

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Διερεύνηση του ρόλου των μη κωδικοποιητικών RNAs που επηρεάζουν
την λειτουργία και την δυναμική των μιτοχονδρίων στην ανδρική
υπογονιμότητα στον Ελληνικό πληθυσμό»

ΣΤΑΜΑΤΕΛΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΟΥ ΙΩΑΝΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



BACHELOR THESIS

“Investigation of the role of non-coding RNAs (ncRNAs) that affect mitochondrial dynamics and function in male infertility in the Greek population”

STAMATELLOS GEORGIOS

LARISA 2023

Τριμελής Επιτροπή

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

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

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών - Διευθύντρια Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας 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

Η παρούσα προπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλαν σε αυτή και με βοήθησαν με κάθε τρόπο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Μαμούρη Ζήση για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μούττου Αικατερίνη και τον κύριο Σταμάτη Κωνσταντίνο για τη διάθεση και συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Φυσικά, θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα την υποψήφια διδάκτορα Μαρία - Άννα Κυργιαφίνη με την οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ. Την ευχαριστώ για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέφερε καθώς και για την αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής. Η ανταπόκρισή της ήταν πάντοτε άμεση και καθοριστική για κάθε δυσκολία που προέκυπτε.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη συνεχή στήριξη, τη συμπαράσταση καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει κατά τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και στους φίλους μου που ήταν δίπλα μου και μοιραστήκαμε κάθε στιγμή σε αυτό το ταξίδι.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	7
Abstract	8
A. Εισαγωγή.....	9
Κεφάλαιο 1 ^ο Ανδρική Υπογονιμότητα.....	9
1.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία.....	9
1.2. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας	9
1.3. Ταξινόμηση ανδρικής υπογονιμότητας	12
1.4. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	13
1.4.1. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας	17
1.5. Διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	20
Κεφάλαιο 2 ^ο Μη κωδικοποιητικά RNAs (Non-coding RNAs)	23
2.1. Γενικές πληροφορίες και βασικές κατηγορίες μη κωδικοποιητικών RNAs	23
2.2. Τα long non-coding RNAs	24
2.2.1. Βιογένεση των long non-coding RNAs.....	26
2.2.2. Μηχανισμός δράσης των long non-coding RNAs.....	27
2.3. Τα microRNAs	29
2.3.1. Βιογένεση των microRNAs	29
2.3.2. Μηχανισμός δράσης των microRNAs.....	32
2.4. Τα non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα.....	33
2.4.1. Τα small non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα	33
2.4.2. Τα long non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα.....	34
Κεφάλαιο 3 ^ο Μιτοχόνδρια.....	37
3.1. Δομή μιτοχονδρίων	37
3.2. Λειτουργίες μιτοχονδρίων.....	39
3.3. Τα μιτοχόνδρια στην ανδρική υπογονιμότητα	40
3.4. Non-coding RNAs και μιτοχόνδρια.....	42
B. Σκοπός	44
Γ. Υλικά και Μέθοδοι.....	45
1. Βιολογικό υλικό.....	45
2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος	45
3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός μοναδικών πολυμορφισμών.....	47
4. Μελέτη πολυμορφισμών σε μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) που εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων	48
5. Αναζήτηση non-coding RNAs σε Ensembl Genome Browser και GeneCards	49

6. Φιλτράρισμα και διάκριση σημαντικότερων πολυμορφισμών σε ncRNAs υπογόνιμων ανδρών	51
7. Διερεύνηση του ρόλου των SNPs με την βάση δεδομένων SNPnexus.....	53
8. Πρόβλεψη επίδρασης μεταλλάξεων στις θέσεις πρόσδεσης των lncRNAs με τη βάση δεδομένων LncRNASNP2.....	54
Δ. Αποτελέσματα.....	56
1. Ταυτοποίηση non-coding RNAs: Γονίδια και κωδικός Ensembl	56
2. Φιλτράρισμα και διάκριση σημαντικότερων πολυμορφισμών σε ncRNAs υπογόνιμων ανδρών	59
3. Διερεύνηση του ρόλου των SNPs με τη χρήση της βάσης δεδομένων SNPnexus.....	63
4. Μελέτη επίδρασης μεταλλάξεων στις θέσεις πρόσδεσης των lncRNAs με τη χρήση της βάσης δεδομένων LncRNASNP2	64
Ε. Συζήτηση.....	67
Βιβλιογραφία	72

Περίληψη

Η υπογονιμότητα αποτελεί μια συχνή ιατρική κατάσταση με σημαντικές ψυχολογικές, οικονομικές και δημογραφικές επιπτώσεις. Τη σημερινή εποχή πλήττει σχεδόν 1 στα 7 ζευγάρια που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία και ο ανδρικός παράγοντας συνεισφέρει στο 50% των περιπτώσεων. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή στην οποία εμπλέκονται περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τα μη κωδικοποιητικά RNAs με την ανδρική υπογονιμότητα ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε η συνεισφορά των μιτοχονδρίων σε πολλές κυτταρικές διεργασίες και ασθένειες. Ωστόσο, ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Στην συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκαν πολυμορφισμοί σε μη κωδικοποιητικά RNAs τα οποία στοχεύουν γονίδια που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες και μετά την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να εντοπιστούν μοναδικές μεταλλάξεις μεταξύ υπογόνιμων και νορμοσπερμικών ανδρών. Από το φιλτράρισμα που πραγματοποιήθηκε ώστε να εντοπιστούν οι σημαντικότεροι πολυμορφισμοί, εντοπίστηκαν συνολικά 121 πολυμορφισμοί σε 9 lncRNAs που πιθανόν επηρεάζουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων. Οι παραπάνω μεταλλάξεις εντοπίζονται μόνο σε υπογόνιμους άνδρες και επιπλέον, 23 από αυτούς οδηγούν σε δημιουργία ή/και απώλεια θέσης αλληλεπίδρασης μεταξύ lncRNA-miRNA, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LncRNASNP2, ενώ άλλοι 3 από αυτούς έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με καρκίνο του αναπαραγωγικού συστήματος ο οποίος συνδέεται συχνά με την υπογονιμότητα. Ακόμη, 5 από αυτούς τους πολυμορφισμούς εντοπίζονται και στους τρεις υποτύπους ανδρικής υπογονιμότητας. Παρόλο που η επίδραση των παραπάνω πολυμορφισμών στην λειτουργία των μιτοχονδρίων και στην εμφάνιση υπογονιμότητας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, η παρούσα μελέτη συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα και αποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των lncRNAs σε αυτή.

Abstract

Infertility is a common medical condition with significant psychological, economic, and demographic implications. Nowadays, it affects nearly one in seven couples of reproductive age while the male factor contributes to 50% of all cases. Male infertility is a multifactorial disorder that involves environmental and genetic factors. Several studies have associated noncoding RNAs with male infertility, while the contribution of mitochondria to many cellular processes and diseases has recently been demonstrated. However, the role of mitochondria in male infertility has not been fully elucidated. In this particular study, variants in noncoding RNAs targeting genes that affect mitochondrial function and dynamics were investigated. More specifically, blood samples from normozoospermic and non-normozoospermic men were used, and whole genome sequencing was followed by bioinformatics analysis to identify mutations found only in infertile men and not in normozoospermic. After variant prioritization with several filters, a total of 121 polymorphisms were identified in 9 lncRNAs that probably affect mitochondrial function. These mutations are only found in infertile men and 23 of them lead to the gain and/or loss of lncRNA-miRNA interaction sites, according to the lncRNASNP2 database. 3 of them have previously been also associated with reproductive cancers that are often linked with infertility. Furthermore, 5 of these variants are found in all three subtypes of male infertility. Although the effect of the above polymorphisms on mitochondrial function and infertility needs further investigation, the present study contributes to a better understanding of the molecular mechanisms involved in male infertility and proves the important role of lncRNAs in it.

A. Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1° | Ανδρική Υπογονιμότητα

1.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία ενός ζευγαριού να επιτύχει σύλληψη έπειτα από τουλάχιστον 12 μήνες τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς τη χρήση κάποιας μεθόδου αντισύλληψης (Agarwal et al., 2020). Υπολογίζεται ότι η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 15% των ζευγαριών που βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία και είναι ένα πρόβλημα που αφορά τόσο το ανδρικό όσο και το γυναικείο φύλο (Vander Borgh & Wyns, 2018).

Η συχνότητα εμφάνισης της ανδρικής υπογονιμότητας παγκοσμίως δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια, αφού σε πολλές περιοχές του κόσμου, κοινωνικοί και πολιτισμικοί παράγοντες (πολυγαμία, υπεροχή ανδρικού φύλου) οδηγούν σε μη αναφορά και καταγραφή όλων των περιστατικών (Kyrgiagini et al., 2020).

Ωστόσο, εκτιμάται ότι περίπου 30 εκατομμύρια άνδρες παγκοσμίως εμφανίζουν υπογονιμότητα με τα υψηλότερα ποσοστά να εντοπίζονται σε αναπτυσσόμενες χώρες. Το 30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα ενώ το 20% οφείλεται σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα. Έτσι, η συνεισφορά του ανδρικού παράγοντα φαίνεται να αγγίζει το 50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας (Vander Borgh & Wyns, 2018).

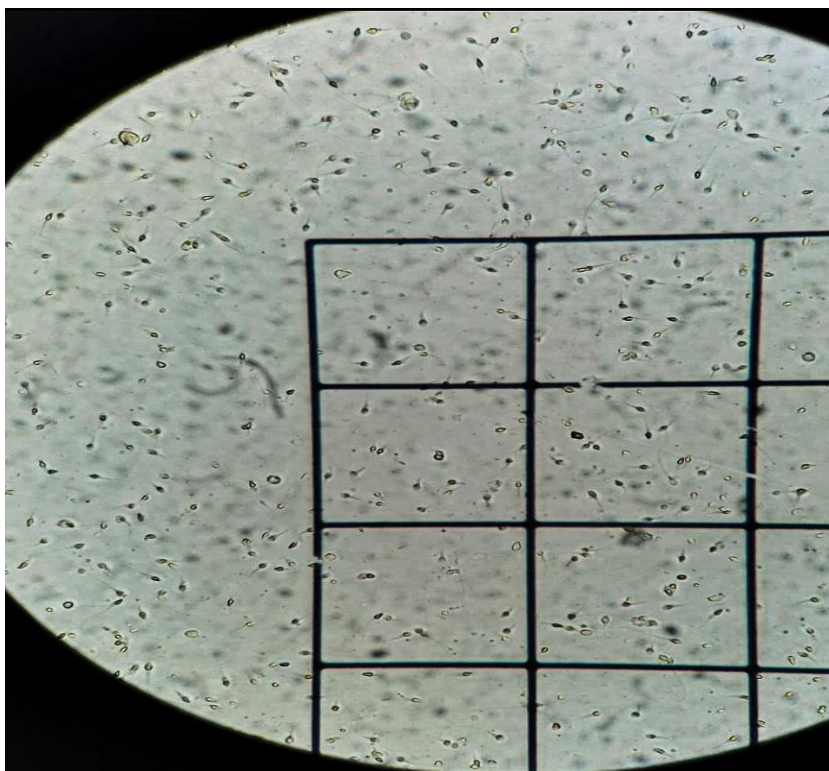
Η ανδρική υπογονιμότητα, η οποία παρουσιάζει ποικίλη φαινοτυπική ετερογένεια, μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια πολυπαραγοντική παθολογική διαταραχή. Οφείλεται δηλαδή σε ένα πλήθος γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων και αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας που επηρεάζει πάρα πολλά ζευγάρια (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Οι αναρίθμητες επιπτώσεις της ανδρικής υπογονιμότητας σε συνδυασμό με τα αυξανόμενα ποσοστά εμφάνισής της, υπαγορεύουν την ανάγκη για εκτενέστερη μελέτη των πολύπλοκων μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή, με απώτερο σκοπό την ακριβέστερη διάγνωση και την καλύτερη αντιμετώπισή της (Agarwal et al., 2020).

1.2. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Η εμφάνιση υπογονιμότητας σε ένα ζευγάρι απαιτεί την περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγηση της κατάστασης προκειμένου να γίνει διάγνωση του παράγοντα (ή των παραγόντων) που την προκαλούν. Είναι γνωστό ότι η ανδρική γονιμότητα εξαρτάται από τις διαδικασίες

παραγωγής και μεταφοράς του σπέρματος (σπερματογένεση), οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και εμπλέκουν το νευρικό, το ενδοκρινικό αλλά και το ανοσοποιητικό σύστημα (Darren J Katz et al., 2017). Όσον αφορά την ανδρική υπογονιμότητα, η Αμερικανική Εταιρία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (ASRM) και η Ευρωπαϊκή Ουρολογική Εταιρία (AUA) συνιστούν ως πρώτο βήμα για την αξιολόγηση της κατάστασης, τη λήψη ιατρικού ιστορικού και την ανάλυση σπέρματος (Agarwal et al., 2020).

- **Λήψη λεπτομερούς ιστορικού.** Το ιστορικό μπορεί να περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τη σεξουαλική ζωή του ατόμου, ασθένειες και χειρουργικές επεμβάσεις, έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης ασθενειών, κ.ά. (Agarwal et al., 2020).
- **Ανάλυση σπέρματος (Σπερμοδιάγραμμα).** Για την ανάλυση σπέρματος, λαμβάνεται δείγμα σπέρματος και στη συνέχεια προσδιορίζεται ένα σύνολο μικροσκοπικών και μακροσκοπικών παραμέτρων, όπως ο όγκος του δείγματος, ο αριθμός, η κινητικότητα, η μορφολογία των σπερματοζωαρίων κ.ά. (Agarwal et al., 2022).



Εικόνα 1. Σπερμοδιάγραμμα που διενεργήθηκε στα πλαίσια πρακτικής άσκησης στην κλινική γονιμότητας Embryolab κατά το καλοκαίρι 2021 (Πηγή: προσωπικό αρχείο)

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει ορίσει μια σειρά από κατώτερες τιμές αναφοράς για τις διάφορες μετρούμενες παραμέτρους του σπέρματος προκειμένου να καταστεί ευκολότερη η διάγνωση και να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα γονιμοποίησης (Darren J Katz et al., 2017).

Πίνακας 1. Παράγοντες προς μέτρηση στην ανάλυση σπέρματος και κατώτερες τιμές αναφοράς σύμφωνα με τον ΠΟΥ (Darren J Katz et al., 2017).

Παράγοντες υπό διερεύνηση	Κατώτερες τιμές αναφοράς
Όγκος	≥1.5 mL
pH	≥7.2
Συγκέντρωση σπέρματος	≥15 εκατομμύρια/mL
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥3 εκατομμύρια
Συνολική κινητικότητα	≥40%
Προοδευτική κινητικότητα	≥32%
Βιωσιμότητα	≥58%
Φυσιολογική μορφολογία	≥4%
Λευκοκύτταρα	<1.0 x 10 ⁶ /mL

Νεότερες επιστημονικές μελέτες προτείνουν επίσης την αξιολόγηση του βαθμού κατακερματισμού του DNA στα σπερματοζωάρια ως παράγοντα που μπορεί να προσφέρει επιπλέον πληροφορίες για την κατάσταση γονιμότητας του άνδρα ή την ύπαρξη ανδρικής υπογονιμότητας. Ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος είναι μια βλάβη που συμβαίνει στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων και αφορά συνήθως μία διατομή σε μία από τις δύο έλικες του DNA. Όταν συμβαίνει αυτό, η έλικα γίνεται ασταθής και το σπέρμα καθίσταται περισσότερο ευαίσθητο στην επίδραση βλαπτικών παραγόντων. Έρευνες αποδεικνύουν ότι σπερματοζωάρια με υψηλό ποσοστό κατακερματισμού του DNA (μεγαλύτερο του 26-30%) έχουν μικρότερη πιθανότητα να δώσουν μια υγιή εγκυμοσύνη. Βέβαια, η δομική αλλοίωση στο DNA του σπέρματος δεν μπορεί να εντοπιστεί σε καμία από τις προαναφερθείσες συμβατικές εξετάσεις. Ο βαθμός κατακερματισμού του DNA στα σπερματοζωάρια υπολογίζεται με την εξέταση DFI (DNA fragmentation index) η οποία απαιτεί μικρή ποσότητα σπερματικού υγρού. Κατά την εξέταση διερευνάται η παρουσία ρηγμάτων στις έλικες του DNA και υπολογίζεται το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA (Wiweko & Utami, 2017).

Αν οι παραπάνω έλεγχοι υποδείξουν τυχόν ανωμαλίες, συνήθως ακολουθούν περεταίρω εξετάσεις ανδρολογικής φύσεως για να διαπιστωθεί ακριβέστερα η κατάσταση και τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας (Agarwal et al., 2020):

- **Κλινική εξέταση.** Περιλαμβάνει τον έλεγχο χαρακτηριστικών που αφορούν τη φυσιολογία του ατόμου αλλά και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου ώστε να εντοπιστούν ενδεχόμενες ανωμαλίες.
- **Ορμονικές εξετάσεις.** Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων μέτρηση των επιπέδων FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη), η οποία διεγείρει τη σπερματογένεση δρώντας στα κύτταρα Sertoli, μέτρηση τεστοστερόνης που αποτελεί το κυριότερο ανδρογόνο κ.ά. (Darren J Katz et al., 2017).

1.3. Ταξινόμηση ανδρικής υπογονιμότητας

Με βάση τα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προτείνει την ταξινόμηση της κάθε περίπτωσης ανδρικής υπογονιμότητας σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες (Colaco & Modi, 2018):

- **Αζωοσπερμία.** Απουσία σπερματοζωαρίων από το σπερματικό υγρό.
Μπορεί να γίνει διάκρισή της σε δύο υποκατηγορίες, (1) την **αποφρακτική αζωοσπερμία** (Obstructive azoospermia – OA), όταν οφείλεται σε προβλήματα σχετικά με την μεταφορά του σπέρματος και (2) την **μη αποφρακτική αζωοσπερμία** (Non-obstructive azoospermia – NOA), κατά την οποία εντοπίζεται κάποιο πρόβλημα στην διαδικασία παραγωγής των σπερματοζωαρίων.
- **Ολιγοζωοσπερμία.** Η κατάσταση κατά την οποία παρατηρούνται λιγότερα από $15-20 \times 10^6$ σπερματοζωάρια στο σπερματικό υγρό.
- **Σοβαρή ολιγοζωοσπερμία.** Όταν στο δείγμα σπέρματος εντοπίζονται λιγότερα από 5×10^6 σπερματοζωάρια στο σπερματικό υγρό.
- **Κρυπτοζωοσπερμία.** Ο τύπος ανδρικής υπογονιμότητας κατά τον οποίο συναντώνται λιγότερα από 10^6 σπερματοζωάρια στο σπερματικό υγρό (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

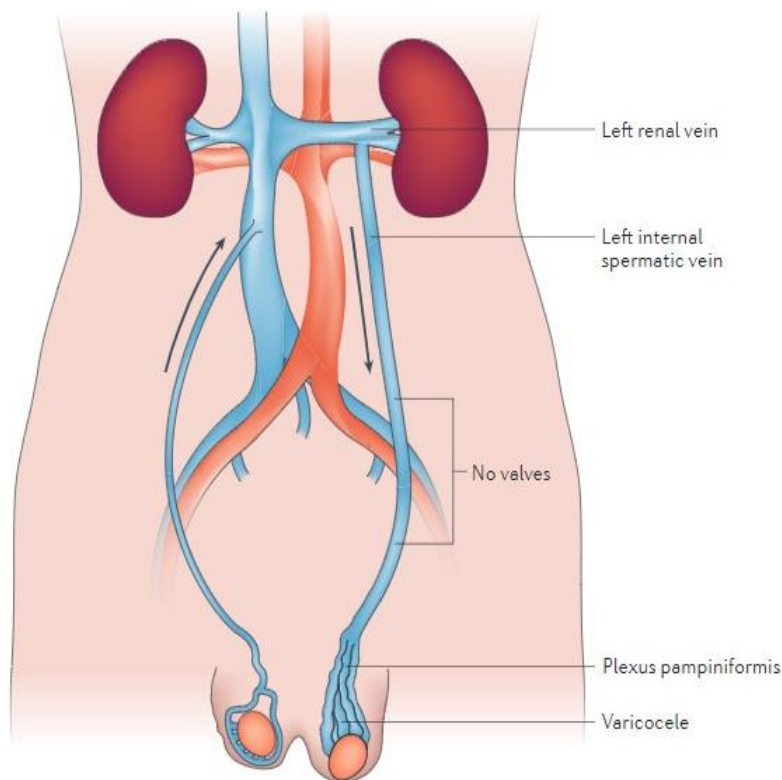
- **Νορμοζωοσπερμία.** Όταν παρατηρείται φυσιολογικός αριθμός σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό.
- **Ασθενοζωοσπερμία.** Η περίπτωση υπογονιμότητας κατά την οποία εμφανίζεται χαμηλή κινητικότητα σε λιγότερο από το 50% των σπερματοζωαρίων.
- **Τερατοζωοσπερμία.** Όταν λιγότερο από 30% των σπερματοζωαρίων έχουν φυσιολογική μορφολογία.
- **Ασπερμία.** Ορίζεται ως η απουσία σπερματικού υγρού κατά την εκσπερμάτιση.

1.4. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα στο ανδρικό φύλο μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, ωστόσο σχεδόν στο 40% των περιπτώσεων δεν εντοπίζεται κάποιο συγκεκριμένο αίτιο υπογονιμότητας, μία κατάσταση γνωστή ως ιδιοπαθής υπογονιμότητα. Στη αυτή την περίπτωση οι ασθενείς δεν έχουν ιστορικό υπογονιμότητας ενώ τα ευρήματα που προκύπτουν από την κλινική εξέταση και τον ενδοκρινολογικό έλεγχο είναι φυσιολογικά. Εντούτοις, η ανάλυση σπέρματος μπορεί να υποδεικνύει ανωμαλίες στον αριθμό, την κινητικότητα ή τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Babakhanzadeh et al., 2020). Όσον αφορά τις υπόλοιπες περιπτώσεις, η εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να οφείλεται σε:

- **Σωματικά αίτια**

Η κίρσοκήλη είναι η συχνότερη αλλά πλέον αναστρέψιμη αιτία εμφάνισης υπογονιμότητας στους άνδρες. Συναντάται στο 40% των υπογόνιμων ανδρών και στο 15% του γενικού ανδρικού πληθυσμού (Agarwal et al., 2020). Πρόκειται για ένα οίδημα των φλεβών του οσχέϊκού σάκου, το οποίο παρεμποδίζει την ομαλή ωρίμανση των σπερματοζωαρίων με επακόλουθη συνέπεια την υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος.



Εικόνα 2. Ανατομία της παροχέτευσης φλεβικού αίματος από τους όρχεις στη συστηματική κυκλοφορία (Jensen et al., 2017).

Επιπλέον, οι λοιμώξεις του αναπαραγωγικού συστήματος αποτελούν συχνή αιτία για την εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας. Ειδικότερα, κάποια σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (ΣΜΝ), όπως τα χλαμύδια και η γονόρροια προκαλούν απόφραξη της επιδιδυμίδας. Είναι επίσης γνωστό ότι η φλεγμονή των όρχεων εξαιτίας του ιού της παρωτίτιδας (ΜuV) μπορεί να οδηγήσει σε ατροφία τους και ακολούθως σε υπογονιμότητα.

Τέλος, υπογονιμότητα μπορεί να προκύψει από προβλήματα που είναι άμεσα συνδεδεμένα με την ψυχολογία του άνδρα και λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία της συνουσίας όπως η στυτική δυσλειτουργία και η πρόωρη ή ανεσταλμένη εκσπερμάτιση (Babakhanzadeh et al., 2020).

▪ **Ορμονικά αίτια**

Η σωστή λειτουργία του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – όρχεις παρέχει τις κατάλληλες συγκεντρώσεις ορμονών, οι οποίες είναι καθοριστικές για την ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος στους άνδρες και τη ρύθμιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης. Αναπόφευκτα, οποιαδήποτε διαταραχή στον άξονα αυτό οδηγεί σε προβλήματα γονιμότητας. Πιο συγκεκριμένα, η μη φυσιολογική έκκριση της GnRH (εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών) και των LH, FSH (γοναδοτροπίνες) συμβάλλει στη διακοπή των διαδικασιών παραγωγής και ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στους όρχεις λόγω των χαμηλών

επιπέδων τεστοστερόνης. Αυτή η παθολογική κατάσταση είναι γνωστή ως υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός (Babakhanzadeh et al., 2020).

▪ Περιβαλλοντικά αίτια

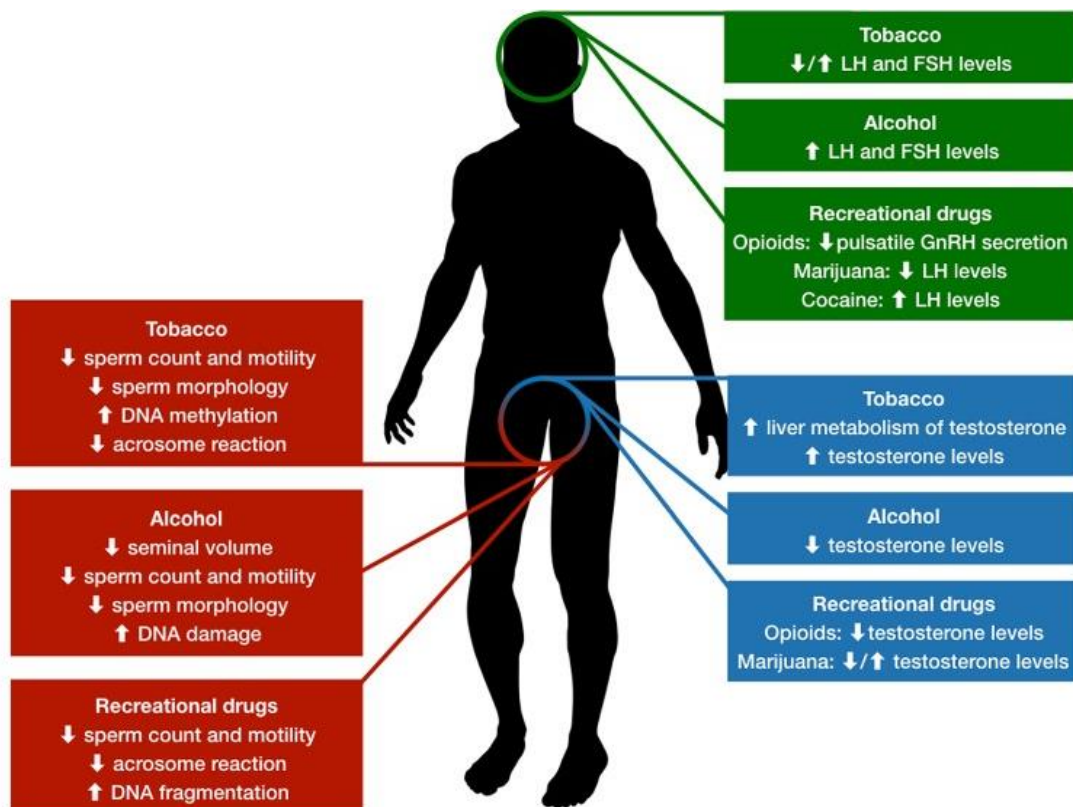
Μελέτες αποδεικνύουν ότι περιβαλλοντικά αίτια μπορούν επίσης να συσχετιστούν με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Η συνεχής επαφή με χημικές ουσίες όπως είναι τα εντομοκτόνα και οι οργανικοί διαλύτες καθώς και η χρόνια έκθεση σε ακτινοβολίες πιθανόν να οδηγήσουν σε μόνιμο πρόβλημα υπογονιμότητας (Babakhanzadeh et al., 2020). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία ατμοσφαιρικών ρύπων όπως το διοξείδιο του θείου (SO₂) προκαλεί αλλαγές στην μορφολογία και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Carré et al., 2017, Fathi Najafi et al., 2015).

Ακόμη, τα επαγγέλματα που επιβάλλουν εργασιακό περιβάλλον με υψηλές θερμοκρασίες ή παρατεταμένη καθιστική ενασχόληση ενδέχεται να συμβάλλουν στην παροδική μείωση του αριθμού σπερματοζωαρίων (Babakhanzadeh et al., 2020).

▪ Αίτια που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής

Μία ακόμη κατηγορία παραγόντων που πιθανόν να εμπλέκονται στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας σχετίζονται με τον τρόπο ζωής. Τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερες μελέτες υπογραμμίζουν τις αναρίθμητες επιπτώσεις του καπνίσματος σε διάφορες πτυχές της υγείας του ανθρώπου. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, περισσότερο από το 30% του ενήλικου ανδρικού πληθυσμού καπνίζει παγκοσμίως (Sansone et al., 2018). Όσον αφορά τις συνέπειες του καπνίσματος στη γονιμότητα, αποδεικνύεται ότι το κάπνισμα επιδρά αρνητικά σε όλες τις παραμέτρους ποιότητας του σπέρματος, δηλαδή στον συνολικό όγκο, τον αριθμό, τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Mann et al., 2020). Επίσης, σε πολλές έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την μεθυλίωση του DNA και αναστέλλει την ακρωσική αντίδραση (Sansone et al., 2018).

Επιπρόσθετα, η συστηματική κατανάλωση αλκοόλ έχει συνδεθεί με την υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος, ειδικότερα λόγω της επίδρασης που έχει στη συγκέντρωση και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Finelli et al., 2022). Το αλκοόλ προκαλεί διαταραχές και στο ισοζύγιο ορμονών αυξάνοντας τα επίπεδα των LH και FSH και μειώνοντας τα επίπεδα της τεστοστερόνης (Sansone et al., 2018).



Εικόνα 3. Επιπτώσεις καπνίσματος, αλκοόλ και ναρκωτικών ουσιών στο σπέρμα (αριστερά) και στο ορμονικό ισοζύγιο (δεξιά). Ο συνδυασμός τους φαίνεται ότι συμβάλλει στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας (Sansone et al., 2018).

Επιπλέον, προβλήματα υπογονιμότητας μπορούν να προκληθούν από τη συχνή χρήση ναρκωτικών ουσιών όπως η κάνναβη με μια πληθώρα μελετών να έχει προσδιορίσει το ρόλο τους στην αύξηση του κατακερματισμού του DNA καθώς και τη μη φυσιολογική έκκριση LH, FSH και τεστοστερόνης (Sansone et al., 2018).

Τέλος, η κακή διατροφή και η παχυσαρκία ενδέχεται να επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την γονιμότητα αφού, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών συντελεί στη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του σπέρματος (Babakhanzadeh et al., 2020).

▪ **Οξειδωτικό στρες**

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species - ROS) αποτελούν παραπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης η οποία πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια και ο μηχανισμός της αναλύεται διεξοδικά στο υποκεφάλαιο «Λειτουργίες των μιτοχονδρίων». Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ROS εξυπηρετούν μία πληθώρα διαδικασιών στα κύτταρα όπως η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και η απόπτωση. Πολλές έρευνες έχουν γνωστοποιήσει τον καθοριστικό τους ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων καθώς και στη διαδικασία της γονιμοποίησης του ωαρίου. Βέβαια, η ανεξέλεγκτη παραγωγή των ROS είναι επιβλαβής για τα κύτταρα και προκαλεί

οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ των παραγόμενων ROS και της ικανότητας του κυττάρου να τα αδρανοποιεί. Τα δραστικά αυτά μόρια σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικά και προκαλούν σημαντικές βλάβες σε πρωτεΐνες, DNA και λιπίδια. Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα αφού, όπως αποδεικνύεται, τα σπερματοζωάρια είναι ευαίσθητα στην δράση των ROS λόγω της ιδιαίτερης δομής και σύστασής τους (υπεροξείδωση λιπιδίων πλασματικής μεμβράνης) (Vertika et al., 2020).

1.4.1. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας

Όσον αφορά τις περιπτώσεις που δεν εντοπίζεται κάποιο ξεκάθαρο αίτιο υπογονιμότητας, όπως στην ιδιοπαθή υπογονιμότητα, είναι αρκετά πιθανό αυτή να αποτελεί απόρροια γενετικών παραγόντων. Η μελέτη του γενετικού υποβάθρου της ανδρικής υπογονιμότητας δεν είναι μία εύκολη υπόθεση λόγω της ετερογένειας που την χαρακτηρίζει δεδομένου ότι οφείλεται τόσο σε έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών γονιδίων όσο και στην περίπλοκη αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλον. Είναι γνωστό ότι χιλιάδες γονίδια εμπλέκονται σε διαδικασίες κομβικές για την ανδρική γονιμότητα, όπως η σπερματογένεση, η ανάπτυξη και η ορμονική ρύθμιση της λειτουργίας των όρχεων. Πολλές έρευνες ωστόσο, υπερκεράζοντας τις δυσκολίες στην μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας, έχουν αποδείξει ότι διάφορες γενετικές ανωμαλίες συσχετίζονται με την εμφάνισή της στους άνδρες και αποτελούν έναν πολύ σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα, συμβάλλοντας τουλάχιστον στο 15% των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα, οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο, υπερβαίνοντας τις δυσκολίες στη γονιμοποίηση που ανακύπτουν κατά τον φυσικό τρόπο σύλληψης. Παράλληλα όμως, με αυτό τον τρόπο επιτρέπουν και την κληρονόμηση μεταλλάξεων στους απογόνους. Συνεπώς, η εκτενέστερη διερεύνηση των γενετικών αιτιών που οδηγούν στην υπογονιμότητα είναι μείζονος σημασίας, αφού έτσι θα καταστεί ευκολότερη η πρόγνωση, η διάγνωση και η ανάλογη αντιμετώπιση των συνεπειών της υπογονιμότητας στην αναπαραγωγική και γενικότερη υγεία των ανδρών αλλά και των απογόνων τους (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Οι γενετικές ανωμαλίες που εντοπίζονται συχνότερα σε άνδρες με υπογονιμότητα αφορούν (Babakhanzadeh et al., 2020):

- **Χρωμοσωμικές ανωμαλίες**

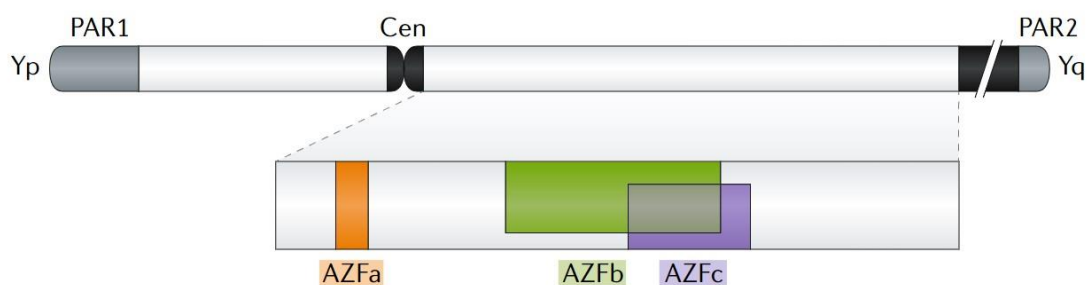
Το ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που εντοπίζονται στον καρυότυπο ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία και ολιγοζωοσπερμία ανέρχεται σε 15% και 4% αντίστοιχα, ενώ στους νορμοσπερμικούς άνδρες κυμαίνεται μόλις μεταξύ 0,7 - 1%. Οι ανωμαλίες αυτές μπορεί να είναι

είτε αριθμητικές (απώλεια ή πλεόνασμα χρωμοσώματος) είτε δομικές (μη φυσιολογική αναδιάταξη) και να αφορούν τόσο αυτοσωμικά όσο και φυλετικά χρωμοσώματα. Ειδικότερα, το σύνδρομο Klinefelter (XXY) και η μεταθέσεις κατά Robertson αποτελούν τις πιο κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε άνδρες με υπογονιμότητα (Gunes & Esteves, 2021).

■ Το χρωμόσωμα Y

Το 95% του συνολικού μήκους του χρωμοσώματος Y συνιστά μια περιοχή όπου δεν συμβαίνει ανασυνδυασμός μεταξύ των χρωμοσωμάτων X-Y και η οποία ονομάζεται MSY (male-specific Y). Η περιοχή MSY πλαισιώνεται από δύο ψευδοαυτοσωματικές περιοχές (5%) που βρίσκονται στα άκρα του χρωμοσώματος (PAR1, PAR2). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κατά τη μείωση στους άνδρες, τα χρωμοσώματα X και Y συνάπτονται στις ψευδοαυτοσωματικές περιοχές και ανταλλάσσουν γενετικό υλικό, υπόκεινται δηλαδή σε ομόλογο ανασυνδυασμό.

Η πλειονότητα των γονιδίων τα οποία εδράζονται στη περιοχή MSY είναι σημαντικά για τις διαδικασίες της σπερματογένεσης και του καθορισμού του αρσενικού φύλου. Λόγω της μοναδικότητας του χρωμοσώματος Y και των κρίσιμων γονιδίων που αυτό φέρει (ένα αντίγραφο γονιδίων), οποιαδήποτε αλλαγή στο γενετικό του υλικό πιθανόν να έχει ισχυρό αντίκτυπο στον φαινότυπο του άνδρα (Dobbs et al., 2018). Αναπόφευκτα λοιπόν, η δεύτερη πιο συχνή γενετική ανωμαλία που προκαλεί υπογονιμότητα στους άνδρες είναι τα μικροελλείμματα που εντοπίζονται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος (Yq). Η συχνότητά τους φτάνει έως και το 15% στους άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία ενώ στον γενικό πληθυσμό συναντάται σε πολύ χαμηλό ποσοστό, δηλαδή 0,025% (Gunes & Esteves, 2021). Πιο συγκεκριμένα, τα πιο συχνά μικροελλείμματα παρατηρούνται στην περιοχή AZF (azoospermia factor region), η οποία απαρτίζεται από τρεις επιμέρους περιοχές, τις AZFa, AZFb και AZFc.



Εικόνα 4. Το χρωμόσωμα Y αποτελείται από δύο βραχίονες, τον βραχύ (Yp) και τον μακρύ (Yq). Η περιοχή AZF διακρίνεται στις υποπεριοχές AZFa, AZFb και AZFc (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Σε κάθε μία από τις παραπάνω περιοχές εδράζονται διάφορα γονίδια που είναι καθοριστικά για τη διαδικασία της σπερματογένεσης, όπως τα *USP9Y* και *DBY* (ή *DDX3Y*) στην περιοχή *AZF_a* και το *PRY* στην *AZF_b* (Dobbs et al., 2018). Στο 60-70% των περιπτώσεων, το μικροέλλειμμα αφορά την περιοχή *AZF_c*, η οποία περιλαμβάνει διάφορα γονίδια όπως είναι το γονίδιο *DAZ* (Ferlin et al., 2019).

▪ **Μεταλλάξεις σε αυτοσωμικά γονίδια**

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός αυτοσωμικών γονιδίων μελετάται για την ενδεχόμενη εμπλοκή τους στην ανδρική υπογονιμότητα. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το γονίδιο *CFTR*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κυστική ίνωση (cystic fibrosis - CF) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7, φέρει τουλάχιστον μία μετάλλαξη σχεδόν στο 80% των αζωοσπερμικών ανδρών με συγγενή έλλειψη σπερματικών πόρων (Congenital bilateral absence of the vas deferens - CBAVD).

Επιπλέον, το γονίδιο *NR5A1* (μεταγραφικός παράγοντας στεροειδογένεσης 1) έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση υπογονιμότητας στους άνδρες αφού αρκετές μεταλλάξεις σε αυτό οδηγούν σε ανωμαλίες στην ορχική ανάπτυξη και αλλαγές στα επίπεδα των φυλετικών ορμονών (Ferlin et al., 2019).

Άλλα γονίδια που ενδεχομένως εμπλέκονται είναι το *DMRT1* (doublesex - and MAB3 - related transcription factor 1) στο χρωμόσωμα 9 και το γονίδιο *FSHR* (υποδοχέας FSH) λόγω του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζουν στην ρύθμιση της σπερματογένεσης και των κυττάρων Sertoli (Tüttelmann et al., 2018).

▪ **Γονίδια του χρωμοσώματος X**

Μελέτες ακόμη αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του χρωμοσώματος X στην ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, σημαντικός αριθμός γονιδίων του χρωμοσώματος X εκφράζονται στους όρχεις και πιθανώς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην σπερματογένεση. Ένα από τα κυριότερα είναι το γονίδιο του υποδοχέα ανδρογόνων (androgen receptor - AR). Περισσότερες από 1000 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο ενώ υπολογίζεται ότι το 2-3% των ανδρών με αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοζωοσπερμία φέρουν μία μετάλλαξη σε αυτό. Ακόμη, το γονίδιο *TEX11* (testis-expressed 11) εκφράζεται αποκλειστικά στα σπερματοκύτταρα και έχει συσχετιστεί με την αζωοσπερμία (Ferlin et al., 2019). Τέλος, ένα ακόμα γονίδιο με πιθανό ρόλο είναι το *RHOX* (human reproductive homeobox) αφού δύο μεταλλάξεις (*RHOXF1* και *RHOXF2/2B*) έχουν εντοπισθεί σε άνδρες με σοβαρή ολιγοζωοσπερμία (Gunes & Esteves, 2021).

1.5. Διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Όπως προκύπτει με βάση τα προηγούμενα, η εμφάνιση υπογονιμότητας στους άνδρες μπορεί να οφείλεται σε διάφορες καταστάσεις. Ορισμένες από αυτές είναι αναγνωρίσιμες και αναστρέψιμες, όπως η κισσοκήλη και ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός. Σε άλλες περιπτώσεις, η αιτία της υπογονιμότητας μπορεί να είναι προσδιορίσιμη, χωρίς όμως να υπάρχει τρόπος να αντιμετωπιστεί. Κρίνεται, λοιπόν, απαραίτητη η αναγνώριση των αναστρέψιμων καταστάσεων προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση και να βελτιωθεί η γονιμότητα ενός άνδρα. Η αναγνώριση των καταστάσεων οι οποίες δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν είναι εξίσου αναγκαία, αφού το ζευγάρι μπορεί έτσι να αποφύγει την ψυχική φθορά των αλλεπάλληλων αναποτελεσματικών θεραπειών. Εύλογα γίνεται αντιληπτό ότι η σωστή αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να επιτρέψει στο ζευγάρι να κατανοήσει καλύτερα τη βάση της υπογονιμότητάς του και να συμβάλει στην αναζήτηση της καταλληλότερης γενετικής καθοδήγησης. Γενικότερα, ανάλογα με το αίτιο που προκαλεί την ανδρική υπογονιμότητα, υπάρχουν και αντίστοιχες θεραπευτικές προσεγγίσεις οι οποίες αναλύονται στη συνέχεια:

- **Φαρμακευτική θεραπεία**

Οι ορμονικές διαταραχές που επηρεάζουν την παραγωγή και ωρίμανση του σπέρματος μπορούν συνήθως να αντιμετωπιστούν επιτυχώς με τη χορήγηση φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, σε υπογόνιμους άνδρες με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό χορηγείται χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (hMG) ως υποκατάστατα των LH και FSH αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την βελτίωση της γονιμότητας (Agarwal et al., 2020).

- **Χειρουργική θεραπεία**

Συνήθως, όταν ένα φυσικό εμπόδιο υποβαθμίζει την ποιότητα του σπέρματος ή δυσχεραίνει την εκσπερμάτιση, η αντιμετώπισή του περιλαμβάνει μικροχειρουργικές επεμβάσεις ή χειρουργείο. Μια τέτοια περίπτωση είναι η κισσοκήλη, η οποία συναντάται στο 25% των ανδρών με παθολογικό σπερμοδιάγραμμα. Η διόρθωση της κισσοκήλης γίνεται με χειρουργική απολίνωση ή με εμβολισμό των σπερματικών φλεβών. Εντούτοις, η χειρουργική επέμβαση δεν ενδείκνυται σε όλες τις περιπτώσεις κισσοκήλης (Agarwal et al., 2020). Επίσης, σε ασθενείς με αποφρακτική αζωοσπερμία, αναλόγως το σημείο στο οποίο εντοπίζεται η απόφραξη, μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργείο προκειμένου να διορθωθούν μικροπροβλήματα που φράζουν την μεταφορά των σπερματοζωαρίων στο σπερματικό πόρο. Εάν οι παραπάνω θεραπείες δεν είναι

δυνατό να πραγματοποιηθούν ή δεν οδηγήσουν σε βελτίωση της κατάστασης, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την χειρουργική ανάκτηση σπερματοζωαρίων σε συνδυασμό με τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Leaver R B, 2016).

- **Ανάκτηση σπερματοζωαρίων**

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι χειρουργικής ανάκτησης σπερματοζωαρίων, είτε από την επιδιδυμίδα είτε από τους όρχεις. Μία από αυτές είναι η βιοψία όρχεως (testicular sperm extraction - TESE), η οποία είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει ανοικτή βιοψία και συλλογή μικρών τεμαχιδίων ορχικού ιστού. Ακολουθεί ειδική επεξεργασία του ιστού και ανεύρεση σπερματοζωαρίων, εφόσον αυτά υπάρχουν, με τη βοήθεια μικροσκοπίου στο εργαστήριο. Η βιοψία όρχεως συνιστάται σε περιπτώσεις αποφρακτικής αλλά και μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας (Leaver R B, 2016). Η micro-TESE είναι μια εξειδικευμένη μορφή βιοψίας, η οποία πραγματοποιείται με το βοήθεια μικροσκοπίου προκειμένου η βιοψία να γίνεται στοχευμένα στις υγιείς περιοχές του όρχεως, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες ανεύρεσης σπερματοζωαρίων στον ελπιζόμενο ιστό (Babakhanzadeh et al., 2020, Shah & Gupta, 2017).

- **Τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης**

Κατά την κλασική μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro fertilization - IVF), ωάρια και σπερματοζωάρια τοποθετούνται μαζί σε καλλιεργητικό υλικό και επωάζονται προκειμένου να επιτευχθεί γονιμοποίηση των ωαρίων in vitro (Zheng et al., 2019). Τα τελευταία χρόνια, η μέθοδος της ενδοκυτταροπλάσματικής έγχυσης σπέρματος (intracytoplasmic sperm injection - ICSI) αποτελεί ακρογωνιαία λίθο της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αφού έχει συμβάλει στην επιτυχημένη αντιμετώπιση της υπογονιμότητας μεγάλου αριθμού ζευγαριών. Εφαρμόζεται σε περιπτώσεις σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας, ωστόσο το ποσοστό πετυχημένης γονιμοποίησης με την ICSI ανέρχεται στο 98%. Κατά την μικρογονιμοποίηση, ένα επιλεγμένο σπερματοζωάριο, αφού υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία, εισάγεται απευθείας στο ώριμο ωάριο με τη χρήση ειδικής βελόνας (injection pipette) διευκολύνοντας έτσι την διαδικασία της γονιμοποίησης, η οποία δεν μπορεί να επιτευχθεί με το φυσικό τρόπο (Leaver R B, 2016).



Εικόνα 5. Μέθοδος της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI). Το ωάριο σταθεροποιείται με τη βοήθεια της holding πιπέτας ενώ το σπερματοζωάριο εισάγεται σε αυτό με την injection πιπέτα. Η εικόνα ελήφθη στα πλαίσια πρακτικής άσκησης στην κλινική γονιμότητας Embryolab κατά το καλοκαίρι 2021 (Πηγή: προσωπικό αρχείο)

Κεφάλαιο 2^ο | Μη κωδικοποιητικά RNAs (Non-coding RNAs)

2.1. Γενικές πληροφορίες και βασικές κατηγορίες μη κωδικοποιητικών RNAs

Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS), έχει διαπιστωθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος μεταγράφεται σε μόρια RNA. Ωστόσο, αποδεικνύεται ότι μόλις το 1-2% των μορίων αυτών κωδικοποιεί για πρωτεΐνες (Beermann et al., 2016).

Με βάση τις παραπάνω διαπιστώσεις, τα μόρια RNA διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται τα μόρια RNA που έχουν την δυνατότητα να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες, τα mRNAs, ενώ στη δεύτερη ανήκουν τα μη κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNAs ή ncRNAs), τα οποία δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Μάλιστα, τα non-coding RNAs διακρίνονται εκ νέου σε δύο υποομάδες ανάλογα με το μέγεθός τους. Η πρώτη ομάδα αφορά μόρια με μέγεθος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια, τα οποία ονομάζονται small non-coding RNAs, ενώ στην δεύτερη συναντώνται μόρια RNA με μέγεθος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία ονομάζονται long non-coding RNAs (Beermann et al., 2016). Η ομάδα των μικρών μορίων RNA περιλαμβάνει τα ενδογενή μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (endo-siRNAs), τα PIWI-interacting RNAs (piRNAs) ενώ τα πιο γνωστά και μελετημένα είναι τα miRNAs (J. X. Yang et al., 2016).

Όπως αναφέρθηκε, τα non-coding RNAs δεν μεταφράζονται και συνεπώς δεν οδηγούν σε πρωτεϊνική παραγωγή. Αυτός είναι και ο λόγος που, μέχρι πρόσφατα, θεωρούνταν μη λειτουργικά μόρια. Κατ' επέκταση και οι αλληλουχίες του γονιδιώματος που παράγουν τα μόρια αυτά θεωρούνταν μικρής βιολογικής σημασίας, γι' αυτό και χαρακτηρίζονταν ως 'junk DNA'. Τα τελευταία χρόνια όμως, η εκτενέστερη διερεύνηση των αλληλουχιών αυτών αποδείχτηκε εξαιρετικά σημαντική, αφού πλέον είναι γνωστό ότι τα ncRNAs συνιστούν καθοριστικό ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης και εμπλέκονται σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών. Ορισμένες από αυτές είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η αναδιάταξη της χρωματίνης καθώς και οι επιγενετικές τροποποιήσεις (Yang et al., 2016). Επιπρόσθετα, τα non-coding RNAs έχουν συσχετιστεί με την πολυπλοκότητα των οργανισμών, αφού, όπως παρατηρήθηκε, υπάρχει μία εμφανής τάση τα επίπεδα έκφρασης των ncRNAs να είναι υψηλότερα σε οργανισμούς με αυξημένη πολυπλοκότητα και πολλαπλά επίπεδα οργάνωσης.

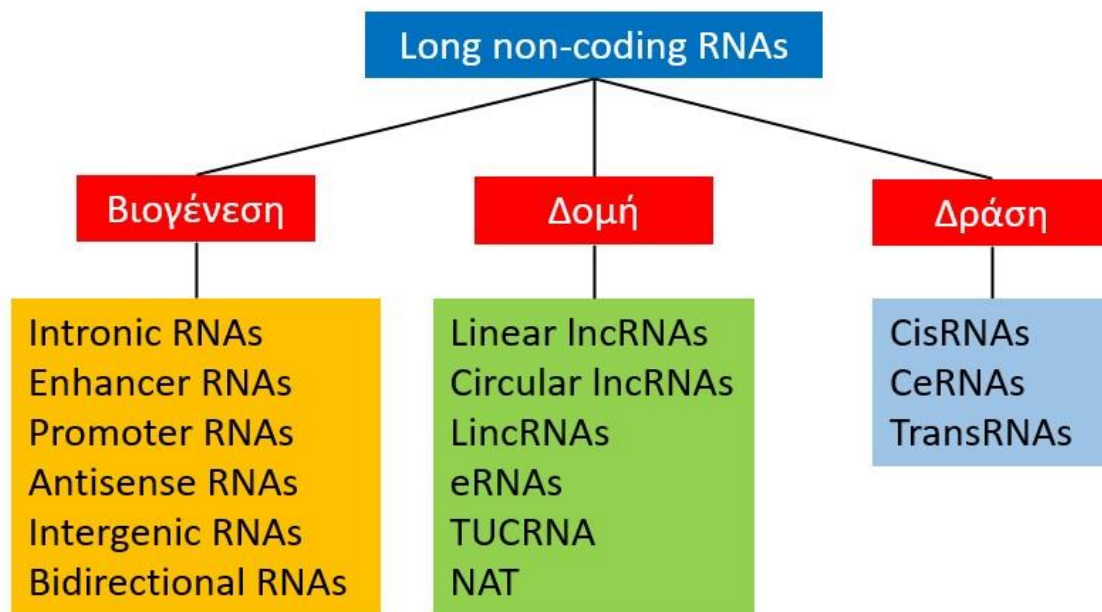
Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν, ότι τα ncRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών διαδικασιών μέσω πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών, με αποτέλεσμα οποιαδήποτε αλλαγή στην έκφρασή τους,

συχνά να διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και να συμβάλει στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων (Joshi & Rajender, 2020).

2.2. Τα long non-coding RNAs

Τα long non-coding RNAs (lncRNAs) είναι μόρια τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά την βιογένεση, την δομή και τον μηχανισμό δράσης τους. Αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία non-coding RNAs και τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Παρόλο που κάθε χρόνο νέες κατηγορίες, χαρακτηριστικά και λειτουργίες καταγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχει ακόμη μεγάλος όγκος δεδομένων που μένει να μελετηθεί (Beermann et al., 2016).

Λόγω της μεγάλης ετερογένειας των lncRNAs αλλά και των πολλών διαφορετικών κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες εμπλέκονται, η κατηγοριοποίησή τους καθίσταται αρκετά δύσκολη (Hombach & Kretz, 2016). Προτείνονται, βέβαια, αρκετοί τρόποι ταξινόμησης, όπως με βάση τη βιογένεση, τη δομή ή τη λειτουργία τους (Dahariya et al., 2019).



Εικόνα 6. Ταξινόμηση lncRNAs με βάση την βιογένεση, τη δομή και τον τρόπο δράσης τους (Dahariya et al., 2019).

Ωστόσο, το ευρέως αποδεκτό σύστημα στηρίζεται στη θέση των περιοχών από τις οποίες μεταγράφονται πάνω στο γονιδίωμα (Joshi & Rajender, 2020):

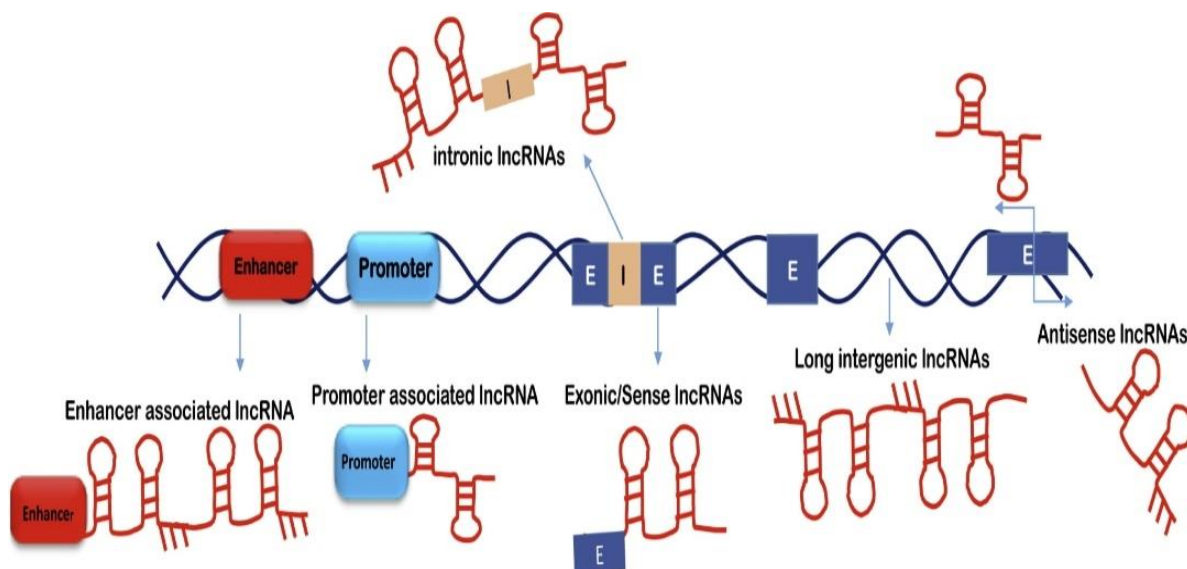
- **Intergenic lncRNAs (lincRNAs).** Προκύπτουν από περιοχές στο γονιδίωμα οι οποίες εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και μεταγράφονται ανεξάρτητα. Μερικά από αυτά είναι το *HOTAIR*, το *H19*, και το *MALAT1*.
- **Ιντρονικά (intronic) lncRNAs.** Τα μόρια αυτά αποτελούν προϊόν ιντρονίου ενός γονιδίου.
- **Sense lncRNAs.** Πρόκειται για μόρια που επικαλύπτονται με ένα ή περισσότερα εξόνια ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη (Beermann et al., 2016).
- **Antisense lncRNAs.** Προκύπτουν από τη μεταγραφή της αντινοσηματικής αλυσίδας και εμφανίζουν μερική ή πλήρη συμπληρωματικότητα με τα μετάγραφα της νοσηματικής αλυσίδας. Αποτελούν ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης μέσω αλληλεπίδρασης RNA-RNA. Το πιο γνωστό παράδειγμα αφορά τα μετάγραφα *Xist* και *Tsix*, η αλληλεπίδραση των οποίων είναι καθοριστική για την διαδικασία της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X.



Εικόνα 7. Οι κωδικές αλληλουχίες των *Xist* και *Tsix* στο χρωμόσωμα X. Τα μετάγραφα που παράγονται μπορούν να αλληλεπιδρούν και προκύπτουν από την μεταγραφή συμπληρωματικών αλυσίδων (Panning B, 2008).

- **Promoter-associated long RNAs.** Προκύπτουν από την μεταγραφή περιοχών που εντοπίζονται σε υποκινητές γονιδίων.
- **Enhancer RNAs (eRNAs).** Προκύπτουν από περιοχές ενισχυτών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Με βάση την κατεύθυνσή μεταγραφής τους διακρίνονται σε μονής και διπλής κατεύθυνσης (unidirectional, bidirectional) (Wu & Du, 2017).

- **Ψευδογονίδια.** Μεταξύ 2-20% των ψευδογονιδίων μεταγράφονται σε μόρια RNA τα οποία και ανήκουν σε αυτή την κατηγορία long non-coding RNAs. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα ψευδογονίδια μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων από τα οποία προέκυψαν μέσω της παραγωγής μη κωδικοποιητικών RNAs.



Εικόνα 8. Κατηγορίες ταξινόμησης lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα (Dahariya et al., 2019).

2.2.1. Βιογένεση των long non-coding RNAs

Η βιογένεση των long non-coding RNAs είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται στον πυρήνα και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες αλλά και διαφορές με τη σύνθεση των mRNAs. Τα περισσότερα lncRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNAP II) ενώ υπάρχουν και ορισμένα που πιθανόν μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III (RNAP III). Σε αντίθεση με τα mRNAs, η πλειοψηφία των ώριμων lncRNAs εντοπίζεται στον πυρήνα παρά στο κυτταρόπλασμα (Statello et al., 2021). Η βιογένεσή τους ρυθμίζεται από διάφορες επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς και από τη δράση εξειδικευμένων μεταγραφικών παραγόντων (Liu et al., 2021). Γενικότερα, τα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs είναι αρκετά χαμηλά, ωστόσο εμφανίζουν σημαντική εξειδίκευση έκφρασης ως προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και ιστούς.

Ακόμη, μετά τη μεταγραφή τους, πολλά lncRNAs υπόκεινται σε τροποποιήσεις όπως η πολυαδενυλίωση, η προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο και η τροποποίηση του RNA. Το

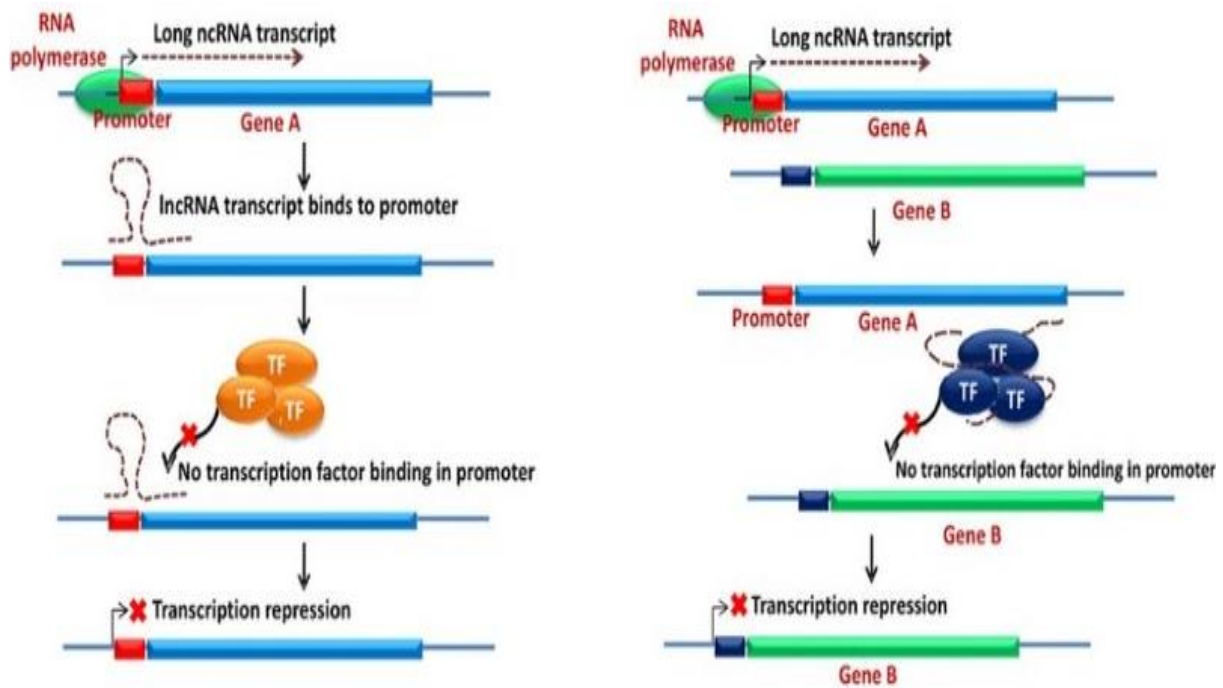
μεγαλύτερο ποσοστό των lncRNAs διαθέτει θέσεις ματίσματος που οδηγούν στη παραγωγή τουλάχιστον δύο διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων (Beermann et al., 2016).

Τέλος, μετά την επεξεργασία τους στον πυρήνα, τα περισσότερα lncRNAs απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα όπου λαμβάνουν την τελική τους διαμόρφωση σχηματίζοντας θερμοδυναμικά σταθερά μόρια (Statello et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, η δευτεροταγής δομή αφορά την αναδίπλωση στο χώρο και περιλαμβάνει το σχηματισμό δομών έλικας, φουρκέτας κ.ά. Η λειτουργικότητα των long non-coding RNAs καθορίζεται σε αρκετές περιπτώσεις από τις παραπάνω διαμορφώσεις, συνεπώς η δευτεροταγής δομή αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην βιογένεσή τους (Beermann et al., 2016).

2.2.2. Μηχανισμός δράσης των long non-coding RNAs

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα long non-coding RNAs είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και επιτελείται σε επίπεδο μεταγραφής, μετα-μεταγραφής και μετάφρασης (Joshi & Rajender, 2020). Η λειτουργικότητα των lncRNAs έγκειται σε μεγάλο βαθμό στην δυνατότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια RNA, DNA καθώς και πρωτεΐνες. Μέσω των αλληλεπιδράσεων αυτών επηρεάζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (Bridges et al., 2021).

Πιο συγκεκριμένα στον πυρήνα, σε επίπεδο μεταγραφής, τα lncRNAs μπορούν να δράσουν *in cis* μέσω της πρόσδεσής τους σε υποκινητές γονιδίων με συνέπεια την παρεμπόδιση της προσέγγισης από μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, η ρύθμιση από τα lncRNAs μπορεί να είναι *in trans* μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μεταγραφικούς παράγοντες εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση αυτών στους υποκινητές των γονιδίων (Kopp & Mendell, 2018). Εμπλέκονται, επίσης, σε μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης αφού μπορούν να στρατολογήσουν σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης τροποποιώντας την προσβασιμότητα του DNA (Dahariya et al., 2019).



Εικόνα 9. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα long non-coding RNAs μπορεί να είναι *in cis* (αριστερά) ή *in trans* (δεξιά) (Mukherjee et al., 2014).

Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, τα long non-coding RNAs μπορούν να επηρεάσουν την επεξεργασία άλλων μορίων RNA, όπως τα mRNAs, επιδρώντας στη διαδικασία του ματίσματος, τη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα, την αποικοδόμηση και τη μετάφρασή τους. Η ρύθμιση από τα lncRNAs δεν περιορίζεται μόνο στα κωδικοποιητικά RNAs, αφού σε πολλές περιπτώσεις εμποδίζουν με διάφορους μηχανισμούς την δράση των miRNAs ή προσδένονται ανταγωνιστικά στους στόχους τους (Joshi & Rajender, 2020). Ο ρυθμιστικός ρόλος των long non-coding RNAs αφορά τόσο την αναστολή όσο και την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης.

Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας πληθώρας μηχανισμών με βάση τους οποίους μπορούν να διακριθούν (Liu et al., 2021):

- **Σηματοδοτικά (Signal) lncRNAs.** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα lncRNAs που λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και η έκφρασή τους έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών. Για παράδειγμα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του μετάγραφου Xist εντοπίζονται πάντοτε κατά τη διαδικασία της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X στα θηλυκά άτομα.
- **lncRNAs – «δολώματα» (Decoy lncRNAs).** Τα συγκεκριμένα lncRNAs προσδένονται σε μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση ή την

καταστολή της έκφρασης των γονιδίων – στόχων τους. Μπορούν επίσης να αλληλεπιδρούν με miRNAs και mRNAs παρεμποδίζοντας την δράση τους ή επάγοντας την αποικοδόμησή τους.

- **LncRNAs – «οδηγοί» (Guide lncRNAs).** Τα lncRNAs αυτής της κατηγορίας δημιουργούν σύμπλοκα με συγκεκριμένες πρωτεΐνες και κατευθύνονται προς περιοχές – στόχους του γονιδιώματος όπου πραγματοποιείται ρύθμιση της έκφρασης. Στόχο μπορεί να αποτελούν κοντινά γονίδια (cis ρύθμιση) ή αρκετά απομακρυσμένα γονίδια (trans ρύθμιση).
- **LncRNAs – «σκαλωσιές» (Scaffold lncRNAs).** Τα εν λόγω lncRNAs δρουν σαν «μόρια – σκαλωσιές» προσελκύοντας δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται μπορεί να ρυθμίζουν την ενεργότητα της RNAP II καθώς και να προκαλούν αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ή τροποποιήσεις ιστονών.

2.3. Τα microRNAs

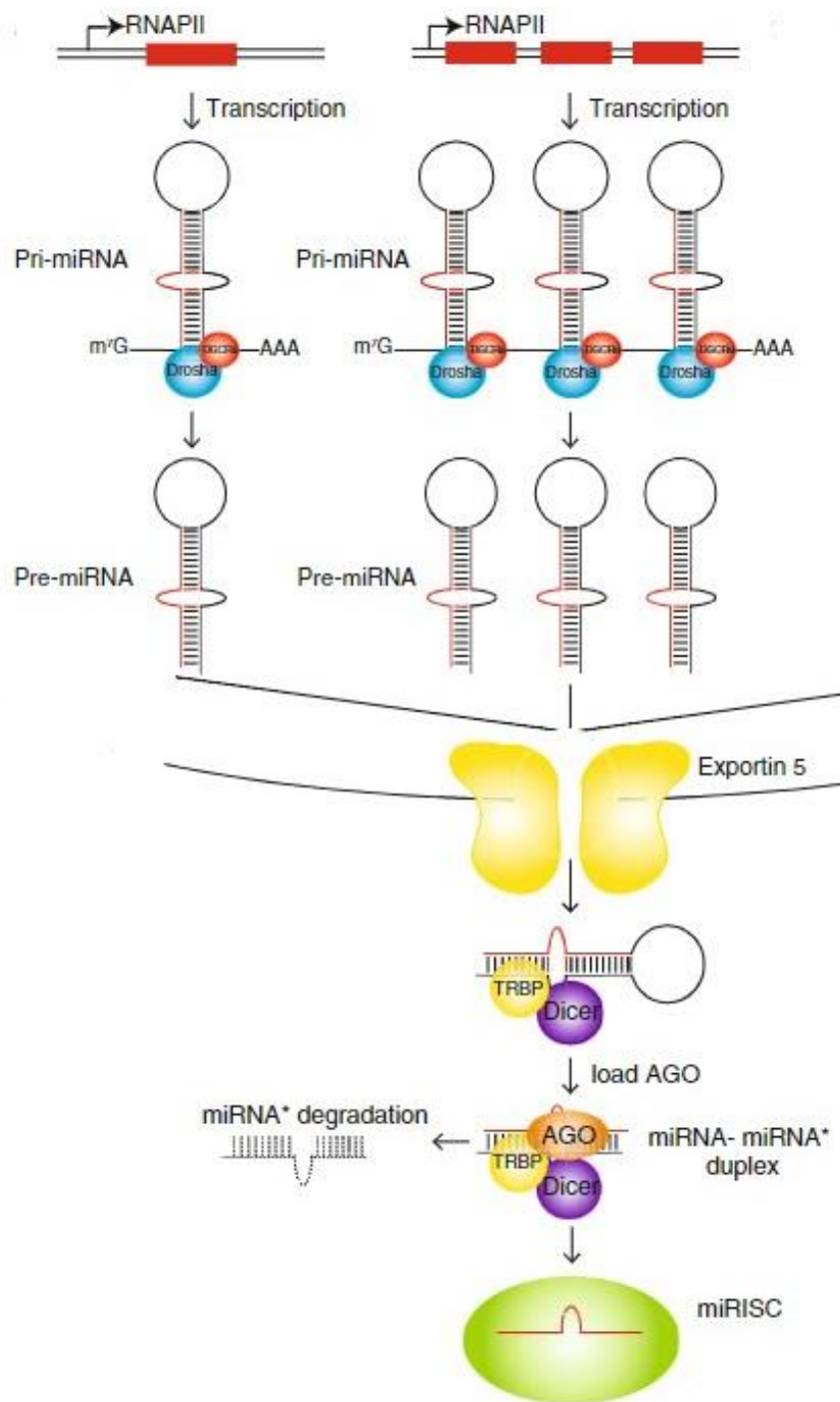
Τα microRNAs (ή miRNAs) αποτελούν την εκτενέστερα μελετημένη υποκατηγορία των μη κωδικοποιητικών RNAs. Πρόκειται για μόρια μήκους 18-22 νουκλεοτιδίων που εκφράζονται ενδογενώς και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Kabekkodu et al., 2018). Το πρώτο miRNA που ανακαλύφθηκε ήταν το lin-4 στον *C.elegans*, το οποίο προσδένεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του γονιδίου *LIN-14* οδηγώντας στην αποικοδόμησή του. Ακολούθησε η ανακάλυψη του let-7, το οποίο συμμετέχει, όπως και το lin-4, στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων υπεύθυνων για αναπτυξιακές διαδικασίες στον *C.elegans*. Βέβαια, διαπιστώθηκε ότι το let-7, σε αντίθεση με το lin-4, δεν εκφράζεται αποκλειστικά στον *C.elegans* αλλά εμφανίζει υψηλά ποσοστά συντήρησης και σε άλλους οργανισμούς. Οι ανακαλύψεις αυτές οδήγησαν στην περαιτέρω μελέτη των miRNAs, τα οποία, όπως αποδείχθηκε, εντοπίζονται σε μια πληθώρα οργανισμών και ειδών διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες (Yang et al., 2016).

2.3.1. Βιογένεση των microRNAs

Οι κωδικοποιητικές αλληλουχίες των miRNAs βρίσκονται διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα και συχνά εντοπίζονται σε ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Σπανιότερα τα miRNAs αποτελούν προϊόντα εξωνίων. Μπορούν επίσης να προκύψουν από περιοχές οι οποίες εντοπίζονται μεταξύ γονιδίων (intergenic). Περίπου το 25% των γονιδίων miRNAs στον άνθρωπο βρίσκονται ομαδοποιημένα στο γονιδίωμα και μεταγράφονται ταυτόχρονα ενώ άλλα αποτελούν ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες (Kabekkodu et al., 2018).

Η βιογένεση των miRNAs είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια καθώς, μετά τη μεταγραφή, απαιτείται η ωρίμανση στον πυρήνα, η εξαγωγή στο κυτταρόπλασμα και η περεταίρω επεξεργασία τους προκειμένου να καταστούν λειτουργικά.

Η πλειοψηφία των miRNAs μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II ενώ ένας μικρός αριθμός μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση III (Beermann et al., 2016). Με αυτό τον τρόπο παράγονται τα pri-miRNAs (primary miRNAs) τα οποία σχηματίζουν μια χαρακτηριστική δομή φουρκέτας. Η αλληλουχία του ώριμου miRNA βρίσκεται στο βρόγχο ενώ τα προεξέχοντα άκρα διαθέτουν 5' καλύπτρα και 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά. Όσο το πρόδρομο αυτό μόριο βρίσκεται ακόμα στον πυρήνα, αλληλεπιδράει με ένα πυρηνικό σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από την Drosha (RNάση τύπου III – ενδονουκλεάση) και την πρωτεΐνη DGCR8. Πιο συγκεκριμένα, η DGCR8 αναγνωρίζει και προσδένεται στο pri-miRNA και ακολουθεί η πέψη του από τη Drosha. Προκύπτει έτσι το pre-miRNA που διατηρεί τη δομή φουρκέτας και αποτελείται από 60 έως 80 νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου υφίσταται περεταίρω επεξεργασία από την Dicer (RNάση τύπου III – ενδονουκλεάση). Η Dicer πραγματοποιεί εκ νέου πέψη απομακρύνοντας τον τερματικό βρόγχο και έτσι προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο RNA, περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Τελικά, το δίκλωνο αυτό μόριο συνδέεται με μια πρωτεΐνη Αργοναύτη (AGO) η οποία προκαλεί την αποδιάταξή του. Ο ένας κλώνος αποικοδομείται ενώ αυτός που αποτελεί το ώριμο miRNA (guide) παραμένει στο σύμπλοκο το οποίο ονομάζεται miRISC. Βέβαια, εκτός από το συγκεκριμένο μονοπάτι βιογένεσης, ορισμένα miRNAs μπορούν να προκύψουν και από άλλα μονοπάτια (Yang et al., 2016).



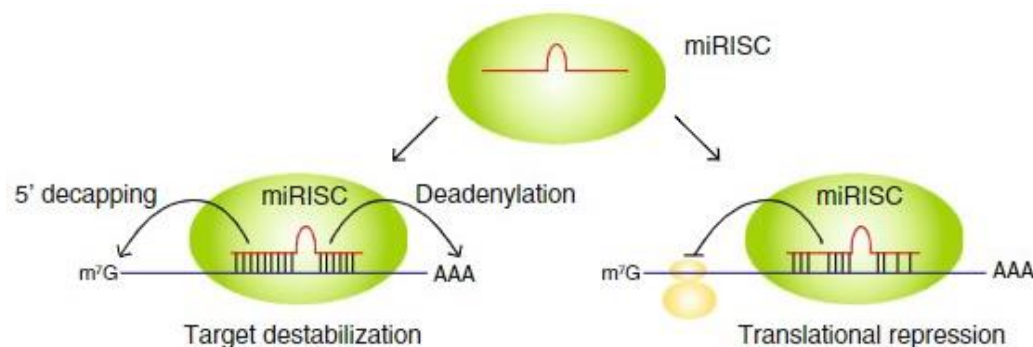
Εικόνα 10. Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν για miRNAs βρίσκονται ομαδοποιημένα στο γονιδίωμα και μεταγράφονται ταυτόχρονα (δεξιά) ενώ άλλα αποτελούν ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες (αριστερά). Μετά την μεταγραφή από την RNAP II προκύπτουν τα pri-miRNAs τα οποία μετατρέπονται σε pre-miRNAs από την Drosha. Στη συνέχεια μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της Εξπορτίνης 5 όπου με την δράση της Dicer σχηματίζονται δίκλινα μόρια (guide miRNA – miRNA*). Η πρόσδεση μιας πρωτεΐνης Αργοναυτή (AGO) προκαλεί την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων και το miRNA* αποικοδομείται ενώ το συμπληρωματικό του, το οποίο είναι το ώριμο miRNA, παραμένει στο σύμπλοκο που ονομάζεται miRISC (Yang et al., 2016).

2.3.2. Μηχανισμός δράσης των microRNAs

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα miRNAs πραγματοποιείται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω των μηχανισμών αναστολής της μετάφρασης και αποικοδόμησης των mRNA-στόχων τους. Η λειτουργικότητα των miRNAs καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται σε ειδικές περιοχές των mRNAs. Φυσικά, η εξειδικευμένη αυτή αλληλεπίδραση προϋποθέτει την συμπληρωματικότητα μεταξύ αλληλουχιών του miRNA και του mRNA. Πιο συγκεκριμένα, τα νουκλεοτίδια 2–8 του miRNA (αλληλουχία εκβλάστησης – seed sequence) εμφανίζουν, στις περισσότερες περιπτώσεις, συμπληρωματικότητα με τμήμα της 3' αμετάφραστης περιοχής (3' UTR) του mRNA-στόχου.

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης, αρχικά, τα miRNAs επιστρατεύουν τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος RISC και με τη βοήθειά τους προσεγγίζουν την συμπληρωματική τους αλληλουχία πάνω στο mRNA. Αφού πραγματοποιηθεί η πρόσδεση, οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του miRISC και του mRNA οδηγούν τελικώς στην γονιδιακή καταστολή.

Αναλυτικότερα, οι πρωτεΐνες Αργοναύτες αλληλεπιδρούν με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες προκαλώντας την αναστολή της μετάφρασης στο στάδιο της έναρξης ή της επιμήκυνσης (Yang et al., 2016). Οι παράγοντες αυτοί είναι καθοριστικοί για σημαντικές διαδικασίες όπως η στρατολόγηση των ριβοσωμικών υπομονάδων, η έναρξη της μετάφρασης και η αποσυναρμολόγηση της μεταφραστικής «μηχανής». Εναλλακτικά, η δράση του miRISC μπορεί να προκαλέσει αφαίρεση της 5' καλύπτρας ή αποαδενυλίωση του 3' άκρου. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται η σταθερότητα του mRNA ενώ ταυτόχρονα έλκονται ένζυμα με ενδονουκλεολυτική και εξονουκλεολυτική δράση που οδηγούν στην αποικοδόμησή του. (Beermann et al., 2016)



Εικόνα 11. Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο κυρίως μέσω αναστολής της μετάφρασης ή αποικοδόμησης των mRNA-στόχων τους (Yang et al., 2016).

2.4. Τα non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα

Όπως προαναφέρθηκε, η ανδρική γονιμότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη πολύπλοκη διαδικασία της σπερματογένεσης, η οποία περιλαμβάνει πολλά αυστηρώς ρυθμιζόμενα στάδια (Darren J Katz et al., 2017). Η γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης ρυθμίζεται σε σημαντικό ποσοστό από τα μη κωδικοποιητικά RNAs ενώ αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ότι πολλές κατηγορίες ncRNAs εκφράζονται στα γαμετικά κύτταρα. Η ομαλή παραγωγή και μεταφορά του σπέρματος προϋποθέτει τόσο την παρουσία όσο και την ορθή λειτουργία αυτών των μορίων στους αρσενικούς γαμέτες (Aliakbari et al., 2021). Αναπόφευκτα λοιπόν, οποιαδήποτε απορρύθμιση στα επίπεδα έκφρασής τους ενδέχεται να οδηγήσει σε προβλήματα γονιμότητας. Η εκτενέστερη μελέτη των προτύπων έκφρασης των non-coding RNAs σε υγιείς και υπογόνιμους άνδρες μπορεί να συμβάλει στον ακριβέστερο προσδιορισμό των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά την σπερματογένεση και επιπλέον να οδηγήσει στην ανακάλυψη καινούριων βιοδεικτών για τη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας (Zhou et al., 2022).

2.4.1. Τα small non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα

Ο ρόλος των non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα αναδείχθηκε για πρώτη φορά με τη βοήθεια μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια. Οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι η απενεργοποίηση (knock-out) της Dicer, η οποία είναι απαραίτητη για τη βιογένεση των miRNAs, οδηγούσε σε φαινότυπο υπογονιμότητας. Έπειτα από περαιτέρω έρευνες αποδείχθηκε ότι η λειτουργικότητα της Dicer είναι αναγκαία προϋπόθεση για τη διαφοροποίηση των σπερματίδων καθώς και για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων Sertoli (Vashisht & Gahlay, 2020).

Ακολούθησαν αρκετές ακόμα μελέτες τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους ο οποίες αποκάλυψαν τον κομβικό ρόλο των miRNAs σε όλα τα στάδια της σπερματογένεσης. Μεγαλύτερη έμφαση έχει δοθεί στο miR-34bc το οποίο συνεισφέρει σημαντικά στη σωστή ρύθμιση της απόπτωσης των γαμετικών κυττάρων. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, knock-out ποντίκια είχαν μειωμένο αριθμό και μη φυσιολογική μορφολογία σπερματοζωαρίων.

Ένα ακόμη miRNA που έχει μελετηθεί αρκετά είναι το miR-17-92 το οποίο τροποποιεί τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων γονιδίων (*BIM*, *KIT*, *SOCS3*, *STAT3*) μέσω της επίδρασής του στα αντίστοιχα mRNAs. Πιο συγκεκριμένα, απουσία του miR-17-92 τα mRNA των παραπάνω γονιδίων δεν υπόκεινται σε έλεγχο της έκφρασής τους και υπερεκφράζονται. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η πρόοδος της σπερματογένεσης και τα σπερματογόνια παραμένουν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση (Vashisht & Gahlay, 2020).

Άλλα miRNAs τα οποία έχουν επίσης αποδειχθεί σημαντικά για τις διαδικασίες της σπερματογένεσης είναι τα miR-469, miR-146a, miR-20, miR-106a κ.ά. (Barbu et al., 2021).

Ειδικότερα, το miR-469 καταστέλλει τη μετάφραση των πρωτεϊνών TP2 (Nuclear transition protein 2) και PRM2 (Protamine 2) οι οποίες εκφράζονται φυσιολογικά στις σπερματίδες και είναι απαραίτητες για την ωρίμανση του σπέρματος και την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης. Αναπόφευκτα, η αυξημένη έκφραση του miR-469 συνεπάγεται την αναστολή της έκφρασης των TP2 και PRM2 και οδηγεί σε αζωοσπερμία (Vashisht & Gahlay, 2020).

Μία ακόμα κατηγορία μορίων small non-coding RNAs που έχουν εντοπισμένο ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης είναι τα piRNAs τα οποία αποτελούνται από 24-30 νουκλεοτίδια και εντοπίζονται, μεταξύ άλλων, στους όρχεις και τα σπερματοκύτταρα. Τα συγκεκριμένα μόρια επιτελούν τα λειτουργικά τους καθήκοντα αφού πρώτα σχηματίσουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες PIWI στο κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα, πολλές μελέτες αναφέρουν πως ένας από τους βασικότερους ρόλους των piRNAs είναι η προστασία των γαμετικών κυττάρων από τη δράση των μεταθετών στοιχείων (Aliakbari et al., 2021). Τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν συστατικά του γονιδιώματος και έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται από μια περιοχή του σε μια άλλη όπου ενσωματώνονται και αντιγράφονται. Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης τα μεταθετά στοιχεία ενεργοποιούνται και μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στη δομή της γενετικής πληροφορίας. Οι αλλαγές αυτές ενδέχεται να οδηγήσουν σε απόπτωση των γαμετικών κυττάρων προκαλώντας τελικά υπογονιμότητα. Η καταστολή λοιπόν των μεταθετών στοιχείων κρίνεται αναγκαία και επιτυγχάνεται με τη συμβολή των piRNAs, τα οποία εξασφαλίζουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και εμποδίζουν τη μεταβίβαση μεταλλάξεων στους απογόνους (Mukherjee et al., 2014).

2.4.2. Τα long non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα

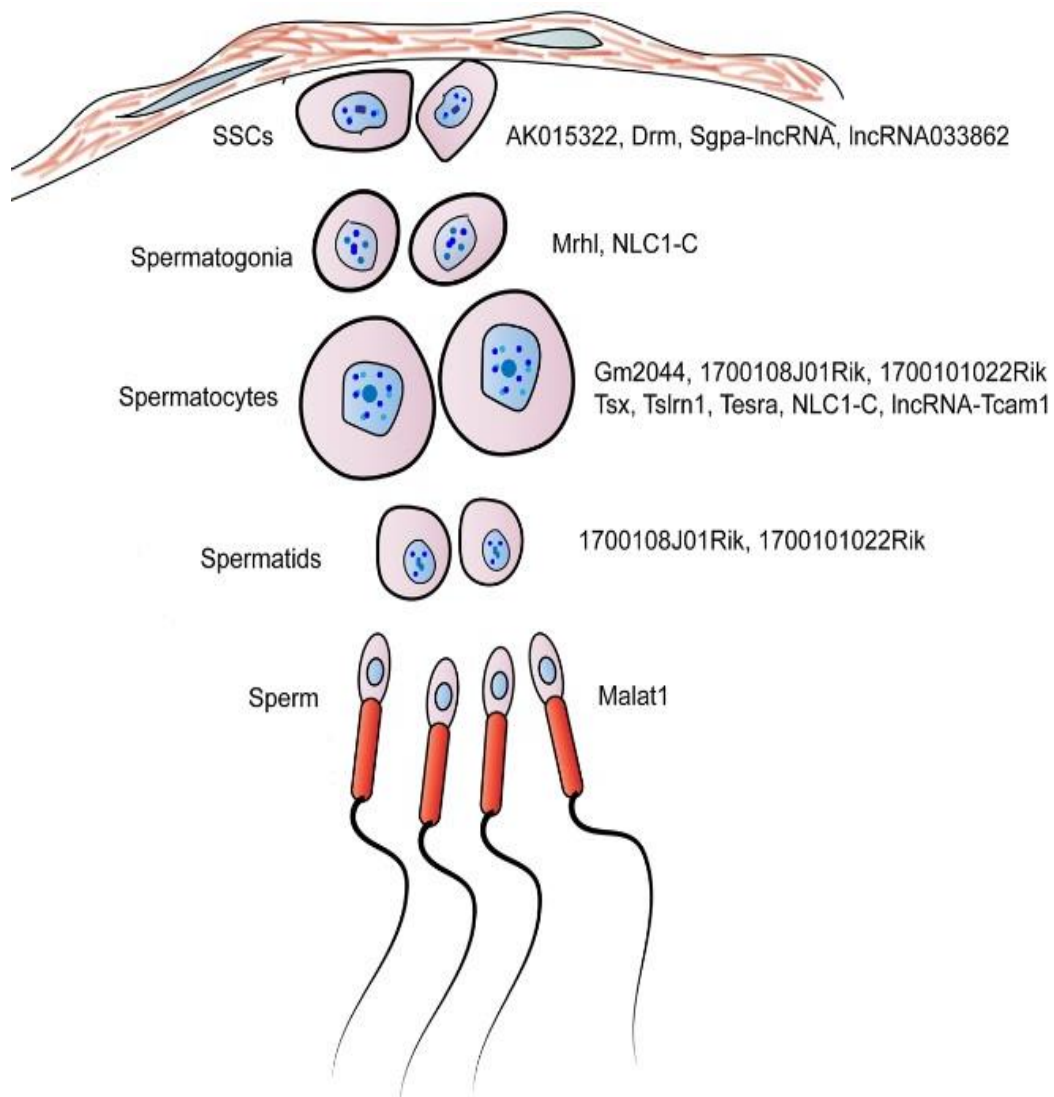
Τα τελευταία χρόνια, οι μελέτες όσον αφορά το ρόλο των long non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα αυξάνονται συνεχώς ενώ η χρήση νέων τεχνολογιών, όπως η αλληλούχηση RNA (RNAseq), έχει συμβάλει στην ακριβέστερη διευκρίνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνισή της (Aliakbari et al., 2021). Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί η έκφραση μίας πληθώρας μορίων lncRNAs τόσο σε γαμέτες ποντικών όσο και σε όρχεις ενήλικων ανθρώπων. Πιθανολογείται ότι τα μόρια αυτά συμμετέχουν στη διαδικασία της σπερματογένεσης, μέσω της επίδρασής τους στην επιγενετική κατάσταση των γαμετικών κυττάρων, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσής τους (Mukherjee et al., 2014). Υπάρχουν επίσης μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα lncRNAs επηρεάζουν διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες είναι σημαντικές για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων καθώς και για την ικανότητά τους να γονιμοποιούν το ωάριο. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των περισσότερων μορίων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως και απαιτούνται περισσότερες έρευνες (Aliakbari et al., 2021).

Μεταξύ των πολλών αναγνωρισμένων μορίων lncRNAs στα αρσενικά γαμετικά κύτταρα έχουν εντοπιστεί και ορισμένα τα οποία εμφανίζουν διαφορική έκφραση ανάμεσα σε υγιείς και υπογονίμους άνδρες και ενδεχομένως να διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην εμφάνιση της υπογονιμότητας. Το NLC1-C (Narcolepsy candidate-region 1 gene) είναι ένα lncRNA που εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των σπερματογονίων και των σπερματοκυττάρων του ανθρώπου και σχετίζεται με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Μελέτες με μικροσυστοιχίες (Microarray analysis) έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του NLC1-C ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε υπογονίμους άνδρες με μη ολοκληρωμένη σπερματογένεση (maturation arrest – MA) συγκριτικά με εκείνους που εμφάνιζαν φυσιολογική σπερματογένεση.

Επιπλέον, μέσα από μια πληθώρα μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια ξεχωρίζουν αρκετά lncRNAs που είναι σημαντικά για την σπερματογένεση και είναι πιθανό να έχουν παρεμφερή ρόλο στη σπερματογένεση του ανθρώπου. Ένα από αυτά είναι το Drm (Dmrt1-related gene) το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά στους όρχεις και μπορεί να αλληλεπιδράσει με διάφορες πρωτεΐνες ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των σπερματογονίων.

Ένα ακόμη μελετημένο lncRNA είναι το Tug1 το οποίο εκφράζεται σε εμβρυϊκούς και ενήλικους ιστούς τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν, knock-out ποντίκια (Tug1^{-/-}) εμφάνιζαν σημαντικά μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων καθώς και μορφολογικές ανωμαλίες στην κεφαλή και το μέσο τμήμα του σπερματοζωαρίου. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο του Tug1 στην ανδρική γονιμότητα ενώ επακόλουθες μελέτες αποκάλυψαν περισσότερες λειτουργίες του συγκεκριμένου μορίου όπως είναι η διατήρηση του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων.

Άλλα lncRNAs που έχουν επίσης αναγνωρισθεί για τη συμμετοχή τους στα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης είναι τα Tsx (Testis-specific X-linked), Tesra, AK015322, Gm2044, Malat1 κ.ά. Απαιτούνται βέβαια περισσότερες και πιο εξειδικευμένες μελέτες προκειμένου να επιβεβαιωθεί η κρισιμότητα του ρόλου τους στην εμφάνιση προβλημάτων υπογονιμότητας. (Joshi & Rajender, 2020)



Εικόνα 12. Τα long non-coding RNAs που έχουν εντοπιστεί στα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης. Όπως απεικονίζεται, η διαδικασία ξεκινά από τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα (Spermatogonial stem cells – SSCs) που πολλαπλασιάζονται μιτωτικά. Μερικά από αυτά παραμένουν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση ως πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, ενώ άλλα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια. Τα σπερματογόνια ύστερα από μια μειωτική διαίρεση δίνουν τα σπερματοκύτταρα, τα οποία διαιρούνται εκ νέου μειωτικά δίνοντας τις σπερματίδες. Ακολουθεί η διαδικασία της σπερμιόγνεσης που περιλαμβάνει την μετατροπή των σπερματίδων σε ώριμα σπερματοζωάρια και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση της διαδικασίας της σπερματογένεσης. LncRNAs ρυθμίζουν πολλά από τα παραπάνω στάδια της σπερματογένεσης (Joshi & Rajender, 2020).

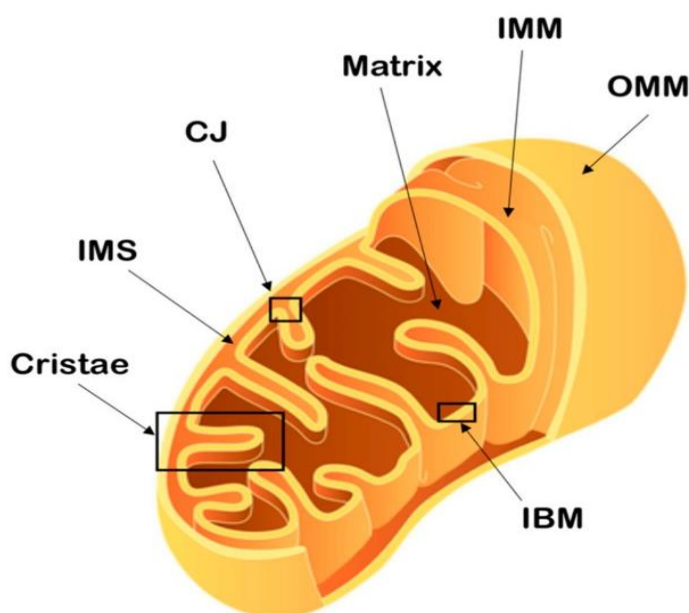
Κεφάλαιο 3^ο | Μιτοχόνδρια

3.1. Δομή μιτοχονδρίων

Σύμφωνα με ορισμένες θεωρίες, τα μιτοχόνδρια αποτελούν εξελικτικά προϊόντα της ενδοσυμβίωσης που πραγματοποιήθηκε πριν περίπου δύο δισεκατομμύρια χρόνια μεταξύ ενός α – πρωτεοβακτηρίου και ενός αρχέγονου ευκαρυωτικού κυττάρου. Με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα, τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπου ενώ ο αριθμός τους ανά κύτταρο κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες έως και χιλιάδες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις ενεργειακές του ανάγκες (Protasoni & Zeviani, 2021).

Όσον αφορά τη μορφολογία τους, τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικές δομές οι οποίες χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα. Το σχήμα ενός μιτοχονδρίου είναι συνήθως κυλινδρικό ή ωοειδές ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, τις συνθήκες και τις ανάγκες του (Iovine et al., 2021).

Αναφορικά με τη δομή τους, τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από δύο βασικές μεμβράνες, την εξωτερική (outer mitochondrial membrane – OMM), η οποία το διαχωρίζει από το κυτταρόπλασμα και την εσωτερική (inner mitochondrial membrane – IMM) η οποία σχηματίζει τις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (cristae).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μιτοχονδρίου. Όπως απεικονίζεται, το μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο βασικές μεμβράνες, την εξωτερική (OMM) και την εσωτερική (IMM). Μεταξύ τους εντοπίζεται ο διαμεμβρανικός χώρος (IMS) ενώ στο εσωτερικό της δομής βρίσκεται η μήτρα (matrix). Σε πολλά σημεία η IMM αναδιπλώνεται σχηματίζοντας τις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (cristae) ενώ σε άλλα παραμένει περιφερειακά και κοντά

στην εξωτερική μεμβράνη (inner boundary membrane – IBM). Οι ακρολοφίες και η IBM συνδέονται με ειδικές δομές που ονομάζονται ακρολοφικοί σύνδεσμοι (cristae junctions) (Protasoni & Zeviani, 2021).

Η περιοχή που εντοπίζεται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες ονομάζεται διαμεμβρανικό διάστημα (intermembrane space – IMS) και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μεταξύ τους σηματοδότηση και επικοινωνία. Τέλος, ο χώρος που περιβάλλει η εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται στρώμα ή μήτρα (matrix) όπου εντοπίζονται ριβοσώματα, διάφορα ένζυμα κ.ά.

Οι δυο μεμβράνες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο σχήμα και τη σύστασή τους. Πιο συγκεκριμένα, το μεγαλύτερο ποσοστό των φωσφολιπιδίων της εσωτερικής μεμβράνης αποτελείται από την καρδιολιπίνη η οποία είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας. Ταυτόχρονα, οι εσωτερικές αναδιπλώσεις της IMM σε συνδυασμό με την πλούσια πρωτεϊνική της σύσταση συμβάλλουν στην επιτέλεση διαφόρων διεργασιών όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Μία ακόμα διαφορά των δύο μεμβρανών άπτεται στη διαπερατότητα τους σε διάφορα μόρια. Ειδικότερα, η εξωτερική μεμβράνη μέσω εξειδικευμένων πρωτεϊνών που ονομάζονται πορίνες (voltage-dependent anion channels – VDACs) καθίσταται διαπερατή στα περισσότερα μικρά μόρια και ιόντα. Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη χαρακτηρίζεται από επιλεκτικότητα καθώς επιτρέπει σε ορισμένα μόνο μόρια, όπως το νερό, το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα να μεταφερθούν διαμέσου αυτής. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης εκατέρωθεν της μεμβράνης η οποία είναι απαραίτητη για τις διαδικασίες παραγωγής της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate – ATP) καθώς και για την ακριβή ρύθμιση των συγκεντρώσεων ιόντων που συμμετέχουν στη κυτταρική σηματοδότηση, όπως το ασβέστιο.

Τέλος, τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια αφού διαθέτουν δικό τους DNA (mtDNA) το οποίο είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο και αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων. Κάθε κύτταρο περιέχει από εκατό έως και δέκα χιλιάδες αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA τα οποία εντοπίζονται στο στρώμα των μιτοχονδρίων ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το mtDNA διαθέτει τον δικό του γενετικό κώδικα, ελαφρώς διαφοροποιημένο από εκείνον του πυρηνικού DNA. Επίσης, το mtDNA περιέχει συνολικά τριάντα επτά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για έντεκα mRNAs (μεταφράζονται σε δεκατρείς πρωτεΐνες), δύο ριβοσωμικά RNAs (12S και 16S rRNA) και είκοσι δύο μεταφορικά RNAs (tRNAs) (Protasoni & Zeviani, 2021).

3.2. Λειτουργίες μιτοχονδρίων

Η ευέλικτη δομή των μιτοχονδρίων υπαγορεύει τον καθοριστικό τους ρόλο στην διεξαγωγή πολύπλοκων διαδικασιών που είναι σημαντικές για την επιβίωση του κυττάρου. Η σπουδαιότητά τους έγκειται πρωτίστως στη συνεισφορά τους στην παραγωγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό εξάλλου χαρακτηρίζονται ως «ενεργειακά κέντρα» του κυττάρου. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή τους σε επιπλέον διαδικασίες, όπως η απόπτωση, η σηματοδότηση του ασβεστίου, η σύνθεση της αίμης κ.ά. (Protasoni & Zeviani, 2021)

▪ Παραγωγή ενέργειας

Η τριφωσφορική αδενοσίνη ή ATP αποτελεί το «ενεργειακό νόμισμα» του κυττάρου αφού με την υδρόλυση του μορίου της (αποφωσφορλίωση) απελευθερώνεται ένα μεγάλο ποσό ενέργειας το οποίο είναι εξαιρετικά χρήσιμο για τις βιολογικές δραστηριότητες των οργανισμών. Συνεπώς, για τη διατήρηση της ζωής, η ATP πρέπει συνεχώς να επανασχηματίζεται. Τα ετερότροφα κύτταρα, και κατ' επέκταση οι οργανισμοί όπως και ο άνθρωπος, επιτυγχάνουν αυτόν το σκοπό μέσω της κυτταρικής αναπνοής κατά την οποία η χημική ενέργεια των μακρομορίων της τροφής μετατρέπεται σε βιολογικά εύχρηστη μορφή που αποθηκεύεται στο μόριο της ATP. Η κυτταρική αναπνοή περιλαμβάνει μία σειρά διαδοχικών μοριακών διεργασιών και μπορεί να χωριστεί σε τρία βασικά στάδια: τη γλυκόλυση, τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την οξειδωτική φωσφορλίωση.

Αφετηρία για την κυτταρική αναπνοή αποτελεί η γλυκόλυση η οποία είναι μία αναερόβια διαδικασία διάσπασης της γλυκόζης και πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Στο στάδιο αυτό, κάθε μόριο γλυκόζης μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος ενώ το κέρδος του κυττάρου ενεργειακά ανέρχεται σε δύο μόρια ATP. Στη συνέχεια, κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος που έχει παραχθεί μεταφέρεται στο μιτοχονδριακό στρώμα όπου έπειτα από μία σειρά αντιδράσεων μετατρέπεται σε ακετύλο-συνένζυμο Α (Acetyl-CoA), το οποίο αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια υπό αερόβιες συνθήκες και αποτελείται από εννέα διακριτές ενζυμικές αντιδράσεις. Με την ολοκλήρωση κάθε κύκλου παράγονται δύο μόρια διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), τρία μόρια NADH (nicotinamide adenine dinucleotide), ένα μόριο FADH_2 (flavine adenine dinucleotide) και ένα μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης (GTP) το οποίο παρέχει ενέργεια για την φωσφορλίωση ενός μορίου διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) προς παραγωγή ενός μορίου ATP.

Ακολούθως, τα μόρια NADH και FADH_2 χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορλίωσης (oxidative phosphorylation – OXPHOS) μέσω της οποίας το κύτταρο πλέον

μπορεί να παράγει μεγάλα ποσά ATP. Στο στάδιο αυτό, τα NADH και FADH₂ μεταβιβάζουν τα ηλεκτρόνιά τους στον τελικό παραλήπτη, που είναι το οξυγόνο, μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων που συγκροτούν την αναπνευστική αλυσίδα. Η ροή των ηλεκτρονίων μέσα από τους διάφορους μεταφορείς δημιουργεί μια βαθμίδωση πρωτονίων (H⁺) στις δύο πλευρές της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Στο τελευταίο βήμα της αναπνευστικής αλυσίδας το οξυγόνο ανάγεται σε νερό ενώ η προκύπτουσα βαθμίδωση επάγει ηλεκτροχημικά την προώθηση των H⁺ πίσω στο στρώμα μέσω της εσωτερικής μεμβράνης. Η μεταφορά αυτή επιτυγχάνεται μέσω της συνθετάσης του ATP (ή σύμπλοκο V) η οποία χρησιμοποιεί την ενέργεια από την ροή των H⁺ για να συνθέσει ATP στο στρώμα χρησιμοποιώντας ADP και μία ελεύθερη φωσφορική ομάδα (Pi). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η σύνθεση της ATP είναι συζευγμένες διαδικασίες και το κύτταρο χρησιμοποιώντας ένα μόριο γλυκόζης παράγει συνολικά τριάντα μόρια ATP. Τα μόρια NADH και FADH₂ μπορούν επίσης να παραχθούν από την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (Protasoni & Zeviani, 2021).

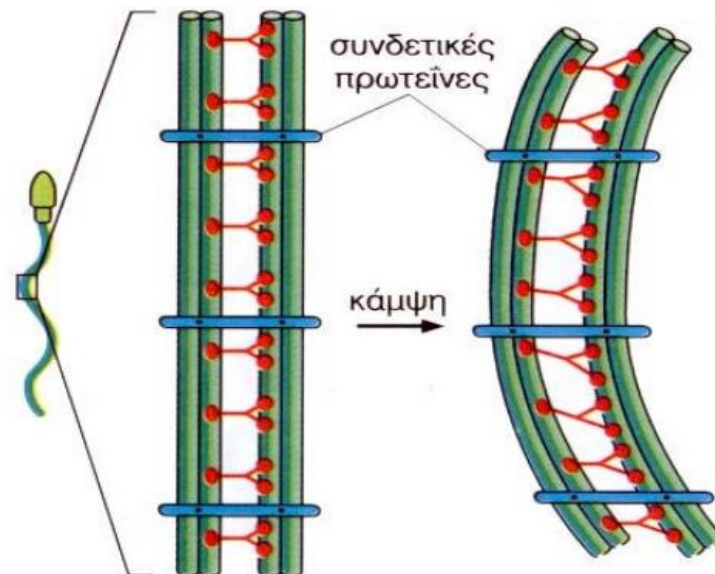
▪ Απόπτωση

Τα μιτοχόνδρια έχουν αναγνωρισμένο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, δηλαδή της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση μπορεί να προκαλείται από εξωτερικά σήματα που προσδένονται σε υποδοχείς κυτταρικού θανάτου της πλασματικής μεμβράνης (εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης) ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να επάγεται ως απόκριση σε βλάβες του DNA ή στρεσογόνους παράγοντες, -όπως το οξειδωτικό στρες, η στέρηση αυξητικών παραγόντων, ορμονών ή κυτοκινών κ.ά. (ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι απόπτωσης). Κατά το ενδογενές μονοπάτι τα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c, το οποίο συνδέεται με την πρωτεΐνη Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) και την προ-κασπάση 9 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που ονομάζεται «αποπτώσωμα». Το σύμπλοκο αυτό σηματοδοτεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων από διάφορες κασπάσες (πρωτεάσες) που τελικώς οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, αξιοσημείωτος είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 (B-cell lymphoma 2) οι οποίες ρυθμίζουν το παραπάνω μονοπάτι προωθώντας ή εμποδίζοντας τον κυτταρικό θάνατο (Protasoni & Zeviani, 2021).

3.3. Τα μιτοχόνδρια στην ανδρική υπογονιμότητα

Στα θηλαστικά, ένα ώριμο σπερματοζωάριο διαθέτει περίπου ογδόντα μιτοχόνδρια τα οποία βρίσκονται αποκλειστικά στο μεσαίο τμήμα (ή αυχένα), τοποθετημένα περιφερειακά γύρω από το σύστημα μικροσωληνίσκων στο αξονικό νημάτιο (Dayem Ullah et al., 2018). Με την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης, τα ώριμα σπερματοζωάρια περιέχουν λιγότερα αλλά

μεταβολικά ενεργότερα μιτοχόνδρια από ότι τα σπερματογόνια και τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Τα μιτοχόνδρια αυτά εμφανίζουν σημαντικά διαφοροποιημένα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων στη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων (Vertika et al., 2020). Η ATP που παράγεται από τα μιτοχόνδρια στο μεσαίο τμήμα καταναλώνεται κυρίως στην ουρά από ειδικές πρωτεΐνες (ΑΤΡάσες) που ονομάζονται δυνεΐνες και είναι απαραίτητες για την κίνηση του μαστιγίου.



Εικόνα 14. Τα μαστίγια των ευκαρυωτικών οργανισμών δομούνται από ένα σύστημα μικροσωληνίσκων. Γενικότερα, η δράση της δυνεΐνης (κινητήρια πρωτεΐνη) προκαλεί ολίσθηση των μικροσωληνίσκων. Ωστόσο, με τη βοήθεια συνδετικών πρωτεϊνών οι μικροσωληνίσκοι της ουράς του σπερματοζωαρίου δεν ολισθαίνουν και η δράση των δυνεϊνών προκαλεί την κάμψη τους προσδίδοντας έτσι την απαραίτητη κινητικότητα στο σπερματοζωάριο (Μούτου Αικατερίνη, Κυτταρική Βιολογία. Κεφάλαιο 9. «Ο Κυτταροσκελετός»).

Στον άνθρωπο, η ασθενοζωοσπερμία έχει συσχετιστεί με μια πληθώρα αλλαγών στα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων. Οι ανωμαλίες αυτές αφορούν τη δομή των μιτοχονδριακών μεμβρανών ή την διάταξη των μιτοχονδρίων στο μεσαίο τμήμα. Επίσης, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων φαίνεται να υποβαθμίζεται σε περιπτώσεις που ο αυχένας έχει μικρότερο μήκος και συνεπώς περιέχει λιγότερα μιτοχόνδρια. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν ότι η απρόσκοπτη λειτουργία των μιτοχονδρίων εξασφαλίζει την παραγωγή της απαιτούμενης ποσότητας ATP η οποία είναι καθοριστική για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Εντούτοις, ο ρόλος της ATP έχει διαπιστωθεί και σε επιπλέον διαδικασίες, όπως η ακροσωμική αντίδραση, η διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο κ.ά.

Όσον αφορά το μιτοχονδριακό DNA, η απουσία ιντρονίων καθώς και πολύπλοκων μηχανισμών επιδιόρθωσής του καθιστά αυτομάτως τις μεταλλάξεις στα μιτοχόνδρια αρκετά πιθανές αιτίες

για εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως η υπογονιμότητα. Πολλές μελέτες σε ασθενοζωοσπερμικούς άνδρες έχουν εντοπίσει αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης διάφορων γονιδίων τα οποία κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό ή το πυρηνικό DNA και εμπλέκονται στις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια. Ακόμη, μέσα από πρωτεομικές αναλύσεις έχει διαπιστωθεί η τροποποίηση της έκφρασης αρκετών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε άνδρες με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων.

Τέλος, τα μιτοχόνδρια αποτελούν τις κύριες θέσεις παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα οι οποίες μπορεί να έχουν επιβλαβή δράση σε άλλα μόρια και κυτταρικές δομές. Αναπόφευκτα, το mtDNA και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες είναι άμεσα εκτεθειμένες στις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την κυτταρική αναπνοή. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε υπογόνιμους άνδρες, το 25-40% εμφάνιζε αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ριζών στο σπέρμα. Όπως προαναφέρθηκε, τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων παρουσιάζουν μεγάλη μεταβολική δραστηριότητα και μια ενδεχόμενη κατάσταση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες βλάβες στα σπερματοζωάρια. Αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ότι ορισμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο σπέρμα συμμετέχουν στη ρύθμιση των επιπέδων παραγωγής των ROS. Μία από αυτές είναι η πρωτεΐνη μοριακή-συνοδός PHB (prohibitin) η έκφραση της οποίας εντοπίζεται ιδιαίτερα μειωμένη σε σπερματοζωάρια ανδρών με χαμηλή κινητικότητα και υψηλά επίπεδα ROS (Boguenet et al., 2021).

3.4. Non-coding RNAs και μιτοχόνδρια

Ο ρόλος των μη κωδικοποιητικών RNAs στα μιτοχόνδρια αποτελεί αντικείμενο συστηματικών ερευνών τις τελευταίες δεκαετίες. Το ανθρώπινο mtDNA κωδικοποιεί για όλα τα απαραίτητα tRNAs, ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα tRNAs που μεταγράφονται στον πυρήνα εισάγονται στα μιτοχόνδρια. Άλλα ncRNAs που εντοπίζονται επίσης στα μιτοχόνδρια είναι το 5S rRNA, το RMRP (RNA Component Of Mitochondrial RNA Processing Endoribonuclease), η Ριβονουκλεάση P (RNase P) κ.ά.

Τα miRNAs που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά μόρια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και η δράση τους εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Είναι γνωστό ότι περισσότερες από χίλιες πεντακόσιες πρωτεΐνες εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και συμμετέχουν σε ποικίλες διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου. Τα συγκεκριμένα miRNAs στοχεύουν τα mRNAs των πρωτεϊνών αυτών στο κυτταρόπλασμα και με έμμεσο τρόπο ρυθμίζουν διεργασίες όπως ο κύκλος του Krebs (πχ. miR-26a), η οξειδωτική φωσφορυλίωση (πχ. miR-663) κ.ά. Η δεύτερη και τρίτη

κατηγορία περιλαμβάνουν miRNAs (γνωστά και ως mitomiRs) τα οποία δρουν εντός των μιτοχονδρίων και κωδικοποιούνται από πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, αντίστοιχα. Ο ακριβής μηχανισμός εισαγωγής και δράσης των mitomiRs στα μιτοχόνδρια δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα.

Όσον αφορά τα long non-coding RNAs, πέρα από τον πυρήνα η δράση τους έχει διαπιστωθεί σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα όπως τα μιτοχόνδρια. Μέχρι στιγμής αποδεικνύεται ότι περισσότερα από είκοσι lncRNAs επηρεάζουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων με έμμεσο ή άμεσο τρόπο. Ορισμένα από αυτά δρουν στο κυτταρόπλασμα στοχεύοντας κυρίως miRNAs (π.χ. *Cerox1*, *UCA1*) ενώ άλλα εισάγονται στα μιτοχόνδρια μέσω αδιευκρίνιστων ακόμη μηχανισμών (π.χ. *SAMMSON*, *Malat1*). Επιπλέον, αρκετά πρόσφατη είναι η ανακάλυψη μορίων lncRNAs που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Μερικά από αυτά είναι τα *IncND5*, *IncND6*, *SncmtRNA*, *LIPCAR* κ.ά. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα από αυτά μεταφέρονται στον πυρήνα όπου επιτελούν τον ρυθμιστικό τους ρόλο (π.χ. *IncCytB*, *ASncmtRNA-2*) (Gusic & Prokisch, 2020).

B. Σκοπός

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί προς τη διερεύνηση της υπογονιμότητας στους άνδρες. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια παθολογική κατάσταση αρκετά διαδεδομένη, η οποία χρήζει πρόληψης, διάγνωσης και αντιμετώπισης. Αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαταραχή, στην οποία εμπλέκονται περιβαλλοντικοί παράγοντες αλλά και σημαντικός αριθμός γονιδίων.

Σήμερα, άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν τα μη κωδικοποιητικά RNA (non-coding RNAs) με την ανδρική υπογονιμότητα. Πολλές κατηγορίες ncRNAs, μεταξύ των οποίων τα miRNAs και τα lncRNAs, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων της διαδικασίας της σπερματογένεσης και ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί διαφορετικό προφίλ έκφρασης των lncRNAs και των miRNAs μεταξύ υγιών και ατόμων με φαινότυπο υπογονιμότητας. Παράλληλα, την τελευταία δεκαετία έχει αναγνωριστεί ο σημαντικός ρόλος των μιτοχονδρίων σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες και αποδεικνύεται ότι εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες, μεταξύ των οποίων και η ανδρική υπογονιμότητα. Βέβαια, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει διαλευκανθεί ακόμη πλήρως.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε μη κωδικοποιητικά RNA, τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας και της δυναμικής των μιτοχονδρίων. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη lncRNAs έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα ώστε να εντοπιστούν οι σημαντικότεροι πολυμορφισμοί οι οποίοι πιθανόν να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας μέσω της επίδρασής τους στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Αρκετοί από αυτούς θα μπορούσαν ενδεχομένως να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες, εφόσον εντοπίζονται μόνο στους ασθενείς ή μόνο στους υγιείς, αλλά και να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση συγκεκριμένων μονοπατιών που εμπλέκονται στο μηχανισμό εμφάνισης της ανδρικής υπογονιμότητας.

Γ. Υλικά και Μέθοδοι

1. Βιολογικό υλικό

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό από βιολογικό δείγμα αίματος ανδρών του ελληνικού πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα συλλέχθηκαν σε συνεργασία με το Κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης 'EMBRYOLAB' από δέκα νορμοσπερμικούς και δεκαπέντε μη νορμοσπερμικούς άνδρες (πέντε ασθενοσπερμικοί, πέντε ολιγοσπερμικοί, πέντε τερατοσπερμικοί). Σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και του εργαστηρίου, η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από την αρχή της συναίνεσης του δότη και από την αρχή της προστασίας των προσωπικών δεδομένων. Συνεπώς, για τη διεξαγωγή της μελέτης εξασφαλίστηκε η γραπτή συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες.

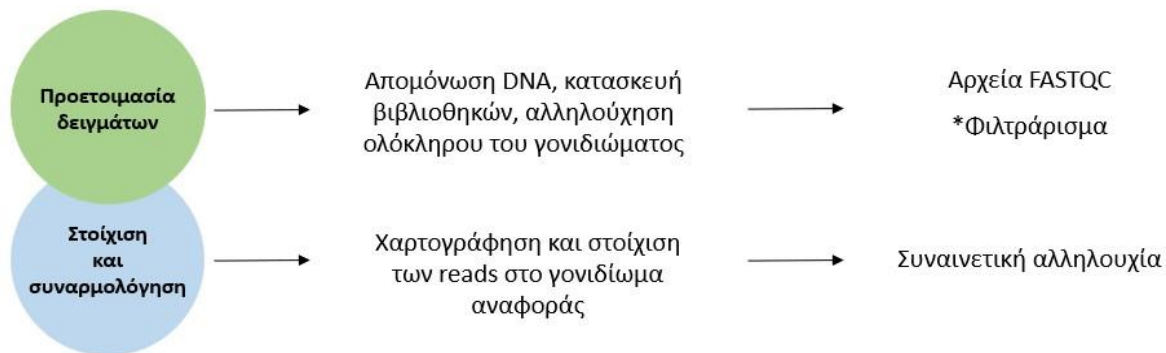
Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χειρισμός των παραπάνω δειγμάτων και η διαδικασία της απομόνωσης DNA από τα δείγματα αίματος είχε ήδη πραγματοποιηθεί πριν την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας βάσει πρωτοκόλλου στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Spermogene.

2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος

Με κατάλληλους χειρισμούς, το DNA των δειγμάτων που προέκυψε ήταν υψηλής ποιότητας και σε ικανοποιητική ποσότητα προκειμένου η αλληλούχηση να είναι αποτελεσματική. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, για τη μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing). Μετά την κατασκευή των βιβλιοθηκών (κατακερματισμός DNA, προσθήκη προσαρμογών, ενίσχυση κλπ.) πραγματοποιήθηκε η αλληλούχηση με 100 bp paired-end βιβλιοθήκες (PE sequencing). Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποθηκεύτηκαν σε αρχεία FASTQ τα οποία περιελάμβαναν την αλληλουχία καθώς και ένα σκορ αλληλούχησης, κωδικοποιημένο με χαρακτήρες ASCII (American Standard Code for Information Interchange). Μέσω της διαδικασίας του φιλτραρίσματος (quality trimming) δόθηκε η δυνατότητα απομάκρυνσης αλληλουχιών χαμηλής ποιότητας. Με τον τρόπο αυτό η ποιότητα των αλληλουχιών βελτιώθηκε ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω αναλύσεις.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε συναρμολόγηση (assembly) των δεδομένων αλληλούχησης η οποία μπορεί να γίνει *de novo* ή με βάση ένα γονιδίωμα αναφοράς (reference genome). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το γονιδίωμα αναφοράς Human GRCh37. Η συγκεκριμένη έκδοση του γονιδιώματος επιλέχθηκε διότι είχε χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες αναλύσεις

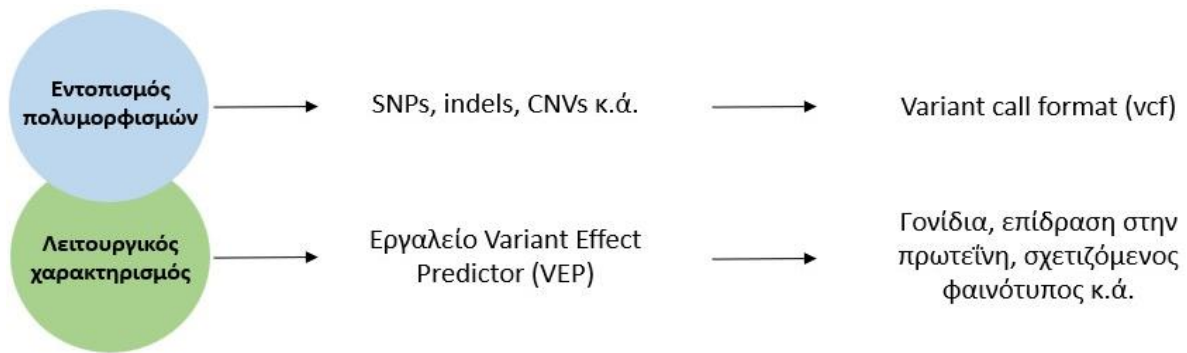
που αφορούσαν τη συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με την ανδρική υπογονιμότητα μέσω ανάλυσης συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study, GWAS) για το ερευνητικό πρόγραμμα SpermoGene. Με τη διαδικασία της συναρμολόγησης έγινε χαρτογράφηση (map) και στοίχιση των reads στο γονιδίωμα αναφοράς ώστε να προκύψουν μεγαλύτερες συνεχόμενες αλληλουχίες και τελικά η συναινετική αλληλουχία (consensus).



Εικόνα 15. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιελάμβανε απομόνωση γενετικού υλικού, κατασκευή βιβλιοθηκών και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος. Έπειτα πραγματοποιήθηκε στοίχιση των reads στο γονιδίωμα αναφοράς και σχηματίστηκε η συναινετική αλληλουχία.

Ακολούθησε το variant calling, μία ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία κατά την οποία εντοπίζονται πολυμορφισμοί, δηλαδή περιοχές του γονιδιώματος που διαφέρουν από το γονιδίωμα αναφοράς (SNPs, indels, CNVs κ.ά.). Τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να σχετίζονται είτε με τυχαίες μεταλλάξεις, οι οποίες δεν επηρεάζουν τη λειτουργία του κυττάρου, είτε με κάποιο είδος ασθένειας. Μετά την ολοκλήρωση του variant calling προέκυψε ένα αρχείο vcf (variant call format) που περιείχε αποθηκευμένη όλη αυτή την πληροφορία.

Το επόμενο βήμα της ανάλυσης ήταν ο λειτουργικός χαρακτηρισμός (annotation) που πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο Variant Effect Predictor (VEP) της Ensembl, στο οποίο δόθηκαν ως αρχικά δεδομένα (input) τα αρχεία vcf που προέκυψαν παραπάνω. Με το annotation έγινε αντιστοίχιση των πολυμορφισμών σε συγκεκριμένα γονίδια και αντλήθηκε βιολογική πληροφορία σχετικά με τη θέση τους (intron variant, missense variant, intergenic variant κλπ.), την πρόβλεψη της επίδρασης στην πρωτεΐνη που παράγεται, συσχετισμένο φαινότυπο κ.ά.

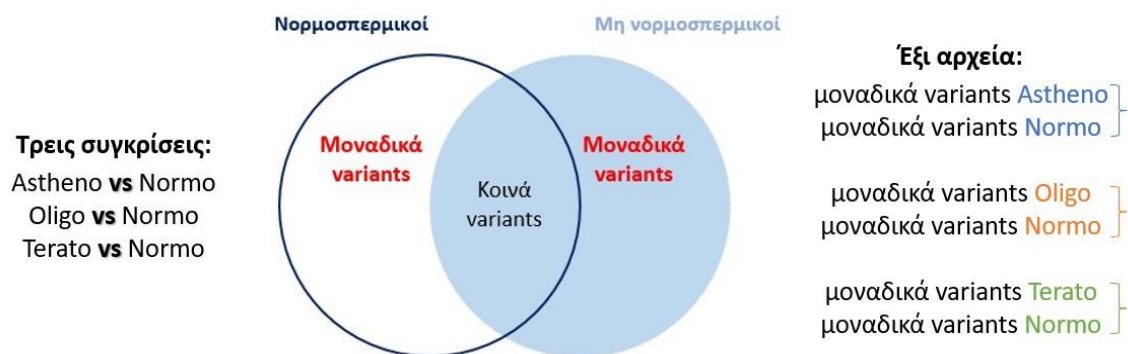


Εικόνα 16. Επόμενο βήμα ήταν η αναγνώριση περιοχών του γονιδιώματος οι οποίες διέφεραν από το γονιδίωμα αναφοράς (variant calling) ενώ στη συνέχεια, με το εργαλείο VEP, έγινε αντιστοίχιση των variants σε συγκεκριμένα γονίδια και αντλήθηκε βιολογική πληροφορία (annotation).

Αξίζει να αναφερθεί ότι και η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω είχε επίσης ολοκληρωθεί πριν την έναρξη πραγματοποίησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Spermogene.

3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός μοναδικών πολυμορφισμών

Έπειτα από την ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχηση, για κάθε υποκατηγορία υπογονιμότητας (ασθενοσπερμία, ολιγοσπερμία, τερατοσπερμία) έγινε σύγκριση μεταξύ των νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών ώστε να εντοπιστούν μοναδικά variants, πολυμορφισμοί δηλαδή που συναντώνται π.χ. μόνο σε ασθενοσπερμικούς σε σύγκριση με τους νορμοσπερμικούς ή μόνο στους νορμοσπερμικούς σε σύγκριση με τους ασθενοσπερμικούς. Αυτοί οι πολυμορφισμοί είναι πιο πιθανό να συνεισφέρουν στην εμφάνιση φαινοτύπου υπογονιμότητας στις διάφορες υποκατηγορίες που μελετήθηκαν. Επομένως, έγιναν τρεις συγκρίσεις (ασθενοσπερμικοί – νορμοσπερμικοί, ολιγοσπερμικοί – νορμοσπερμικοί, τερατοσπερμικοί – νορμοσπερμικοί) και προέκυψαν δύο αρχεία για κάθε σύγκριση (Μεταλλάξεις ασθενοσπερμικών - Μεταλλάξεις νορμοσπερμικών/ Μεταλλάξεις ολιγοσπερμικών - Μεταλλάξεις νορμοσπερμικών/ Μεταλλάξεις τερατοσπερμικών - Μεταλλάξεις νορμοσπερμικών), συνολικά δηλαδή έξι αρχεία.

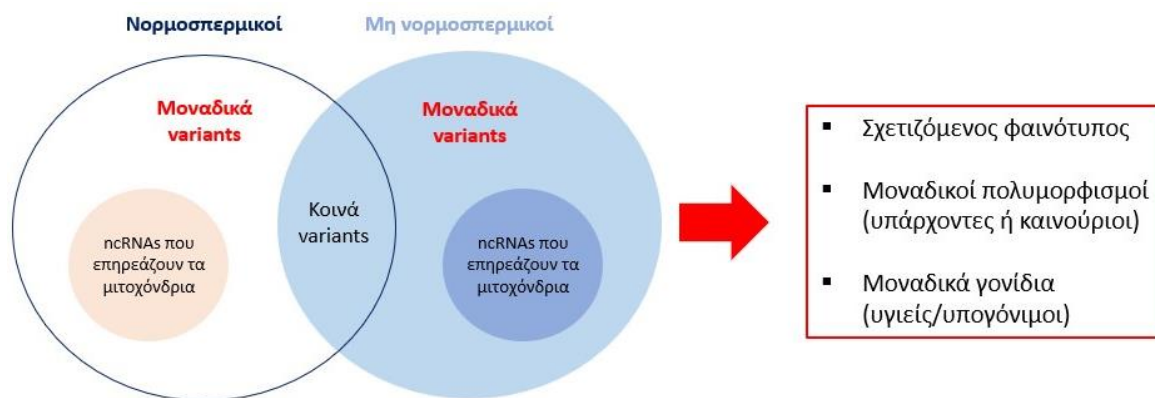


Εικόνα 17. Για κάθε μία υποκατηγορία υπογονιμότητας πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών ώστε να εντοπιστούν μοναδικοί πολυμορφισμοί. Τελικά προέκυψαν δύο αρχεία για κάθε σύγκριση, συνολικά δηλαδή έξι αρχεία.

Επομένως, με βάση τα παραπάνω αρχεία μπορεί να γίνει μελέτη πολυμορφισμών σε συγκεκριμένα γονίδια ή περιοχές του γονιδιώματος που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Οι πολυμορφισμοί αυτοί ενδέχεται να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες, εφόσον εντοπίζονται μόνο στους ασθενείς ή μόνο στους υγιείς και επομένως να αξιοποιηθούν στη διάκριση αυτών. Επιπρόσθετα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εντοπιστούν συγκεκριμένα μονοπάτια που εμπλέκονται στο μηχανισμό εμφάνισης της νόσου, δηλαδή της ανδρικής υπογονιμότητας. Οι παραπάνω συγκρίσεις επίσης δεν πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Spermogene.

4. Μελέτη πολυμορφισμών σε μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) που εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ο σημαντικός ρόλος των μιτοχονδρίων σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες και αποδεικνύεται ότι εμπλέκονται στην εμφάνιση πολλών ασθενειών, μεταξύ των οποίων και η ανδρική υπογονιμότητα. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται σε μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) τα οποία στοχεύουν γονίδια που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων.



Εικόνα 18. Για τη μελέτη των πολυμορφισμών σε μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) που επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία ακολουθήθηκε η παραπάνω προσέγγιση.

Για το σκοπό αυτό, το πρώτο βήμα ήταν η δημιουργία μιας λίστας με όλα τα ncRNAs, δηλαδή miRNAs και lncRNAs που επηρεάζουν την μιτοχονδριακή λειτουργία, μέσω της στόχευσης σχετικών γονιδίων, ώστε να γίνει στη συνέχεια εντοπισμός πολυμορφισμών στα συγκεκριμένα μόρια (ncRNAs), οι οποίοι όμως συναντώνται μόνο σε άτομα που εμφανίζουν ανδρική υπογονιμότητα και συνεπώς είναι πιθανό να συμβάλλουν στο μηχανισμό εμφάνισής της. Η δημιουργία της παραπάνω λίστας βασίστηκε στην επιστημονική δημοσίευση των Gusic και Prokisch, η οποία μελετά το ρόλο των μη κωδικοποιητικών RNAs στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και την εμφάνιση ασθενειών (Gusic & Prokisch, 2020). Πιο συγκεκριμένα, τα ncRNAs που επιλέχθηκαν συμπεριλαμβάνονται στους Πίνακες 2 και 5 της παραπάνω δημοσίευσης. Η λίστα συμπεριελάμβανε 91 miRNAs και 22 lncRNAs τα οποία σύμφωνα με μελέτες επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων.

5. Αναζήτηση non-coding RNAs σε Ensembl Genome Browser και GeneCards

Αφού σχηματίστηκαν οι λίστες των miRNAs και lncRNAs που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στο Excel, ακολούθησε η αναζήτηση στη βάση δεδομένων Ensembl στην έκδοση GRCh37 ώστε να γίνει στη συνέχεια αναζήτηση των πολυμορφισμών που εντοπίζονται στα συγκεκριμένα ncRNAs στα αρχεία που περιέχουν τις μοναδικές μεταλλάξεις από τις συγκρίσεις που αναφέρονται παραπάνω. Η Ensembl Genome Browser (Cunningham et al., 2022) περιλαμβάνει δεδομένα για περισσότερα από διακόσια γονιδιώματα σπονδυλωτών, μεταξύ αυτών του ανθρώπου, του ποντικού, καθώς και πολλών οργανισμών που χρησιμοποιούνται ευρέως σε πειραματικές μελέτες (π.χ. *Zebrafish*, *D. melanogaster*, *C. elegans* κ.ά.). Παρέχει επίσης

μια πληθώρα δεδομένων και εργαλείων που υποστηρίζουν την έρευνα στη γενετική και εξελικτική βιολογία, τη συγκριτική γονιδιωματική κ.ά.

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene MIR122. The top navigation bar includes links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, and Help & Docs. The main header indicates the human genome (GRCh37.p13) and the specific gene/transcript (MIR122/MIR122-201). The left sidebar lists various genomic displays such as Summary, Splice variants, Transcript comparison, Gene alleles, Sequence, Secondary Structure, Comparative Genomics, Paralogues, Genomic alignments, Gene tree, Gene gain/loss tree, Orthologues, Ontologies, Phenotypes, Genetic Variation, Variant table, Variant image, Structural variants, Gene expression, and Pathway. The main content area displays the gene MIR122 with its Ensembl ID ENSG00000207778 highlighted in a red box. The description states it is a microRNA 122. Synonyms include MIR122A, MIRN122, MIRN122A, hsa-mir-122, hsa-mir-122a, miRNA122, and miRNA122A. The location is on Chromosome 18: 56,118,306-56,118,390 forward strand. The page also shows a summary of the gene, including its name (MIR122), Ensembl version (ENSG00000207778.1), other assemblies, gene type (MiRNA), annotation method (Non-coding RNAs predicted using sequences from Rfam and miRBase), and secondary structure (MIR122 skeleton-with-bp).

Εικόνα 19. Αναζήτηση μορίου miRNA στη βάση δεδομένων της Ensembl. Για κάθε μόριο miRNA ή lncRNA σημειώθηκε το όνομα του γονιδίου καθώς και το Ensembl ID το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών στα υπό μελέτη ncRNAs του αρχείου annotation.

Για κάθε non-coding RNA της λίστας που δημιουργήθηκε προηγουμένως σημειώθηκε το όνομα του γονιδίου που εμφάνιζε η Ensembl καθώς και ο μοναδικός κωδικός που αντιστοιχεί σε αυτό (Ensembl ID). Οι παραπάνω κωδικοί ήταν απαραίτητοι καθώς χρησιμοποιήθηκαν στην αναζήτηση με χρήση γραμμής εντολών προκειμένου να εντοπιστούν οι πολυμορφισμοί των υπό μελέτη ncRNAs στο σχετικό αρχείο annotation που είχε προκύψει από τις συγκρίσεις μεταξύ νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών, όπως αναλύεται παραπάνω.

Μία ακόμη σημαντική βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η GeneCards (www.genecards.org) αφού αρκετές φορές η αναζήτηση στην Ensembl δεν είχε αποτέλεσμα (Stelzer et al., 2016). Αυτό συνέβαινε κυρίως κατά την αναζήτηση lncRNAs, τα οποία έχουν αρκετές εναλλακτικές ονομασίες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιούνταν μία αρχική αναζήτηση στη GeneCards η οποία μεταξύ άλλων εμφανίζει όλες τις εναλλακτικές ονομασίες των μορίων και παραπέμπει στην σχετική σελίδα διάφορων βάσεων δεδομένων. Βέβαια, όσον αφορά την Ensembl, η παραπομπή αντιστοιχεί στην έκδοση GRCh38, επομένως με βάση το όνομα του γονιδίου που εμφάνιζε η GRCh38, πραγματοποιούνταν εκ νέου αναζήτηση στην έκδοση GRCh37 και ακολουθούσε η καταγραφή των πληροφοριών.

FALEC

Gene - Focally Amplified Long Non-Coding RNA In Epithelial Cancer

RNA Gene

(Updated: Jan 10, 2023 ; GC01P151481 ; GIFTS: 19)

Follow Gene

Phenotype Search

Jump to section	Aliases Paralogs	Disorders Pathways	Domains Products	Drugs Proteins	Expression Publications	Function Sources	Genomics Summaries	Localization Transcripts	Orthologs Variants
Research Products	Antibodies Cell Lines	Assays Clones	Proteins Primers	Inhib. RNA Genotyping	CRISPR	Exp. Assays	miRNA	Drugs	Animal Models

Proteins

Primary Antibodies

ELISAs

Antibody Arrays

Activity Assays

Proteins

Antibodies

Assays

Genes

shRNA

Primers

CRISPR

Lentiviral Particles

CRISPR Knockout Kit

sgRNA

KO Pools

iPSC

SNV Clone

Free Bioinformatics Tools

C. elegans Transgenics

Zebrafish Genome Editing

Humanized animal models

Aliases for FALEC Gene

?

Data sources for FALEC Gene:

HGNC

NCBI Entrez Gene

Ensembl

RNAcentral

NONCODE

LncBook

LNCipedia

RefSeq

ENA

RNA type for FALEC Gene

lncRNA

Aliases for FALEC Gene

GeneCards Symbol: FALEC²

Focally Amplified Long Non-Coding RNA In Epithelial Cancer

(HGNC, NCBI Entrez Gene, Ensembl)

NCRNA-A1 (HGNC, NCBI Entrez Gene, Ensembl)

FA1 (HGNC, NCBI Entrez Gene, Ensembl)

Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 568 (HGNC, NCBI Entrez Gene)

Focally Amplified LncRNA On Chromosome 1 (HGNC, NCBI Entrez Gene)

LINC00568 (NCBI Entrez Gene, Ensembl)

Noncoding RNA-Activating 1 (NCBI Entrez Gene)

NONHSAG002854.2 (NONCODE)

HSALNG0007045 (LncBook)

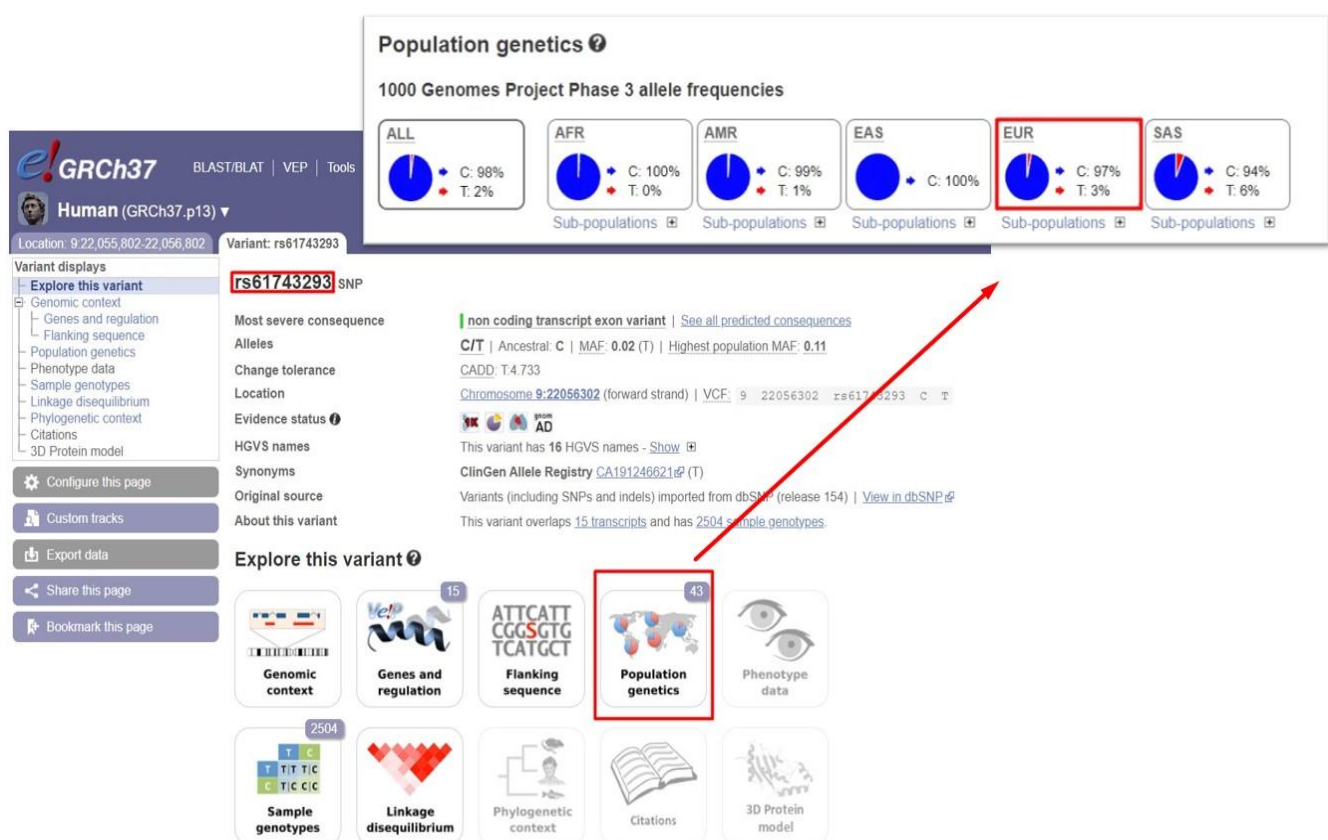
FALEC (LNCipedia)

6. Φιλτράρισμα και διάκριση σημαντικότερων πολυμορφισμών σε ncRNAs υπογόνιμων ανδρών

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε υποτύπο ανδρικής υπογονιμότητας δημιουργήθηκε ένα αρχείο Excel το οποίο περιείχε όλες τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα υπό μελέτη lncRNAs. Τα αρχεία αυτά περιελάμβαναν μια πληθώρα δεδομένων για κάθε εντοπισμένο πολυμορφισμό, όπως η θέση του πάνω στο γονιδίωμα (π.χ. 9:22012229-22012229) και το αλληλόμορφο (A/T/G/C κ.ά.). Επιπλέον, κάθε πολυμορφισμός συνοδεύεται από ένα μοναδικό κωδικό που τον χαρακτηρίζει (π.χ. rs61743293) με βάση τον οποίο πραγματοποιούνταν η αναζήτηση στην Ensembl. Το φιλτράρισμα έγινε με βάση τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου (allele frequency) < 0.05 (5%) σύμφωνα με δεδομένα που προκύπτουν από το 1000 Genome Project για

τον πληθυσμό της Ευρώπης καθώς πιο σπάνιες μεταλλάξεις, που δεν συναντώνται με αυξημένη συχνότητα στον γενικό πληθυσμό, είναι πιο πιθανό να συμβάλλουν στην εμφάνιση κάποιου παθογόνου φαινοτύπου. Επιλέχθηκαν επίσης πολυμορφισμοί για τους οποίους δεν υπήρχαν δεδομένα πληθυσμιακής γενετικής με βάση την Ensembl καθώς συνήθως πρόκειται για αρκετά σπάνιες μεταλλάξεις που επίσης μπορεί να συσχετίζονται με παθολογία.

Ως δεύτερο φίλτρο χρησιμοποιήθηκε ακόμη η τιμή CADD score > 10. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη ανήκει στο 10% των πιο επιβλαβών μεταλλάξεων για το ανθρώπινο γονιδίωμα (αντίστοιχα CADD > 20 σημαίνει ότι ανήκει στο 1% κ.ο.κ) και επομένως είναι πιθανόν να εμπλέκεται στην εμφάνιση παθογόνου φαινοτύπου.

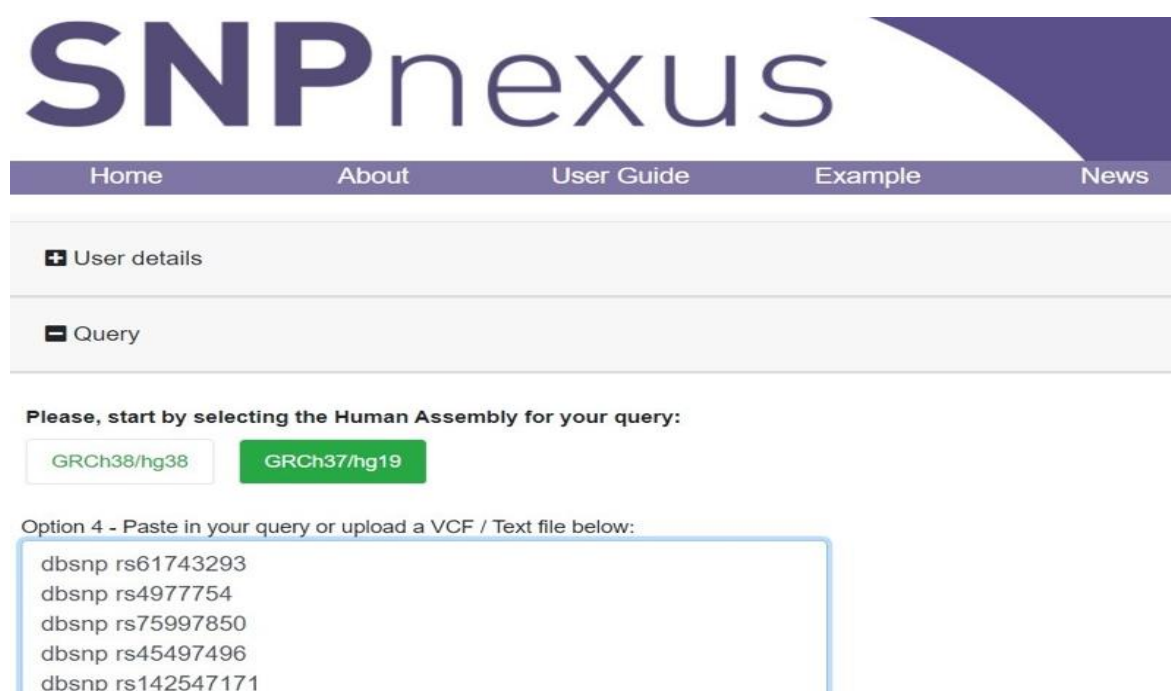


Εικόνα 21. Αποτέλεσμα αναζήτησης πολυμορφισμού στην Ensembl. Παρέχονται πληροφορίες για τα εναλλακτικά αλληλόμορφα και τη συχνότητά τους σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες κ.ά. Το φιλτράρισμα πραγματοποιήθηκε με βάση τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου < 5% για τον πληθυσμό της Ευρώπης (δεδομένα από 1000 Genome Project) και με το CADD score > 10.

7. Διερεύνηση του ρόλου των SNPs με την βάση δεδομένων SNPnexus

Οι πολυμορφισμοί που προέκυψαν μετά το φιλτράρισμα εισήχθησαν στη βάση δεδομένων SNPnexus προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους και να εντοπιστεί ποιοι από αυτούς έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την ανδρική υπογονιμότητα, άλλες ασθένειες ή καρκίνο του αναπαραγωγικού συστήματος. Η SNPnexus (Dayem Ullah et al., 2018) είναι μία βάση δεδομένων που προσφέρει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες ώστε να διευκολύνεται κάθε φορά η επιλογή των SNPs που πιθανόν συνεισφέρουν στο μελετώμενο φαινότυπο. Πιο συγκεκριμένα, με την αναζήτηση κάθε SNP η SNPnexus προσφέρει πληροφορίες που αφορούν την επίδραση του SNP σε επίπεδο μεταγράφου ή σε πρωτεϊνικό επίπεδο, δεδομένα HarMap, βιβλιογραφία που συσχετίζει τους πολυμορφισμούς με συγκεκριμένο φαινότυπο ή ασθένεια κ.ά.

Για να πραγματοποιηθεί η αναζήτηση, τα δεδομένα εισήχθησαν με τη μορφή dbSNP rs# (πχ. dbSNP rs61743293) στην υποενότητα 'Query Options' επιλέγοντας μαζική αναζήτηση των SNPs (Batch Query). Στη συνέχεια, από την υποενότητα 'Annotation categories' επιλέχθηκε η έκδοση γονιδιώματος GRCh37 και ορίστηκαν οι διάφοροι παράμετροι αναζήτησης.



The screenshot displays the SNPnexus web application interface. At the top, the 'SNPnexus' logo is visible. Below it is a navigation bar with links: Home, About, User Guide, Example, and News. The main content area has a sidebar on the left with 'User details' and 'Query' sections. The 'Query' section is active, showing a prompt: 'Please, start by selecting the Human Assembly for your query:'. There are two buttons: 'GRCh38/hg38' and 'GRCh37/hg19', with the latter being highlighted in green. Below this, a text box labeled 'Option 4 - Paste in your query or upload a VCF / Text file below:' contains a list of SNPs: dbSNP rs61743293, dbSNP rs4977754, dbSNP rs75997850, dbSNP rs45497496, and dbSNP rs142547171.

Εικόνα 22. Μαζική αναζήτηση SNPs στην αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων SNPnexus. Τα δεδομένα εισάγονται με τη μορφή dbSNP rs# στο πλαίσιο αναζήτησης, επιλέγεται η έκδοση γονιδιώματος και ορίζονται οι παράμετροι αναζήτησης. Για κάθε SNP η SNPnexus παρέχει μία πληθώρα πληροφοριών όπως η επίδραση σε επίπεδο μεταγράφου ή πρωτεΐνης, συσχέτιση με άλλα SNPs ή ασθένειες κ.ά.

8. Πρόβλεψη επίδρασης μεταλλάξεων στις θέσεις πρόσδεσης των lncRNAs με τη βάση δεδομένων LncRNASNP2

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα lncRNAs έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια RNA, DNA και πρωτεΐνες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αλληλεπιδράσεις τους με τα miRNAs μέσω των οποίων εμπλέκονται με διάφορους τρόπους στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές συνήθως αφορούν την προσέλκυση των miRNAs από τα lncRNAs επιτυγχάνοντας την ρύθμιση των επιπέδων και των δύο μορίων άλλοτε μέσω της αποικοδόμησης των lncRNAs και άλλοτε μέσω απομάκρυνσης των miRNAs από τους mRNA-στόχους τους. Δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές απαιτούν υψηλή συμπληρωματικότητα των δύο μορίων, γίνεται αντιληπτό ότι μεταλλάξεις στα lncRNAs ενδεχομένως να επηρεάζουν τη δυναμική αυτή οδηγώντας σε απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Η LncRNASNP (Yang et al., 2023) είναι μία βάση δεδομένων η οποία αφορά SNPs που εντοπίζονται σε lncRNAs στον άνθρωπο και τον ποντικό και παρέχει πληροφορίες για τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων αυτών στη δομή των lncRNAs, στη λειτουργία τους, στην αλληλεπίδρασή τους με miRNAs κ.ά.

Στην παρούσα μελέτη οι πολυμορφισμοί που προέκυψαν από το παραπάνω φιλτράρισμα εισήχθησαν στην LncRNASNP2 η οποία για κάθε πολυμορφισμό, μεταξύ άλλων, εμφάνιζε τη δημιουργία (gain) ή/και την απώλεια (loss) θέσης πρόσδεσης miRNA πάνω στο lncRNA. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώθηκαν αλλαγές που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων και είναι αρκετά πιθανό να σχετίζονται με την εμφάνιση υπογονιμότητας στους άνδρες.

SNP Detail	SNP in lncRNA	SNP in LD region	SNP cause miRNA target gain	SNP cause miRNA target loss			
SNP causes miRNA:lncRNA Gains							
miRNA ID	lncRNA	SNP ID	Energy (kCal/Mol)	Binding Start (TargetScan)	Binding End (TargetScan)	Binding Start (miRanda)	Binding End (miRanda)
hsa-miR-3145-3p	NONHSAT130429.2	rs16935753	-16.25	22012227	22012233	22012210	22012233

SNP Detail	SNP in lncRNA	SNP in LD region	SNP cause miRNA target gain	SNP cause miRNA target loss			
SNP causes miRNA:lncRNA losses							
miRNA ID	lncRNA	SNP ID	Energy (kCal/Mol)	Binding Start (TargetScan)	Binding End (TargetScan)	Binding Start (miRanda)	Binding End (miRanda)
hsa-miR-888-3p	NONHSAT130429.2	rs16935753	-20.389999	22012229	22012235	22012213	22012236
hsa-miR-6719-3p	NONHSAT130429.2	rs16935753	-18.41	22012228	22012234	22012210	22012235

Εικόνα 23. Αποτέλεσμα αναζήτησης στη βάση δεδομένων LncRNASNP2. Παρέχονται πληροφορίες για τη δημιουργία (gain) ή την απώλεια (loss) θέσης πρόσδεσης miRNA πάνω στο lncRNA που εμφανίζει το συγκεκριμένο SNP. Επιλέγοντας το πλαίσιο ‘SNP in LD region’ εμφανίζονται δεδομένα για Tag SNPs και σχετιζόμενες ασθένειες.

Δ. Αποτελέσματα

1. Ταυτοποίηση non-coding RNAs: Γονίδια και κωδικός Ensembl

Αρχικά, ως πρώτο βήμα της παρούσας μελέτης δημιουργήθηκε μια λίστα που συμπεριελάμβανε όλα τα non-coding RNAs που εμπλέκονται στην ρύθμιση της δυναμικής των μιτοχονδρίων σύμφωνα με την επιστημονική δημοσίευση των (Gusic & Prokisch, 2020). Αφού σχηματίστηκαν οι λίστες των lncRNAs και miRNAs που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, ακολούθησε η αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων Ensembl και GeneCards ώστε να εντοπιστούν οι κωδικοί Ensembl (Ensembl ID) και να γίνει αναζήτηση στα αρχεία που περιέχουν τις μοναδικές μεταλλάξεις μεταξύ νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών.

Ορισμένα μόρια αποκλείστηκαν από τη συνέχεια της ανάλυσης καθώς δεν ήταν αρκετά μελετημένα και η αναζήτησή τους στις βάσεις δεδομένων δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, η τελική λίστα που προέκυψε όσον αφορά τα non-coding RNAs που επηρεάζουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων περιλάμβανε 13 lncRNAs και 91 miRNAs. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 3. Για κάθε lncRNA που συμπεριλαμβάνονταν στη δημοσίευση των (Gusic & Prokisch, 2020) σημειώθηκε το όνομα του γονιδίου που εμφάνιζε η Ensembl καθώς και το Ensembl ID το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό πολυμορφισμών στο αρχείο annotation που προέκυψε από τις συγκρίσεις μεταξύ νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών.

Ονομασία lncRNA	Ονομασία γονιδίου (Ensembl)	Ensembl ID
<i>ANRIL</i>	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
<i>FAL1</i>	<i>LINC00568</i>	ENSG00000228126
<i>GAS5</i>	<i>GAS5</i>	ENSG00000234741
<i>HOTAIR</i>	<i>HOTAIR</i>	ENSG00000228630
<i>H19</i>	<i>H19</i>	ENSG00000130600
<i>HOTTIP</i>	<i>HOTTIP</i>	ENSG00000243766
<i>MEG3</i>	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
<i>Pvt1</i>	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
<i>Tug1</i>	<i>TUG1</i>	ENSG00000253352
<i>UCA1</i>	<i>UCA1</i>	ENSG00000214049
<i>MALAT1</i>	<i>MALAT1</i>	ENSG00000251562
<i>ZFAS1</i>	<i>ZFAS1</i>	ENSG00000177410
<i>RMRP</i>	<i>RMRP</i>	ENSG00000269900

Πίνακας 4. Για κάθε miRNA που συμπεριλαμβάνονταν στη δημοσίευση των (Gusic & Prokisch, 2020) σημειώθηκε το όνομα του γονιδίου που εμφάνιζε η Ensembl καθώς και το Ensembl ID.

Ονομασία miRNA	Ονομασία γονιδίου (Ensembl)	Ensembl ID
miR-148a	<i>MIR148A</i>	ENSG00000199085
miR-148b	<i>MIR148B</i>	ENSG00000199122
miR-299-5p	<i>MIR299</i>	ENSG00000207749
miR-122a	<i>MIR122</i>	ENSG00000207778
miR-421	<i>MIR421</i>	ENSG00000202566
miR-494	<i>MIR494</i>	ENSG00000194717
miR-183	<i>MIR183</i>	ENSG00000207691
miRNA-26a	<i>MIR26A1</i>	ENSG00000199075
miR-210-5p	<i>MIR210</i>	ENSG00000199038
miR-147b	<i>MIR147B</i>	ENSG00000211519
miR-101 -3p	<i>MIR101-1</i>	ENSG00000199135
miR-127-5p	<i>MIR127</i>	ENSG00000207608
miR-338-5p	<i>MIR338</i>	ENSG00000211563
miR-181c	<i>MIR181C</i>	ENSG00000207613
miR- 34a	<i>MIR34A</i>	ENSG00000207865
miR-663	<i>MIR633</i>	ENSG00000207552
miR-204-5p	<i>MIR204</i>	ENSG00000207935
miR-224-5p	<i>MIR224</i>	ENSG00000207621
miR-212	<i>MIR212</i>	ENSG00000267195
miR-132	<i>MIR132</i>	ENSG00000267200
miR-370	<i>MIR370</i>	ENSG00000199005
miR-33b	<i>MIR33B</i>	ENSG00000207839
miR-378 / miR-378*	<i>MIR378A</i>	ENSG00000199047
miR-33a	<i>MIR33A</i>	ENSG00000207932
miR-107	<i>MIR107</i>	ENSG00000198997
miR-103	<i>MIR103A1</i>	ENSG00000199035
miR-29a-3p	<i>MIR29A</i>	ENSG00000226380
miR-199a-5b	<i>MIR199A1</i>	ENSG00000207752
miR-29b	<i>MIR29B1</i>	ENSG00000265410
miR-23a-3p	<i>MIR23A</i>	ENSG00000207980
miR-23b-3p	<i>MIR23B</i>	ENSG00000207563
miR-193b	<i>MIR193B</i>	ENSG00000207639
miR-502	<i>MIR502</i>	ENSG00000272080
miR-940	<i>MIR940</i>	ENSG00000260778
miR-149	<i>MIR149</i>	ENSG00000207611
miR-125	<i>MIR125A</i>	ENSG00000208008
miR-22	<i>MIR22HG</i>	ENSG00000186594
miR-15b	<i>MIR15B</i>	ENSG00000207779
miR-16	<i>MIR16-1</i>	ENSG00000208006

miR-25	<i>MIR25</i>	ENSG00000207547
miR-155	<i>MIR155HG</i>	ENSG00000234883
miR-184	<i>MIR184</i>	ENSG00000207695
miR-141	<i>MIR141</i>	ENSG00000207708
miR-30a-5p	<i>MIR30A</i>	ENSG00000207827
miR-483-5p	<i>MIR483</i>	ENSG00000207805
miR-484	<i>MIR484</i>	ENSG00000272213
miR-499	<i>MIR499A</i>	ENSG00000207635
miR-9/9*	<i>MIR9-1</i>	ENSG00000207933
miR-27	<i>MIR27A</i>	ENSG00000207808
miR-761	<i>MIR761</i>	ENSG00000212076
miR-593	<i>MIR593</i>	ENSG00000207588
miR-200a-3p	<i>MIR200A</i>	ENSG00000207607
miR-140	<i>MIR140</i>	ENSG00000208017
miR-382-5p	<i>MIR382</i>	ENSG00000207742
miR-214	<i>MIR214</i>	ENSG00000207949
miR-106a	<i>MIR106A</i>	ENSG00000207602
miR-30a	<i>MIR30A</i>	ENSG00000207827
miR-30b	<i>MIR30B</i>	ENSG00000207582
miR-30c-1	<i>MIR30C1</i>	ENSG00000207962
miR-30c-2	<i>MIR30C2</i>	ENSG00000199094
miR-30d	<i>MIR30D</i>	ENSG00000199153
miR-30e	<i>MIR30E</i>	ENSG00000198974
miR-590-3p	<i>MIR590</i>	ENSG00000207741
miR-26	<i>MIR26A1</i>	ENSG00000199075
miR-133a	<i>MIR133A2</i>	ENSG00000207764
miR-7	<i>MIR7-3HG</i>	ENSG00000176840
miR-146a	<i>MIR146A</i>	ENSG00000253522
miR-181a	<i>MIR181A1</i>	ENSG00000207759
miR-24-2	<i>MIR24-2</i>	ENSG00000267519
miR-365-2	<i>MIR365B</i>	ENSG00000199187
miR-497	<i>MIR497HG</i>	ENSG00000267532
miR-146	<i>MIR146A</i>	ENSG00000253522
miR-17-92	<i>MIR17HG</i>	ENSG00000215417
miR-92a	<i>MIR92A2</i>	ENSG00000208034
miR-145	<i>MIR145</i>	ENSG00000269936
miR-137	<i>MIR137HG</i>	ENSG00000225206
miR-504	<i>MIR504</i>	ENSG00000207800
miR-125b	<i>MIR125B1</i>	ENSG00000207971
miR-21	<i>MIR21</i>	ENSG00000199004
miR-128	<i>MIR128-2</i>	ENSG00000207625
miR-335	<i>MIR335</i>	ENSG00000199043
miR-17*	<i>MIR17HG</i>	ENSG00000215417

2. Φιλτράρισμα και διάκριση σημαντικότερων πολυμορφισμών σε ncRNAs υπογόνιμων ανδρών

Με βάση τα Ensembl ID που προέκυψαν όπως αναλύεται παραπάνω, έγινε αναζήτηση στα αρχεία annotation που περιείχαν μοναδικές μεταλλάξεις μεταξύ νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών προκειμένου να εντοπιστούν μεταλλάξεις στα παραπάνω lncRNAs και miRNAs οι οποίες εντοπίζονται μόνο σε μη νορμοσπερμικούς άνδρες κι επομένως έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να συμβάλλουν στην εμφάνιση του υπό μελέτη φαινοτύπου, δηλαδή της ανδρικής υπογονιμότητας. Καθώς τα miRNAs έχουν μικρό μέγεθος, δεν εντοπίστηκαν μοναδικές μεταλλάξεις σε περιοχές που κωδικοποιούν για τα παραπάνω miRNAs (Πίνακας 4) σε κανέναν από τους τρεις υποτύπους ανδρικής υπογονιμότητας (ασθενοσπερμία, ολιγοσπερμία, τερατοσπερμία).

Έτσι, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν σε lncRNAs αποκλειστικά σε υπογόνιμους άνδρες των τριών υποκατηγοριών (ασθενοσπερμικοί, ολιγοσπερμικοί, τερατοσπερμικοί). Οι μεταλλάξεις αυτές φιλτραρίστηκαν ώστε να εντοπιστούν εκείνες που είναι πιο πιθανό να εμπλέκονται στην εμφάνιση της συγκεκριμένης υποκατηγορίας ανδρικής υπογονιμότητας στον Ελληνικό πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, το φιλτράρισμα έγινε με βάση τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου < 5% (1000 Genome Project – Ευρώπη) καθώς οι πιο σπάνιες μεταλλάξεις είναι πιο πιθανό να συμβάλλουν στην εμφάνιση κάποιου παθογόνου φαινοτύπου ενώ ως δεύτερο φίλτρο χρησιμοποιήθηκε η τιμή CADD score > 10.

Από το παραπάνω φιλτράρισμα προέκυψαν συνολικά 121 πολυμορφισμοί σε 9 lncRNAs που εντοπίζονται μόνο σε υπογόνιμους άνδρες και πιθανώς επηρεάζουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, για την ασθενοζωοσπερμία εντοπίστηκαν 35 πολυμορφισμοί σε 6 lncRNAs ενώ για την ολιγοζωοσπερμία 56 πολυμορφισμοί σε 5 lncRNAs. Όσον αφορά την τερατοζωοσπερμία, μετά το φιλτράρισμα προέκυψαν 51 πολυμορφισμοί σε 6 lncRNAs. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι 11 μεταλλάξεις ήταν κοινές τουλάχιστον σε δύο υποκατηγορίες υπογονιμότητας ενώ 5 από αυτές εντοπίστηκαν και στις τρεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα περιέχονται στους Πίνακες 5, 6 και 7.

Πίνακας 5. Εμφάνιση αποτελεσμάτων έπειτα από φιλτράρισμα των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν σε lncRNAs σε άνδρες με ασθενοσπερμία. Σημειώνονται οι μεταλλάξεις που είναι κοινές στις δύο (**) ή και τις τρεις υποκατηγορίες (***) ανδρικής υπογονιμότητας.

SNP ID	Variant	lncRNAs	Ensembl ID
rs139645979**	A	<i>HOTAIR</i>	ENSG00000228630
rs35040664	A	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs117671229	T	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs145857832	T	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs79796477	C	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs558040978	A	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs141440721	T	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs79302727	G	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs72698763	G	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs77508107**	A	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs79315403	G	<i>GAS5</i>	ENSG00000234741
rs144730930	AATAA	<i>HOTTIP</i>	ENSG00000243766
rs114323395	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs1293520072***	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs757197012	AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs117549407	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs118184290	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs149614373	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs534630618	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs62512808***	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs62512840***	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs1157889887	AAAAAAAA	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs188541206	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs201921302	AG	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs16902565	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs569594741	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs117362020**	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs17382616**	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs79957048**	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs1042291365	G	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs548840655	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs61743293***	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs4977754***	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs573214899	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs879668840	-	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498

Πίνακας 6. Εμφάνιση αποτελεσμάτων έπειτα από φιλτράρισμα των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν σε lncRNAs σε άνδρες με ολιγοσπερμία. Σημειώνονται οι μεταλλάξεις που είναι κοινές στις δύο (**) ή και τις τρεις υποκατηγορίες (***) ανδρικής υπογονιμότητας.

SNP ID	Variant	LncRNAs	Ensembl ID
rs139645979**	A	HOTAIR	ENSG00000228630
rs114669921	A	MEG3	ENSG00000214548
rs142491851	A	MEG3	ENSG00000214548
rs373798228	T	MEG3	ENSG00000214548
rs142880931	C	MEG3	ENSG00000214548
rs79796477	C	MEG3	ENSG00000214548
rs75997850	T	MEG3	ENSG00000214548
rs45497496	A	MEG3	ENSG00000214548
rs142547171**	A	MEG3	ENSG00000214548
rs77508107**	A	MEG3	ENSG00000214548
rs188154930	T	ZFAS1	ENSG00000177410
rs558352708	G	ZFAS1	ENSG00000177410
rs116625385	A	ZFAS1	ENSG00000177410
rs77423602	T	PVT1	ENSG00000249859
rs80145390	C	PVT1	ENSG00000249859
rs75608030**	A	PVT1	ENSG00000249859
rs80289709**	T	PVT1	ENSG00000249859
rs10099198	G	PVT1	ENSG00000249859
rs1293520072***	T	PVT1	ENSG00000249859
rs6470580	G	PVT1	ENSG00000249859
rs113265401	C	PVT1	ENSG00000249859
rs2859694	A	PVT1	ENSG00000249859
rs56026723	T	PVT1	ENSG00000249859
rs35716862	A	PVT1	ENSG00000249859
rs6470593	T	PVT1	ENSG00000249859
rs62512808***	A	PVT1	ENSG00000249859
rs2004326	C	PVT1	ENSG00000249859
rs78547245	G	PVT1	ENSG00000249859
rs148257498	A	PVT1	ENSG00000249859
rs115916738	A	PVT1	ENSG00000249859
rs145534320	A	PVT1	ENSG00000249859
rs16902501	C	PVT1	ENSG00000249859
rs201297121	ATTACATATTACAT	PVT1	ENSG00000249859
rs76209830	A	PVT1	ENSG00000249859
rs776885058	A	PVT1	ENSG00000249859
rs139026397	AATAAA	PVT1	ENSG00000249859
rs537151594	G	PVT1	ENSG00000249859
rs62512840***	G	PVT1	ENSG00000249859
rs117208114**	A	PVT1	ENSG00000249859
rs74559819**	A	PVT1	ENSG00000249859

rs1466247184	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs560930234	TGT	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs75843346	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs75855504	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs145631028	ACACACACA	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs149837755	TTAC	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs73710129	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs117362020**	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs75880747	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs79957048**	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs78767029	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs117307963	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs916141052	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs770564099	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs61743293***	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs4977754***	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498

Πίνακας 7. Εμφάνιση αποτελεσμάτων έπειτα από φιλτράρισμα των μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν σε lncRNAs σε άνδρες με τετατοσπερμία. Σημειώνονται οι μεταλλάξεις που είναι κοινές σε δύο (**) ή και τρεις (***) υποκατηγορίες ανδρικής υπογονιμότητας.

SNP	Variant	LncRNAs	Ensembl ID
rs76035707	T	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs147430031	G	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs559684919	-	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs142547171**	A	<i>MEG3</i>	ENSG00000214548
rs182698882	T	<i>UCA1</i>	ENSG00000214049
rs147453927	A	<i>TUG1</i>	ENSG00000253352
rs951410939	-	<i>HOTTIP</i>	ENSG00000243766
rs17501326	G	<i>HOTTIP</i>	ENSG00000243766
rs75608030**	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs80289709**	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs145861869	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs1293520072***	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs55789181	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs940647818	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs35294273	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs753147910	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs75852829	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs62512788	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs75299468	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs79798186	C	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs62512808***	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs62512809	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859

rs62512811	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs62512840***	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs1420354484	CCC	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs117208114**	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs74559819**	A	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs192616921	T	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs16902624	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs17382616**	G	<i>PVT1</i>	ENSG00000249859
rs16935753	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs60693449	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs143070667	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs73652847	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs73652849	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs2151279	G	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs61743293***	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs543665338	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs4977754***	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs41386451	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs61374441	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs7855162	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs146293394	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs372394016	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs73448370	T	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs1547704	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs144853922	C	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs141546182	G	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs35998780	TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs201704790	AT	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498
rs141991179	A	<i>CDKN2B-AS1</i>	ENSG00000240498

3. Διερεύνηση του ρόλου των SNPs με τη χρήση της βάσης δεδομένων SNPnexus

Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι παραπάνω πολυμορφισμοί εισήχθησαν στη βάση δεδομένων SNPnexus προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους και να εντοπιστεί ποιοι από αυτούς έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την ανδρική υπογονιμότητα, άλλες ασθένειες ή καρκίνο του αναπαραγωγικού συστήματος. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, η SNPnexus εμφάνισε αποτέλεσμα για 3 μεταλλάξεις.

Πίνακας 8. Εμφάνιση αποτελεσμάτων έπειτα από αναζήτηση στη βάση δεδομένων SNPnexus για τη διερεύνηση του ρόλου των πολυμορφισμών.

SNP	rs61743293	rs4977754	rs16935753
Ονομασία γονιδίου	<i>CDKN2B-AS1</i>	<i>CDKN2B-AS1</i>	<i>CDKN2B-AS1</i>
Σχετιζόμενος πολυμορφισμός	rs1011970	rs1011970	rs17694493 rs1011970
Σχετιζόμενη ασθένεια	Καρκίνος μαστού	Καρκίνος μαστού	Καρκίνος προστάτη Καρκίνος μαστού
Εντοπισμός	Ασθενοζωοσπερμία Ολιγοζωοσπερμία Τερατοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία Ολιγοζωοσπερμία Τερατοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία

Όλοι οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται στο γονίδιο *CDKN2B-AS1* το οποίο κωδικοποιεί για το lncRNA *ANRIL*. Οι 2 από αυτούς έχουν συσχετιστεί με τον πολυμορφισμό rs1011970 και τον καρκίνο του μαστού ενώ εντοπίζονται και στις 3 υποκατηγορίες υπογονιμότητας. Ο τρίτος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί επιπλέον με τον πολυμορφισμό rs17694493 και τον καρκίνο του προστάτη ενώ έχει ταυτοποιηθεί μόνο στον υποτύπο της τερατοζωοσπερμίας.

4. Μελέτη επίδρασης μεταλλάξεων στις θέσεις πρόσδεσης των lncRNAs με τη χρήση της βάσης δεδομένων LncNASNP2

Στο τελευταίο βήμα της ανάλυσης οι πολυμορφισμοί που προέκυψαν από το φιλτράρισμα εισήχθησαν στη βάση δεδομένων LncNASNP2 προκειμένου να μελετηθεί η ενδεχόμενη επίδρασή τους στη δυναμική των αλληλεπιδράσεων μεταξύ lncRNA – miRNA. Η LncNASNP2 εμφάνισε αποτέλεσμα για συνολικά 23 SNPs. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν τη δημιουργία (gain) ή/και την απώλεια (loss) θέσης πρόσδεσης miRNA πάνω σε lncRNA. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώθηκαν αλλαγές που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων και είναι αρκετά πιθανό να σχετίζονται με την εμφάνιση υπογονιμότητας στους άνδρες.

Πίνακας 9. Εμφάνιση αποτελεσμάτων στην LncRNASNP2 που αφορούν τη δημιουργία θέσης πρόσδεσης miRNA - lncRNA.

SNP	Ονομασία lncRNA	Δημιουργία θέσης πρόσδεσης: miRNA
rs72698763	<i>MEG3</i>	hsa-miR-3121-5p
rs77508107	<i>MEG3</i>	hsa-miR-3130-5p
		hsa-miR-203b-5p
		hsa-miR-6718-5p
		hsa-miR-4482-5p
		hsa-miR-383-3p
rs79315403	<i>GAS5</i>	hsa-miR-641
		hsa-miR-3617-5p
rs117549407	<i>PVT1</i>	hsa-miR-1290
rs118184290	<i>PVT1</i>	hsa-miR-875-3p
		hsa-miR-4463
		hsa-miR-873-3p
rs188541206	<i>PVT1</i>	hsa-miR-4659a-3p
		hsa-miR-4778-3p
		hsa-miR-4659b-3p
rs61743293	<i>ANRIL</i>	hsa-miR-4457
		hsa-miR-624-3p
		hsa-miR-513b-5p
rs4977754	<i>ANRIL</i>	hsa-miR-3611
rs75997850	<i>MEG3</i>	hsa-miR-4662a-5p
rs45497496	<i>MEG3</i>	hsa-miR-490-3p
		hsa-miR-7851-3p
		hsa-miR-619-3p
rs188154930	<i>ZFAS1</i>	hsa-miR-3687
		hsa-miR-4442
rs558352708	<i>ZFAS1</i>	hsa-miR-6894-3p
rs75608030	<i>PVT1</i>	hsa-miR-3198
		hsa-miR-6514-5p
		hsa-miR-8082
		hsa-miR-4534
		hsa-miR-4309
rs56026723	<i>PVT1</i>	hsa-miR-4690-5p
rs182698882	<i>UCA1</i>	hsa-miR-4671-5p
rs147453927	<i>TUG1</i>	hsa-miR-596
rs62512788	<i>PVT1</i>	hsa-miR-548av-3p
rs16935753	<i>ANRIL</i>	hsa-miR-3145-3p

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, συνολικά 18 πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε 7 lncRNAs οδηγούν στη δημιουργία 36 νέων θέσεων πρόσδεσης miRNA. Η δημιουργία αυτών των θέσεων ευνοεί αλληλεπιδράσεις μορίων οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν

πραγματοποιούνται. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και είναι αρκετά πιθανό να σχετίζονται με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας.

Πίνακας 10. Εμφάνιση αποτελεσμάτων στην LncRNASNP2 που αφορούν την απώλεια θέσης πρόσδεσης miRNA - lncRNA.

SNP	Ονομασία lncRNA	Απώλεια θέσης πρόσδεσης: miRNA
rs79315403	<i>GAS5</i>	hsa-miR-577
rs117549407	<i>PVT1</i>	hsa-miR-4320
rs118184290	<i>PVT1</i>	hsa-miR-5186
rs75997850	<i>MEG3</i>	hsa-miR-6804-5p
rs45497496	<i>MEG3</i>	hsa-miR-6125
rs142547171	<i>MEG3</i>	hsa-miR-4731-5p
		hsa-miR-637
rs558352708	<i>ZFAS1</i>	hsa-miR-632
		hsa-miR-654-3p
		hsa-miR-4288
rs75608030	<i>PVT1</i>	hsa-miR-4775
rs80289709	<i>PVT1</i>	hsa-miR-4775
rs56026723	<i>PVT1</i>	hsa-miR-6808-5p
		hsa-miR-583
		hsa-miR-6893-5p
		hsa-miR-940
		hsa-miR-1827
rs142547171	<i>MEG3</i>	hsa-miR-4731-5p
		hsa-miR-637
rs182698882	<i>UCA1</i>	hsa-miR-3150b-3p
		hsa-miR-6888-5p
		hsa-miR-151a-5p
rs80289709	<i>PVT1</i>	hsa-miR-4775
rs62512788	<i>PVT1</i>	hsa-miR-892c-5p
rs16935753	<i>ANRIL</i>	hsa-miR-888-3p
		hsa-miR-6719-3p

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, συνολικά 15 SNPs που εντοπίζονται σε 6 lncRNAs οδηγούν στην απώλεια 26 θέσεων πρόσδεσης miRNA. Η απώλεια αυτών των θέσεων αποτελεί σημαντικό εύρημα αφού οδηγεί στην εξάλειψη αλληλεπιδράσεων οι οποίες πιθανώς συνεισφέρουν σημαντικά στη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων και είναι κομβικές για την ανδρική γονιμότητα.

E. Συζήτηση

Η υπογονιμότητα αποτελεί μια συχνή ιατρική κατάσταση με σημαντικό ψυχολογικό, οικονομικό και κοινωνικό αντίκτυπο. Αποτελεί ένα πρόβλημα που αφορά τόσο το ανδρικό όσο και το γυναικείο φύλο ενώ εκτιμάται ότι η συνεισφορά του ανδρικού παράγοντα προσεγγίζει το 50% των περιπτώσεων. Οι πολλαπλές επιπτώσεις της ανδρικής υπογονιμότητας σε συνδυασμό με τα αυξανόμενα ποσοστά εμφάνισής της, υπαγορεύουν την ανάγκη για εκτενέστερη μελέτη των πολύπλοκων μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή, με απώτερο σκοπό την πρόληψη, την έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματικότερη θεραπεία. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τα μη κωδικοποιητικά RNAs με την ανδρική υπογονιμότητα ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η συμβολή των μιτοχονδρίων σε πολλές κυτταρικές διεργασίες και ασθένειες. Εντούτοις, ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν πολυμορφισμοί σε μη κωδικοποιητικά RNAs τα οποία στοχεύουν γονίδια που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες και μετά την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να εντοπιστούν μοναδικές μεταλλάξεις στους υπογόνιμους άνδρες συγκριτικά με τους νορμοσπερμικούς. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκρίσεις μεταξύ νορμοσπερμικών και τριών υποκατηγοριών υπογόνιμων ανδρών (τερατοσπερμικοί, ολιγοσπερμικοί, ασθενοσπερμικοί). Από το φιλτράρισμα που πραγματοποιήθηκε συγκεντρώθηκαν συνολικά 121 σημαντικοί πολυμορφισμοί σε 9 lncRNAs. Από τη σύγκριση ασθενοσπερμικοί - νορμοσπερμικοί προέκυψαν 35 πολυμορφισμοί σε 6 lncRNAs, από τη σύγκριση ολιγοσπερμικοί - νορμοσπερμικοί 56 πολυμορφισμοί σε 5 lncRNAs και από τη σύγκριση τερατοσπερμικοί - νορμοσπερμικοί εντοπίστηκαν 51 πολυμορφισμοί σε 6 lncRNAs. Αυτοί οι πολυμορφισμοί ακολούθως εισήχθησαν σε διάφορες βάσεις δεδομένων προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος και η επίδρασή τους καθώς και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο ή άλλες ασθένειες. Η ανδρική υπογονιμότητα εξάλλου συχνά συνδέεται με διάφορους τύπους καρκίνου, ιδιαίτερα του αναπαραγωγικού συστήματος (Kyrgiafini et al., 2022). Επιπλέον, έγινε έλεγχος της επίδρασης των μεταλλάξεων αυτών στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ lncRNAs και miRNAs.

Από τον λειτουργικό χαρακτηρισμό προέκυψαν 3 πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στο γονίδιο *CDKN2B-AS1* το οποίο κωδικοποιεί για το μόριο *ANRIL*. Οι μεταλλάξεις αυτές συσχετίζονται με καρκίνους του αναπαραγωγικού συστήματος (μαστού, προστάτη) και άλλους καρκίνους. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι 15 SNPs οδηγούν σε απώλεια θέσης πρόσδεσης 23 μορίων miRNA ενώ 18 SNPs οδηγούν σε δημιουργία θέσης πρόσδεσης 36 μορίων miRNA. Οι αλληλεπιδράσεις που ευνοούνται ή εξαλείφονται ως αποτέλεσμα των παραπάνω μεταλλάξεων

ενδέχεται να μεταβάλλουν την έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και πιθανώς να σχετίζονται με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι αρκετοί από τους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν ήταν κοινοί μεταξύ των τριών υποκατηγοριών υπογονιμότητας. Εντοπίστηκαν δηλαδή ως μοναδικές μεταλλάξεις σε δύο ή ακόμη και στις τρεις συγκρίσεις.

Σημαντικός αριθμός μελετών υποδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο των μιτοχονδρίων στη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων κυρίως μέσω της συμβολής τους στην παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας σε μορφή ATP. Η ATP χρησιμοποιείται τόσο για την κίνηση της ουράς του σπερματοζωαρίου όσο και για άλλες κρίσιμες διαδικασίες, όπως η ακροσωμική αντίδραση, η σύντηξη των γαμετών κ.ά. (Irigoyen et al., 2022). Αναπόφευκτα, οποιαδήποτε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνεπάγεται μειωμένη παραγωγή ATP οδηγώντας σε προβλήματα γονιμότητας (Boguenet et al., 2021). Η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων σε άνδρες με υπογονιμότητα μπορεί να υποβαθμίζεται από ποικίλους παράγοντες (γενετικούς, περιβαλλοντικούς, οξειδωτικό στρες, ηλικία κ.ά.) με συνέπεια την αδυναμία του σπερματοζωαρίου να γονιμοποιήσει επιτυχώς το ωάριο (Kamínski et al., 2020).

Όσον αφορά το ρόλο των lncRNAs στην ανδρική υπογονιμότητα, έχει παρατηρηθεί ότι αρκετά μόρια εκφράζονται ιστοειδικά σε όρχεις ενήλικων ανδρών και πιθανολογείται πως συμμετέχουν στη διαδικασία της σπερματογένεσης, μέσω της επίδρασής τους στην επιγενετική κατάσταση των γαμετικών κυττάρων, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσής τους (Mukherjee et al., 2014). Πολλές επίσης μελέτες αποδεικνύουν ότι ορισμένα lncRNAs επηρεάζουν διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες είναι σημαντικές για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων καθώς και για την ικανότητά τους να γονιμοποιούν το ωάριο (Aliakbari et al., 2021).

Από την παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι μεταλλάξεις σε περισσότερα από 6 lncRNAs πιθανόν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων τα οποία είναι κομβικά για τη δυναμική και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων συμβάλλοντας στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Τα πιο σημαντικά lncRNAs, όπως προκύπτει, είναι τα *ANRIL* και *PVT1* τα οποία έχουν συσχετιστεί με ποικίλες διαδικασίες της μιτοχονδριακής λειτουργίας.

Σύμφωνα με μελέτες, περίπου το 36-45% των γεννητικών κυττάρων εκφυλίζονται κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης. Τα αίτια δεν είναι γνωστά, ωστόσο πιθανολογείται ότι ο εκφυλισμός αυτός μπορεί να είναι ένας μηχανισμός εξάλειψης γενετικά ακατάλληλων γαμετών. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο σε αυτή την εκφυλιστική διαδικασία για να εξασφαλίσουν την παραγωγή καλής ποιότητας σπερματοζωαρίων στα αρσενικά άτομα. Η παραπάνω αποπτωτική διαδικασία πραγματοποιείται έπειτα από μιτοχονδριακή σηματοδότηση και η παρεμπόδιση της ενδεχομένως να συμβάλλει στην υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος και την εμφάνιση υπογονιμότητας (Vertika et al., 2020).

Άξιο αναφοράς είναι ότι τα *ANRIL* και *PVT1* φαίνεται να ρυθμίζουν τη διαδικασία της απόπτωσης μέσω της επίδρασής τους στα μιτοχόνδρια. Πιο συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις υπερέκφρασης του *ANRIL* έχει παρατηρηθεί αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης ενώ αποδεικνύεται ότι το μόριο αυτό έχει ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 (B-cell lymphoma 2) οι οποίες ρυθμίζουν το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι προωθώντας ή εμποδίζοντας τον κυτταρικό θάνατο (De Raeye et al., 2018). Σημαντικός είναι επίσης ο αριθμός των μελετών που επισημαίνουν τον αντι-αποπτωτικό ρόλο του *ANRIL* σε καρκινικά κύτταρα, ιδιαίτερα σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και του μαστού (Alsibai et al., 2019).

Οι δημοσιεύσεις που αφορούν το *PVT1* είναι εξίσου πολυάριθμες ενώ οι συσχετίσής του με τα μιτοχόνδρια έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Ειδικότερα, το *PVT1* συνεισφέρει στις διαδικασίες της κυτταρικής αναπνοής και αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή αρκετών μιτοχονδριακών διεργασιών όπως η αυτοφαγία, η μιτοφαγία, η σύντηξη και η διαίρεση κ.ά. (F. Wu et al., 2021). Η μιτοφαγία αποτελεί κομβικής σημασίας διαδικασία για την ανδρική γονιμότητα αφού εξασφαλίζει την άμεση απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα σπερματοζωάρια προστατεύοντάς τα από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Όπως σημειώνουν ορισμένες έρευνες, η απορρύθμιση της μιτοφαγίας μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης και να συνεισφέρει στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας (Wang et al., 2022). Επιπλέον, ο ρόλος του *PVT1* στη ρύθμιση της απόπτωσης είναι επιβεβαιωμένος και παρόμοιος με του *ANRIL* και εξυπηρετείται μέσω μηχανισμών (αναστολή σηματοδότησης, μείωση ROS, παρεμπόδιση απόπτωσης κ.ά.) οι οποίοι απομακρύνουν τα ελαττωματικά σπερματοζωάρια από το αποπτωτικό μονοπάτι με αποτέλεσμα τη συνολική υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος (Li et al., 2021).

Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια συνεισφέρουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού των σπερματοζωαρίων. Η απορρύθμιση της λειτουργίας τους μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι επιβλαβείς για το DNA του σπέρματος. Το ελαττωματικό DNA στο σπερματοζωάριο επηρεάζει τη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου, οδηγώντας σε υπογονιμότητα ή αυξημένο κίνδυνο αποβολής. Οι ROS αποτελούν «δίκολο μαχαίρι» στη ρύθμιση της λειτουργικότητας του σπέρματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι απαραίτητες για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα ενώ σε επόμενα στάδια μπορούν να αυξήσουν τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να επιτευχθεί η σύντηξη του σπερματοζωαρίου με το ωάριο. Αντίθετα, τα υπερβολικά υψηλά επίπεδα ROS έχουν επιβλαβή δράση στη λιπιδική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων επηρεάζοντας την κινητικότητα του σπέρματος ενώ ταυτόχρονα μπορεί να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες στο DNA (Wang et al., 2022).

Όπως φαίνεται, τα lncRNAs που ξεχώρισαν από την παρούσα μελέτη έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν αρκετές φορές με το οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα *ANRIL* και *PVT1* μπορούν να διαμορφώσουν τις κυτταρικές αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες ρυθμίζοντας την παραγωγή αλλά και την αδρανοποίηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Alessio et al., 2019) (Zhang et al., 2020). Όσον αφορά το *PVT1*, έχει διαπιστωθεί επιπλέον ότι μπορεί να επηρεάσει την έκφραση αντιοξειδωτικών παραγόντων ενώ σημαντική παρατήρηση αποτελεί η απορρύθμιση της έκφρασής του σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες, όπως συμβαίνει στον καρκίνο του προστάτη κ.ά. (J. Yang et al., 2017).

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν σε lncRNAs αποκλειστικά σε υπογόνιμους άνδρες των τριών υποκατηγοριών (ασθενοσπερμικοί, ολιγοσπερμικοί, τερατοσπερμικοί) καθώς δεν εντοπίστηκαν μοναδικοί πολυμορφισμοί στα miRNAs της λίστας που δημιουργήθηκε αρχικά. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι τα miRNAs αποτελούνται από μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων οπότε η εύρεση μεταλλάξεων καθίσταται δυσκολότερη. Μολονότι τα lncRNAs αποτελούν μια ελάχιστα μελετημένη κατηγορία non-coding RNAs, αποδεικνύεται ότι πιθανόν διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας μέσω της επίδρασής τους στη μιτοχονδριακή λειτουργία και δυναμική. Η παρούσα διπλωματική αναδεικνύει την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των lncRNAs και των μιτοχονδριακών διεργασιών, υπαγορεύοντας τον πιθανό ρόλο τους στην αναπαραγωγική υγεία. Διερευνώντας τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων στα μιτοχόνδρια και στη λειτουργία τους, αποκαλύπτονται πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας.

Θα πρέπει βέβαια να τονιστεί ότι η παρούσα μελέτη εμφανίζει κάποιους περιορισμούς. Αρχικά, απαιτείται έλεγχος σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, τόσο νορμοσπερμικών όσο και μη νορμοσπερμικών ανδρών, και πραγματοποίηση λειτουργικών πειραμάτων καθώς η διερεύνηση του ρόλου των πολυμορφισμών έγινε με βάση βιοπληροφορικά εργαλεία και μεθόδους. Επιπλέον, απαιτείται περαιτέρω μελέτη του ρόλου των lncRNAs που εντοπίστηκαν ώστε να προσδιοριστεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης τους αλλά και περαιτέρω μελέτη των πολυμορφισμών που βρέθηκαν σε αυτά.

Συμπερασματικά, παρόλο που η επίδραση των παραπάνω πολυμορφισμών στην λειτουργία των μιτοχονδρίων και στην εμφάνιση υπογονιμότητας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, η παρούσα μελέτη συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα και αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο των lncRNAs σε αυτή. Αρκετοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς θα μπορούσαν ενδεχομένως να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες, εφόσον εντοπίζονται μόνο στους ασθενείς ή μόνο στους υγιείς, αλλά και να χρησιμοποιηθούν σε

μελλοντικές μελέτες για την ανεύρεση συγκεκριμένων μονοπατιών που εμπλέκονται στο μηχανισμό εμφάνισης της ανδρικής υπογονιμότητας.

Κλείνοντας, η ενδελεχής και ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα γονιμότητας, πρόκειται να συμβάλει σε μία ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με το προφίλ του ασθενούς ώστε να προταθούν κατάλληλες τεχνικές αντιμετώπισης που θα οδηγήσουν σε μια επιτυχή κύηση. Προσεγγίσεις σαν αυτή μπορούν να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση, την εξατομικευμένη θεραπεία και τη διαχείριση της ανδρικής υπογονιμότητας, προσφέροντας έτσι ελπίδα σε άτομα και ζευγάρια που αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην προσπάθειά τους να γίνουν γονείς.

Βιβλιογραφία

- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2020). Male infertility. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10271, pp. 319–333). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Sharma, R., Gupta, S., Finelli, R., Parekh, N., Selvam, M. K. P., Pompeu, C. P., Madani, S., Belo, A., Darbandi, M., Singh, N., Darbandi, S., Covarrubias, S., Sadeghi, R., Arafa, M., Majzoub, A., Caraballo, M., Giroski, A., McNulty, K., ... Henkel, R. (2022). Standardized Laboratory Procedures, Quality Control and Quality Assurance Are Key Requirements for Accurate Semen Analysis in the Evaluation of Infertile Male. In *World Journal of Men's Health* (Vol. 40, Issue 1, pp. 52–65). Korean Society for Sexual Medicine and Andrology. <https://doi.org/10.5534/wjmh.210022>
- Alessio, E., Buson, L., Chemello, F., Peggion, C., Grespi, F., Martini, P., Massimino, M. L., Pacchioni, B., Millino, C., Romualdi, C., Bertoli, A., Scorrano, L., Lanfranchi, G., & Cagnin, S. (2019). Single cell analysis reveals the involvement of the long non-coding RNA Pvt1 in the modulation of muscle atrophy and mitochondrial network. *Nucleic Acids Research*, 47(4), 1653–1670. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz007>
- Aliakbari, F., Eshghifar, N., Mirfakhraie, R., Pourghorban, P., & Azizi, F. (2021). Coding and non-coding RNAs, as male fertility and infertility biomarkers. In *International Journal of Fertility and Sterility* (Vol. 15, Issue 3, pp. 158–166). Royan Institute (ACECR). <https://doi.org/10.22074/ijfs.2021.134602>
- Alsibai, K. D., Vacher, S., Meseure, D., Nicolas, A., Lae, M., Schnitzler, A., Chemlali, W., Cros, J., Longchamp, E., Cacheux, W., Pignot, G., Callens, C., Pasmant, E., Allory, Y., & Bieche, I. (2019). High positive correlations between ANRIL and p16-CDKN2A/p15-CDKN2B/p14-ARF gene cluster overexpression in multi-tumor types suggest deregulated activation of an ANRIL-ARF bidirectional promoter. *Non-Coding RNA*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/ncrna5030044>
- Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., & Khodadadian, A. (2020). Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. In *International Journal of General Medicine* (Vol. 13, pp. 29–41). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S241099>
- Barbu, M. G., Thompson, D. C., Suciu, N., Voinea, S. C., Cretoiu, D., & Predescu, D. V. (2021). The roles of micrnas in male infertility. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1–13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22062910>
- Beermann, J., Piccoli, M.-T., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev*, 96, 1297–1325. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2015.-Ad>
- Boguenet, M., Bouet, P. E., Spiers, A., Reynier, P., & May-Panloup, P. (2021). Mitochondria: Their role in spermatozoa and in male infertility. In *Human Reproduction Update* (Vol. 27, Issue 4, pp. 697–719). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab001>

- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: IncRNA localization and function. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 220, Issue 2). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/JCB.202009045>
- Carré, J., Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. (2017). *Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review*. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0291-8>
- Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0330-5>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Ridwan Amode, M., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Database Issue Nucleic Acids Research*, 50, 989. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. In *Molecular Immunology* (Vol. 112, pp. 82–92). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>
- Darren J Katz, Patrick Teloken, & Ohad Shoshany. (2017). *Male infertility – The other side*.
- 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, 109–113. <https://doi.org/10.1093/nar/gky399>
- De Paepe, B., Lefever, S., & Mestdagh, P. (2018). How long noncoding RNAs enforce their will on mitochondrial activity: regulation of mitochondrial respiration, reactive oxygen species production, apoptosis, and metabolic reprogramming in cancer. In *Current Genetics* (Vol. 64, Issue 1, pp. 163–172). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0744-1>
- Dobbs, R. W., Sofer, L., & Ohlander, S. (2018). Y chromosome microdeletions. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 238–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64538-5>
- Fathi Najafi, T., Latifnejad Roudsari, R., Namvar, F., Ghavami Ghanbarabadi, V., Hadizadeh Talasaz, Z., Esmali, M., & Author, C. (2015). Air Pollution and Quality of Sperm: A Meta-Analysis. *Iran Red Crescent Med J*, 17(4), 26930. [https://doi.org/10.5812/ircmj.17\(4\)2015.26930](https://doi.org/10.5812/ircmj.17(4)2015.26930)
- Ferlin, A., Dipresa, S., Delbarba, A., Maffezzoni, F., Porcelli, T., Cappelli, C., & Foresta, C. (2019). Contemporary genetics-based diagnostics of male infertility. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 19, Issue 7, pp. 623–633). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1633917>
- Finelli, R., Mottola, F., & Agarwal, A. (2022). Impact of Alcohol Consumption on Male Fertility Potential: A Narrative Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010328>

- Gunes, S., & Esteves, S. C. (2021). Role of genetics and epigenetics in male infertility. In *Andrologia* (Vol. 53, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/and.13586>
- Gusic, M., & Prokisch, H. (2020). ncRNAs: New Players in Mitochondrial Health and Disease? *Frontiers in Genetics*, 11, 95. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00095/BIBTEX>
- Hombach, S., & Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, biology and functioning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 937, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1
- Iovine, J. C., Claypool, S. M., & Alder, N. N. (2021). Mitochondrial compartmentalization: emerging themes in structure and function. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 46, Issue 11, pp. 902–917). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.06.003>
- Irigoyen, P., Pintos-Polasky, P., Rosa-Villagran, L., Skowronek, M. F., Cassina, A., & Sapiro, R. (2022). Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.926684>
- Jensen, C. F. S., Østergren, P., Dupree, J. M., Ohl, D. A., Sønksen, J., & Fode, M. (2017). Varicocele and male infertility. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 523–533). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrrol.2017.98>
- Joshi, M., & Rajender, S. (2020). *Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility*. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00660-6>
- Kabekkodu, S. P., Shukla, V., Varghese, V. K., d'Souza, J., Chakrabarty, S., & Satyamoorthy, K. (2018). Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews*, 93(4), 1955–1986. <https://doi.org/10.1111/brv.12428>
- Kamínski, P., Baszynski J., Jerzak, I., Kavanagh, B. P., Nowacka-Chiari, E., Polanin, M., Szymá Nski, M., Woźniak, A. W., & Kozera, W. (2020). External and Genetic Conditions Determining Male Infertility. *Int. J. Mol. Sci*, 21, 5274. <https://doi.org/10.3390/ijms21155274>
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). *Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). *Genetics of male infertility*. <https://doi.org/10.1038/s41585>
- Kyrgiafini, M. A., Markantoni, M., Sarafidou, T., Chatziparasidou, A., Christoforidis, N., & Mamuris, Z. (2020). Genome-wide association study identifies candidate markers related to lincRNAs associated with male infertility in the Greek population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(11), 2869–2881. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01937-w>
- Kyrgiafini, M. A., Sarafidou, T., & Mamuris, Z. (2022). The Role of Long Noncoding RNAs on Male Infertility: A Systematic Review and In Silico Analysis. In *Biology* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology11101510>
- Li, F., Liu, J., Tang, S., Yan, J., Chen, H., Li, D., & Yan, X. (2021). Quercetin regulates inflammation, oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial structure and function in H9C2 cells by promoting PVT1 expression. *Acta Histochemica*, 123(8). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151819>

- Liu, Y., Ding, W., Yu, W., Zhang, Y., Ao, X., & Wang, J. (2021). *Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.005>
- Mann, U., Shiff, B., & Patel, P. (2020). Reasons for worldwide decline in male fertility. In *Current opinion in urology* (Vol. 30, Issue 3, pp. 296–301). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000745>
- Mukherjee, A., Koli, S., & Reddy, K. V. R. (2014). Regulatory non-coding transcripts in spermatogenesis: Shedding light on “dark matter.” In *Andrology* (Vol. 2, Issue 3, pp. 360–369). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00183.x>
- Panning, B. (2008). X-chromosome inactivation: The molecular basis of silencing. *Journal of Biology*, 7(8). <https://doi.org/10.1186/jbiol95>
- Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). *Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions*. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Rachel Busuttil Leaver. (2016). *Male infertility. An overview of causes and treatment options*.
- Sansone, A., Dato, C. Di, De Angelis, C., Menafrà, D., Pozza, C., Pivonello, R., Isidori, A., & Gianfrilli, D. (2018). *Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility*. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0320-7>
- Shah, R., & Gupta, C. (2017). Advances in sperm retrieval techniques in azoospermic men: A systematic review. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.010>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 96–118). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Iny Stein, T., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
- Tüttelmann, F., Ruckert, C., & Röpke, A. (2018). Spermatogenesestörungen: Perspektiven für erweiterte genetische Diagnostik nach 20 Jahren unveränderter Routine. In *Medizinische Genetik* (Vol. 30, Issue 1, pp. 12–20). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0181-7>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 62, pp. 2–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Vashisht, A., & Gahlay, G. K. (2020). *Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges*. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa016/5743508>
- Vertika, S., Singh, K. K., & Rajender, S. (2020). Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility – An update. In *Mitochondrion* (Vol. 54, pp. 26–40). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.003>

- Wang, J. J., Wang, S. X., Tehmina, Feng, Y., Zhang, R. F., Li, X. Y., Sun, Q., & Ding, J. (2022). Age-Related Decline of Male Fertility: Mitochondrial Dysfunction and the Antioxidant Interventions. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15050519>
- Wiweko, B., & Utami, P. (2017). Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic and Clinical Andrology*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s12610-016-0046-3>
- Wu, F., Huang, W., Tan, Q., Guo, Y., Cao, Y., Shang, J., Ping, F., Wang, W., & Li, Y. (2021). ZFP36L2 regulates myocardial ischemia/reperfusion injury and attenuates mitochondrial fusion and fission by LncRNA PVT1. *Cell Death and Disease*, 12(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03876-5>
- Wu, T., & Du, Y. (2017). LncRNAs: From basic research to medical application. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 13, Issue 3, pp. 295–307). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16968>
- Yang, J., Li, C., Mudd, A., & Gu, X. (2017). *LncRNA PVT1 predicts prognosis and regulates tumor growth in prostate cancer*. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1387048>
- Yang, J. X., Rastetter, R. H., & Wilhelm, D. (2016). Non-coding RNAs: An introduction. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 886, pp. 13–32). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_2
- Yang, Y., Wang, D., Miao, Y.-R., Wu, X., Luo, H., Cao, W., Yang, W., Yang, J., Guo, A.-Y., & Gong, J. (2023). lncRNASNP v3: an updated database for functional variants in long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac981>
- Zhang, C., Ge, S., Gong, W., Xu, J., Guo, Z., Liu, Z., Gao, X., Wei, X., & Ge, S. (2020). LncRNA ANRIL acts as a modular scaffold of WDR5 and HDAC3 complexes and promotes alteration of the vascular smooth muscle cell phenotype. *Cell Death and Disease*, 11(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2645-3>
- Zheng, D., Zeng, L., Yang, R., Lian, Y., Zhu, Y.-M., Liang, X., Tang, L., Wang, H., Cao, Y., Hao, G., Liu, J., Zhao, J., Wang, R., Mol, B. W., Li, R., Huang, H.-F., & Qiao, J. (2019). *Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional in vitro fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): protocol for a multicentre randomised controlled trial*. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030366>
- Zhou, G., Zhang, M., Zhang, J., Feng, Y., Xie, Z., Liu, S., Zhu, D., & Luo, Y. (2022). The gene regulatory role of non-coding RNAs in non-obstructive azoospermia. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.959487>