρίου. Άρα είναι λογικό οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό να προκαλούν προβλήματα στην κίνηση τα οποία σε ένα σπερμοδιάγραμμα θα παρουσιαζόταν ως Ασθενοσπερμία.

Αυτό βέβαια θα σημαίνει ότι όλες οι ομάδες ατόμων που παρουσιάζουν Ασθενοσπερμία θα έπρεπε να έχουν περίπου ίδια διαφορά ποσοστών μετάλλαξης μεταξύ τους η οποία θα ήταν μεγαλύτερη από αυτήν των ομάδων ατόμων που δεν παρουσιάζουν Ασθενοσπερμία.

Πράγματι όλες οι ομάδες ατόμων που παρουσιάζουν Ασθενοσπερμία έχουν κατά μέσο όρο περισσότερες μεταλλάξεις στα επιλεγμένα SNPs του γονιδίου (εκτός από την ομάδα n/a/n) η οποία αποτελείται από ένα μόνο άτομο), όμως υπάρχει σχετικά μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ομάδων αυτών.

Η μεγαλύτερη διαφορά όπως προαναφέρθηκε είναι στα άτομα o/a/t. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει διότι τα άτομα αυτά τα οποία παρουσιάζουν προβλήματα σε πολλές πτυχές της λειτουργίας και μορφής των σπερματοζωαρίων, πιθανόν να έχουν μεγαλύτερη ποσότητα συσσωρευμένων μεταλλάξεων σε γονίδια που επηρεάζουν την γονιμότητα και συνεπώς αυξάνονται οι πιθανότητες να έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο DNAH5.

Γενικότερα η ταυτοποίηση συγκεκριμένων SNPs που σχετίζονται με την αντρική υπογονιμότητα είναι χρήσιμο λόγω της πιθανότητας δημιουργίας σε πρώτη φάση διαγνωστικού τεστ που θα βοηθάει στην διάγνωση των συγκεκριμένων μορίων και μονοπατιών που δεν λειτουργούν (πχ στην περίπτωση του γονιδίου DNAH5 οι βαριές αλυσίδες δυνείνης) και σε δεύτερη φάση τον σχεδιασμό τροπών βελτίωσης της γονιμότητας των αντρών. Οι δυο στόχοι αυτοί δουλεύουν «χερι-χερι». Όπως έχει προαναφερθεί η αντρική υπογονιμότητα είναι ένα περίπλοκο πολυπαραγοντικό παζλ, αφού υπάρχουν πολλοί παράγοντες, περιβαλλοντικοί, γενετικοί, επιγενετικοί κλπ. που μπορούν να επηρεάσουν την γονιμότητα ενός άνδρα. Μέχρι τώρα μπορούν να γίνουν κάποιοι βασικοί διαχωρισμοί αναμεσα στους πιθανούς παράγοντες που οδηγούν στην υπογονιμότητα. Όμως επειδή ακριβώς η σωστή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος του άντρα εξαρτάται από τόσο μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, υποδοχέων, ορμονών κλπ. η δυσλειτουργία ενός από αυτών μπορεί να διαταράξει την λειτουργία του. Συνεπώς η διασαφήνιση του ή των «προβληματικών» παραγόντων, μπορεί να είναι το πρώτο βήμα για την διόρθωση των δυσλειτουργιών αυτών.

Τέλος όσον αφορά την τρίτη ανάλυση η σύγκριση των δεδομένων των δειγμάτων που αναλυθήκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής με δεδομένα άλλων πληθυσμών μπορούν να είναι χρήσιμα για την εύρεση του σωστού “baseline” για το τι σημαίνει πολλές ή λίγες μεταλλάξεις στο κάθε SNP συγκεκριμένα στον ελληνικό πληθυσμό αλλά και την σύγκριση των ποσοστών μετάλλαξης του ελληνικού πληθυσμού σε σχέση με τους υπολοίπους πληθυσμούς με τα ποσοστά εμφάνισης της ανδρικής υπογονιμότητας σε Έλληνες σε σχέση με άλλους πληθυσμούς.

Το πρώτο σκέλος του παραπάνω ερωτήματος είναι ως εξής: τα ποσοστά μεταλλάξεων με τα οποία έχουν συγκριθεί τα δεδομένα που λήφθηκαν από την βιοπληροφορική ανάλυση

αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό . Όμως διαφορά μοτίβα κληρονόμησης μεταλλάξεων είναι πιο συντηρημένα μέσα σε έναν πληθυσμό απ' ό τι αναμεσά σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Έτσι πρέπει να ξεκαθαριστεί αν ένα άτομο έχει μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων , και αυτό οδηγεί στην εκδήλωση υπογονιμότητας ή αν ένα άτομο έχει μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων επειδή αυτό συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό στον πληθυσμό στον οποίον ανήκει το άτομο. Για παράδειγμα το rs10513155 στα δεδομένα των δικών μας δειγμάτων είναι κατά 38% ομόζυγα για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου ενώ τα δεδομένα όλων των πληθυσμών υποδεικνύουν ποσοστό 62%. Αν η ίδια ανάλυση γινόταν σε μεγαλύτερη κλίμακα θα μπορούσε να διασαφηνιστεί , ποιες μεταλλάξεις είναι πιο σπάνιες ή συχνές για κάθε πληθυσμό – σε συνδυασμό με την αλληλούχηση DNA σε περισσότερους άντρες που αντιμετωπίζουν την υπογονιμότητα – και έτσι να μπορεί να διαγνωστεί πιο αποτελεσματικά για κάθε άτομο ποια μετάλλαξη συγκεκριμένα προκαλεί το πρόβλημα στην γονιμότητα και ποια ενδεχομένως δεν την επηρεάζει.

Το δεύτερο σκέλος , αφορά την συσχέτιση παραγόντων ειδικούς σε κάθε πληθυσμό με τα ποσοστά μετάλλαξης του πληθυσμού αυτού. Εν ολίγης η ανάλυση του κατά ποσό παράγοντες όπως το κλίμα η διατροφή το κάπνισμα η παχυσαρκία κ.α. - οι οποίοι είναι διαφορετικοί και παρουσιάζονται σε διαφορετικά ποσοστά σε κάθε πληθυσμό - μεταφράζονται και σε διαφορετικά ποσοστά μετάλλαξης σε γονίδια σχετικά με την γονιμότητα.

Συμπερασματικά , η ερευνά πάνω στο θέμα της ανδρικής υπογονιμότητας είναι σημαντική καθώς αφορά ένα θέμα το οποίο αφορά την πλειοψηφία των ανθρώπων. Όμως παρόλο που η σημασία της ερευνάς πάνω στο θέμα αυτό είναι προφανές , η ποσότητα της ερευνάς που έχει γίνει είναι αρκετά μικρή. Η διεκπεραίωση αναλύσεων όμοια με αυτήν της παρούσας εργασίας , αλλά σε πολύ μεγαλύτερη κλίμακα σε ότι αναφορά άτομα και γονίδια μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική αρχή για την επίλυση του προβλήματος αυτού .

Βιβλιογραφία

1. Sherwood L., 2016: Εισαγωγή στη Φυσιολογία του ανθρώπου: από τα κύτταρα στα συστήματα (8^η έκδοση) , (μεταφρ . Μαγκίρης Ευαγγελος et al) Ακαδημαϊκες Εκδοσεις Ι. Μπασδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
2. Διαγνωστική Αθηνων , 2014 , Ανατομία και Φυσιολογία του Σπερματοζωαρίου , (<https://athenslab.gr/blog/urogonimotita-spermascan/anatomia-kai-fusiologia-tou-spermatozoariou>)
3. Γεωργία Λαγοδόντη ,2018, Σπερμοδιάγραμμα , (<http://new.fertility-point.com/σπερμοδιάγραμμα/>)
4. Jonathan M.W Slack, 2013, Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης (3^η έκδοση), (μεταφρ. Βακάκη Βασιλική et al)) Ακαδημαϊκες Εκδοσεις Ι. Μπασδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
5. Milisav Irina, 1998, Dynein and Dynein-Related Genes, Cell Motility and the Cytoskeleton 39:261–272
6. Davidson Michael W., 2015, Cilia and Flagella, (<https://micro.magnet.fsu.edu/cells/ciliaandflagella/ciliaandflagella.html>)
7. Burgess Stan A., 2003, Dynein structure and power stroke, Nature vol 421 pg 715-718
8. Okabe M. et al, (2013). "The cell biology of mammalian fertilization" Development. 140 (22): 4471–4479.
9. Ickowicz D. et al, 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. Asian Journal of Andrology 14, 816–821
10. Visconti P. et al, 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm Capacitation, Asian Journal of Andrology 13, 395–405
11. Breitbart H, 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction, Molecular and Cellular Endocrinology 187 ,139–144
12. Breitbart H., Spungin B., 1997, The biochemistry of the acrosome reaction, Molecular Human Reproduction vol.3 no.3 pp. 195–202
13. Yanagimachi R., 2011, Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? , BIOLOGY OF REPRODUCTION 85, pg 4–5
14. Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al, 2002, Molecular Biology of the Cell. 4th edition
15. Σαλμάς Ι.,2016, Τι είναι το σπερμοδιάγραμμα; , ourodiagnosi.gr/τι-είναι-το-σπερμοδιάγραμμα/
16. Salvador Z. , Fernandez A. , 2018 , Semen analysis microscopic examination .

<https://www.invitro.com/en/results-of-the-sperm-analysis/seminal-analysis-microscopic-examination/>

17. Rasagnya Viswanadha, Winfield S. Sale, Mary E. Porter ,2017 , Ciliary Motility: Regulation of Axonemal Dynein Motors , Cold Spring Harb Perspect Biol pg 1-22
18. Weyrich, A. (2012), Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm. Current Protocols in Molecular Biology, 98: 2.13.1-2.13.3.
19. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., de Bakker, P.I., Daly, M.J., Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome
20. Dayem Ullah, A.Z., Lemoine, R.N., Chelala, C., (2012), SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants, Nucleic Acids Research, 40(W1), p. W65–W70.
21. Russell, P.J. (2006). iGenetics, Μια Μεντελική Προσέγγιση (μεταφρ.). Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα, σελ. 75-79.
22. Chelala, C., Khan, A., Lemoine, R.N., (2009). SNPnexus: a web database for functional annotation of newly discovered and public domain single nucleotide polymorphisms, Bioinformatics, 25(5),p. 655–661.
23. Dayem Ullah, A.Z., Oscanoa, J., Wang, J., Nagano, A., Lemoine, N. R., & Chelala, C. (2018). SNPnexus: assessing the functional relevance of genetic variation to facilitate the promise of precision medicine. Nucleic acids research, 46(W1), W109–W113.