



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΜΙΚΡΩΝ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ
RNAs (miRNAs) ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ**

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF miRNAs IN MALE INFERTILITY
USING NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)**



ΒΕΣΕΛΙΝ ΒΕΣΕΛΙΝΟΒ ΒΑΣΙΛΕΒ

ΛΑΡΙΣΑ 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

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

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

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

ΓΙΑΝΝΟΥΛΗΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. Ανδρική υπογονιμότητα.....	7
1.1 Ορισμός και Επιδημιολογικά στοιχεία	7
1.2 Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας.....	7
1.3 Τύποι ανδρικής υπογονιμότητας	9
1.4 Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας.....	10
2. Μη κωδικοποιητικά RNAs	15
2.1 Γενικές πληροφορίες – Υποκατηγορίες ncRNAs.....	15
2.2 miRNAs	16
2.3 Μηχανισμοί βιογένεσης των miRNAs	16
2.4 Δράση miRNAs.....	17
2.5 miRNAs και ανδρική υπογονιμότητα	18
B. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	20
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
1. Επιλογή ασθενών και βιολογικού υλικού.....	21
2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση του γονιδιώματος.....	21
2.1 Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Next Generation Sequencing (NGS)	21
3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός των μοναδικών πολυμορφισμών	22
4. Βάσεις δεδομένων.....	24
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
1. Αναλύσεις	31
1.1 Εντοπισμός πολυμορφισμών σε miRNAs (miRNASNP)	31
1.2 Δεύτερη Ανάλυση.....	38
1.3 Διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων που στοχεύονται από τα miRNAs	47
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
1. Ολιγοσπερμία.....	58
1.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι p53	58
1.2 Κυτταρικός κύκλος και πολλαπλασιασμός – Άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.....	60
2. Ασθενοσπερμία	64
3. Τερατοσπερμία.....	66
4. Συμπέρασμα	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	68

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74
--------------------------	-----------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γεγονός πως η υπογονιμότητα αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα που πλήττει την κοινωνία και προβληματίζει αρκετά ζευγάρια. Η διαταραχή αυτή μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα προβλημάτων όπως οικονομικών, ψυχολογικών και κοινωνικών. Φαίνεται να είναι αρκετά διαδεδομένη καθώς απασχολεί ένα στα έξι ζευγάρια και μελέτες δείχνουν πως στο 50% των περιπτώσεων την ευθύνη φέρει ο άνδρας. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μία σύνθετη και πολυπαραγοντική διαταραχή η οποία μπορεί να προκύψει από τον τρόπο ζωής, από περιβαλλοντικούς παράγοντες, από το γενετικό υπόβαθρο ή συχνότερα από συνδυασμό αιτιών. Μελέτες αποδεικνύουν ότι σημαντικό ρόλο στην εμφάνισή της παίζουν επίσης τα μη κωδικοποιητικά RNAs και ιδιαίτερα τα microRNAs (miRNAs). Στην παρούσα διπλωματική εργασία ερευνώνται πολυμορφισμοί σε περιοχές που κωδικοποιούν για miRNAs και διερευνάται ο ρόλος των γονιδίων-στόχων αυτών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος και αίματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες από τον ελληνικό πληθυσμό. Έγινε απομόνωση DNA και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος με τη μέθοδο αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS). Ακολούθησε ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων ώστε να εντοπιστούν μοναδικοί πολυμορφισμοί που παρατηρούνται μόνο στους υπογόνιμους άνδρες και όχι στους νορμοσπερμικούς. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά βάσεων δεδομένων για την ανάλυσή τους. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε μια λίστα miRNAs στα οποία εντοπίζονται οι παραπάνω πολυμορφισμοί κι έπειτα διερευνήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω miRNAs με γονίδια-στόχους. Τέλος, διερευνήθηκε ο ρόλος των παραπάνω γονιδίων για τους τρεις υποτύπους της ανδρικής υπογονιμότητας που μελετήθηκαν (ασθενοσπερμία, τερατοσπερμία, ολιγοσπερμία). Εντοπίστηκε ένα μεγάλο πλήθος πολυμορφισμών σε πολλά miRNAs τα οποία επηρεάζουν γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης, πολλά από αυτά εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκίνου. Περαιτέρω μελέτη των παραπάνω πολυμορφισμών και των miRNAs μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερο χαρακτηρισμό της αιτιολογίας της ανδρικής υπογονιμότητας καθώς και στην ανάπτυξη μεθόδων για την αντιμετώπισή της.

ABSTRACT

It is a fact that infertility constitutes a serious problem affecting society and causing concern for many couples. This disorder can lead to a multitude of problems, including financial, psychological, and social issues. It appears to be quite widespread, affecting one in six couples, and studies show that in 50% of cases, the responsibility lies with the man. Male infertility is a complex and multifactorial disorder that can result from lifestyle, environmental factors, genetic background, or more often, a combination of causes. Studies demonstrate that non-coding RNAs, particularly microRNAs (miRNAs), also play a significant role in its manifestation. In this thesis, polymorphisms in regions encoding miRNAs are investigated, and the role of their target genes is explored. For this purpose, sperm and blood samples from normospermic and non-normospermic men from the Greek population were used. DNA was isolated and whole genome sequencing was performed using next-generation sequencing (NGS). Data analysis and processing followed to identify unique polymorphisms observed only in infertile men and not in normospermic men. Subsequently, a series of databases was used for their analysis. Specifically, a list of miRNAs with identified polymorphisms was created, and the interactions of these miRNAs with target genes were investigated. Finally, the role of these genes in the three subtypes of male infertility studied (asthenospermia, teratospermia, oligospermia) was explored. A large number of polymorphisms were identified in many miRNAs, which affect genes related to the cell cycle, apoptosis, and cell proliferation. Additionally, many of these are involved in the development of cancer. Further study of these polymorphisms and miRNAs could lead to a better characterization of the etiology of male infertility and the development of methods to address it.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανδρική υπογονιμότητα

1.1 Ορισμός και Επιδημιολογικά στοιχεία

Ένα μείζον πρόβλημα το οποίο καλείται να αντιμετωπίσει η σημερινή κοινωνία είναι αυτό της υπογονιμότητας. Η υπογονιμότητα φαίνεται να απασχολεί περισσότερους από 186 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, ασκώντας ψυχολογική, κοινωνική και οικονομική επιρροή, πέραν του αντίκτυπου στην αναπαραγωγή, στο ζευγάρι ^[1]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ως υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται η ανικανότητα επίτευξης σύλληψης έπειτα από το πέρασ 12 μηνών ανελλιπών προσπαθειών άνευ προφυλάξεως. Η πάθηση αυτή είναι παρούσα στο 8-12% των ζευγαριών διεθνώς και προκαλείται είτε από αίτια εκ της γυναικείας μεριάς, είτε εκ της ανδρικής, ενώ δεν αποκλείεται και συνδυασμός αιτιών ^[2]. Οι λόγοι εμφάνισης υπογονιμότητας στις γυναίκες έχουν διερευνηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, εν αντιθέσει με τη διερεύνηση αυτών στους άνδρες, όπου εκεί το γνωστικό επίπεδο υστερεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στην πολυπλοκότητα της πάθησης αυτής δεδομένου ότι μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς ή/και γενετικούς παράγοντες, αλλά και στο γεγονός ότι στη διαδικασία μόνο της σπερματογένεσης συμμετέχουν περίπου 2.000 γονίδια, καθιστώντας τη διαδικασία της έρευνας δαιδαλώδη. Γενικώς, η ανδρική υπογονιμότητα είναι μία πολυπαραγοντική παθολογική κατάσταση η οποία εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια στο φαινότυπο ^[3]. Περίπου το 7% των ανδρών πάσχει από αυτήν, ενώ τα στοιχεία δείχνουν αποκλειστική ευθύνη του ανδρός στο 20-30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Επιπλέον, σε ένα ποσοστό 20% των περιπτώσεων, ο ανδρικός παράγοντας φαίνεται να συμβάλλει σε συνδυασμό με τον γυναικείο οδηγώντας καθολικά σε ένα ποσοστό του 50% ^[2]. Συνεπώς, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη της διεξοδικότερης και περαιτέρω έρευνας επί του θέματος.

1.2 Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Η αξιολόγηση και η διάγνωση πιθανής ύπαρξης υπογονιμότητας στον άνδρα επιβάλλεται όταν παρατηρείται αποτυχία επίτευξης σύλληψης για διάστημα 12 μηνών ή για διάστημα 6 μηνών σε περίπτωση που η σύντροφος είναι 35 ετών και άνω. Επιπρόσθετα, συνετό θεωρείται ο άνδρας να υποβάλλεται σε διαγνωστικές εξετάσεις εάν υπάρχουν προβληματισμοί σχετικά με την γονιμότητά του λόγω ιστορικού ή προηγούμενων παθήσεων και τραυματισμών ^[4]. Η εξέταση απαρτίζεται από τα εξής στάδια:

- 1) **Ιστορικό εξεταζόμενου:** Στη φάση αυτή συλλέγεται το πλήρες ιστορικό του εξεταζόμενου στο οποίο συμπεριλαμβάνεται η φαρμακευτική αγωγή, διεξαχθείσες εγχειρήσεις, εάν υπήρξαν, πιθανά γενετικά ή περιβαλλοντικά αίτια. Επιπλέον, γίνεται αναφορά των ερωτικών συνευρέσεων, αλλά και του ιατρικού ιστορικού, του τρόπου ζωής που ακολουθεί ο εξεταζόμενος, καθώς και της ύπαρξης παθήσεων συναφών με την πρόκληση υπογονιμότητας στην οικογένειά του.

- 2) **Φυσική εξέταση:** Στη φάση αυτή γίνεται η εξέταση της ανατομίας και φυσιολογίας του πέους του εξεταζόμενου, ελέγχονται τα χαρακτηριστικά των όρχεων και της επιδιδυμίδας, όπως και η περίπτωση ύπαρξης κισσοκήλης ή ενδείξεις προηγούμενων επεμβάσεων ή τραυματισμών. Επιπλέον, ελέγχονται και τα δευτερεύοντα φυλετικά χαρακτηριστικά.
- 3) **Ενδοκρινική εξέταση:** Η δράση συγκεκριμένων ορμονών συνδέεται άμεσα με την ρύθμιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης. Για τον λόγο αυτόν γίνεται η καταμέτρηση κυρίως των επιπέδων της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και της πρωινής τεστοστερόνης με λήψη αίματος. Σε περίπτωση που ο εξεταζόμενος έχει χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης συνιστάται η διεξαγωγή περαιτέρω εξετάσεων, όπως η καταμέτρηση της ελεύθερης τεστοστερόνης, της ωχρινότροπου ορμόνης και της προλακτίνης. Τα αποτελέσματα των ενδοκρινικών εξετάσεων μπορούν στις περισσότερες περιπτώσεις να υποδείξουν την αιτία της πάθησης.
- 4) **Ανάλυση σπέρματος:** Η ανάλυση σπέρματος αποτελεί την πιο κρίσιμη εξέταση, καθώς αυτή ως επί το πλείστον θα υποδείξει εν τέλει την ύπαρξη της διαταραχής. Για την επιτέλεσή της απαιτείται επαρκής συλλογή δείγματος σπέρματος ώστε να προκύψει αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα. Η δειγματοληψία είναι προτιμότερο να γίνεται απευθείας στο εξειδικευμένο εργαστήριο, αλλά είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και κατ' οίκον με την εναπόθεση του δείγματος σε αποστειρωμένο δοχείο. Το δείγμα ωστόσο, θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία σώματος έως την παραλαβή του από το εξεταστικό κέντρο. Προσοχή χρειάζεται να δοθεί και στο διάστημα αποχής από οποιαδήποτε σεξουαλική πράξη που πρέπει να τηρήσει ο εξεταζόμενος. Το ιδανικό χρονικό διάστημα είναι αυτό των δύο ημερών έως τεσσάρων ημερών, καθώς εάν συλλεχθεί νωρίτερα ίσως προκύψει σφάλμα όσον αφορά τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, ενώ εάν γίνει η συλλογή αργότερα πιθανώς παρουσιαστεί κάποιο πρόβλημα που σχετίζεται με την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Η ανάλυση σπέρματος είναι συνετό να γίνεται ανά τρεις μήνες για ασθενείς με ήπια συμπτώματα, ενώ για αυτούς που πάσχουν από олиγοσπερμία ή αζωοσπερμία κάθε δύο με τέσσερις εβδομάδες.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) έχει ορίσει τιμές ορίου οι οποίες αξιοποιούνται ως βάση για τις μετρήσιμες παραμέτρους οι οποίες εξετάζονται στην ανάλυση σπέρματος. Αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Οι τιμές ορίου που έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για τις παραμέτρους ανάλυσης σπέρματος

Παράμετροι	Τιμές
Όγκος	≥1,5ml
pH	≥7,2

Συγκέντρωση σπέρματος	≥15 εκατομμύρια/ml
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥39 εκατομμύρια
Συνολική κινητικότητα	≥40%
Προοδευτική κινητικότητα	≥32%
Βιωσιμότητα	≥58%
Φυσιολογική μορφολογία	≥4%
Λευκοκύτταρα	<1,0 x 10 ⁶ /ml

1.3 Τύποι ανδρικής υπογονιμότητας

Ανάλογα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης σπέρματος μπορεί να εντοπιστούν προβλήματα που σχετίζονται με την υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος, όπως αλλαγές στην κινητικότητα και την μορφολογία του. Μπορεί, επίσης, να εντοπιστεί μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων υπό των τιμών αναφοράς, ενώ δεν αποκλείεται συνδυασμός ποιοτικών και ποσοτικών μεταβολών στη σύσταση του δείγματος σπέρματος ^[5]. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα μπορεί να γίνει κατηγοριοποίηση και ταξινόμηση της εκάστοτε περίπτωσης ανδρικής υπογονιμότητας ^[2]. Οι κατηγορίες φαινότυπων που προκύπτουν είναι οι εξής:

- **Ασπερμία:** Χαρακτηρίζεται από την πλήρη έλλειψη σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση.
- **Ασθenoσπερμία:** Η κατάσταση κατά την οποία το ποσοστό της προοδευτικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων παρατηρείται να είναι υπό των φυσιολογικών τιμών.
- **Ασθενoτερατοσπερμία:** Χαρακτηρίζεται από συνδυασμό τύπων ανδρικής υπογονιμότητας, καθότι παρουσιάζεται ποσοστό προοδευτικής κινητικότητας και φυσιολογικής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων μικρότερων των φυσιολογικών τιμών.
- **Αζωοσπερμία:** Χαρακτηρίζεται από την έλλειψη σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση.
- **Κρυπτοσπερμία:** Χαρακτηρίζεται από την έλλειψη σπερματοζωαρίων σε φρέσκο δείγμα σπέρματος. Παρ' όλα αυτά μπορεί να γίνει εντοπισμός αυτών ύστερα από φυγοκέντρηση.
- **Αιμοσπερμία:** Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ερυθροκυττάρων στην εκσπερμάτιση.
- **Λευκοσπερμία:** Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη λευκοκυττάρων στην εκσπερμάτιση σε ποσοστά που υπερβαίνουν αυτά της καθορισμένης οριακής τιμής.
- **Νεκροσπερμία:** Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη χαμηλών ποσοστών ζωντανών και υψηλών ποσοστών ακίνητων σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση.
- **Νορμοσπερμία:** Είναι η κατάσταση στην οποία ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων και μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι ίσο ή υπερβαίνει αυτό του ελάχιστου ορίου αναφοράς.

- **Ολιγοασθενοσπερμία:** Ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων είναι μικρότερα από τα ελάχιστα όρια αναφοράς.
- **Ολιγοασθενότερατοσπερμία:** Ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων και μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων βρίσκονται υπό των ελάχιστων ορίων αναφοράς.
- **Ολιγοτερατοσπερμία:** Το ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων, καθώς και ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωσή τους βρίσκονται υπό των ελάχιστων ορίων αναφοράς.
- **Ολιγοσπερμία:** Ο συνολικός αριθμός ή η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων βρίσκονται υπό το ελάχιστο όριο αναφοράς.
- **Τερατοσπερμία:** Το ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων βρίσκεται υπό το ελάχιστο όριο αναφοράς.

1.4 Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Η εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να οφείλεται σε μία πληθώρα αιτιών. Εντούτοις, για το 40% των περιπτώσεων δεν υπάρχει σαφής προσδιορισμός της αιτίας και χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθής υπογονιμότητα. Επιπρόσθετα, η αποσαφήνιση των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας περιπλέκεται και από τις διαδικασίες παραγωγής και μεταφοράς του σπέρματος που ρυθμίζονται και ελέγχονται στενά από το ενδοκρινικό, το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα. Επομένως, παθήσεις στα συστήματα αυτά μπορούν να έχουν άμεσο ή έμμεσο αντίκτυπο στην γονιμότητα του ανδρός ^[3]. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κυριότεροι παράγοντες που αποτελούν και τις συχνότερες αιτίες εμφάνισης ανδρικής υπογονιμότητας ^[2].

Πίνακας 2: Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας

Αιτίες και παράγοντες ανδρικής υπογονιμότητας	
Κληρονομικοί	Ανορχία
	Εκ γενετής απουσία σπερματικών πόρων
	Κρυψορχία
	Μικροελλείματα στο Υ χρωμόσωμα
	Χρωμοσωμικές και γενετικές ανωμαλίες
	Ενδοκриноπάθεια
	Εκ γενετής απόφραξη
	Κισσοκήλη
	Τραυματισμός στους όρχεις
	Συστροφή των όρχεων
	Καρκίνος γεννητικών κυττάρων
	Επίκτητος υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός
	Επαναλαμβανόμενες ουρογεννητικές μολύνσεις
	Μεταφλεγμονώδεις παθήσεις

Επίκτητοι	Απόφραξη της ουρογεννητικής οδού
	Εξωγενείς παράγοντες (π.χ. ακτινοβολία, χημειοθεραπείες, κ.α.)
	Συστημικά νοσήματα (π.χ. νεφρική ανεπάρκεια, κίρρωση του ήπατος)
	Αντισώματα σπέρματος
	Εγχειρήσεις στα αγγεία των όρχεων
	Σεξουαλική δυσλειτουργία
Ιδιοπαθείς	Κάπνισμα
	Αλκοόλ
	Ναρκωτικά
	Παχυσαρκία
	Ψυχολογικοί παράγοντες
	Προχωρημένη ηλικία του πατρός
	Διατροφικοί παράγοντες
	Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Περαιτέρω έρευνες έχουν αναδείξει και πλήθος άλλων αιτιών που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας, όπως γενετικές ανωμαλίες, τραυματισμοί, περιβαλλοντικοί παράγοντες, ορμονικές διαταραχές, ο τρόπος ζωής, κ.α. ^[6]. Στη συνέχεια, θα αναλυθούν οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες που αναφέρονται παραπάνω.

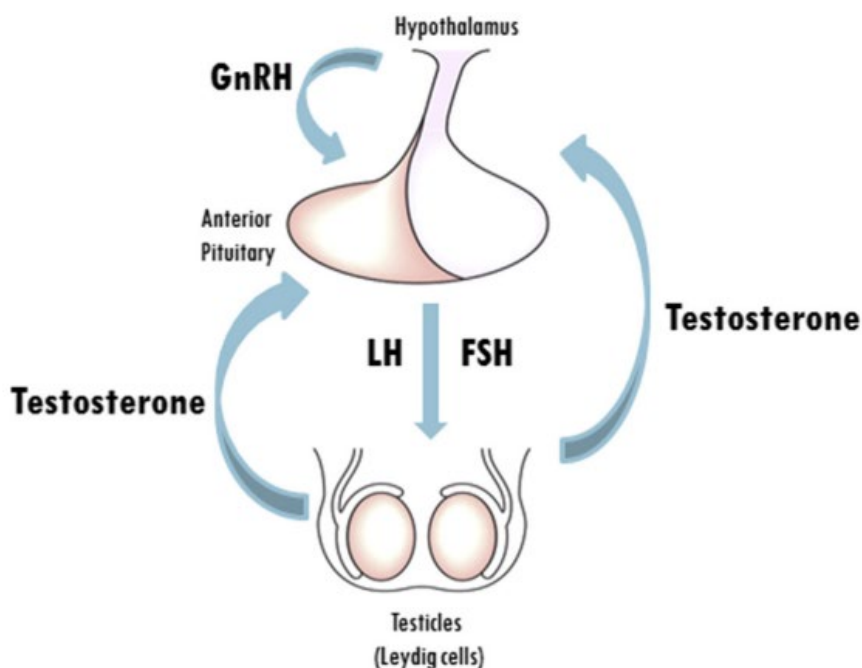
Σεξουαλικά προβλήματα: Πολλά προβλήματα στον τομέα αυτόν μπορεί να οφείλονται είτε σε σωματικά είτε σε ψυχολογικά αίτια. Οι συχνότερες παθήσεις που συσχετίζονται με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας είναι η στυτική δυσλειτουργία, η πρόωρη εκσπερμάτιση ή η ανικανότητα εκσπερμάτισης.

Σωματικά αίτια: Ορισμένα σωματικά αίτια ή ασθένειες μπορούν να οδηγήσουν στην παρεμπόδιση της παραγωγής του σπέρματος και της μεταφοράς του. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μεγέθυνση των σπερματικών αγγείων, γνωστή ως κιρσοκήλη, η οποία φαίνεται να προκαλεί προβλήματα υπογονιμότητας στο 40% των ανδρών που αντιμετωπίζουν τέτοια θέματα. Ακόμη, η συστροφή των όρχεων εντός του όσχεου είναι ικανή να καταλήξει σε τραυματισμό των όρχεων λόγω της αύξησης της πίεσης στα σπερματικά αγγεία και στην διαστρέβλωση της κυκλοφορίας σε αυτά. Προβλήματα μπορούν να δημιουργηθούν, επίσης, από διάφορες λοιμώξεις ή επιμολύνσεις, όπως επί παραδείγματι από παρωτίτιδα, ευρέως διαδεδομένη ως μαγουλάδες, η οποία επιφέρει ατροφία των όρχεων και υπογονιμότητα. Τέλος, σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα όπως η γονόρροια και τα χλαμύδια μπορούν να συμβάλλουν στην εκδήλωση υπογονιμότητας μέσω απόφραξης στην επιδιδυμίδα.

Περιβάλλον και τρόπος ζωής: Οι ουσίες που καταναλώνονται από τους άνδρες, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες εκτίθενται στον εκάστοτε χώρο εργασίας τους και γενικώς στα μέρη όπου συχνάζουν μπορεί να έχουν συνέπειες στην γονιμότητά τους. Παράλληλα, καίριο ρόλο φαίνεται να παρουσιάζουν και οι συνήθειες οι οποίες

απαρτίζουν τον τρόπο ζωής του καθενός. Χαρακτηριστικά, προβλήματα μπορούν να προκύψουν από την έκθεση σε ακτινοβολία, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής σπέρματος, ενώ η έντονη και διαρκής έκθεση σε αυτήν μπορεί να προκαλέσει μέχρι και πλήρη υπογονιμότητα. Επιπλέον, η υπερβολική χρήση αντιηλιακού έχειδειχθεί πως ελαττώνει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων προσωρινώς. Αντίστοιχα, επαγγέλματα στα οποία απαιτείται πολύωρη καθιστική θέση, όπως αυτά των οδηγών, ή αυτά στα οποία οι υπάλληλοι εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτά των αρτοποιών, μπορούν να έχουν αρνητικές συνέπειες στη γονιμότητα. Ακόμη, αν και δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένα στοιχεία, το χρόνιο κάπνισμα και η ασυλλόγιστη κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος. Επιπρόσθετα, η κακή διατροφή είναι σε θέση να επηρεάσει και αυτή τη γονιμότητα, με μία σχετικά πρόσφατη έρευνα να αποδεικνύει τις αρνητικές επιπτώσεις στη συγκέντρωση του σπέρματος έπειτα από αυξημένη κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών. Σε ελάττωση της συγκέντρωσης του σπέρματος, καθώς και της τεστοστερόνης, μπορεί να οδηγήσει και η κατά εξακολούθηση χρήση ναρκωτικών, όπως κοκαΐνης και κανναβινοειδών. Τέλος, ο μολυσμένος και ρυπασμένος αέρας μπορεί να επηρεάσει αρνητικά στην κινητικότητα και στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Ορμονικές διαταραχές: Οι ορμόνες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο αναπαραγωγικό σύστημα του ανδρός. Ο κύριος άξονας ρύθμισης είναι αυτός του υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων. Αυτός συμβάλει στην παροχή της κατάλληλης συγκέντρωσης ορμονών ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Αναλυτικότερα, η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο και επάγει την έκκριση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από την υπόφυση. Οι τελευταίες, με την σειρά τους, επάγουν την παραγωγή στεροειδών ορμονών από τις γονάδες, όπως η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη (Εικόνα 1). Η έλλειψη GnRH επιφέρει διαταραχές που επηρεάζουν το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Μία από τις πιο γνωστές παθήσεις είναι το σύνδρομο Kallmann και συνδέεται με την απουσία σεξουαλικής ωρίμανσης. Παρομοίως, μία ελάττωση της παραγωγής των LH και FSH ορμονών από την υπόφυση υπό των κανονικών τιμών μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της παραγωγής τεστοστερόνης και σπέρματος από τους όρχεις. Αντιθέτως, η αυξημένη συγκέντρωση της LH και της FSH συνδράμουν στην ελάττωση των συγκεντρώσεων τεστοστερόνης και εν γένει προκαλούνται προβλήματα στην σπερματογένεση. Τέλος, η υπέρ των κανονικών συγκεντρώσεων προλακτίνη μπορεί να επιφέρει μείωση της παραγωγής σπέρματος, μείωση της σεξουαλικής επιθυμίας και στυτική δυσλειτουργία.



Εικόνα 1: Ο άξονας ρύθμισης του υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται ^[7].

Γενετικοί παράγοντες: Οι γενετικοί παράγοντες διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τις μονογονιδιακές μεταλλάξεις. Αυτές εντοπίζονται στο 15% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Όσον αφορά στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, το σύνδρομο Klinefelter, κατά το οποίο το πάσχων άτομο διαθέτει ένα επιπλέον χρωμόσωμα Y, φαίνεται να είναι η πιο κοινή γενετική αιτία για την πρόκληση αζωοσπέρμιας. Οι αρνητικές συνέπειες εκδηλώνονται λόγω της αυξημένης FSH και της ύπαρξης του επιπλέον αντιγράφου του χρωμοσώματος Y, οδηγώντας σε προβλήματα στην σπερματογένεση. Δυσλειτουργίες στην διαδικασία της σπερματογένεσης λόγω αύξησης της FSH παρατηρούνται και στο σύνδρομο Noonan, το οποίο είναι ανάλογο με το σύνδρομο Turner των γυναικών. Επιπρόσθετα, οι υπογόνιμοι άνδρες τείνουν να παρουσιάζουν αναστροφές σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα 8 φορές πιο συχνά σε σχέση με τους υγιείς, έχοντας ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρής αζωοσπέρμιας ή ολιγοασθενοτεροσπέρμιας. Συνεχίζοντας, είναι γνωστό ότι το χρωμόσωμα Y διαδραματίζει καίριο ρόλο στην εύρυθμη ανάπτυξη και ρύθμιση του αναπαραγωγικού συστήματος. Σε μία έρευνα, η οποία διεξήχθη από τον Zofardi και τους συνεργάτες του, έγινε ανάλυση καρυοτύπου σε έξι υπογόνιμους άνδρες για τα ελλείματα που διέθεταν στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y. Η περιοχή αυτή ονομάστηκε AZF (Azoospermia Factor) και διαθέτει τρεις ζώνες: AZFa, AZFb και AZFc. Ο ανασυνδυασμός παρεμφερών θραυσμάτων σε παλίνδρομες αλληλουχίες μπορεί να προκαλέσει μικροελλείψεις στις περιοχές αυτές. Οι μικροελλείψεις στο χρωμόσωμα Y είναι παρούσες στο 10% των υπογόνιμων ανδρών με την πλειοψηφία αυτών να εντοπίζονται στην περιοχή AZFc. Τέλος, συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις είναι σε θέση να προκαλούν, επίσης, παθολογικά σύνδρομα τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να επιφέρουν υπογονιμότητα. Επί παραδείγματι, η συγγενής αμφίπλευρη απουσία του

σπερματικού αγγείου (Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens) η οποία προκαλεί αποφρακτική αζωοσπερμία στο 80 με 90% των περιπτώσεων. Η CBAVD εκδηλώνεται λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο *CFTR*, το οποίο συνδέεται με την εμφάνιση κυστικής ίνωσης.

Επιγενετικοί παράγοντες: Οι δύο κύριες επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες συνδράμουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι αυτές της μεθυλίωσης και της ακετυλίωσης των ιστονών. Τα γεννητικά κύτταρα υπόκεινται σε έναν γενικευμένο επιγενετικό επαναπρογραμματισμό κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Ένα από αυτά είναι η υποκατάσταση της ιστόνης από την πρωταμίνη. Η διαδικασία αυτή θεωρείται καίρια για την επίτευξη της περαιτέρω συμπύκνωσης του DNA στη κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Πρόβλημα στη ορθή διεξαγωγή της μπορεί να προκαλέσει αζωοσπερμία, олиγοσπερμία ή τερατοσπερμία ^[16]. Πληθώρα μελετών έχει δείξει τη συσχέτιση διαταραχών της επιγενετικής λειτουργίας στο σπέρμα με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας, όπως η олиγοσπερμία και η олиγοασθενοτερατοσπερμία. Τέλος, αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι η υπερμεθυλίωση πολλών γονιδίων μπορεί, επίσης, να επηρεάσει παραμέτρους του σπέρματος και να προκαλέσει υπογονιμότητα.

2. Μη κωδικοποιητικά RNAs

2.1 Γενικές πληροφορίες – Υποκατηγορίες ncRNAs

Είναι ευρέως γνωστό πως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (non-coding RNAs) κατέχουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση και στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Εντούτοις, όχι προ καιρού, οι αλληλουχίες του γονιδιώματος που δεν κωδικοποιούσαν για πρωτεΐνες εκλαμβάνονταν ως περιοχές χωρίς συγκεκριμένη λειτουργία και μάλιστα αποκαλούνταν με τον όρο «junk DNA» (δηλαδή «DNA σκουπίδια»). Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται εξελικτικά για τις περιοχές του γονιδιώματος που δεν διαθέτουν λειτουργικότητα και των οποίων η πιθανή έλλειψη ή απόκτηση δεν είναι σε θέση να επηρεάσει την αρμοστικότητα των οργανισμών ^[8]. Μετέπειτα, με την αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, προέκυψε ότι μόλις το 1-2% αυτού κωδικοποιεί για πρωτεΐνες, ενώ οι περιοχές αυτές που μέχρι πρότινος χαρακτηρίζονταν ως «junk» εμφανίζουν υψηλά ποσοστά συντήρησης μεταξύ των οργανισμών. Δεδομένου της εκτενέστερης διερεύνησης του ρόλου αυτών των αλληλουχιών, εν τέλει επιβεβαιώθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος μεταγράφεται, οδηγώντας στην ανάδειξη των μη κωδικοποιητικών RNAs.

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, τα μόρια RNA κατατάχθηκαν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει αυτά που μπορούν να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες, δηλαδή τα messenger RNAs (mRNAs), ενώ στη δεύτερη αυτά που δεν έχουν την ικανότητα αυτή και ονομάστηκαν μη κωδικοποιητικά (non-coding RNAs, ncRNAs). Συνεπακόλουθα, τα ncRNAs διαχωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες με κριτήριο το μέγεθός τους: η πρώτη απαρτίζεται από αυτά τα οποία έχουν μέγεθος μικρότερο των 200 νουκλεοτιδίων και ονομάζονται small non-coding RNAs, ενώ η δεύτερη από αυτά τα οποία αποτελούνται από περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια και ονομάζονται long non-coding RNAs ^[9]. Η πιο γνωστή κατηγορία μικρών μορίων RNA είναι αυτή των microRNAs (miRNAs).

Όσον αφορά τον ρόλο των ncRNAs, αυτά φαίνεται να μετέχουν σχεδόν σε κάθε διαδικασία εντός του κυττάρου. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από αυτά είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και οι επιγενετικές τροποποιήσεις ^[10]. Επιπρόσθετα, κατέχουν μείζον ρόλο σε σχέση με την πολυπλοκότητα των οργανισμών και μάλιστα σε αναλογικό επίπεδο, καθώς όσο αυξάνεται αυτή και ο αριθμός των επιπέδων οργάνωσης τόσο αυξάνεται και ο αριθμός των ncRNAs. Εντυπωσιακό είναι το παράδειγμα του ανθρώπου και του *C. elegans* όπου οι δύο αυτοί οργανισμοί έχουν περίπου ίσο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όμως, ο αριθμός των ncRNAs υπερτερεί σημαντικά στον άνθρωπο. Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι τα ncRNAs αποτελούν κομβικό παράγοντα της πολυπλοκότητας. Εν γένει, η σημαντικότητα τους και η συμμετοχή τους σε κάθε πιθανή κυτταρική διαδικασία είναι και ο λόγος που οποιαδήποτε μετάλλαξη, αλλοίωση ή διαστρέβλωση, καθώς και αυξομείωση της συγκέντρωσής τους έχει την δυνατότητα να επιφέρει διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου και εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων ^[9].

2.2 miRNAs

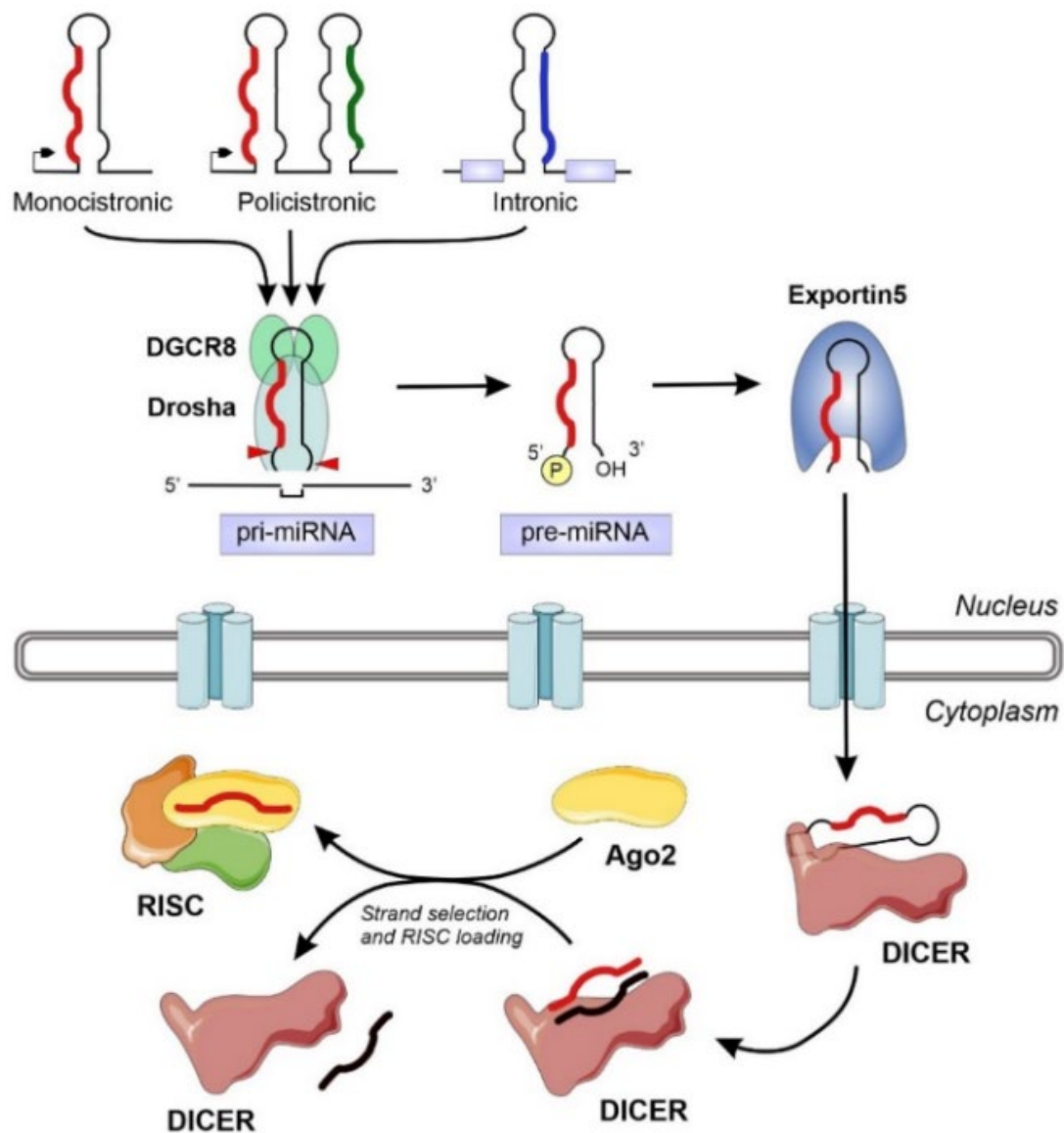
Μία από της πιο διεξοδικά διερευνημένες υποκατηγορίες μικρών μη κωδικοποιητικών RNAs (small non-coding RNAs) είναι αυτή των miRNAs, τα οποία αποτελούνται από περίπου 20 νουκλεοτίδια. Αυτά εκφράζονται ενδογενώς και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο ^[9].

Τα μόρια αυτά ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά μέσω ερευνών στον *C. elegans*, ο οποίος αποτελεί οργανισμό μοντέλο. Συγκεκριμένα, ήταν τα miRNAs lin-4 και let-7 τα οποία αποδείχτηκε πως μετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που φέρουν την ευθύνη για αναπτυξιακές διαδικασίες ^[11]. Εν κατακλείδι, μεγάλος αριθμός μορίων miRNAs βρέθηκε σε πληθώρα οργανισμών, όπως φυτά, έντομα και θηλαστικά, ενώ τα υψηλά ποσοστά συντήρησης μεταξύ των ειδών έπαιξαν κομβικό ρόλο για την εξακρίβωση των λειτουργιών και των επιδράσεών τους σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες ^[9].

2.3 Μηχανισμοί βιογένεσης των miRNAs

Τα miRNAs κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται παντού επί του γονιδιώματος και αρκετές φορές επικαλύπτονται με τις περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ^[9]. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως η τοποθεσία της πλειονότητας αυτών των γονιδίων είναι σε ιντρόνια, ενώ αυτά σε εξώνια δεν συναντώνται τόσο συχνά ^[11]. Τα miRNAs έχουν την δυνατότητα να συσταθούν από αυτόνομες μεταγραφικές μονάδες. Επιπρόσθετα, η βιογένεσή τους απαρτίζεται από μία σειρά διαδοχικών σταδίων, όπως της μεταγραφής, της ωρίμανσης στον πυρήνα, της εξαγωγής και της κυτταροπλασματικής επεξεργασίας, πριν την εκκίνηση της ενεργούς δράσης τους.

Πιο συγκεκριμένα, για την διαδικασία παραγωγής τους, τα miRNAs αρχικώς μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, ενώ ένας μικρός αριθμός αυτών μπορεί να μεταγράφεται και από την RNA πολυμεράση III. Επομένως, σχηματίζονται τα primary microRNAs (pri-miRNAs) τα οποία έχουν 5' καλύπτρα και 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά, δημιουργώντας επιπλέον μία δομή φουρκέτας η οποία συμπεριλαμβάνει την αλληλουχία του ώριμου miRNA στο βρόχο της. Έπειτα, το pri-miRNA αναγνωρίζεται από ένα σύμπλοκο που δομείται από την πρωτεΐνη DGCR8 και βρίσκεται στον πυρήνα. Η αναγνώριση αυτή, οδηγεί εν τέλει στην πέψη του από την RNAάση-ενδονουκλεάση Drosha. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το precursor microRNA (pre-miRNA), περίπου 60 νουκλεοτιδίων με δομή φουρκέτας, το οποίο εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Εκεί η RNAάση-ενδονουκλεάση Dicer πέπτει το pre-miRNA οδηγώντας στον σχηματισμό δίκλωνων μορίων RNA περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Ύστερα, αυτά συνδέονται με πρωτεΐνες Αργοναύτες προς δημιουργία miRISC συμπλόκων. Εν τέλει, ο κλώνος που αποτελεί το ώριμο miRNA παραμένει στο σύμπλοκο, ενώ ο άλλος αποικοδομείται. Αυτό αποτελεί ένα από τα κύρια μονοπάτια βιογένεσης (Εικόνα 2), παρότι τα miRNAs είναι πιθανόν να προκύψουν και από άλλα μονοπάτια ^[9].



Εικόνα 2: Διαδικασία βιογένεσης των miRNAs^[12].

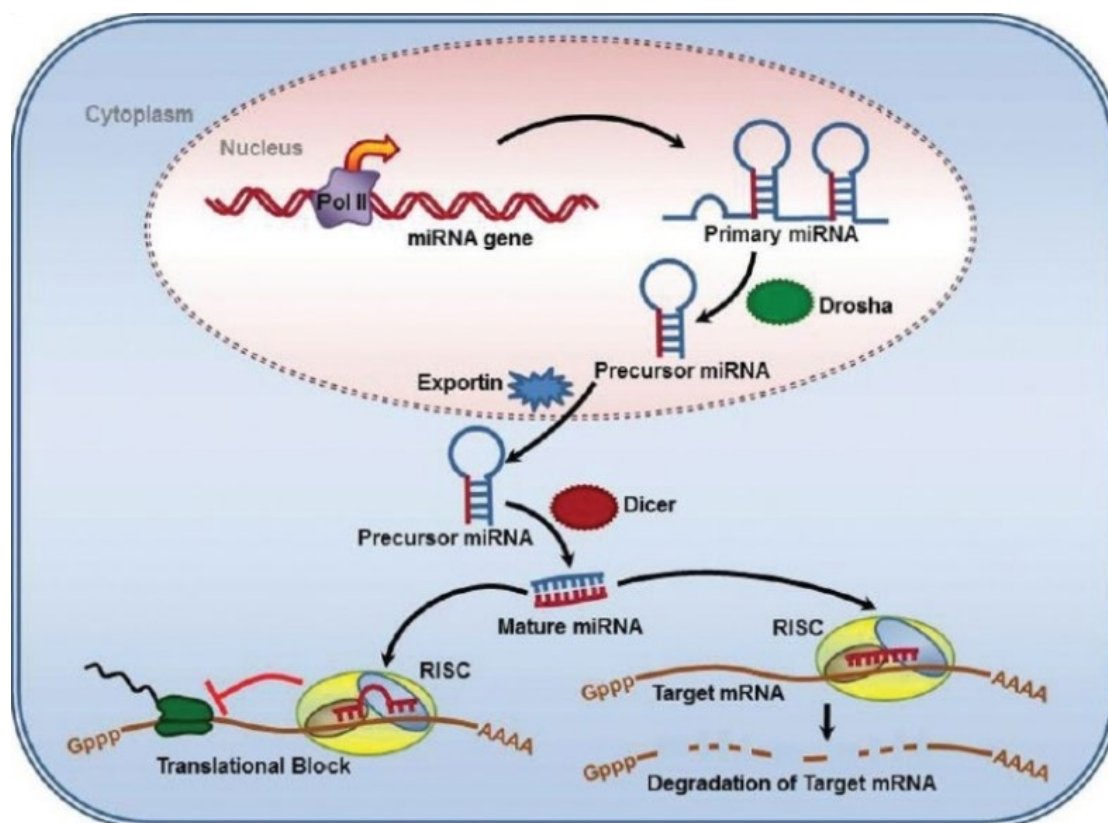
2.4 Δράση miRNAs

Η επίτευξη της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων από τα miRNAs επιτυγχάνεται μέσω της αποικοδόμησης του mRNA και της καταστολής της μετάφρασης ως επί το πλείστον.

Όσον αφορά την διαδικασία της αποικοδόμησης του mRNA, αυτή εκκινείται με την πρόσδεση του miRNA στην 3' αμετάφραστη περιοχή (Untranslated Region, UTR) του mRNA-στόχου, η οποία προκύπτει λόγω της υπάρχουσας συμπληρωματικότητας των νουκλεοτιδίων. Στο σημείο αυτό να τονιστεί πως η στόχευση επηρεάζεται και από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου miRISC και όχι εξ ολοκλήρου από την αλληλεπίδραση miRNA-mRNA. Τα miRNAs επάγουν την ενεργοποίηση του πρωτεϊνικού συμπλόκου και το κατευθύνουν στον στόχο. Τέλος, ακολουθεί η καταστολή του γονιδίου-στόχου με την αποικοδόμηση του mRNA, η οποία προκύπτει είτε μέσω αποαδενυλίωσης του 3' άκρου είτε μέσω της αφαίρεσης της 5' καλύπτρας. Αυτό έχει ως συνέπεια την

μείωση της σταθερότητας του mRNA και την προσέλκυση παραγόντων με ενδονουκλεολυτική και εξωνουκλεολυτική δράση (Εικόνα 3).

Από την άλλη μεριά, η διαδικασία παρεμπόδισης της μετάφρασης του mRNA απαρτίζεται από τα ίδια αρχικά βήματα, αλλά τελικά η ρύθμιση προκύπτει μέσω των πρωτεϊνών Αργοναυτών, οι οποίες συναγωνίζονται τους παράγοντες που κατευθύνουν τις ριβοσωμικές υπομονάδες ή αποδιοργανώνουν την διαδικασία της μετάφρασης εν γένει (Εικόνα 3) ^[9].



Εικόνα 3: Στην εικόνα αυτή απεικονίζεται συνοπτικά η δημιουργία των miRNA και ακολούθως η δράση τους ^[13].

2.5 miRNAs και ανδρική υπογονιμότητα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα μη κωδικοποιητικά RNAs (non-coding RNAs) κατέχουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην σπερματογένεση, καθώς και στον αυστηρό έλεγχο που υπόκειται το κάθε στάδιο της διαδικασίας αυτής ^[14].

Περαιτέρω έρευνες υποδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των ncRNAs και συγκεκριμένων υποκατηγοριών τους στην ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την έκφραση πολλών κατηγοριών ncRNAs στους γαμέτες, τα οποία μάλιστα κρίνονται και απαραίτητα για την ομαλή και σωστή διεκπεραίωση της πολύπλοκης αυτής διαδικασίας ^[15]. Εστιάζοντας στα miRNAs, μελέτες απέδειξαν ότι βλάβες στη διαδικασία βιογένεσής τους συνδέονται με την

εμφάνιση φαινότυπου υπογονιμότητας. Συνεπώς, αυτές οι μελέτες αποτέλεσαν θεμέλιο λίθο για την ανάδειξη του ρόλου που κατέχουν τα non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα, υποδεικνύοντας ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του θέματος. Πιο συγκεκριμένα, αρκετές μελέτες επιτελέστηκαν σε ποντίκια στα οποία πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση της Dicer (ποντίκια knock-out), η οποία εν συνεχεία αποδείχθηκε πως είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των σπερματίδων, καθώς και για την εύρυθμη λειτουργία και κατά συνέπεια επιβίωση των κυττάρων Sertoli ^[14]. Η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τους αποκάλυψε την επίδραση των miRNAs στα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης. Καταρχάς, μόρια miRNA, όπως το miR-21 και το miR-34c, είναι σε θέση να διατηρούν τα σπερματογόνια σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Παρ' όλα αυτά, έχει αποδειχθεί, επίσης, πως άλλες ομάδες miRNA ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των προηγούμενων αναφερθέντων κυττάρων, δηλαδή ακριβώς της αντίθετης διεργασίας. Αναλυτικότερα, έχει επιβεβαιωθεί ότι συγκεκριμένα miRNAs υπόκεινται σε ελάττωση της έκφρασής τους κατά τη διαφοροποίηση των σπερματογονίων, η οποία επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ. Αυτό έχει ως συνέπεια τα mRNAs των Bim, Kit, Soc3 και Stat3, τα οποία αποτελούν στόχους για τα miRNAs, να ρυθμίζονται θετικώς και να προάγουν τη διαδικασία αυτή. Επιπλέον, άλλα miRNAs, έχοντας ως στόχο διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν επίδραση στην απόπτωση των γαμετικών κυττάρων, ενώ παράλληλα φαίνεται να συμμετέχουν και στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των σπερματίδων. Σημαντική θεωρείται, επομένως, η σωστή ρύθμιση της έκφρασης των miRNAs, καθότι σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να προκληθούν προβλήματα υπογονιμότητας. Αυτό έχει τεκμηριωθεί και μέσω μελετών όπου συγκρίθηκαν προφίλ miRNA των όρχεων υγιών και πασχόντων ατόμων. Σε αυτές εντοπίστηκε μεγάλος αριθμός miRNAs που απορρυθμίζονται και μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αζωοσπερμία ή αποφρακτική αζωοσπερμία, επί παραδείγματι. Επιπρόσθετα, σε θέσεις πρόσδεσης των miRNAs σε γονίδια που έχουν ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης έχουν ταυτοποιηθεί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), οι οποίοι επιφέρουν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αυτών και συνεπώς αύξηση του κινδύνου πρόκλησης υπογονιμότητας.

Συμπερασματικά, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν πιο πολλές μελέτες για τη βιολογική λειτουργία όσο το δυνατόν περισσότερων miRNAs και γενικώς ncRNAs και να αναλυθούν εκτενέστερα οι μηχανισμοί δράσης τους, ώστε μελλοντικά να αναπτυχθούν μέθοδοι πρόγνωσης, διάγνωσης και αντιμετώπισης της ανδρικής υπογονιμότητας ^[15].

B. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ανακύπτει συνεπώς από τα προαναφερθέντα πως ένα από τα μείζονα προβλήματα που αντιμετωπίζουν τα σύγχρονα ζευγάρια είναι αυτό της υπογονιμότητας. Η επιστήμη έχει αποδειχθεί ισχυρός σύμμαχος στην αντιμετώπισή της, καθώς όχι μόνο συμβάλλει με την χρήση προηγμένης τεχνολογίας στην υποβοήθηση απόκτησης βιολογικού απογόνου μέσω τεχνητής αναπαραγωγής, αλλά επιπρόσθετα έχει εντατικοποιήσει τις μελέτες που σχετίζονται με την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία της υπογονιμότητας.

Σύμφωνα με τα δεδομένα προκύπτει πως υπαίτιος στο 50% των περιπτώσεων είναι ο ανδρικός παράγοντας. Μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας είναι ανεξήγητης αιτιολογίας (ιδιοπαθής υπογονιμότητα). Επομένως, καίρια θεωρείται η μελέτη και ο εντοπισμός των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν την ικανότητα της αναπαραγωγής στον άνδρα. Ωστόσο, μία σχετικά μεγάλη δυσκολία που καλείται να αντιμετωπιστεί είναι αυτή της πολυπαραγοντικότητας της διαταραχής, δηλαδή του μεγάλου αριθμού γονιδίων που οδηγούν στην εμφάνιση παθολογικού φαινότυπου. Για τον λόγο αυτό πολλές μελέτες έχουν αρχίσει να ενσωματώνουν στην ερευνητική τους διαδικασία την αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS) ώστε να προκύψει ένα γενετικό προφίλ των υπογόνιμων ανδρών, αλλά και να εξακριβωθούν τα γονίδια που ευθύνονται για την εκδήλωση της πάθησης. Η έκφραση των γονιδίων αυτών έχει βρεθεί πως εμπλέκεται σε πληθώρα μονοπατιών, όπως επί παραδείγματι αυτό της σπερματογένεσης, του μεταβολισμού και της σωστής μορφογένεσης των σπερματοζωαρίων. Σε αυτό το πλαίσιο σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης τα μη κωδικοποιητικά RNAs.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι ο εντοπισμός σημαντικών πολυμορφισμών που εντοπίζονται σε miRNAs, καθώς και η μελέτη του γενετικού προφίλ των ασθενών με ολιγοσπερμία, ασθενοσπερμία και τερατοσπερμία στον ελληνικό πληθυσμό χρησιμοποιώντας την αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS). Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από ολιγοσπερμικούς, ασθενοσπερμικούς, τερατοσπερμικούς και νορμοσπερμικούς άνδρες. Διεξήχθη αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και έπειτα βιοπληροφορική ανάλυση για να γίνει εντοπισμός των πολυμορφισμών που συναντώνται μόνο σε ολιγοσπερμικούς ή ασθενοσπερμικούς ή τερατοσπερμικούς άνδρες. Επιπρόσθετα, μέσω περαιτέρω βιοπληροφορικής ανάλυσης, σε συνδυασμό με τη χρήση φίλτρων, απομονώθηκαν προς μελέτη μόνο τα γονίδια που φέρουν μοναδικούς πολυμορφισμούς και μεταγράφονται αποδίδοντας miRNAs, διότι αυτά αποτελούν το αντικείμενο προς μελέτη της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος των miRNAs στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας με τη χρήση διαφόρων βιοπληροφορικών εργαλείων. Μέσω της διαδικασίας αυτής, έγινε μία προσπάθεια δημιουργίας μιας πιο πλήρους εικόνας σχετικά με το γενετικό προφίλ των ασθενών και εντοπισμού των διαφορών που θα μπορούσαν μετέπειτα να αξιοποιηθούν ώστε να βελτιωθεί η διάγνωση και η πρόγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας και των υποτύπων της.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή ασθενών και βιολογικού υλικού

Αρχικά, έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος και σπέρματος από εθελοντές σε συνεργασία με το Κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης «Embryolab». Για την εξασφάλιση της νομιμότητας των διαδικασιών όλοι οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για την συμμετοχή τους και επιπρόσθετα, η διεξαγωγή της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε ανδρολογική εξέταση και ακολούθησε ανάλυση του σπέρματός τους (σπερμοδιάγραμμα). Για την αποκόμιση όσον το δυνατόν καλύτερων αποτελεσμάτων τα δείγματα συλλέχθηκαν ύστερα από δύο έως τρεις μέρες αποχής από οποιαδήποτε σεξουαλική πράξη.

Μετέπειτα, βάσει των αποτελεσμάτων από τα σπερματοδιαγράμματα, οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες. Οι νορμοσπερμικοί χαρακτηρίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, όπως παρουσιάζονται παραπάνω στον Πίνακα 1. Όσον αφορά στις άλλες ομάδες, ως ασθενοσπερμικοί χαρακτηρίστηκαν αυτοί που έχουν σπερματοζωάρια με ποσοστό προοδευτικής κινητικότητας μικρότερο της φυσιολογικής τιμής (<32%). Ως ολιγοσπερμικοί αυτοί οι οποίοι έχουν συγκέντρωση σπέρματος και ολικό αριθμό σπερματοζωαρίων μικρότερα των φυσιολογικών τιμών (<15 εκατομμυρίων/ml και <39 εκατομμύρια αντιστοίχως). Τέλος, ως τερατοσπερμικοί χαρακτηρίστηκαν αυτοί που έχουν φυσιολογική μορφολογία σπερματοζωαρίων υπό το ελάχιστο όριο (<4%). Όσον αφορά στον αριθμό των ατόμων, συμπεριελήφθησαν 10 νορμοσπερμικοί, 5 ασθενοσπερμικοί, 5 ολιγοσπερμικοί και 5 τερατοσπερμικοί άνδρες. Επιπρόσθετα, στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν μόνο Έλληνες, όπως επιβεβαιώνεται μέσω των στοιχείων από τα ερωτηματολόγια που συμπλήρωσαν.

2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση του γονιδιώματος

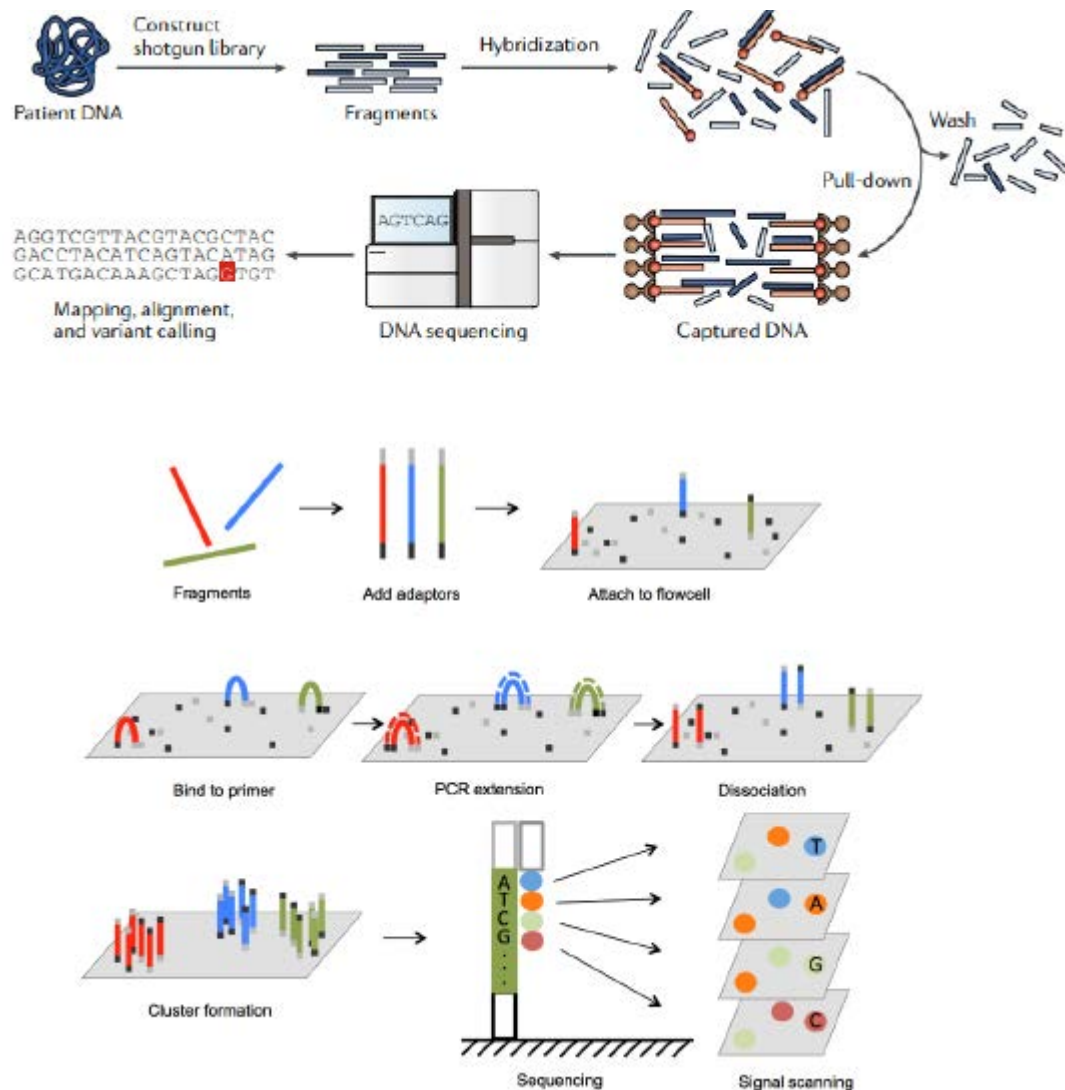
Αρχικά, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα αίματος όλων των συμμετεχόντων χρησιμοποιώντας το PureLink Genomic DNA Mini Kit, ενώ για την εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA επιτελέστηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και φωτομέτρηση με την συσκευή Qubit.

Έπειτα, δημιουργήθηκαν 5 pools δειγμάτων. Αναλυτικότερα, τα δύο πρώτα pools διέθεταν το DNA που απομονώθηκε από τους 10 νορμοσπερμικούς συμμετέχοντες (5 άτομα για κάθε pool), ενώ τα υπόλοιπα τρία αντιστοιχούσαν το καθένα σε μία από τις υπό μελέτη καταστάσεις (δηλαδή 1 pool που αποτελείται από 5 άτομα με ασθενοσπερμία, 1 με 5 άτομα με τερατοσπερμία, κ.λπ.). Μετά την προετοιμασία τους τα δείγματα αποστάλθηκαν στην Novogene (Ηνωμένο Βασίλειο). Εκεί πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση με Illumina HiSeq 3000.

2.1 Αλληλούχηση Νέας Γενιάς – Next Generation Sequencing (NGS)

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) η οποία είναι μία τεχνολογία μαζικής και παράλληλης αλληλούχησης μορίων με αποτελεσματικό, γρήγορο τρόπο και χαμηλό κόστος. Πιο

συγκεκριμένα, για τη μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας έγινε χρήση της μεθόδου αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing, WGS). Η διαδικασία αλληλούχησης περιλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια: αρχικά, απομονώνεται το DNA και κατακερματίζεται σε πολλά μικρά κομμάτια, τα οποία αποκαλούνται θραύσματα (fragments). Έπειτα, ακολουθεί η προσθήκη των προσαρμογέων (adapters) και η αλληλούχηση των βιβλιοθηκών αφού έχει προηγηθεί ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Τέλος, γίνεται η βιοπληροφορική ανάλυση και η συναρμολόγηση από την οποία προκύπτει ολόκληρη η αλληλουχία (Εικόνα 4).



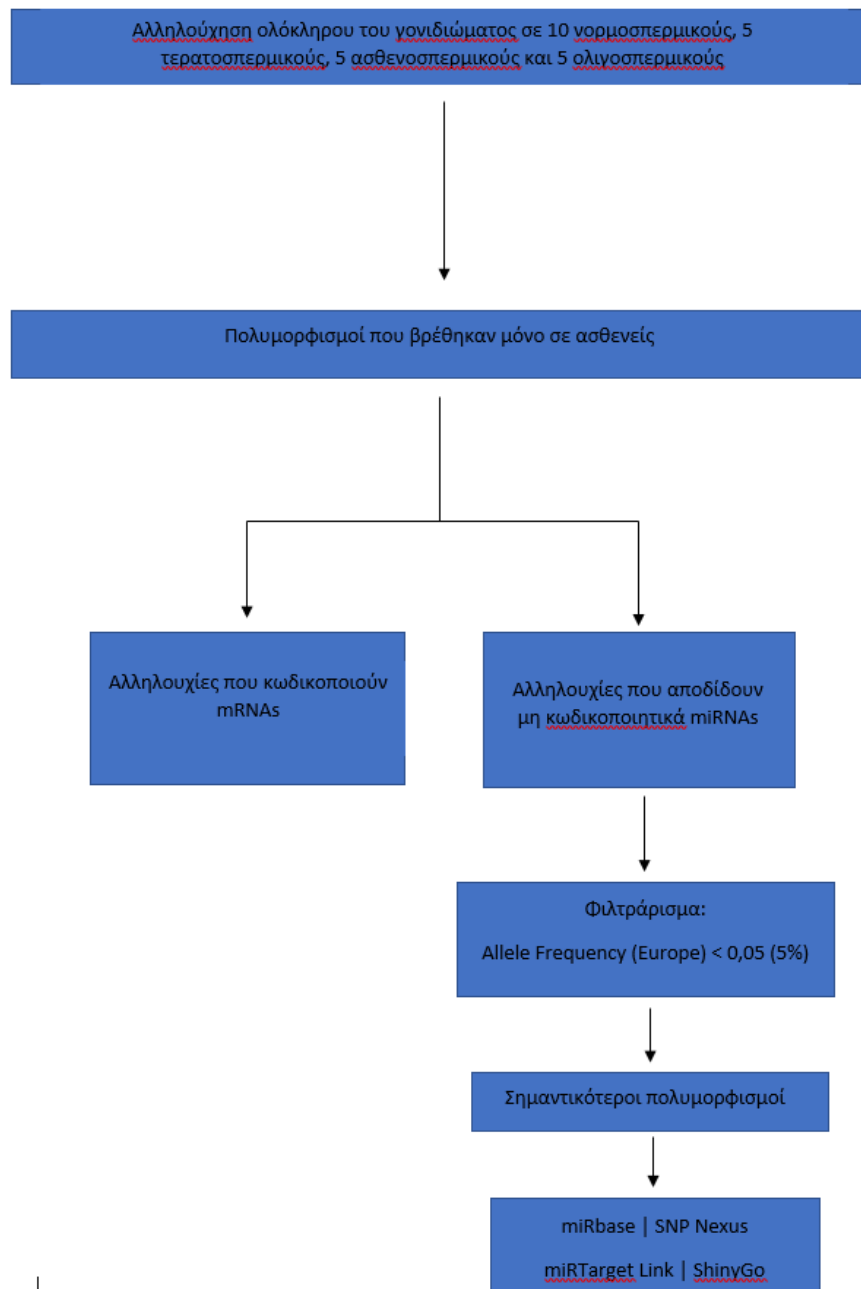
Εικόνα 4: Αναπαράσταση της διαδικασίας αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS).

3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός των μοναδικών πολυμορφισμών

Έπειτα από την αλληλούχηση έγινε ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν και πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανάμεσα στα νορμοσπερμικά άτομα και στα ασθενοσπερμικά, τα ολιγοσπερμικά και τα τερατοσπερμικά ώστε να γίνει εντοπισμός των πολυμορφισμών που συναντώνται μόνο στους υπογόνιμους άνδρες

της κάθε σύγκρισης καθώς αυτοί είναι πιθανότερο να συσχετίζονται με την εμφάνιση οποιουδήποτε από τους προαναφερθέντες παθολογικούς φαινότυπους.

Έπειτα, οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν μόνο στους υπογόνιμους άνδρες επιλέχθηκαν για να μελετηθούν περαιτέρω και να εντοπιστούν αυτές που είναι πιθανότερο να εμφανίζουν συσχέτιση με την εμφάνιση κάποιου από τους υπότυπους ανδρικής υπογονιμότητας στον Ελληνικό πληθυσμό ή να επιδρούν στο φαινόμενο. Επιπρόσθετα, έγινε απόρριψη των πολυμορφισμών που εντοπίζονται σε περιοχές του DNA που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες δεδομένου πως στην παρούσα εργασία ερευνώνται τα miRNAs που είναι μη κωδικοποιητικά μόρια RNA.



Εικόνα 5: Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για των χαρακτηρισμό των σημαντικότερων πολυμορφισμών που εντοπίζονται μόνο σε ασθενείς και σε περιοχές που κωδικοποιούν για miRNAs.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως όλα τα βήματα που περιεγράφηκαν έως τώρα δεν πραγματοποιήθηκαν κατά την υλοποίηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας αλλά στο πλαίσιο του προγράμματος «Ανδρική γονιμότητα: γονιδιωματική, πρωτεωμική και διάγνωση – Από τον εργαστηριακό πάγκο στον ασθενή», το οποίο πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της δράσης «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» και υλοποιείται από το BIOZ – Εργαστήριο Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής Embryolab.

4. Βάσεις δεδομένων

Είναι γεγονός πως ο αριθμός των βάσεων δεδομένων τόσο στο πεδίο της Βιοπληροφορικής όσο και σε αυτό της Μοριακής Βιολογίας έχει αυξηθεί εκθετικά τα τελευταία έτη. Η κάθε μία από αυτές παρέχει διαφορετικές πληροφορίες και εργαλεία στον χρήστη ώστε ο ίδιος μετέπειτα να είναι σε θέση να αντλήσει τα επιθυμητά δεδομένα. Στην παρούσα διατριβή έγινε αναζήτηση συγκεκριμένων πληροφοριών και επεξεργασία αυτών σε βάσεις δεδομένων ώστε να παρθούν δεδομένα σχετικά με το συναφές θέμα. Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Στο σημείο αυτό να επισημανθεί επίσης πως όλες οι διαδικασίες που θα εξηγηθούν παρακάτω πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, διότι έπρεπε να γίνει έρευνα για τρεις κατηγορίες ασθενών που πάσχουν από υπογονιμότητα (ασθενοσπερμία, ολιγοσπερμία, τερατοσπερμία).

4.1 miRNASNP-v3

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRNASNP, η οποία βρίσκεται επί του παρόντος στην τρίτη της έκδοση. Η βάση αυτή παρέχει πληθώρα πληροφοριών περί των υπό εξέταση miRNAs. Η διαδικασία αναζήτησης σε αυτή ήταν απλή και ως εξής: για το σύνολο των μοναδικών πολυμορφισμών που εντοπίζονται σε miRNAs έγινε χρήση μίας συγκεκριμένης κωδικής ονομασίας που προσδιορίζει τον πιθανό μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό στο γονίδιο που παράγει το miRNA (π.χ. rs12345678). Πέραν της άντλησης πληροφοριών, η χρήση αυτής της βάσης δεδομένων έγινε και για να εντοπιστούν πολυμορφισμοί οι οποίοι πράγματι βρίσκονται σε miRNAs με βάση την τελευταία έκδοση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το περιβάλλον της βάσης δεδομένων miRNASNP. Στο κόκκινο πλαίσιο που φαίνεται στην εικόνα εισάγουμε την κωδική ονομασία των πολυμορφισμών. Έπειτα, επιλέγουμε το «Submit» και λαμβάνουμε τις πληροφορίες που έχει να μας διαθέσει η συγκεκριμένη βάση. Αυτές φαίνονται στο μαύρο πλαίσιο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ξεχωριστά για κάθε πιθανό πολυμορφισμό από τα αρχεία δεδομένων που προέκυψαν για κάθε κατηγορία που εξετάστηκε, δηλαδή για τους τερατοσπερμικούς, τους ασθενοσπερμικούς και τους ολιγοσπερμικούς.

miRNASNP-v3 Mature-miRNA Pre-miRNA SNP Disease Predict Download Help

SNP in miRNA and gene 3'UTR

A total of **46,526** SNPs in pre-miRNAs and **7,115,796** SNPs in gene 3'UTRs were identified by miRNASNP-v3, including **6,229** SNPs in miRNA seed regions. For SNPs in miRNA seed regions and SNPs in gene 3'UTRs, we focused on their effects on miRNA:gene interactions, for SNPs in pre-miRNAs, we investigated their effects on pre-miRNA structure. Users can retrieve specific genes/miRNAs to obtain SNPs in them and explore the impact of the SNP on miRNA:miRNA interaction.

SNP GMAF: All

Gene/miRNA: TP53

SNP ID: rs17091403

☐ SNP in GWAS LD region

Submit Reset

SNP in pre-miRNA

Pre-miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	Region	Mature miRNA	ΔG	Predict	LD
hsa-miR-2110	rs17091403	chr10:114174146	C/T	0.9289/0.0711	pre-miRNA	-	-1.50	mild	X

Copyright © Guo Lab, Biomedical Big Data Center, West China Hospital, Sichuan University, China
Any comments and suggestions, please contact us.

Εικόνα 6: Η βάση δεδομένων miRNASNP.

4.2 SNPnexus

Η SNPnexus, όπως και η προηγούμενη βάση δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η χαρτογράφηση των πολυμορφισμών σε miRNAs με βάση την τελευταία έκδοση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Εντούτοις, η βάση δεδομένων παρέχει και επιπλέον πληροφορίες για αυτούς, όπως π.χ. την συσχέτιση των miRNAs με συγκεκριμένες ασθένειες ή φαινοτύπους, κ.ά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση έγινε διερεύνηση και για την συσχέτιση των πολυμορφισμών με ασθένειες για όλους τους υποτύπους υπογονιμότητας.

SNPnexus

Home About User Guide Example News Citation Contact

Dear user, We'd love to hear your thoughts on SNPnexus! Take a few minutes to complete our [short survey](#) and help us improve the tool. Your feedback is crucial in shaping the future of SNPnexus. We will greatly appreciate it. Thanks!

SNPnexus is a web-based variant annotation tool designed to simplify and assist in the selection and prioritisation of known and novel genomic alterations. Check our video tutorial.

SNPnexus is freely available for academic and non-profit use only. Due to increased demand, we are limiting the maximum number of variants in a single batch query to 10,000. If you are a commercial user/service provider, if you need to run larger queries, or if you are interested in a customised version of SNPnexus, please contact us on info@snp-nexus.org

User details

Query

Please, start by selecting the Human Assembly for your query:

☒ GRCh38/hg38 ☐ GRCh37/hg19

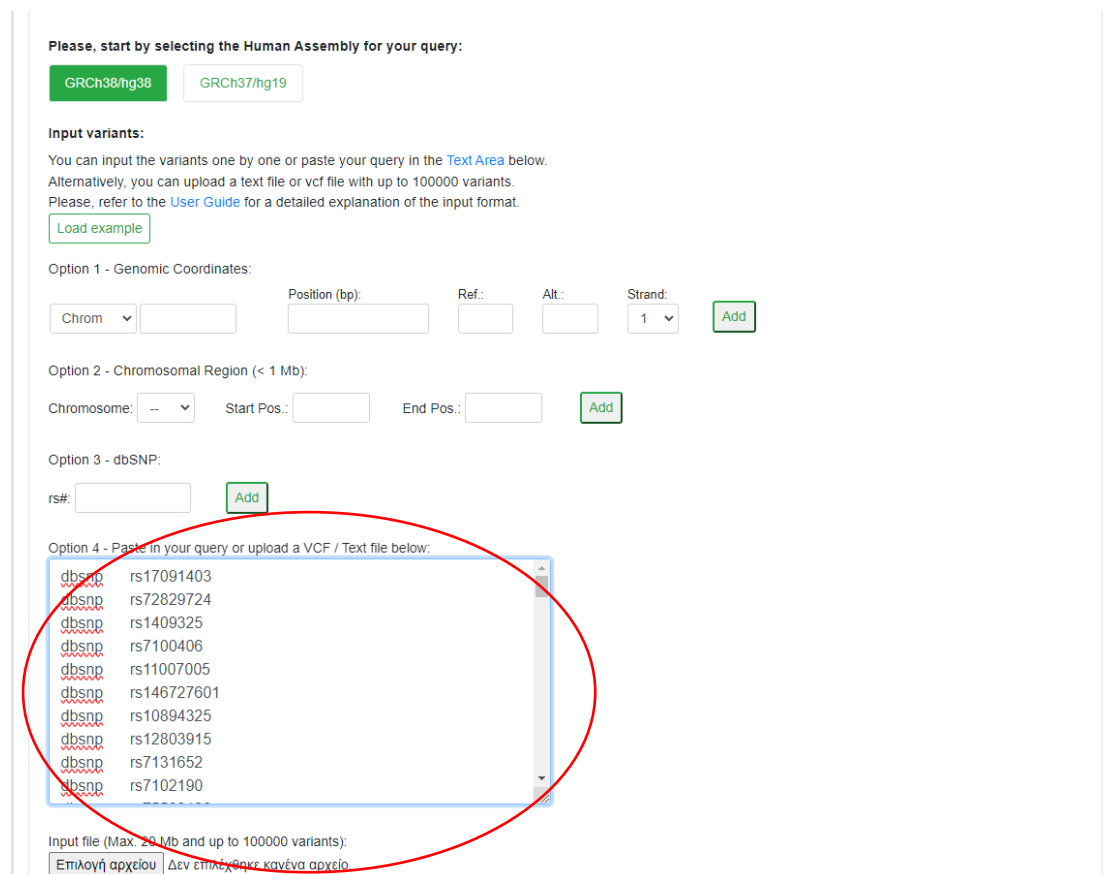
Input variants:

You can input the variants one by one or paste your query in the [Text Area](#) below. Alternatively, you can upload a text file or vcf file with up to 100000 variants. Please, refer to the [User Guide](#) for a detailed explanation of the input format.

[Load example](#)

Εικόνα 7: Η βάση δεδομένων SNPnexus.

Αρχικά, για την αναζήτηση και την άντληση δεδομένων, επιλέγουμε την επιλογή GRCh38/hg38 (όπως απεικονίζεται στο κόκκινο πλαίσιο της Εικόνας 7), ώστε να γίνει έρευνα στην πιο ενημερωμένη έκδοση για το γονιδίωμα του ανθρώπου.



Please, start by selecting the Human Assembly for your query:

GRCh38/hg38 GRCh37/hg19

Input variants:

You can input the variants one by one or paste your query in the [Text Area](#) below. Alternatively, you can upload a text file or vcf file with up to 100000 variants. Please, refer to the [User Guide](#) for a detailed explanation of the input format.

[Load example](#)

Option 1 - Genomic Coordinates:

Chrom: Position (bp): Ref.: Alt.: Strand: [Add](#)

Option 2 - Chromosomal Region (< 1 Mb):

Chromosome: Start Pos.: End Pos.: [Add](#)

Option 3 - dbSNP:

rs#: [Add](#)

Option 4 - Paste in your query or upload a VCF / Text file below:

Input file (Max. 20 Mb and up to 100000 variants): [Επιλογή αρχείου](#) [Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο](#)

Εικόνα 8: Η βάση δεδομένων SNPnexus. Αναζήτηση πολυμορφισμών.

Έπειτα, γίνεται εισαγωγή της κωδικής ονομασίας των πολυμορφισμών, όπως και στην miRNASNP. Η μόνη διαφορά έγκειται στο ότι αυτήν την φορά γίνεται προσθήκη του προθέματος «dbSNP» και είναι εφικτή η ταυτόχρονη αναζήτηση πολλών πολυμορφισμών, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 8.

Ακολούθως, γίνεται η εφαρμογή των επιλογών αναζήτησης όπως υποδεικνύονται στην Εικόνα 9. Αυτές οι επιλογές σχετίζονται με το σε ποιες πληροφορίες να εστιάσει κυρίως η διενέργεια της αναζήτησης. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέγουμε αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων από τις οποίες αντλεί πληροφορίες η SNPnexus και οποίες αφορούν στα miRNAs. Οι άλλες επιλογές αφορούν την συσχέτιση με ασθένειες καθώς και την απόδοση ενός σκορ στους πολυμορφισμούς με βάση την πιθανότητα λειτουργικού ρόλου (CADD, FunSeq2). Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή επιλέγουμε το «Submit Query».

Annotation Categories Select All

Gene/Protein Consequences Select All	☒ Ensembl ☐ RefSeq ☐ UCSC ☐ CCDS			
Effect of Non-synonymous Coding SNPs on Protein Function	☐ SIFT ☐ PolyPhen			
Population Data	1000 Genomes Select All	☐ African ☐ European	☐ American ☐ South Asian	☐ East Asian
	HapMap Select All	☐ ASW ☐ CHD ☐ JPT ☐ MKK	☐ CEU ☐ GIH ☐ LWK ☐ TSI	☐ CHB ☐ HCB ☐ MEX ☐ YRI
	gnomAD Exome Data Select All	☐ African / African American ☐ Finnish ☐ South Asian	☐ Latino ☐ Non-Finnish European	☐ East Asian ☐ Other
	gnomAD Genome Data Select All	☐ African / African American ☐ Finnish	☐ Latino ☐ Non-Finnish European	☐ East Asian ☐ Other
Regulatory Elements Select All	☒ miRBASE ☐ CpG Islands ☒ TarBase miRNA Target Sites ☒ microRNAs (miRNA Registry) / snoRNAs and scaRNAs (snoRNA-LBME-DB) ☐ Ensembl Regulatory Build ☐ ENCODE ☐ Roadmap Epigenomics			
Conservation	☐ Vertebrate Alignment and Conservation (PHAST) ☐ Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP++)			
Phenotype & Disease Association	☒ ClinVar ☒ Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) ☒ NHGRI Catalogue of Published Genome-Wide Association Studies			
Non-coding Scoring	☒ CADD - Combined Annotation Dependent Depletion ☒ FunSeq2			

Εικόνα 9: Η βάση δεδομένων SNPnexus. Επιλογές αναζήτησης.

4.3 miRTargetLink 2.0

Στη συνέχεια ακολούθησε η χρήση της βάσης δεδομένων miRTargetLink. Η διαφορά της σε σύγκριση με τις προηγούμενες δύο είναι πως αυτή προσφέρει πληροφορίες όσον αφορά στις αλληλεπιδράσεις των miRNAs με τα mRNAs των γονιδίων-στόχων τους με βάση πειραματικές μελέτες αλλά και δεδομένα πρόβλεψης.

miRTargetLink 2.0

Home
Unidirectional search
Bidirectional search
Tutorial
Statistics
About

CHAIR FOR CLINICAL BIOINFORMATICS
SAARLAND UNIVERSITY
CBI CENTER FOR BIOINFORMATICS
Imprint
Data protection

Select a species

miRNA-centric search
Interaction landscape for a single microRNA:
e.g. hsa-let-7b-5p
QGo
Target-gene overlap between multiple microRNAs:
hsa-miR-1269b
hsa-miR-296-3p
hsa-miR-296-3p
hsa-miR-296-3p
QGo
Select available miRNA set:
Select a miRNA set...
QGo

Target gene-centric search
Interaction landscape for a single gene symbol:
e.g. NOTCH
QGo
microRNA interaction overlap between multiple genes:
e.g. NOTCH, FOXO1, TP53
QGo
Select available pathway or gene set:
Select a gene set...
QGo

Εικόνα 10: Η βάση δεδομένων miRTargetLink. Αναζήτηση miRNAs.

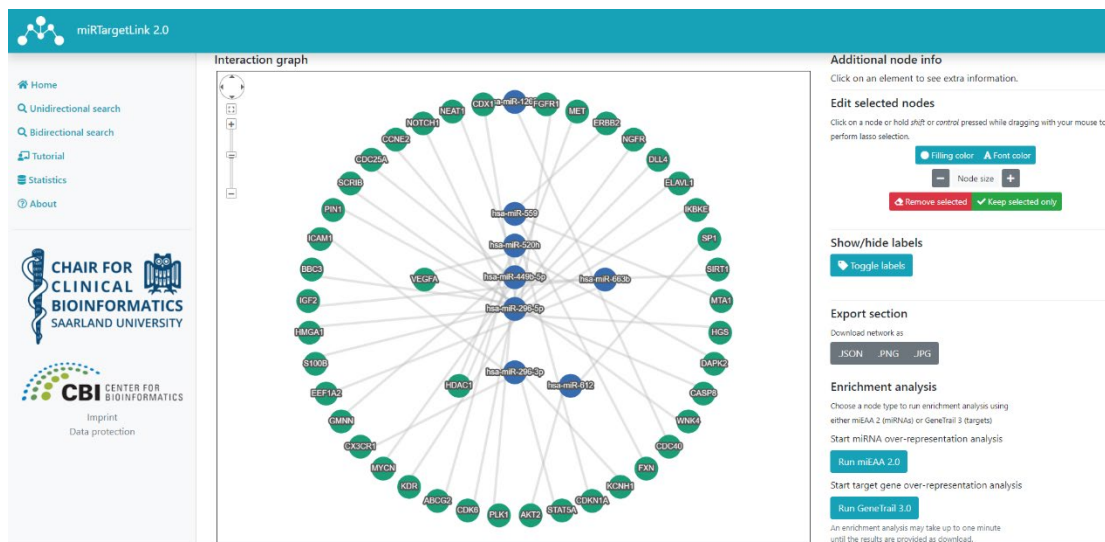
Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων καθώς και οι επιλογές που εφαρμόζονται. Αρχικά, επιλέγεται το «Unidirectional Search», όπως φαίνεται στο κόκκινο πλαίσιο. Έπειτα, επιλέγεται το είδος στο οποίο ο χρήστης επιθυμεί να γίνει η αναζήτηση. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε ο άνθρωπος, όπως φαίνεται στο μαύρο πλαίσιο. Τέλος, εισάγονται τα miRNAs για τα οποία θα γίνει αναζήτηση. Αυτή η διαδικασία γίνεται με την εισαγωγή των κωδικών ονομασιών των miRNAs (π.χ. hsa-miR-296-5p), όπως απεικονίζεται στο κίτρινο πλαίσιο. Η πραγματοποίησή της αναζήτησης γίνεται με το πάτημα του «Go».

Result for:	Hits	miRNA
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-449b-5p'	1 hit	hsa-miR-449b-5p
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-520h'	1 hit	hsa-miR-520h
Result for: 'hsa-mir-559'	5 hits	hsa-miR-559
Result for: 'hsa-mir-559'	5 hits	hsa-miR-559
Result for: 'hsa-mir-559'	5 hits	hsa-miR-559
Result for: 'hsa-mir-612'	7 hits	hsa-miR-612
Result for: 'hsa-mir-612'	7 hits	hsa-miR-612
Result for: 'hsa-mir-612'	7 hits	hsa-miR-612
Result for: 'hsa-mir-612'	7 hits	hsa-miR-612
Result for: 'hsa-mir-612'	7 hits	hsa-miR-612
Result for: 'hsa-mir-663b'	1 hit	hsa-miR-663b
Result for: 'hsa-mir-663b'	1 hit	hsa-miR-663b

Εικόνα 11: Η βάση δεδομένων miRTargetLink. Αποτελέσματα.

Αφού ολοκληρωθεί η προηγούμενη διαδικασία η βάση δεδομένων θα προσπαθήσει να εντοπίσει τα σωστά miRNAs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Πολλά από τα miRNAs εντοπίζονται αμέσως, όπως φαίνεται με πράσινο χρώμα, ενώ άλλα εμφανίζουν εναλλακτικές μορφές, όπως φαίνεται με πορτοκαλί. Σε αυτή την περίπτωση συνήθως εντοπίζονται οικογένειες miRNAs. Τέλος, επιλέγεται το «Submit».

Εν τέλει, γίνεται η λήψη των αποτελεσμάτων. Στην Εικόνα 12 φαίνεται μία γραφιστική απεικόνιση των miRNAs και των γονιδίων με τα οποία αλληλεπιδρούν. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα σε μορφή πίνακα. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως αποεπιλέγουμε το «weak validation» και ύστερα πατάμε το «Update». Με αυτό το τρόπο θα αφαιρεθούν πιθανές αστοχίες και θα μείνουν μόνο οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις που επιβεβαιώνονται από πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 12: Η βάση δεδομένων miRTargetLink. Αποτελέσματα.

miRNA	Target / Target pathway	Support	Source	Experiment(s)	Reference - PMID
hsa-miR-1269b	CDC40	Functional MTI	MIRT733873	EMSA, Flow, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27349221
hsa-miR-296-3p	KCNH1	Functional MTI	MIRT006973	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	22999387
hsa-miR-296-3p	ICAM1	Functional MTI	MIRT054646	Flow, Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	24263102
hsa-miR-296-3p	CX3CR1	Functional MTI	MIRT733640	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27186308
hsa-miR-296-3p	STAT5A	Functional MTI	MIRT734490	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay	26923924
hsa-miR-296-3p	WNK4	Functional MTI	MIRT004559	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	20561597

Εικόνα 13: Η βάση δεδομένων miRTargetLink. Αποτελέσματα σε μορφή πίνακα.

4.4 ShinyGO

Η ShinyGO είναι η τελευταία βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε. Αυτή θα μας δώσει πληροφορίες σχετικά με το σε ποια βιοχημικά και μοριακά μονοπάτια εμπλέκονται τα γονίδια-στόχοι των miRNAs. Επιπρόσθετα, μπορεί να αξιοποιεί πληροφορίες από τις βάσεις δεδομένων KEGG, GO και STRING και να τις οπτικοποιεί μέσω διαγραμμάτων και δικτύων.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αναλύσεις

1.1 Εντοπισμός πολυμορφισμών σε miRNAs (miRNASNP)

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRNASNP για την επιβεβαίωση του εντοπισμού των πολυμορφισμών σε miRNAs και τη δημιουργία μιας λίστας miRNAs με πιθανό ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα.

1.1.1 Ολιγοσπερμία

Αρχικά, παρατίθενται τα αποτελέσματα για την ολιγοσπερμία (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miRNASNP για τους άνδρες με ολιγοσπερμία

Ολιγοσπερμία										
	Pre-miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	Region	Mature miRNA	ΔG	Predict	LD
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-2110	rs17091403	chr10:114174146	C/T	0.9289/0.0711	pre-miRNA	-	-1.50	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-612	rs12803915	chr11:65444508	G/A	0.8236/0.1764	pre-miRNA	-	0.80	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3652	rs17797090	chr12:103930488	G/A	0.9229/0.0771	pre-miRNA	-	4.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-1538	rs191393746	chr16:69565832	G/A	0.9934/0.0065	pre-miRNA	-	1.90	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-1538	rs191393746	chr16:69565832	G/T	0.9934/0.0001	pre-miRNA	-	1.30	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-1269b	rs7210937	chr17:12917329	G/C	0.7556/0.2444	Seed	hsa-miR-1269b	-0.30	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3976	rs72855836	chr18:5840811	G/A	0.9685/0.0315	pre-miRNA	-	0.60	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-520h	rs56013413	chr19:53742534	G/A	0.9136/0.0864	pre-miRNA	-	4.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-296	rs117258475	chr20:58817631	G/A	0.9915/0.0085	Mature	hsa-miR-296-3p	2.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3156-3	rs2747232	chr21:13406400	A/T	-/-	pre-miRNA	-	-4.60	up	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5692b	rs451887	chr21:42951004	T/C	0.1151/0.8849	Seed	hsa-miR-5692b	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-663b	rs200194626	chr2:132257044	A/G	1/-	pre-miRNA	-	-2.80	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-663b	rs200194626	chr2:132257044	A/C	1/-	pre-miRNA	-	-5.30	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-663b	rs199671138	chr2:132257048	A/C	-/-	pre-miRNA	-	-2.30	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-1302-4	rs767805489	chr2:207269389	T/C	-/-	pre-miRNA	-	-4.30	up	(-)

SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4441	rs12233076	chr2:239085848	C/T	-/-	pre-miRNA	-	2.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-548ad	rs918690276	chr2:35471412	G/T	1/-	pre-miRNA	-	3.90	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-559	rs114803590	chr2:47377717	T/C	0.9884/0.0116	pre-miRNA	-	-0.10	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4789	rs78831152	chr3:175369619	C/T	0.8966/0.1034	pre-miRNA	-	-0.20	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3135a	rs6787734	chr3:20137605	C/T	0.7259/0.2741	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3142	rs772572114	chr5:160474464	CCTTCAG AAAGGC TGCTGAA T/C	-/-	Mature	hsa-miR-3142	-	-	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-449b	rs10061133	chr5:55170716	A/G	0.9087/0.0913	Mature	hsa-miR-449b-5p	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/C	-/-	Seed	hsa-miR-3939	3.60	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/A	-/-	Seed	hsa-miR-3939	1.80	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-548a-1	rs12197631	chr6:18571825	T/G	0.8773/0.1227	pre-miRNA	-	2.51	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3683	rs6943868	chr7:7066969	T/A	0.8727/0.1273	pre-miRNA	-	4.60	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3683	rs6943868	chr7:7066969	T/C	0.8727/-	pre-miRNA	-	0.00	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5680	rs12549434	chr8:102125435	T/C	-/-	pre-miRNA	-	3.70	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-548h-4	rs73235381	chr8:27048885	C/T	0.9608/0.0392	Mature	hsa-miR-548h-3p	5.40	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-548h-4	rs184537764	chr8:27048920	A/G	0.9607/0.0393	pre-miRNA	-	0.00	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477a	rs1844035	chr9:63819652	G/T	-/-	pre-miRNA	-	5.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477a	rs1844035	chr9:63819652	G/A	-/-	pre-miRNA	-	2.70	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477b	rs1844035	chr9:63819652	G/A	-/-	pre-miRNA	-	6.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477b	rs1844035	chr9:63819652	G/T	-/-	pre-miRNA	-	6.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-2278	rs356125	chr9:94809962	G/A	0.9604/0.0396	pre-miRNA	-	0.30	mild	(+)

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε μία πληθώρα πληροφοριών. Ξεκινώντας από την πρώτη στήλη αρχικά έχουμε τον τύπο του miRNA, με βάση τα στάδια βιογένεσης των miRNAs, στο οποίο παρατηρείται ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single

Nucleotide Polymorphism, SNP). Στην συγκεκριμένη περίπτωση όλοι οι πολυμορφισμοί βρίσκονται σε pre-miRNA. Έπειτα, στις στήλες «pre-miRNA» και «SNP ID» αναφέρονται οι κωδικές ονομασίες των pre-miRNAs και των SNPs. Ακολουθεί το «Position» το οποίο μας δίνει τις γονιδιωματικές συντεταγμένες. Παραδείγματος χάριν, όταν αναγράφεται chr10:114174146 αυτό σημαίνει πως ο πολυμορφισμός εντοπίζεται στο δέκατο χρωμόσωμα και στη θέση 114174146. Συνεχίζοντας, παρατίθεται το «Ref/Alt», το οποίο στην ουσία είναι το αλληλόμορφο αναφοράς έναντι αυτού που προκύπτει. Για παράδειγμα, όταν αναγράφεται C/T σημαίνει πως μία θυμίνη έχει αντικαταστήσει μία κυστεΐνη. Στην διπλανή στήλη αναγράφεται το «Ref freq./Alt freq.», το οποίο αντιπροσωπεύει την συχνότητα με την οποία εμφανίζεται το αλληλόμορφο αναφοράς έναντι του πολυμορφικού. Η συχνότητα παίρνει τιμές από το 0 έως το 1, δηλαδή από την πλήρης ανυπαρξία έως την αποκλειστική παρουσία του αλληλομόρφου αυτού. Υπάρχει περίπτωση να αναγράφεται και το έξης σύμβολο «-». Στην περίπτωση αυτή το σύμβολο αυτό προσδιορίζει την έλλειψη πληροφοριών. Εν συνεχεία, παρατίθεται το «Region» που αναφέρεται στον τύπο του miRNA. Στην στήλη αυτή αναγράφονται οι εξής περιπτώσεις: «pre-miRNA», «Mature» και το «Seed». Το pre-miRNA είναι το ανώριμο ακόμα miRNA, πριν υποστεί επεξεργασία, ενώ το Mature είναι το ώριμο πλέον. Το Seed είναι μία περιοχή στην 5' περιοχή του ώριμου miRNA που εκτείνεται από το δεύτερο έως το έβδομο νουκλεοτίδιο και είναι πάντα απόλυτα συμπληρωματική με την αντίστοιχη περιοχή πρόσδεσης στο mRNA στόχο. Μετέπειτα, παρουσιάζεται το «Mature miRNA» που αναγράφονται όλες οι κωδικές ονομασίες των ώριμων miRNAs. Δίπλα ακριβώς παρατίθεται το «ΔG» το οποίο αφορά στη μέτρηση της ελεύθερης ενέργειας. Όταν αυτή λαμβάνει αρνητικές τιμές οδηγούμαστε σε μία πιο σταθερή κατάσταση και διαμόρφωση, ενώ σε θετικές το αντίθετο. Ακολουθεί το «Predict» δηλώνει την πιθανή επίπτωση του πολυμορφισμού στο miRNA. Αυτή μπορεί να είναι up, down, mild ή «-», δηλαδή αυξημένη έκφραση, μειωμένη έκφραση, ήπια αλλαγή ή μη μελετημένη. Τέλος, το LD αναφέρεται στην ανισορροπία σύνδεσης.

Από τους παραπάνω πολυμορφισμούς, αυτοί που εντοπίζονται σε περιοχή αλληλεπίδρασης miRNA-mRNA αναλύονται περαιτέρω από την βάση δεδομένων και παρατίθεται η απώλεια και η δημιουργία θέσεων πρόσδεσης, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miRNASNP για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία

Ολιγοσπερμία								
	Mature miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	LD	Gain	Loss
SNP in seed	hsa-miR-1269b	rs7210937	Chr17:12917329	G/C	0.7556/0.2444	(+)	3.165	2.074
SNP in seed	hsa-miR-5692b	rs451887	chr21:42951004	T/C	0.1151/0.8849	(+)	1.319	3.444
SNP in seed	hsa-miP-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/C	-/-	(-)	1.895	135

SNP in seed	hsa-miP-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/A	-/-	(-)	846	259
-------------	--------------	------------	----------------	-----	-----	-----	-----	-----

Όπως προκύπτει, στην προκειμένη περίπτωση μελετώνται μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στη seed περιοχή των miRNAs και επιπλέον προστίθεται σαν πληροφορία το «Gain» και το «Loss». Δεδομένου πως η αλληλουχία αυτής της περιοχής του miRNA πρέπει να είναι απόλυτα συμπληρωματική με αυτή του mRNA στόχου του, εύκολα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως η παραμικρή αλλαγή σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο μπορεί να οδηγήσει στην ανικανότητα σύνδεσης του miRNA με το mRNA ή την απόκτηση καινούριων αλληλεπιδράσεων με διαφορετικά mRNA. Αυτό εκφράζει το «Gain» και το «Loss», την απόκτηση καινούριων αλληλεπιδράσεων miRNA-mRNA και το τερματισμό προϋπάρχουσων. Οι υπόλοιπες στήλες είναι ακριβώς οι ίδιες με αυτή του προηγούμενου πίνακα και οι πληροφορίες τους αναφέρονται στα ίδια πράγματα.

1.1.2 Ασθενοσπερμία

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζονται κατ' αντιστοιχία τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την ασθενοσπερμία.

Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miR SNP για τους ασθενείς με ασθενοσπερμία

Ασθενοσπερμία										
	Pre-miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	Region	Mature miRNA	ΔG	Predict	LD
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-2110	rs17091403	chr10:114174146	C/T	0.9289/0.0711	pre-miRNA	-	-1.50	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-612	rs12803915	chr11:65444508	G/A	0.8236/0.1764	pre-miRNA	-	0.80	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3652	rs17797090	chr12:103930488	G/A	0.9229/0.0771	pre-miRNA	-	4.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-618	rs2682818	chr12:80935757	A/T	0.1971/-	pre-miRNA	-	1.40	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-618	rs2682818	chr12:80935757	A/C	0.1971/0.8029	pre-miRNA	-	-3.50	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5094	rs11435035	chr15:89850717	CT/C	-/-	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5094	rs11435035	chr15:89850717	CT/CTT	-/-	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5094	rs11435035	chr15:89850717	CT/CTTT	-/-	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5094	rs11435035	chr15:89850717	CT/CTTTT	-/-	pre-miRNA	-	-	-	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-1269b	rs7210937	chr17:12917329	G/C	0.7556/0.2444	Seed	hsa-miR-1269b	-0.30	mild	(+)

SNP in pre-miRNA	hsa-mir-518d	rs74704964	chr19:53734954	C/T	0.9709/0.0291	pre-miRNA	-	2.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-296	rs117258475	chr20:58817631	G/A	0.9915/0.0085	Mature	hsa-miR-296-3p	2.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5692b	rs451887	chr21:42951004	T/C	0.1151/0.8849	Seed	hsa-miR-5692b	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-650	rs5996397	chr22:22822846	C/A	0.7945/-	pre-miRNA	-	0.80	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-650	rs5996397	chr22:22822846	C/G	0.7945/0.2055	pre-miRNA	-	-0.80	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4441	rs12233076	chr2:239085848	C/T	-/-	pre-miRNA	-	2.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4786	rs78832554	chr2:239943059	G/A	0.9822/0.0178	pre-miRNA	-	1.20	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3135a	rs6787734	chr3:20137605	C/T	0.7259/0.2741	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3135a	rs142342924	chr3:20137638	G/A	0.9112/0.0888	pre-miRNA	-	1.90	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3938	rs10575780	chr3:55852545	TAA/T	-/0.1995	pre-miRNA	-	-0.20	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3938	rs10575780	chr3:55852545	TAA/TAAA	-/-	pre-miRNA	-	-	-	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3938	rs10575780	chr3:55852545	TAA/TA	-/-	pre-miRNA	-	-	-	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-449b	rs10061133	chr5:55170716	A/G	0.9087/0.0913	Mature	hsa-miR-449b-5p	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/C	-/-	Seed	hsa-miR-3939	3.60	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/A	-/-	Seed	hsa-miR-3939	1.80	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024234	chr6:166997900	C/A	-/-	pre-miRNA	-	2.11	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024234	chr6:166997900	C/G	-/-	pre-miRNA	-	1.81	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4645	rs67030829	chr6:2854065	C/A	0.9908/-	pre-miRNA	-	2.78	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4645	rs67030829	chr6:2854065	C/T	0.9908/0.0092	pre-miRNA	-	2.78	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-548u	rs4994089	chr6:57390141	G/T	-/-	pre-miRNA	-	6.90	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4656	rs921372085	chr7:4788588	C/G	1/-	pre-miRNA	-	5.20	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5680	rs12549434	chr8:102125435	T/C	-/-	pre-miRNA	-	3.70	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3689d-1	rs113454901	chr9:134849634	G/A	-/-	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)

SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477a	rs1844035	chr9:63819652	G/T	-/-	pre-miRNA	-	5.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477a	rs1844035	chr9:63819652	G/A	-/-	pre-miRNA	-	2.70	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477b	rs1844035	chr9:63819652	G/A	-/-	pre-miRNA	-	6.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477b	rs1844035	chr9:63819652	G/T	-/-	pre-miRNA	-	6.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-2278	rs356125	chr9:94809962	G/A	0.9604/0.0396	pre-miRNA	-	0.30	mild	(+)

Αντίστοιχα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν σε περιοχές αλληλεπίδρασης miRNA-mRNA στην ασθενοσπερμία στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miRNASNP για τους ασθενείς με ασθενοσπερμία

Ασθενοσπερμία								
	Mature miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	LD	Gain	Loss
SNP in seed	hsa-miR-1269b	rs7210937	chr17:12917329	G/C	0.7556/0.2444	(+)	3.165	2.074
SNP in seed	hsa-miR-5692b	rs451887	chr21:42951004	T/C	0.1151/0.8849	(+)	1.319	3.444
SNP in seed	hsa-miR-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/C	-/-	(-)	1.895	135
SNP in seed	hsa-miR-3939	rs73024232	chr6:166997849	G/A	-/-	(-)	846	259

1.1.3 Τερατοσπερμία

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για τους τερατοσπερμικούς, με βάση την miRNASNP, στους Πίνακες 7 και 8.

Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miRNASNP για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

Τερατοσπερμία										
	Pre-miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	Region	Mature miRNA	ΔG	Predict	LD
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3652	rs17797090	chr12:103930488	G/A	0.9229/0.0771	pre-miRNA	-	4.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-618	rs2682818	chr12:80935757	A/T	0.1971/-	pre-miRNA	-	1.40	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-618	rs2682818	chr12:80935757	A/C	0.1971/0.8029	pre-miRNA	-	-3.50	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3171	rs35170395	chr14:27633270	CTA/C	-/-	pre-miRNA	-	1.50	mild	(-)

SNP in pre-miRNA	hsa-mir-1269b	rs7210937	chr17:12917329	G/C	0.7556/0.2444	Seed	hsa-miR-1269b	-0.30	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-516b-2	rs10670323	chr19:53725488	G/GAAAGA	-/-	pre-miRNA	-	-	-	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-200b	rs72563729	chr1:1167183	G/A	0.9891/0.0109	pre-miRNA	-	2.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-200b	rs72563729	chr1:1167183	G/C	0.9891/-	pre-miRNA	-	-3.70	up	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-2682	rs74904371	chr1:98045291	C/T	0.9799/0.0201	Seed	hsa-miR-2682-3p	3.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-5692b	rs451887	chr21:42951004	T/C	0.1151/0.8849	Seed	hsa-miR-5692b	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-650	rs5996397	chr22:22822846	C/A	0.7945/-	pre-miRNA	-	0.80	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-650	rs5996397	chr22:22822846	C/G	0.7945/0.2055	pre-miRNA	-	-0.80	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-663b	rs200194626	chr2:132257044	A/G	1/-	pre-miRNA	-	-2.80	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-663b	rs200194626	chr2:132257044	A/C	1/-	pre-miRNA	-	-5.30	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-663b	rs199671138	chr2:132257048	A/C	-/-	pre-miRNA	-	-2.30	up	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4441	rs12233076	chr2:239085848	C/T	-/-	pre-miRNA	-	2.10	down	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4789	rs78831152	chr3:175369619	C/T	0.8966/0.1034	pre-miRNA	-	-0.20	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3135a	rs6787734	chr3:20137605	C/T	0.7259/0.2741	pre-miRNA	-	0.00	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3135a	rs142342924	chr3:20137638	G/A	0.9112/0.0888	pre-miRNA	-	1.90	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024234	chr6:166997900	C/A	-/-	pre-miRNA	-	2.11	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3939	rs73024234	chr6:166997900	C/G	-/-	pre-miRNA	-	1.81	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-548u	rs4994089	chr6:57390141	G/T	-/-	pre-miRNA	-	6.90	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4467	rs374409015	chr7:102471478	C/T	0.9784/0.0216	Seed	hsa-miR-4467	1.90	mild	(+)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3683	rs6943868	chr7:7066969	T/A	0.8727/0.1273	pre-miRNA	-	4.60	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-3683	rs6943868	chr7:7066969	T/C	0.8727/-	pre-miRNA	-	0.00	mild	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477a	rs1844035	chr9:63819652	G/T	-/-	pre-miRNA	-	5.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477a	rs1844035	chr9:63819652	G/A	-/-	pre-miRNA	-	2.70	down	(-)

SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477b	rs1844035	chr9:63819652	G/A	-/-	pre-miRNA	-	6.50	down	(-)
SNP in pre-miRNA	hsa-mir-4477b	rs1844035	chr9:63819652	G/T	-/-	pre-miRNA	-	6.50	down	(-)

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *miRSNP* για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

Τερατοσπερμία								
	Mature miRNA	SNP ID	Position	Ref/Alt	Ref freq./Alt freq.	LD	Gain	Loss
SNP in seed	hsa-miR-1269b	rs7210937	chr17:12917329	G/C	0.7556/0.2444	(+)	3.165	2.074
SNP in seed	hsa-miR-5692b	rs451887	chr21:42951004	T/C	0.1151/0.8849	(+)	1.319	3.444
SNP in seed	hsa-miR-2682-3p	rs74904371	chr1:98045291	C/T	0.9799/0.0201	(+)	2.498	2.950
SNP in seed	hsa-miR-4467	rs374409015	chr7:102471478	C/T	0.9784/0.0216	(+)	562	1.609

1.2 Δεύτερη Ανάλυση

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την βάση δεδομένων SNPnexus, αρχικά, για την ολιγοσπερμία. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί ο εντοπισμός των πολυμορφισμών σε θέσεις που κωδικοποιούν για miRNAs, να δημιουργηθεί η τελική λίστα miRNAs, να διερευνηθεί πιθανή συσχέτισή τους με ασθένειες καθώς και ο πιθανός λειτουργικός τους ρόλος.

1.2.1 Ολιγοσπερμία

Ο πρώτος πίνακας αποτελεσμάτων (Πίνακας 9) για την ολιγοσπερμία αναφέρεται στα miRNAs που εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί. Παίρνοντας τις στήλες κατά σειρά αρχικά παρουσιάζεται το «Variation ID» που αναφέρεται στην κωδική ονομασία του πολυμορφισμού. Στη δεύτερη στήλη ακολουθεί το «Overlapped gene» το οποίο αναφέρεται στην ονομασία του γονιδίου στην οποία χαρτογραφείται ο πολυμορφισμός. Συνεχίζοντας, παρατίθεται το «Type» το οποίο δηλώνει το είδος του γονιδίου που σαφώς είναι miRNA. Τέλος, αναφέρεται το «Annotation» το οποίο δίνει πληροφορίες σχετικά με το ρόλο του γονιδίου. Αυτό στις περισσότερες περιπτώσεις είναι non-coding, πράγμα λογικό αφού μελετώνται miRNAs.

Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *SNPnexus* για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία

Genomic Coordinates and Overlapping			
Overlapped and Nearest Genes			
Variation ID	Overlapped gene	Type	Annotation
rs17091403	MIR2110	miRNA	non-coding
rs12803915	MIR612	miRNA	non-coding
rs17797090	MIR3652	miRNA	non-coding
rs191393746	MIR1538	miRNA	non-coding
rs7210937	MIR1269B	miRNA	non-coding

rs72855836	MIR3976	miRNA	non-coding
rs56013413	MIR520H	miRNA	non-coding
rs918690276	MIR548AD	miRNA	non-coding
rs114803590	MIR559	miRNA	non-coding
rs200194626	MIR663B	miRNA	non-coding
rs199671138	MIR663B	miRNA	non-coding
rs767805489	MIR1302-4	miRNA	non-coding
rs12233076	MIR4441	miRNA	non-coding
rs117258475	MIR296	miRNA	non-coding
rs451887	MIR5692B	miRNA	non-coding
rs6787734	MIR3135A	miRNA	non-coding
rs78831152	MIR4789	miRNA	non-coding
rs10061133	MIR449B	miRNA	non-coding
rs772572114	MIR3142	miRNA	non-coding non-coding exonic-3downstream
rs12197631	MIR548A1	miRNA	non-coding
rs73024232	MIR3939	miRNA	non-coding
rs6943868	MIR3683	miRNA	non-coding
rs73235381	MIR548H4	miRNA	non-coding
rs184537764	MIR548H4	miRNA	non-coding
rs12549434	MIR5680	miRNA	non-coding
rs1844035	MIR4477B	miRNA	non-coding
rs356125	MIR2278	miRNA	non-coding

Στον δεύτερο πίνακα (Πίνακας 10) αναφέρονται και πάλι οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε miRNAs παρέχοντας επιπρόσθετες πληροφορίες που εντοπίζονται στην Τρίτη στήλη. Αρχικά παρατίθεται το «Variation ID» όπου αναφέρεται η κωδική ονομασία του πολυμορφισμού. Ακολουθεί το «Symbol» που είναι η ονομασία του γονιδίου που φέρει την μετάλλαξη. Τέλος, αποδίδεται το «Predicted Function» το οποίο σχετίζεται με την λειτουργία του πολυμορφισμού. Όπως και προηγουμένως τα αποτελέσματα είναι non-coding.

Πίνακας 10: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNP Nexus για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία

Gene/Protein Consequences		
Variation ID	Symbol	Predicted Function
rs10061133	MIR449C	3downstream
rs10061133	MIR449A	5upstream
rs10061133	MIR449B	non-coding
rs114803590	MIR559	non-coding
rs117258475	MIR298	3downstream
rs117258475	MIR296	non-coding
rs12197631	MIR548A1HG	non-coding intronic
rs12197631	MIR548A1	non-coding
rs12233076	MIR4441	non-coding
rs12549434	MIR5680	non-coding
rs12803915	MIR612	non-coding
rs17091403	MIR2110	non-coding
rs17797090	MIR3652	non-coding
rs1844035	MIR4477B	non-coding
rs184537764	MIR548H4	non-coding
rs191393746	MIR1538	non-coding
rs199671138	MIR663B	non-coding
rs200194626	MIR663B	non-coding
rs2965466	MIR3683	5upstream
rs356125	MIR2278	non-coding
rs451887	MIR5692B	non-coding
rs56013413	MIR517C	3downstream
rs56013413	MIR520H	non-coding
rs6787734	MIR3135A	non-coding

rs6943868	MIR3683	non-coding
rs7210937	MIR1269B	non-coding
rs72855836	MIR3976HG	non-coding intronic
rs72855836	MIR3976	non-coding
rs73024232	MIR3939	non-coding
rs73235381	MIR548H4	non-coding
rs767805489	MIR1302-4	non-coding
rs772572114	MIR3142HG	non-coding intronic
rs772572114	MIR3142	non-coding
rs918690276	MIR548AD	non-coding

Στον τρίτο πίνακα (Πίνακας 11) επιβεβαιώνεται και πάλι ότι οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται σε miRNAs με βάση πληροφορίες της miRBase και της miRNA, δύο βάσεων δεδομένων από τις οποίες αντλεί πληροφορίες η SNPnexus. Παίρνοντάς τα αποτελέσματα κατά στήλες, στην πρώτη αναφέρεται το «Variation ID» που είναι η κωδική ονομασία του πολυμορφισμού. Ακολουθεί το «Name» που είναι η κωδική ονομασία του ώριμου miRNA. Τέλος, παρατίθεται το «Type» το οποίο είναι το είδος του miRNA.

Πίνακας 11: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNPnexus για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία

Regulatory Elements		
miRBASE		
Variation ID	Name	Type
rs10061133	hsa-mir-449b	miRNA_primary_transcript
rs10061133	hsa-miR-449b-5p	miRNA
rs114803590	hsa-mir-559	miRNA_primary_transcript
rs117258475	hsa-mir-296	miRNA_primary_transcript
rs117258475	hsa-miR-296-3p	miRNA
rs12197631	hsa-mir-548a-1	miRNA_primary_transcript
rs12233076	hsa-mir-4441	miRNA_primary_transcript
rs12549434	hsa-mir-5680	miRNA_primary_transcript
rs12803915	hsa-mir-612	miRNA_primary_transcript
rs17091403	hsa-mir-2110	miRNA_primary_transcript
rs17797090	hsa-mir-3652	miRNA_primary_transcript
rs1844035	hsa-mir-4477a	miRNA_primary_transcript
rs1844035	hsa-mir-4477b	miRNA_primary_transcript
rs184537764	hsa-mir-548h-4	miRNA_primary_transcript
rs191393746	hsa-mir-1538	miRNA_primary_transcript
rs199671138	hsa-mir-663b	miRNA_primary_transcript
rs200194626	hsa-mir-663b	miRNA_primary_transcript
rs356125	hsa-mir-2278	miRNA_primary_transcript
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA_primary_transcript
rs451887	hsa-miR-5692b	miRNA
rs56013413	hsa-mir-520h	miRNA_primary_transcript
rs6787734	hsa-mir-3135a	miRNA_primary_transcript
rs6943868	hsa-mir-3683	miRNA_primary_transcript
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA_primary_transcript
rs7210937	hsa-miR-1269b	miRNA
rs72855836	hsa-mir-3976	miRNA_primary_transcript
rs73024232	hsa-mir-3939	miRNA_primary_transcript
rs73024232	hsa-miR-3939	miRNA
rs73235381	hsa-mir-548h-4	miRNA_primary_transcript
rs73235381	hsa-miR-548h-3p	miRNA
rs767805489	hsa-mir-1302-4	miRNA_primary_transcript
rs772572114	hsa-mir-3142	miRNA_primary_transcript
rs772572114	hsa-miR-3142	miRNA
rs78831152	hsa-mir-4789	miRNA_primary_transcript
rs918690276	hsa-mir-548ad	miRNA_primary_transcript
miRNA		

rs10061133	hsa-mir-449b	miRNA
rs114803590	hsa-mir-559	miRNA
rs117258475	hsa-mir-296	miRNA
rs12197631	hsa-mir-548a-1	miRNA
rs12233076	hsa-mir-4441	miRNA
rs12549434	hsa-mir-5680	miRNA
rs12803915	hsa-mir-612	miRNA
rs17091403	hsa-mir-2110	miRNA
rs17797090	hsa-mir-3652	miRNA
rs1844035	hsa-mir-4477a	miRNA
rs1844035	hsa-mir-4477b	miRNA
rs184537764	hsa-mir-548h-4	miRNA
rs191393746	hsa-mir-1538	miRNA
rs199671138	hsa-mir-663b	miRNA
rs200194626	hsa-mir-663b	miRNA
rs356125	hsa-mir-2278	miRNA
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA
rs56013413	hsa-mir-520h	miRNA
rs6787734	hsa-mir-3135a	miRNA
rs6943868	hsa-mir-3683	miRNA
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA
rs72855836	hsa-mir-3976	miRNA
rs73024232	hsa-mir-3939	miRNA
rs73235381	hsa-mir-548h-4	miRNA
rs767805489	hsa-mir-1302-4	miRNA
rs772572114	hsa-mir-3142	miRNA
rs78831152	hsa-mir-4789	miRNA
rs918690276	hsa-mir-548ad	miRNA

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε επίσης η πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών με την εκδήλωση συγκεκριμένων φαινοτύπων ή ασθενειών. Για κανέναν πολυμορφισμό δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα ή με άλλη κατάσταση που σχετίζεται με αυτή.

Τέλος, διερευνήθηκε ο πιθανός λειτουργικός ρόλος των πολυμορφισμών με βάση το CADD score (Πίνακας 12). Με βάση τα αποτελέσματα, στην πρώτη στήλη παρατίθεται το «Variation ID» που είναι η κωδική ονομασία του πολυμορφισμού για το γονίδιο το οποίο το φέρει. Ακολουθεί το «PHRED» που υποδηλώνει το CADD score. Στην παρούσα έρευνα μόνο τα αποτελέσματα με τιμές PHRED άνω των 10 συμπεριλήφθηκαν καθώς υποδηλώνουν πιθανό λειτουργικό ρόλο.

Πίνακας 12: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNPnexus για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία

Non-coding Scoring	
Variation ID	PHRED
rs12197631	10.540
rs796983598	12.060
rs191393746	12.420
rs191393746	12.820
rs17797090	14.590
rs10061133	14.630
rs117258475	19.420
rs72855836	19.440

1.2.2 Ασθενосπερμία

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την ασθενοσπερμία, ξεκινώντας από τον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *SNPnexus* για τους ασθενείς με ασθενοσπερμία

Genomic Coordinates and Overlapping			
Overlapped and Nearest Genes			
Variation ID	Overlapped gene	Type	Annotation
rs17091403	MIR2110	miRNA	non-coding
rs12803915	MIR612	miRNA	non-coding
rs2682818	MIR618	miRNA	non-coding
rs17797090	MIR3652	miRNA	non-coding
rs11435035	MIR5094	miRNA	non-coding
rs7210937	MIR1269B	miRNA	non-coding
rs74704964	MIR518D	miRNA	non-coding
rs12233076	MIR4441	miRNA	non-coding
rs78832554	MIR4786	miRNA	non-coding
rs117258475	MIR296	miRNA	non-coding
rs451887	MIR5692B	miRNA	non-coding
rs5996397	MIR650	miRNA	non-coding
rs6787734	MIR3135A	miRNA	non-coding
rs142342924	MIR3135A	miRNA	non-coding
rs10575780	MIR3938	miRNA	non-coding
rs10061133	MIR449B	miRNA	non-coding
rs67030829	MIR4645	miRNA	non-coding
rs4994089	MIR548U	miRNA	non-coding
rs73024232	MIR3939	miRNA	non-coding
rs921372085	MIR4656	miRNA	non-coding
rs12549434	MIR5680	miRNA	non-coding
rs1844035	MIR4477B	miRNA	non-coding
rs356125	MIR2278	miRNA	non-coding
rs113454901	MIR3689D1	miRNA	non-coding

Όπως και προηγουμένως, οι πολυμορφισμοί και τα γονίδια στα οποία εντοπίζονται με βάση την *SNPnexus* παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *SNPnexus* για τους ασθενείς με ασθενοσπερμία

Gene/Protein Consequences		
Variation ID	Variation ID	Variation ID
rs77264282	MIR1248	5upstream
rs7210937	MIR1269B	non-coding
rs17091403	MIR2110	non-coding
rs356125	MIR2278	non-coding
rs117258475	MIR296	non-coding
rs117258475	MIR298	3downstream
rs6787734	MIR3135A	non-coding
rs142342924	MIR3135A	non-coding
rs17797090	MIR3652	non-coding
rs2965466	MIR3683	5upstream
rs113454901	MIR3689A	5upstream
rs113454901	MIR3689B	3downstream
rs113454901	MIR3689C	5upstream
rs113454901	MIR3689D1	non-coding
rs113454901	MIR3689D2	3downstream
rs113454901	MIR3689E	3downstream
rs113454901	MIR3689F	3downstream
rs10575780	MIR3938	non-coding
rs73024232	MIR3939	non-coding

rs12233076	MIR4441	non-coding
rs1844035	MIR4477B	non-coding
rs10061133	MIR449A	Supstream
rs10061133	MIR449B	non-coding
rs10061133	MIR449C	3downstream
rs67030829	MIR4645	non-coding
rs921372085	MIR4656	non-coding
rs78832554	MIR4786	non-coding
rs11435035	MIR5094	non-coding
rs74704964	MIR516B1	Supstream
rs74704964	MIR518D	non-coding
rs4994089	MIR548U	non-coding
rs12549434	MIR5680	non-coding
rs451887	MIR5692B	non-coding
rs12803915	MIR612	non-coding
rs2682818	MIR618	non-coding
rs5996397	MIR650	non-coding

Ακολουθεί η επιβεβαίωση της χαρτογράφησης των πολυμορφισμών με βάση της πληροφορίες από την miRBase και την miRNA στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNP Nexus για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία

Regulatory Elements		
miRBASE		
Variation ID	Variation ID	Variation ID
rs10061133	hsa-mir-449b	miRNA_primary_transcript
rs10061133	hsa-mir-449b-5p	miRNA
rs10575780	hsa-mir-3938	miRNA_primary_transcript
rs113454901	hsa-mir-3689d-1	miRNA_primary_transcript
rs11435035	hsa-mir-5094	miRNA_primary_transcript
rs117258475	hsa-mir-296	miRNA_primary_transcript
rs117258475	hsa-miR-296-3p	miRNA
rs12233076	hsa-mir-4441	miRNA_primary_transcript
rs12549434	hsa-mir-5680	miRNA_primary_transcript
rs12803915	hsa-mir-612	miRNA_primary_transcript
rs142342924	hsa-mir-3135a	miRNA_primary_transcript
rs17091403	hsa-mir-2110	miRNA_primary_transcript
rs17797090	hsa-mir-3652	miRNA_primary_transcript
rs1844035	hsa-mir-4477a	miRNA_primary_transcript
rs1844035	hsa-mir-4477b	miRNA_primary_transcript
rs2682818	hsa-mir-618	miRNA_primary_transcript
rs356125	hsa-mir-2278	miRNA_primary_transcript
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA_primary_transcript
rs451887	hsa-miR-5692b	miRNA
rs4994089	hsa-mir-548u	miRNA_primary_transcript
rs5996397	hsa-mir-650	miRNA_primary_transcript
rs67030829	hsa-mir-4645	miRNA_primary_transcript
rs6787734	hsa-mir-3135a	miRNA_primary_transcript
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA_primary_transcript
rs7210937	hsa-miR-1269b	miRNA
rs73024232	hsa-mir-3939	miRNA_primary_transcript
rs73024232	hsa-miR-3939	miRNA
rs74704964	hsa-mir-518d	miRNA_primary_transcript
rs78832554	hsa-mir-4786	miRNA_primary_transcript
rs921372085	hsa-mir-4656	miRNA_primary_transcript
miRNA		
rs10061133	hsa-mir-449b	miRNA
rs117258475	hsa-mir-296	miRNA
rs12233076	hsa-mir-4441	miRNA
rs12549434	hsa-mir-5680	miRNA
rs12803915	hsa-mir-612	miRNA

rs17091403	hsa-mir-2110	miRNA
rs17797090	hsa-mir-3652	miRNA
rs1844035	hsa-mir-4477a	miRNA
rs1844035	hsa-mir-4477b	miRNA
rs2682818	hsa-mir-618	miRNA
rs356125	hsa-mir-2278	miRNA
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA
rs6787734	hsa-mir-3135a	miRNA
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA
rs73024232	hsa-mir-3939	miRNA
rs10575780	hsa-mir-3938	miRNA
rs113454901	hsa-mir-3689d-1	miRNA
rs4994089	hsa-mir-548u	miRNA
rs67030829	hsa-mir-4645	miRNA
rs921372085	hsa-mir-4656	miRNA
rs11435035	hsa-mir-5094	miRNA
rs142342924	hsa-mir-3135a	miRNA
rs5996397	hsa-mir-650	miRNA
rs74704964	hsa-mir-518d	miRNA
rs78832554	hsa-mir-4786	miRNA

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, δεν προέκυψε συσχέτιση πολυμορφισμών με την ανδρική υπογονιμότητα ή άλλες σχετικές ασθένειες. Τα αποτελέσματα για το CADD score στην περίπτωση της ασθenoσπερμίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNPnexus για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία

Non-coding Scoring	
Variation ID	PHRED
rs79423059	10.440
rs539650443	10.590
rs74761498	10.900
rs74761498	11.060
rs74761498	11.320
rs1419570888	11.340
rs12035375	13.590
rs371647814	13.600
rs17797090	14.590
rs10061133	14.630
rs7103202	16.610
rs7103202	16.690
rs7103202	16.830
rs12671106	17.830
rs13019380	18.000
rs117258475	19.420
rs79423059	10.440

1.2.3 Τερατοσπερμία

Έπειτα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων SNPnexus για την τερατοσπερμία (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNPnexus για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

Genomic Coordinates and Overlapping
Overlapped and Nearest Genes

Variation ID	Variation ID	Variation ID	Variation ID
rs12233076	MIR4441	miRNA	non-coding
rs142342924	MIR3135A	miRNA	non-coding
rs17797090	MIR3652	miRNA	non-coding
rs1844035	MIR4477B	miRNA	non-coding
rs199671138	MIR663B	miRNA	non-coding
rs200194626	MIR663B	miRNA	non-coding
rs2682818	MIR618	miRNA	non-coding
rs374409015	MIR4467	miRNA	non-coding
rs451887	MIR5692B	miRNA	non-coding
rs4994089	MIR548U	miRNA	non-coding
rs5996397	MIR650	miRNA	non-coding
rs6787734	MIR3135A	miRNA	non-coding
rs6943868	MIR3683	miRNA	non-coding
rs7210937	MIR1269B	miRNA	non-coding
rs74904371	MIR2682	miRNA	non-coding
rs78831152	MIR4789	miRNA	non-coding
rs10670323	MIR516B2	miRNA	non-coding
rs72563729	MIR200B	miRNA	non-coding
rs35170395	MIR3171	miRNA	non-coding

Όπως και προηγουμένως, επιπλέον πληροφορίες για τους πολυμορφισμούς στην περίπτωση της τερατοσπερμίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *SNPnexus* για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

Gene/Protein Consequences		
Variation ID	Variation ID	Variation ID
rs7210937	MIR1269B	non-coding
rs74904371	MIR137	3downstream
rs74904371	MIR137HG	non-coding intronic
rs74904371	MIR137HG	non-coding intronic
rs74904371	MIR137HG	non-coding
rs74904371	MIR137HG	non-coding
rs74904371	MIR137HG	non-coding intronic
rs74904371	MIR137HG	non-coding intronic
rs72563729	MIR200A	Supstream
rs72563729	MIR200B	non-coding
rs74904371	MIR2682	non-coding
rs6787734	MIR3135A	non-coding
rs142342924	MIR3135A	non-coding
rs35170395	MIR3171	non-coding
rs17797090	MIR3652	non-coding
rs2965466	MIR3683	Supstream
rs6943868	MIR3683	non-coding
rs72563729	MIR429	Supstream
rs12233076	MIR4441	non-coding
rs374409015	MIR4467	non-coding
rs1844035	MIR4477B	non-coding
rs78831152	MIR4789	non-coding
rs10670323	MIR516B2	non-coding
rs10670323	MIR526A2	Supstream
rs4994089	MIR548U	non-coding
rs451887	MIR5692B	non-coding
rs2682818	MIR618	non-coding
rs5996397	MIR650	non-coding
rs199671138	MIR663B	non-coding
rs200194626	MIR663B	non-coding

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της miRBase και miRNA (Πίνακας 19) για την τερατοσπερμία.

Πίνακας 19: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων SNP Nexus για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

Regulatory Elements		
miRBASE		
Variation ID	Variation ID	Variation ID
rs10670323	hsa-mir-516b-2	miRNA_primary_transcript
rs12233076	hsa-mir-4441	miRNA_primary_transcript
rs142342924	hsa-mir-3135a	miRNA_primary_transcript
rs17797090	hsa-mir-3652	miRNA_primary_transcript
rs1844035	hsa-mir-4477a	miRNA_primary_transcript
rs1844035	hsa-mir-4477b	miRNA_primary_transcript
rs199671138	hsa-mir-663b	miRNA_primary_transcript
rs200194626	hsa-mir-663b	miRNA_primary_transcript
rs2682818	hsa-mir-618	miRNA_primary_transcript
rs35170395	hsa-mir-3171	miRNA_primary_transcript
rs374409015	hsa-mir-4467	miRNA_primary_transcript
rs374409015	hsa-mir-4467	miRNA
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA_primary_transcript
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA
rs4994089	hsa-mir-548u	miRNA_primary_transcript
rs5996397	hsa-mir-650	miRNA_primary_transcript
rs6787734	hsa-mir-3135a	miRNA_primary_transcript
rs6943868	hsa-mir-3683	miRNA_primary_transcript
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA_primary_transcript
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA
rs72563729	hsa-mir-200b	miRNA_primary_transcript
rs74904371	hsa-mir-2682	miRNA_primary_transcript
rs74904371	hsa-mir-2682-3p	miRNA
rs78831152	hsa-mir-4789	miRNA_primary_transcript
miRNA		
rs10670323	hsa-mir-516b-2	miRNA
rs12233076	hsa-mir-4441	miRNA
rs142342924	hsa-mir-3135a	miRNA
rs17797090	hsa-mir-3652	miRNA
rs1844035	hsa-mir-4477a	miRNA
rs1844035	hsa-mir-4477b	miRNA
rs199671138	hsa-mir-663b	miRNA
rs200194626	hsa-mir-663b	miRNA
rs2682818	hsa-mir-618	miRNA
rs35170395	hsa-mir-3171	miRNA
rs374409015	hsa-mir-4467	miRNA
rs451887	hsa-mir-5692b	miRNA
rs4994089	hsa-mir-548u	miRNA
rs5996397	hsa-mir-650	miRNA
rs6787734	hsa-mir-3135a	miRNA
rs6943868	hsa-mir-3683	miRNA
rs7210937	hsa-mir-1269b	miRNA
rs72563729	hsa-mir-200b	miRNA
rs74904371	hsa-mir-2682	miRNA
rs78831152	hsa-mir-4789	miRNA
rs10670323	hsa-mir-516b-2	miRNA

Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις δεν εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί που να συσχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα ή άλλες σχετικές ασθένειες. Τα αποτελέσματα για το CADD score παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *SNPnexus* για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

Non-coding Scoring	
Variation ID	PHRED
rs796983598	12.060
rs72563729	13.690
rs72563729	13.860
rs17797090	14.590
rs74904371	18.630
rs8192600	19.960
rs796983598	12.060

1.3 Διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων που στοχεύονται από τα miRNAs

Στο τελευταίο μέρος των αναλύσεων, εντοπίστηκαν τα γονίδια-στόχοι των παραπάνω miRNAs και στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος τους και η εμπλοκή τους σε μοριακές διεργασίες και μονοπάτι προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά μονοπάτια που επηρεάζονται από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς στην ανδρική υπογονιμότητα. Σε αυτή τη φάση της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων miRTargetLink και ShinyGO.

1.3.1 Ολιγοσπερμία

Αρχικά, παρουσιάζεται ο πίνακας (Πίνακας 21) με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την miRTargetLink σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις miRNA-mRNA. Εξετάζοντάς τον στήλη προς στήλη, στο «miRNA» αναφέρεται η κωδική ονομασία του ώριμου miRNA. Έπειτα, ακολουθεί το «Target/Target pathway» το οποίο δηλώνει το γονίδιο-στόχο ή το βιοχημικό μονοπάτι-στόχο του miRNA. Μετέπειτα, αναφέρεται το «Support», δηλαδή πώς προκύπτει αυτή η αλληλεπίδραση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση έχει επιλεγθεί ως φίλτρο η εμφάνιση ισχυρών αλληλεπιδράσεων επομένως όλες οι σχέσεις προέρχονται από λειτουργικά πειράματα («Functional»). Εν συνεχεία, αναφέρεται το «Source», δηλαδή το γονίδιο το οποίο μόλις μεταγραφεί και υποστεί την ανάλογη επεξεργασία θα δώσει το ώριμο miRNA. Τέλος, παρουσιάζονται τα «Experiments», δηλαδή οι πειραματικές διαδικασίες από τις οποίες έχουν προκύψει οι αλληλεπιδράσεις καθώς και το «Reference - PMID» το οποίο είναι ένας μοναδικός κωδικός που αναλογεί σε κάθε επιστημονικό άρθρο στο οποίο καταγράφεται η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση.

Πίνακας 21: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *miRTargetLink* για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία

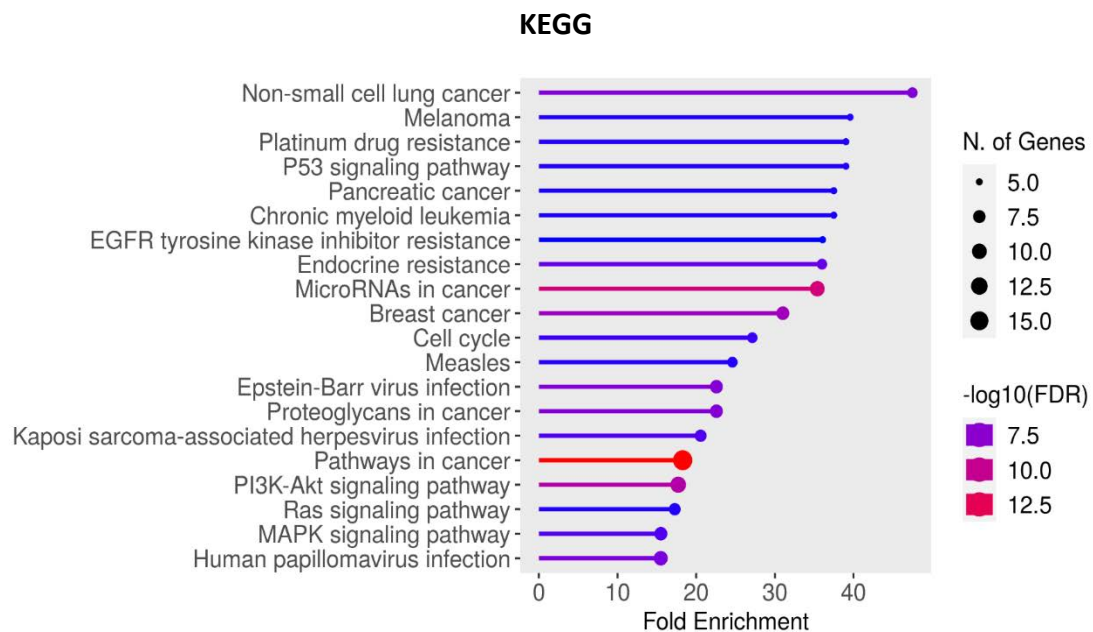
Ολιγοσπερμία					
miRNA	Target/ Target pathway	Support	Source	Experiment(s)	Reference - PMID
hsa-miR-1269b	CDC40	Functional MTI	MIRT733873	EMSA, Flow, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27349221
hsa-miR-296-3p	CX3CR1	Functional MTI	MIRT733640	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27186308

hsa-miR-296-3p	STAT5A	Functional MTI	MIRT734490	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay	26923924
hsa-miR-296-3p	KCNH1	Functional MTI	MIRT006973	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	22999387
hsa-miR-296-3p	ICAM1	Functional MTI	MIRT054646	Flow, Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	24263102
hsa-miR-296-5p	ELAVL1	Functional MTI	MIRT731587	Luciferase reporter assay	26898797
hsa-miR-296-5p	S100B	Functional MTI	MIRT731708	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27186401
hsa-miR-296-5p	PLK1	Functional MTI	MIRT732109	Luciferase reporter assay, Western blot	26549165
hsa-miR-296-5p	HMGA1	Functional MTI	MIRT732722	Luciferase reporter assay	26898758
hsa-miR-296-5p	FGFR1	Functional MTI	MIRT734669	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27714806
hsa-miR-296-5p	CASP8	Functional MTI	MIRT734976	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay, qRT-PCR	27927008
hsa-miR-296-5p	VEGFA	Functional MTI	MIRT734906	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	KDR	Functional MTI	MIRT734907	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	DLL4	Functional MTI	MIRT734908	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	NOTCH1	Functional MTI	MIRT734909	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	NGFR	Functional MTI	MIRT734977	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay, qRT-PCR	27927008
hsa-miR-296-5p	SCRIB	Functional MTI	MIRT006438	Luciferase reporter assay	21643016
hsa-miR-296-5p	WNK4	Functional MTI	MIRT004559	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	20561597
hsa-miR-296-5p	HGS	Functional MTI	MIRT004900	Luciferase reporter assay, Western blot	18977327
hsa-miR-296-5p	HGS	Functional MTI	MIRT004900	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	IKBKE	Functional MTI	MIRT006572	Luciferase reporter assay	22114321
hsa-miR-296-5p	BBC3	Functional MTI	MIRT006683	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	21633093
hsa-miR-296-5p	CDX1	Functional MTI	MIRT054157	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, Microarray, qRT-PCR, Western blot	23353818
hsa-miR-296-5p	PIN1	Functional MTI	MIRT438128	Luciferase reporter assay	24915000
hsa-miR-449b-5p	MYCN	Functional MTI	MIRT733043	Luciferase reporter assay	27764804
hsa-miR-449b-5p	NEAT1	Functional MTI	MIRT734739	Luciferase reporter assay, qRT-PCR	26242266
hsa-miR-449b-5p	SIRT1	Functional MTI	MIRT006349	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	CCNE2	Functional MTI	MIRT006350	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	MET	Functional MTI	MIRT006351	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	GMNN	Functional MTI	MIRT006352	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	HDAC1	Functional MTI	MIRT006353	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	CDC25A	Functional MTI	MIRT016138	Reporter assay; Western blot	19833767

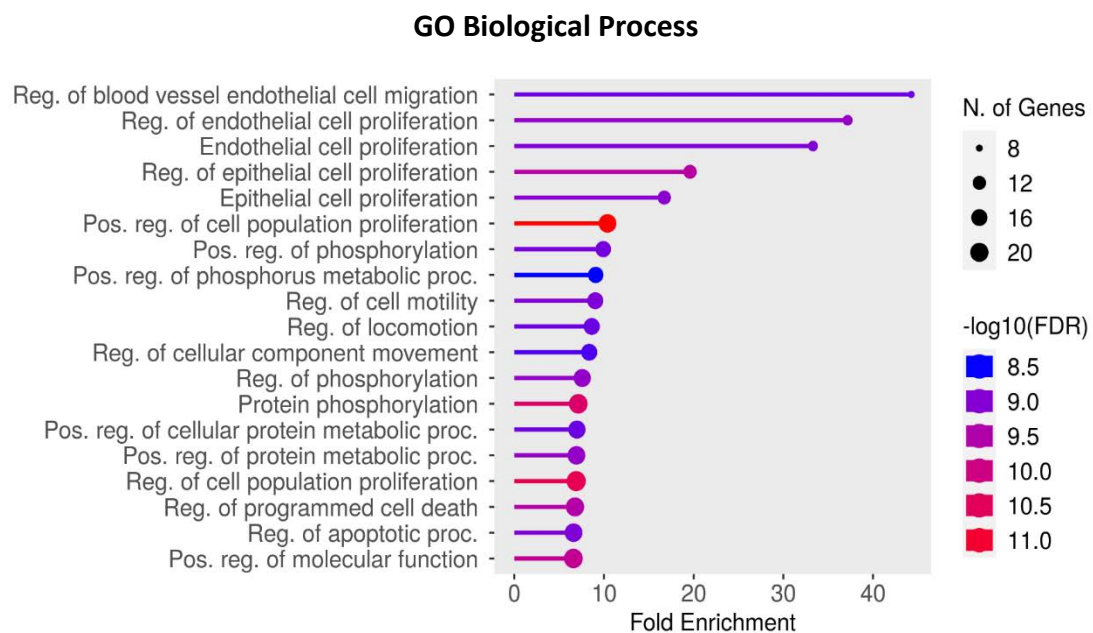
hsa-miR-449b-5p	CDK6	Functional MTI	MIRT016139	Reporter assay;Western blot	19833767
hsa-miR-520h	DAPK2	Functional MTI	MIRT734432	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	25982274
hsa-miR-520h	CDKN1A	Functional MTI	MIRT000582	qRT-PCR, Luciferase reporter assay, Western blot	20190813
hsa-miR-520h	ABCG2	Functional MTI	MIRT001952	Luciferase reporter assay, Microarray	18189265
hsa-miR-520h	ABCG2	Functional MTI	MIRT001952	Luciferase reporter assay	19825807
hsa-miR-520h	ABCG2	Functional MTI	MIRT001952	qRT-PCR, Western blot	20628378
hsa-miR-520h	VEGFA	Functional MTI	MIRT004458	ELISA, Luciferase reporter assay	18320040
hsa-miR-520h	HDAC1	Functional MTI	MIRT053589	Flow, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	24316511
hsa-miR-559	ERBB2	Functional MTI	MIRT000036	Luciferase reporter assay, Reporter assay;Other	19486885
hsa-miR-559	MTA1	Functional MTI	MIRT004442	Luciferase reporter assay, Western blot	19584269
hsa-miR-559	FXN	Functional MTI	MIRT007228	Luciferase reporter assay	23382970
hsa-miR-612	SP1	Functional MTI	MIRT733905	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27685621
hsa-miR-612	AKT2	Functional MTI	MIRT053175	Immunofluorescence, Luciferase reporter assay, Western blot	24704424
hsa-miR-612	AKT2	Functional MTI	MIRT053175	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	23478189
hsa-miR-612	AKT2	Functional MTI	MIRT053175	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	26158514
hsa-miR-663b	IGF2	Functional MTI	MIRT731345	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27895308
hsa-miR-663b	EEF1A2	Functional MTI	MIRT734759	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	25744894

Έπειτα, τα παραπάνω γονίδια-στόχοι χρησιμοποιήθηκαν για αναζήτηση στην ShinyGo ώστε να προκύψουν τα μοριακά μονοπάτια και οι μηχανισμοί που επηρεάζονται. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται με την μορφή διαγραμμάτων τα αποτελέσματα που αφορούν στα βιολογικά μονοπάτια (KEGG), βιολογικές διεργασίες (GO Biological Processes), σχηματισμό τμημάτων ή μερών του κυττάρου (GO Cellular Components), καθώς και σε μοριακές λειτουργίες (GO Molecular Function). Όλα τα διαγράμματα παρουσιάζουν τις πληροφορίες τους με τον ίδιο τρόπο. Στα αριστερά έχουμε το μονοπάτι ή την λειτουργία ή το μέρος του κυττάρου. Ο κύκλος στην άκρη της γραμμής υποδηλώνει των αριθμό των γονιδίων. Να σημειωθεί εδώ πως δεν αναφέρεται στον συνολικό αριθμό των γονιδίων που σχετίζονται με ένα βιοχημικό μονοπάτι. Τέλος, το μήκος της γραμμής είναι ανάλογο του αρνητικού λογάριθμου του «Fold Enrichment», ένα στατιστικό εργαλείο που μας δηλώνει την στατιστική σημαντικότητα.

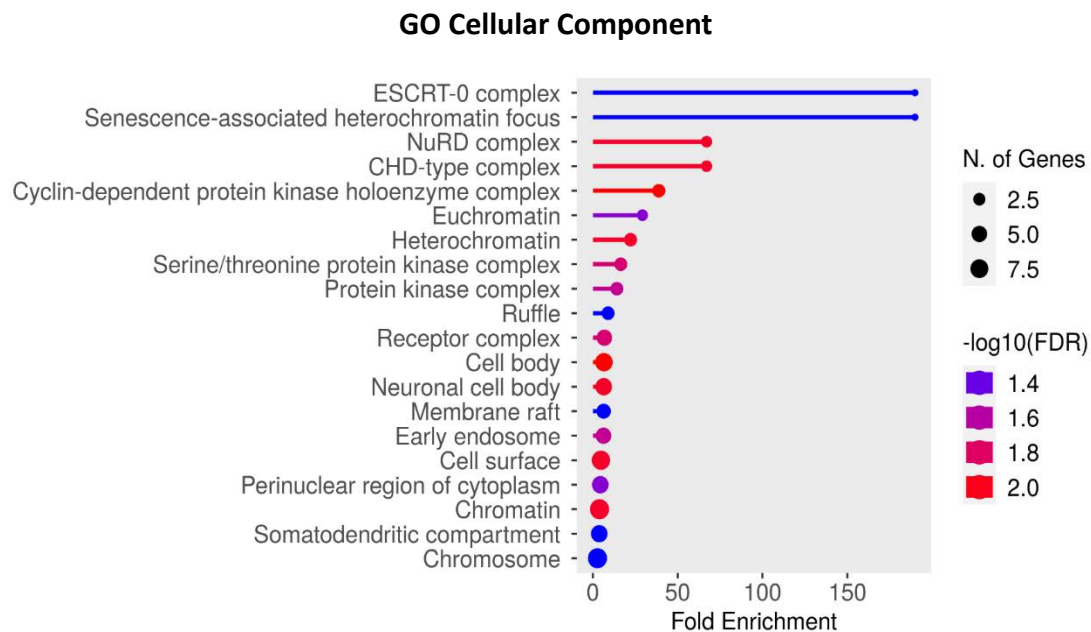
Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζονται σε σειρά βιολογικά μονοπάτια (KEGG), βιολογικές διεργασίες (GO Biological Processes), κυτταρικός εντοπισμός (GO Cellular Components) και μοριακές λειτουργίες (GO Molecular Function) (Εικόνες 15-18).



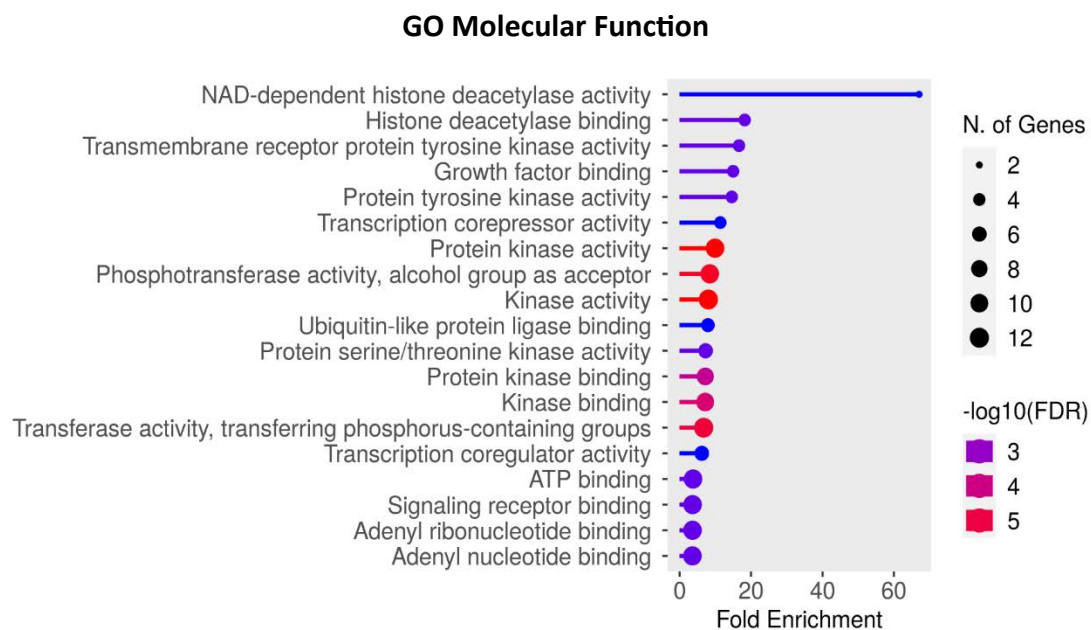
Εικόνα 15: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-KEGG για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία.



Εικόνα 16: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-Biological Process για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία.



Εικόνα 17: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-Cellular Component για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία.



Εικόνα 18: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-Molecular Function για τους ασθενείς με ολιγοσπερμία.

1.3.2 Ασθenoσπερμία

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα για την ασθenoσπερμία. Στον Πίνακα 22 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την miRTargetLink.

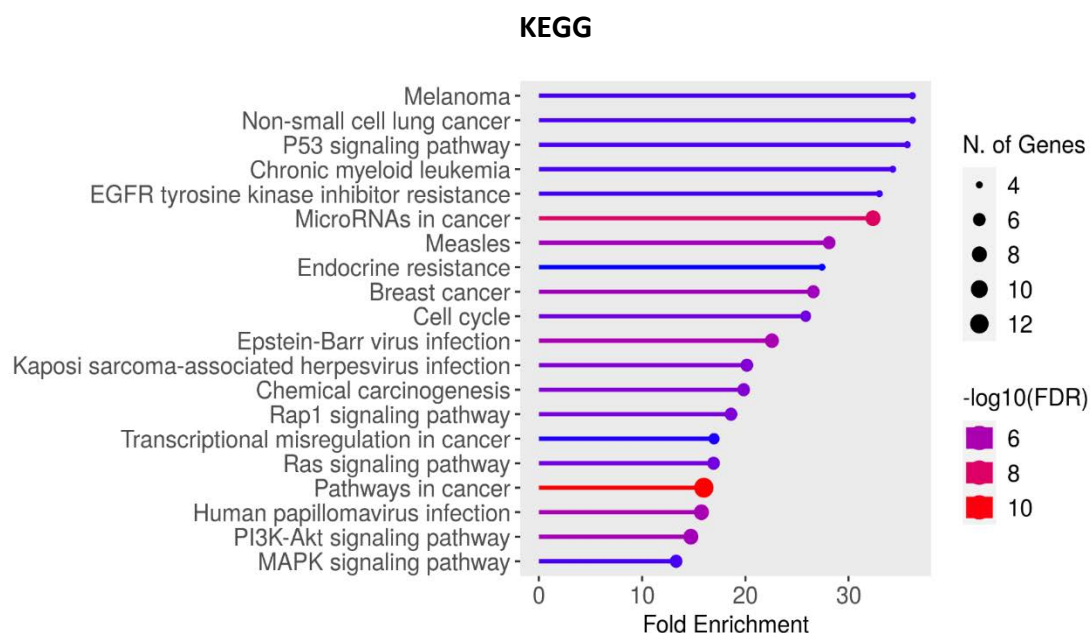
Πίνακας 22: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miRTargetLink για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία

Ασθenoσπερμία				
	Target/			Reference

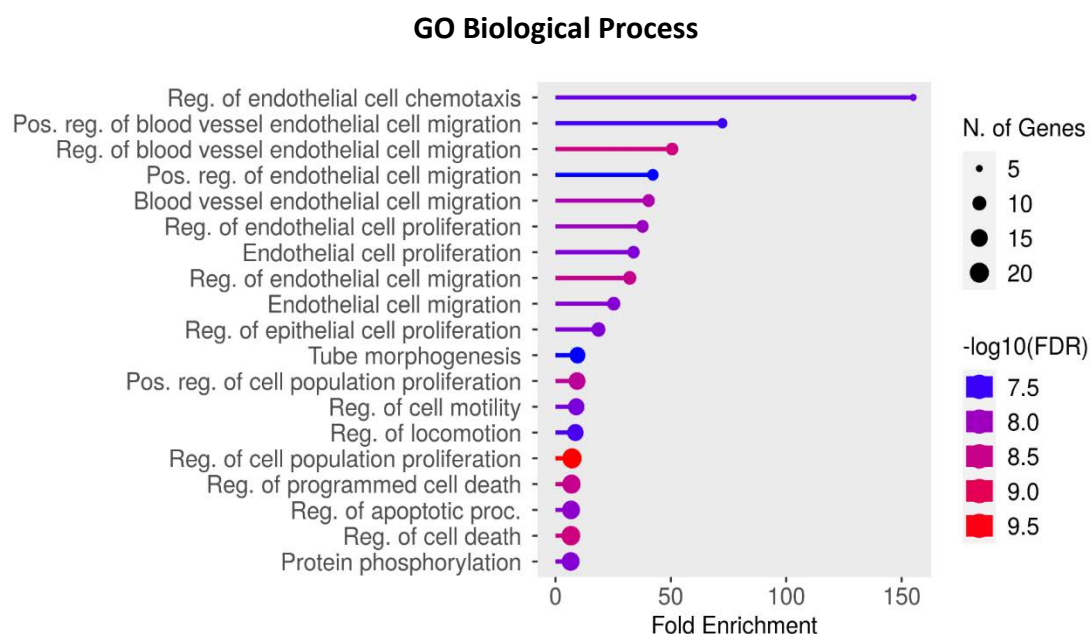
miRNA	Target pathway	Support	Source	Experiment(s)	- PMID
hsa-miR-1269b	CDC40	Functional MTI	MIRT733873	EMSA, Flow, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27349221
hsa-miR-296-3p	CX3CR1	Functional MTI	MIRT733640	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27186308
hsa-miR-296-3p	STAT5A	Functional MTI	MIRT734490	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay	26923924
hsa-miR-296-3p	KCNH1	Functional MTI	MIRT006973	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	22999387
hsa-miR-296-3p	ICAM1	Functional MTI	MIRT054646	Flow, Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	24263102
hsa-miR-296-5p	ELAVL1	Functional MTI	MIRT731587	Luciferase reporter assay	26898797
hsa-miR-296-5p	HMGA1	Functional MTI	MIRT732722	Luciferase reporter assay	26898758
hsa-miR-296-5p	S100B	Functional MTI	MIRT731708	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27186401
hsa-miR-296-5p	PLK1	Functional MTI	MIRT732109	Luciferase reporter assay, Western blot	26549165
hsa-miR-296-5p	FGFR1	Functional MTI	MIRT734669	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27714806
hsa-miR-296-5p	VEGFA	Functional MTI	MIRT734906	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	CASP8	Functional MTI	MIRT734976	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay, qRT-PCR	27927008
hsa-miR-296-5p	NGFR	Functional MTI	MIRT734977	Immunoprecipitation, Luciferase reporter assay, qRT-PCR	27927008
hsa-miR-296-5p	KDR	Functional MTI	MIRT734907	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	DLL4	Functional MTI	MIRT734908	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	NOTCH1	Functional MTI	MIRT734909	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	WNK4	Functional MTI	MIRT004559	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	20561597
hsa-miR-296-5p	HGS	Functional MTI	MIRT004900	Luciferase reporter assay, Western blot	18977327
hsa-miR-296-5p	HGS	Functional MTI	MIRT004900	qRT-PCR, Western blot	26500043
hsa-miR-296-5p	SCRIB	Functional MTI	MIRT006438	Luciferase reporter assay	21643016
hsa-miR-296-5p	IKBKE	Functional MTI	MIRT006572	Luciferase reporter assay	22114321
hsa-miR-296-5p	CDX1	Functional MTI	MIRT054157	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, Microarray, qRT-PCR, Western blot	23353818
hsa-miR-296-5p	BBC3	Functional MTI	MIRT006683	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	21633093
hsa-miR-296-5p	PIN1	Functional MTI	MIRT438128	Luciferase reporter assay	24915000
hsa-miR-449b-5p	MYCN	Functional MTI	MIRT733043	Luciferase reporter assay	27764804
hsa-miR-449b-5p	NEAT1	Functional MTI	MIRT734739	Luciferase reporter assay, qRT-PCR	26242266
hsa-miR-449b-5p	SIRT1	Functional MTI	MIRT006349	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	CCNE2	Functional MTI	MIRT006350	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558

hsa-miR-449b-5p	MET	Functional MTI	MIRT006351	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	GMNN	Functional MTI	MIRT006352	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	HDAC1	Functional MTI	MIRT006353	Luciferase reporter assay, Western blot	21418558
hsa-miR-449b-5p	CDC25A	Functional MTI	MIRT016138	Reporter assay;Western blot	19833767
hsa-miR-449b-5p	CDK6	Functional MTI	MIRT016139	Reporter assay;Western blot	19833767
hsa-miR-612	SP1	Functional MTI	MIRT733905	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27685621
hsa-miR-612	AKT2	Functional MTI	MIRT053175	Immunofluorescence, Luciferase reporter assay, Western blot	24704424
hsa-miR-612	AKT2	Functional MTI	MIRT053175	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	23478189
hsa-miR-612	AKT2	Functional MTI	MIRT053175	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	26158514
hsa-miR-650	IFIT2	Functional MTI	MIRT735319	Immunoblot, Luciferase reporter assay, Microarray, qRT-PCR	26460926
hsa-miR-650	ING4	Functional MTI	MIRT000448	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	20381459
hsa-miR-650	ING4	Functional MTI	MIRT000448	FACS, Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	23991130
hsa-miR-650	NDRG2	Functional MTI	MIRT006183	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	21352815

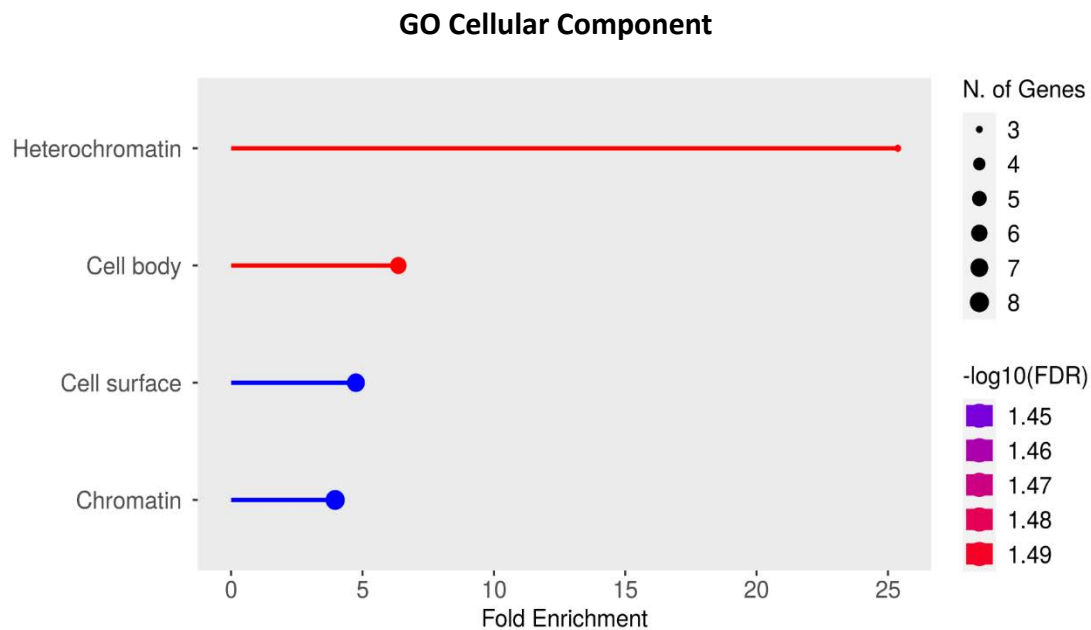
Τα παραπάνω γονίδια-στόχοι εισήχθησαν στη συνέχεια στη ShinyGo για να εντοπιστούν τα μοριακά μονοπάτια και οι μηχανισμοί που επηρεάζονται. Όπως και προηγουμένως, στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζονται σε σειρά βιολογικά μονοπάτια (KEGG), βιολογικές διεργασίες (GO Biological Processes), κυτταρικός εντοπισμός (GO Cellular Components) και μοριακές λειτουργίες (GO Molecular Function) (Εικόνες 19-22).



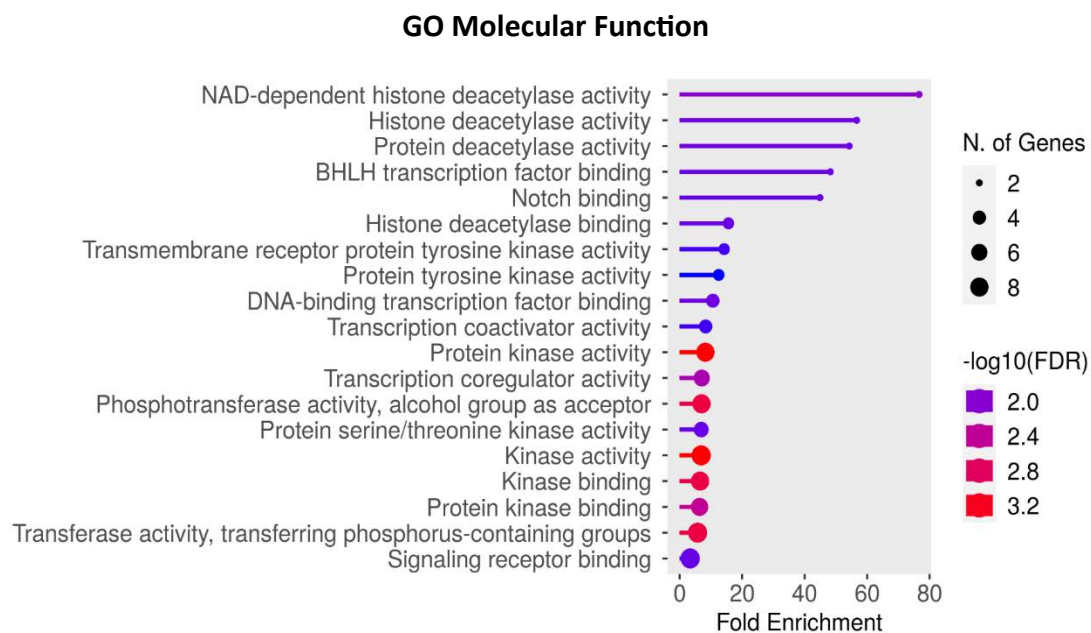
Εικόνα 19: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-KEGG για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία.



Εικόνα 20: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-GO Biological Process για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία.



Εικόνα 21: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-GO Cellular Component για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία.



Εικόνα 22: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων ShinyGO-GO Molecular Function για τους ασθενείς με ασθenoσπερμία.

1.3.3 Τερατοσπερμία

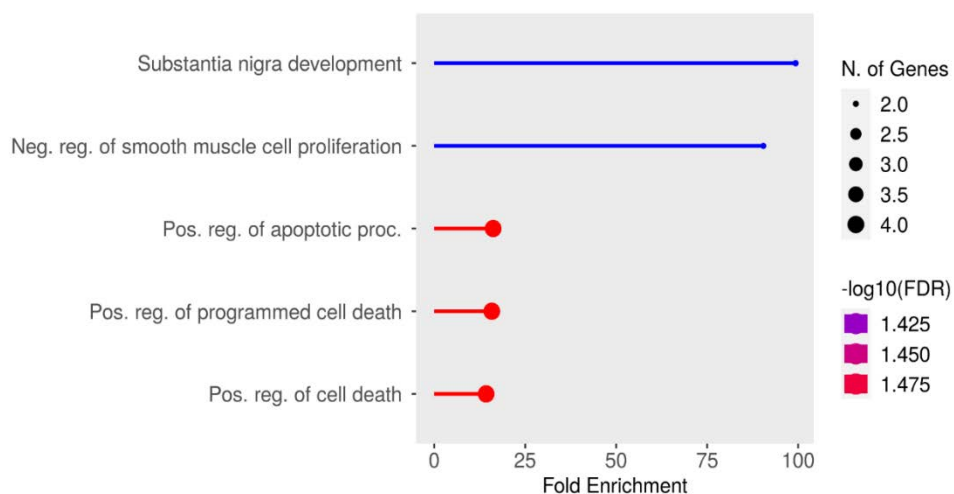
Τέλος, παρουσιάζονται στον Πίνακα 23 τα αποτελέσματα που αφορούν την τερατοσπερμία, όπως προέκυψαν από τη βάση δεδομένων miRTargetLink.

Πίνακας 23: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων miRTargetLink για τους ασθενείς με τερατοσπερμία

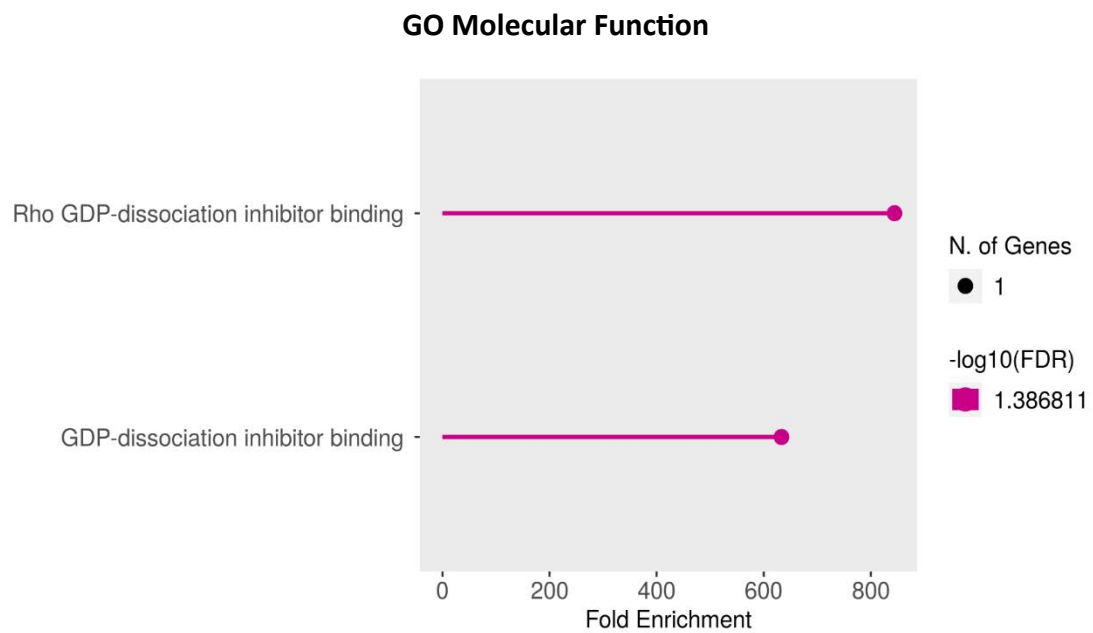
Τερατοσπερμία					
miRNA	Target/ Target pathway	Support	Source	Experiment(s)	Reference - PMID
hsa-miR-1269b	CDC40	Functional MTI	MIRT733873	EMSA, Flow, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27349221
hsa-miR-200b-5p	RHOA	Functional MTI	MIRT735214	Immunofluorescence, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	25909223
hsa-miR-200b-5p	ATG12	Functional MTI	MIRT734172	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	26416454
hsa-miR-200b-5p	PROM1	Functional MTI	MIRT731955	Luciferase reporter assay	28362995
hsa-miR-650	NDRG2	Functional MTI	MIRT006183	Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	21352815
hsa-miR-650	IFIT2	Functional MTI	MIRT735319	Immunoblot, Luciferase reporter assay, Microarray, qRT-PCR	26460926
hsa-miR-650	ING4	Functional MTI	MIRT000448	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	20381459
hsa-miR-650	ING4	Functional MTI	MIRT000448	FACS, Immunohistochemistry, Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	23991130
hsa-miR-663b	IGF2	Functional MTI	MIRT731345	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	27895308
hsa-miR-663b	EEF1A2	Functional MTI	MIRT734759	Luciferase reporter assay, qRT-PCR, Western blot	25744894

Έπειτα, έγινε και πάλι αναζήτηση των γονιδίων-στόχων στη ShinyGo (Εικόνα 23, 24). Ωστόσο, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για την KEGG αλλά ούτε και την GO Cellular Component.

GO Biological Process



Εικόνα 23: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *ShinyGO-GO Biological Process* για τους ασθενείς με τερατοσπερμία.



Εικόνα 24: Τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων *ShinyGO-GO Molecular Function* για τους ασθενείς με τερατοσπερμία.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι δεδομένο πως η υπογονιμότητα είναι ένα μείζον πρόβλημα που επηρεάζει πολλά ζευγάρια. Υπολογίζεται πως για το 50% των περιπτώσεων ευθύνεται ο ανδρικός παράγοντας. Όσον αφορά στην Ελλάδα έχει διαπιστωθεί πως το πρόβλημα πλήττει ένα ποσοστό γύρω στο 10-15% των ζευγαριών. Επομένως, επιτακτική θεωρείται η ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας.

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαταραχή στην οποία εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η ίδια η διαδικασία της σπερματογένεσης είναι αρκετά πολύπλοκη και ανά πάσα στιγμή ρυθμίζεται και ελέγχεται από πληθώρα γονιδίων, η έκφραση των οποίων πρέπει να είναι ακριβής και προσεγμένη. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης σε όλη την διαδικασία τα μη κωδικοποιητικά RNAs και ιδιαίτερα τα miRNAs.

Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) για τον εντοπισμό και την εξέταση πολυμορφισμών που εντοπίζονται μόνο σε ασθενοσπερμικούς ή ολιγοσπερμικούς ή τερατοσπερμικούς, αλλά όχι σε νορμοσπερμικούς άνδρες. Πιο συγκεκριμένα, έγινε λήψη σπέρματος και αίματος από εθελοντές σε συνεργασία με το κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης «Embryolab». Έπειτα, τα δείγματα χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες: σε νορμοσπερμικούς, ασθενοσπερμικούς, ολιγοσπερμικούς και τερατοσπερμικούς βάσει του φαινοτύπου που εκδήλωναν. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA και ακολούθησε αλληλούχηση των δειγμάτων. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν μόνο στα υπογόνιμα άτομα φιλτραρίστηκαν ώστε να εντοπιστούν αυτές που είναι πιο πιθανό να εμπλέκονται στην εμφάνιση κάποιων από τους παραπάνω υπότυπους ανδρικής υπογονιμότητας στον ελληνικό πληθυσμό. Ειδικότερα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν μόνο οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στα μη κωδικοποιητικά RNAs και συγκεκριμένα στα miRNAs. Τέλος, έγινε διερεύνηση του ρόλου των miRNAs στα οποία εντοπίστηκαν οι ανωτέρω πολυμορφισμοί.

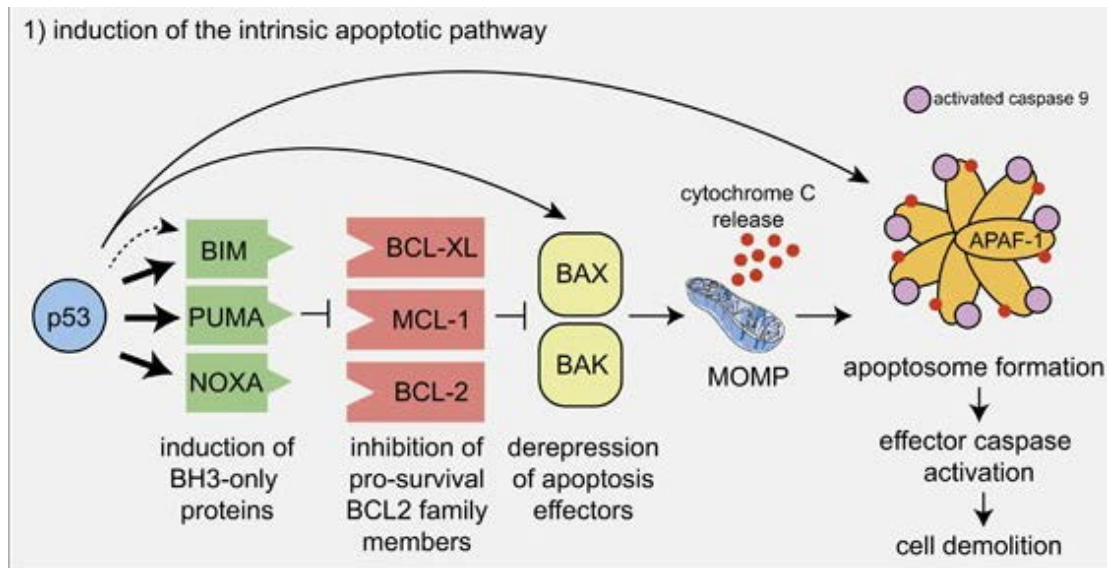
1. Ολιγοσπερμία

Η ολιγοσπερμία σχετίζεται με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και εκδηλώνεται όταν ο αριθμός τους είναι μικρότερος από τις τιμές ορίων που έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

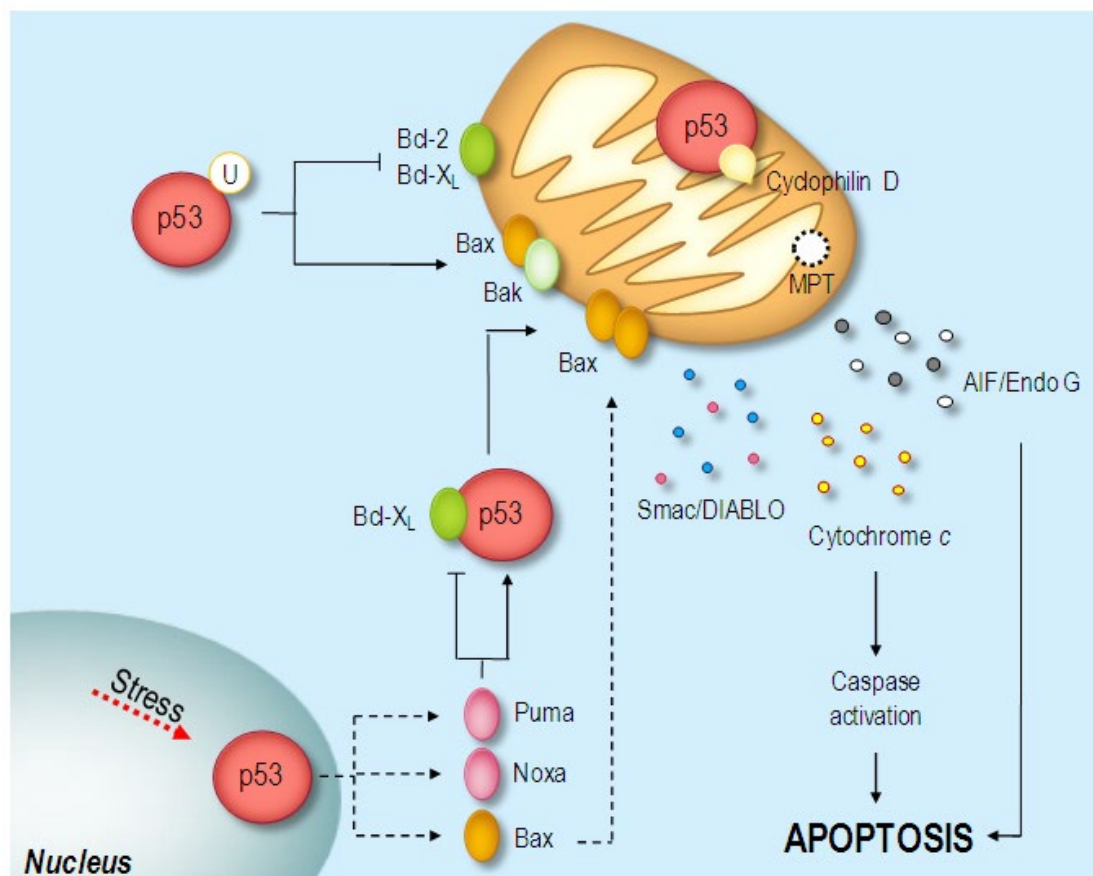
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί σε miRNAs τα οποία σχετίζονται με διάφορες μοριακές διεργασίες και μονοπάτια, μεταξύ των οποίων αυτό του p53, των MAPK και PI3K-Akt.

1.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι p53

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του p53 είναι καίριο για την διαδικασία της απόπτωσης του κυττάρου όταν αυτή κριθεί αναγκαία, δηλαδή όταν έχουν συσσωρευθεί πολλές μεταλλάξεις, έχει γίνει κάποια ανεπανόρθωτη καταστροφή ή το κύτταρο δεν είναι πλέον σε θέση να επιτελέσει την λειτουργία του.



Εικόνα 25: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του p53.^[17]



Εικόνα 26: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του p53.^[18]

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του p53 ενεργοποιείται ως απόκριση στο στρες, την υποξία και τις βλάβες στο DNA. Το p53 που βρίσκεται στο πυρήνα προάγει την

έκφραση της PUMA, αλλά και άλλων πρωτεϊνών της Noxa. Η PUMA επιφέρει την αποδέσμευση του Bcl-X_L από το p53 κυτταρόπλασμα. Το Bcl-X_L είναι μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη που δεσμεύει την p53 στο κυτταρόπλασμα και την καθιστά μη ενεργή. Εφόσον γίνει η αποδέσμευση η p53 μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο όπου επάγει τον ολιγομερισμό των Bax και Bak, οι οποίες είναι αποπτωτικές πρωτεΐνες που ανταγωνίζονται τις αντι-αποπτωτικές Bcl-X_L και BCL-2. Έπειτα το p53 θα συνδεθεί με την κυκλοφιλίνη D στην έσω μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η σύνδεση αυτή θα οδηγήσει σε διασπάσεις της μεμβράνης και σε απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως αυτή του κυτοχρώματος C. Το προαναφερθέν με την σειρά του ενεργοποιεί τις κασπάσες, οι οποίες σχηματίζουν το αποπτώσωμα. Αυτό στη συνέχεια δρα ως ενεργοποιητής της κασπάσης-9, η οποία εν τέλει θα εκκινήσει τις διαδικασίες για την καταστροφή του κυττάρου.^{[17][18]}

Συνεπώς, είναι γεγονός πως το σηματοδοτικό μονοπάτι αυτό είναι υψίστης σημασίας και οποιαδήποτε απορρύθμισή του μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα παθήσεων, μεταξύ αυτών και της υπογονιμότητας. Αυτό επιβεβαιώνεται από αρκετές μελέτες. Ενδεικτικά και ως παράδειγμα αναφέρεται στις έρευνες των Salvatore Raimondo et al και Alireza Panahi et al πως η συγκέντρωση του p53 σχετίζεται με την υπογονιμότητα και όταν αυτή είναι υψηλή στα σπερματοζωάρια τότε εκδηλώνεται η πάθηση αυτή.^{[19][20]}

Ένας πιθανός τρόπος που θα μπορούσαν τα miRNAs, που είναι το αντικείμενο της παρούσας μελέτης, είναι μέσω μετάλλαξης που έχει προκύψει σε αυτά που συνδέονται με τα mRNAs του p53. Η ανικανότητα σύνδεσης θα οδηγήσει με την σειρά της την μη καταστροφή συγκεκριμένου ποσοστού των μεταγράφων. Κατά συνέπεια η συγκέντρωση του p53 θα είναι αυξημένη και το σπερματοζωάριο λανθασμένα θα εκκινήσει την διαδικασία απόπτωσής του.

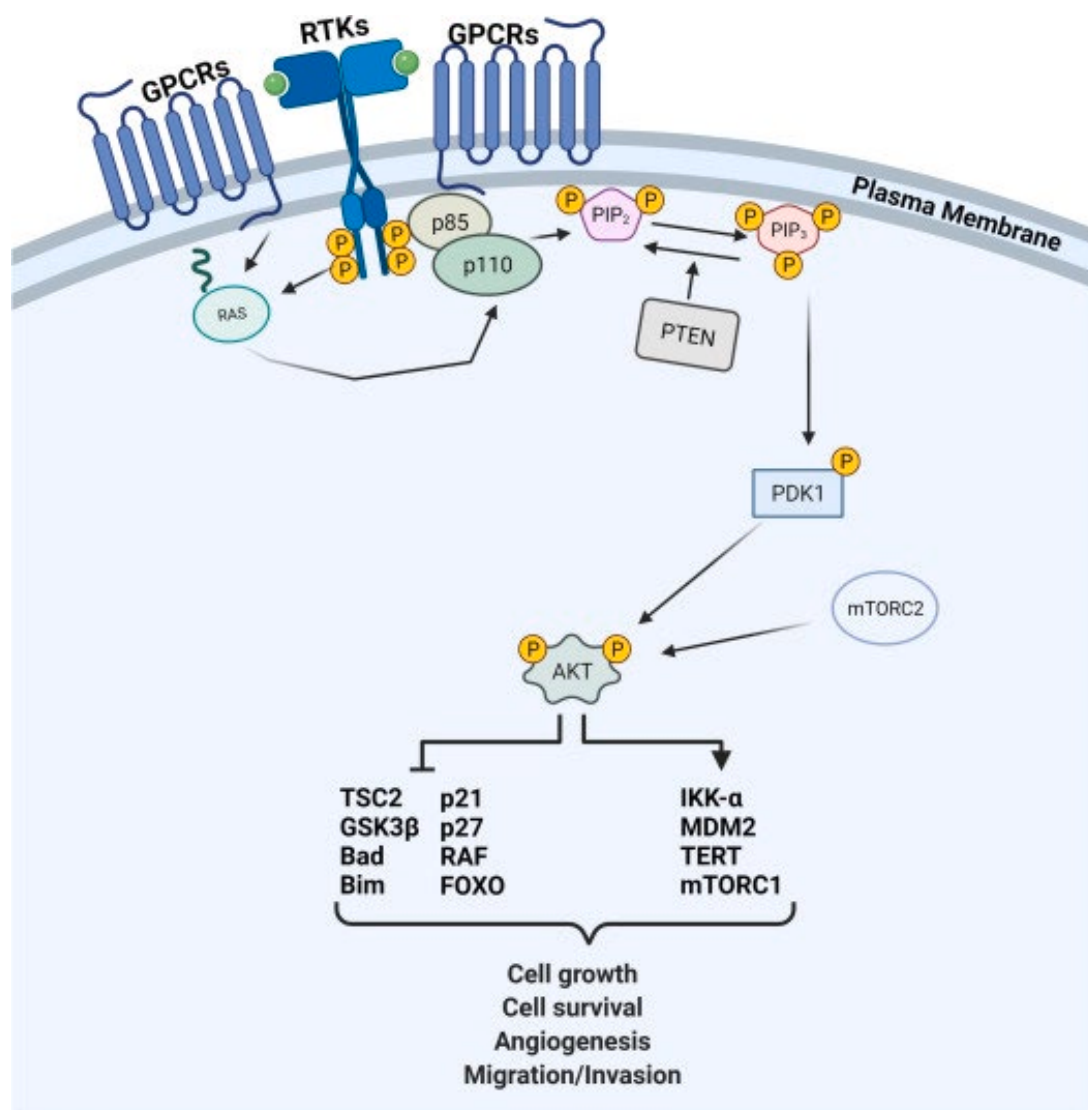
Επιπρόσθετα, παρατηρώντας τα αποτελέσματα του πίνακα 21 φαίνεται τα miRNAs να αλληλεπιδρούν με το γονίδιο CASP8. Το γονίδιο όταν εκφράζεται δίνει την κασπάση-8. Η οποία ενεργοποιεί τις κασπάσες που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία του αποπτοσώματος. Επομένως, εάν η έκφρασή της δεν ρυθμίζεται σωστά λόγω μεταλλάξεων σε miRNAs που τα καθιστούν ανίκανα να συνδεθούν με τα μετάγραφα του CASP8 θα έχουμε αυξημένο σχηματισμό αποπτοσωμάτων και εκκίνηση της διαδικασίας καταστροφής του κυττάρου.

Συμπερασματικά, η απορρύθμιση του μονοπατιού που οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου και συγκεκριμένα του σπερματοζωαρίου και η λανθασμένη ενεργοποίησή του χωρίς να είναι ουσιαστικά απαραίτητο οδηγεί στην θανάτωση σπερματοζωαρίων που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ήταν πλήρως λειτουργικά. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται ο αριθμός τους και εκδηλώνεται η πάθηση της ολιγοσπερμίας.

1.2 Κυτταρικός κύκλος και πολλαπλασιασμός – Άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια

Τα γονίδια-στόχοι των miRNAs που επηρεάζονται εξαιτίας των πολυμορφισμών, εμπλέκονται επίσης στις διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να υπάρχει επιρροή σε βιοχημικά μονοπάτια όπως αυτά των MAPK και PI3K-Akt σηματοδοτικών μονοπατιών.

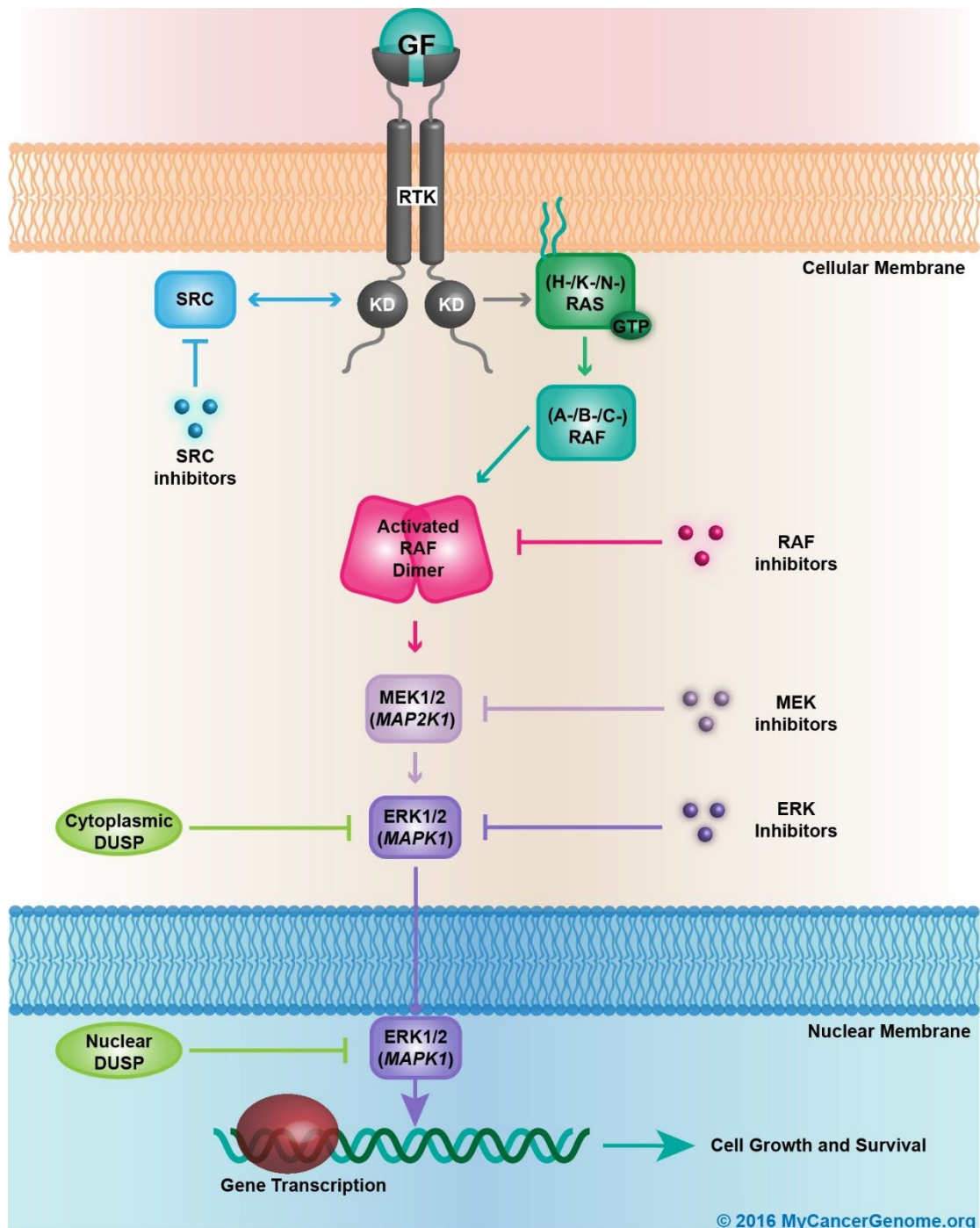


Εικόνα 27: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του PI3K/AKT.^[21]

Στην εικόνα 27 παρατηρούμε το σηματοδοτικό μονοπάτι του PI3K/AKT. Αρχικά γίνεται η σύνδεση του προσδέματος στους υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης (RTKs). Αυτοί με την σειρά τους αυτοφωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα τυροσίνης που διαθέτουν και ενεργοποιούν την κινάση των 3-φωσφατιδυλινোসιτολών (PI3K). Η προαναφερθείσα μετατρέπει τη διφωσφορική φωσφατιδυλινোসιτόλη (PIP₂) σε τριφωσφορική φωσφατιδυλινোসιτόλη (PIP₃). Τα τελευταία ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από φωσφατιδυλινোসιτόλη κινάση (PDK1). Έπειτα, αυτή και η mTORC2 θα φωσφορυλιώσουν και θα ενεργοποιήσουν την AKT κινάση. Τέλος, αυτή μέσω της καταστολής και της επαγωγής περαιτέρω γονιδίων θα οδηγήσει στην κυτταρική αύξηση και επιβίωση του κυττάρου και κατά επέκταση του σπερματοζωαρίου.

Στον πίνακα 21 παρατηρούνται πολλές αλληλεπιδράσεις miRNAs με μετάγραφα των γονιδίων AKT κινάσης. Η κινάση αυτή θεωρείται σημαντική για την διεκπεραίωση του σηματοδοτικού μονοπατιού αυτού. Συνεπώς, μία πιθανή αιτία που οδηγεί στην εκδήλωση της ολιγοσπερμίας να είναι η μη σωστή ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού. Πιο συγκεκριμένα, λόγω μεταλλάξεων που έχουν προκύψει σε γονίδια miRNAs να στοχεύεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό το μετάγραφο της AKT και με αυτόν τον τρόπο να οδηγούμαστε στην αποσιώπηση του γονιδίου. Εν τέλει, αυτό θα επιφέρει την αδυναμία ανάπτυξης και επιβίωσης του σπερματοζωαρίου, μειώνοντας τον αριθμό τους και έχοντας ως αποτέλεσμα την εκδήλωση της ολιγοσπερμίας.

Συμπερασματικά, το μονοπάτι αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς ελέγχει μεγάλο αριθμό λειτουργιών και διαδικασιών. Εκτός της ανάπτυξης και της επιβίωσης, εμπλέκεται και στην διαδικασία της σπερματογένεσης, στην αυτοφαγία στα σπερματοζωάρια, σε ενδοκρινικές αποκρίσεις, αλλά και στη ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδας.^[22]



Εικόνα 28: Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/MAPK.

Στη συνέχεια παρατηρείται στην εικόνα 28 το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/MAPK. Αρχικά γίνεται η σύνδεση του προσδέματος στους υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης (RTKs), συνήθως αυτοί είναι αυξητικοί παράγοντες. Στη συνέχεια έχουμε την ενεργοποίηση της Ras από αυτούς, αλλά και μέσω της ανταλλαγής διφοσφωρικής γουανοσίνης (GDP) με τριφοσφωρική γουανοσίνη (GTP), η οποία επιτελείται από τον παράγοντα ανταλλαγής γουανοσίνων (GEF, δεν απεικονίζεται). Αυτή με την σειρά της ενεργοποιεί την RAF, η οποία έπειτα από τον διμερισμό της δραστηριοποιεί την

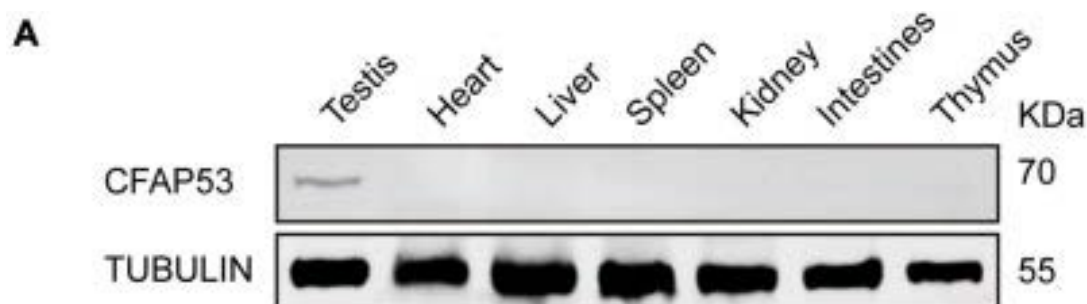
MEK1/2. Η τελευταία θα ενεργοποιήσει την ERK1/2, η οποία θα εισέλθει στο πυρήνα και θα επηρεάσει πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου. Ο τρόπος με τον οποίο υπάρχει περίπτωση να προκληθεί κάποια επίπτωση στην σωστή διεκπεραίωση αυτού του μονοπατιού λόγω απορρύθμισής του από τα miRNAs είναι ο ίδιος με αυτόν που αναφέρθηκε προηγουμένως. Παραδείγματος χάριν, είναι πολύ πιθανόν miRNAs που έχουν υποστεί μετάλλαξη πλέον να έχουν ως στόχο τα μεταγγραφα της Ras. Αυτό θα έχει ως συνέπεια την μείωση της συγκέντρωσης της και επομένως την διαταραχή του μονοπατιού που αποτελεί μέρος του, αποτρέποντας την ορθή εκτύλιξη του. Εν τέλει, αυτό θα δημιουργήσει πρόβλημα στην ανάπτυξη και επιβίωση του σπερματοζωαρίου, οδηγώντας στην μείωση του αριθμού τους και άρα στην εκδήλωση της ολιγοσπερμίας.

Συμπερασματικά, το μονοπάτι αυτό κρίνεται δεόντως σημαντικό καθότι εμπλέκεται στην σπερματογένεση, στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, στις βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έπειτα από την απελευθέρωσή τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, αλλά και στην ακροσωμική αντίδραση, η οποία είναι απαραίτητη για την επίτευξη της γονιμοποίησης. Επομένως, γίνεται αμέσως κατανοητό γιατί η οποιαδήποτε επίπτωση σε αυτό δημιουργεί σοβαρά προβλήματα και κυρίως υπογονιμότητα.^[23]

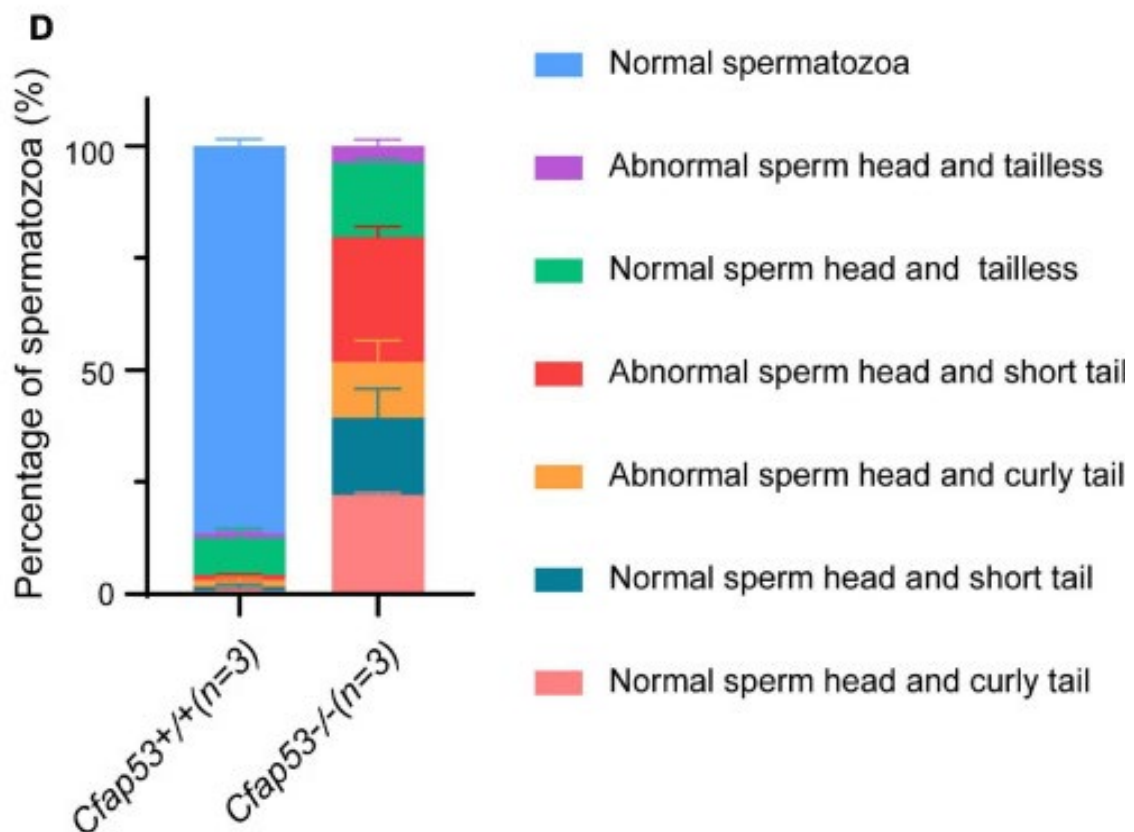
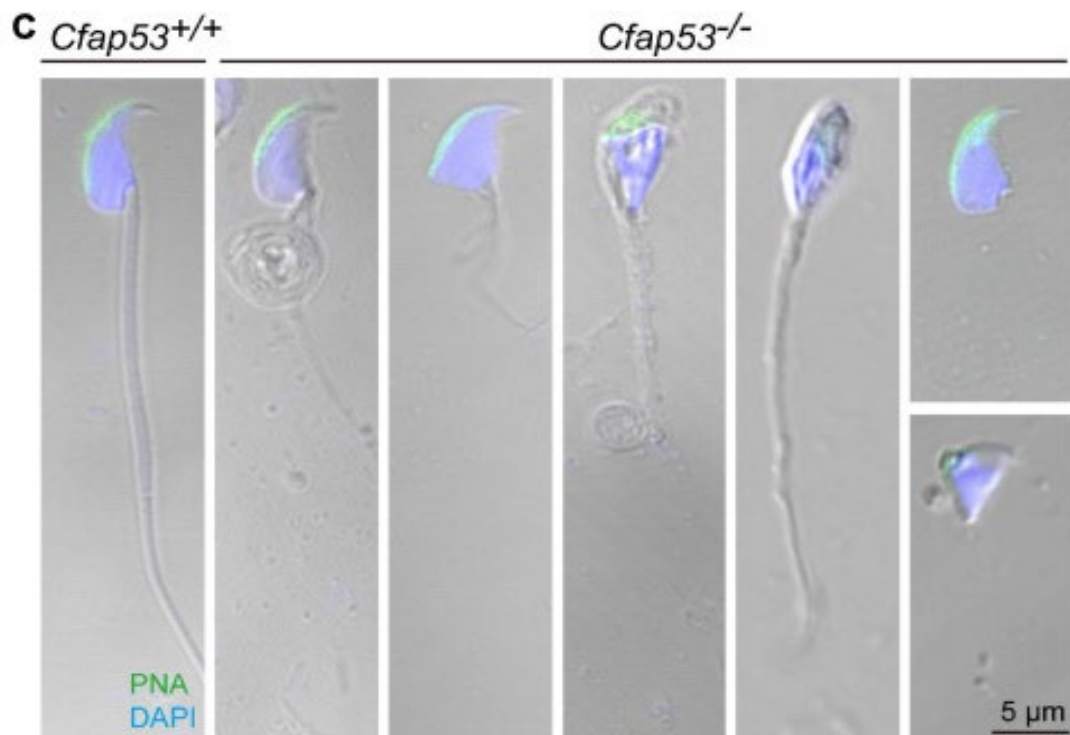
2. Ασθενοσπερμία

Η ασθενοσπερμία σχετίζεται με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων η οποία μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα γονιμοποίησης του ωαρίου. Από τα πιο σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων που τους επιτρέπουν να κινούνται είναι η ουρά ή μαστίγιο. Μία από τις πιο γνωστές αιτίες που οδηγούν στην εκδήλωση της ασθενοσπερμίας είναι οι πολλαπλές μορφολογικές ανωμαλίες του μαστιγίου του σπέρματος (Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella). Φαίνεται πως η αιτία αυτή προκύπτει από μεταλλάξεις γονιδίων του μιτοχονδρίου και συγκεκριμένα στα DNAH1, CFAP43, CFAP44, CFAP69 και QRICH2. Περαιτέρω μελέτες που διεξήχθησαν έδειξαν πως η απώλεια της λειτουργίας των γονιδίων αυτών θα μπορούσαν να προκαλέσουν πρόβλημα στην σωστή διαμόρφωση του μαστιγίου και να προκαλέσουν υπογονιμότητα.^[24]

Ιδιαίτερως σημαντικά κρίνονται τα γονίδια της οικογένειας CFAP.



Εικόνα 29: Αποτελέσματα εξετάσεων για την ανίχνευση του ιστού που εκφράζεται η CFAP53.^[25]



Εικόνα 30: Η εικόνα C παρουσιάζει την μορφολογία των σπερματοζωαρίων *knockout* ποντικών για το CFAP53 φυσιολογικών και η D τα δεδομένα οπτικοποιημένα.^[25]

Στην εικόνα 29 φαίνεται πως εκφράζεται κυρίως στους όρχεις και αυτό είναι εύκολο αντιληπτό καθώς μόνο εκεί παρατηρείται μαύρη γραμμή σε σχέση με το control που χρησιμοποιήθηκε για συγκριτικούς λόγους και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Αυτό μας ωθεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει μία ιστοειδικότητα. Επιπρόσθετα, στην εικόνα 30 παρατηρούνται τα αποτελέσματα της αποσιώπησης του γονιδίου αυτού. Στο σημείο αυτό να τονιστεί πως τα συγκεκριμένα πειράματα έγιναν σε ποντίκια, καθώς η διεξαγωγή τέτοιου είδους πειραμάτων απαγορεύεται να εφαρμόζονται στον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφής επίπτωση στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων με μεγάλο ποσοστό από αυτά να είναι στο μαστίγιο.

Ένας πιθανός τρόπος πρόκλησης ασθενοσπερμίας είναι τα γονίδια που προαναφέρθηκαν να είναι πλήρως λειτουργικά και φυσιολογικά, όμως, λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια miRNAs τα μετάγραφα των γονιδίων αυτών να στοχεύονται και να καταστρέφονται.

3. Τερατοσπερμία

Η τερατοσπερμία σχετίζεται με την μορφολογία του σπερματοζωαρίου. Όταν αυτή είναι διαταραγμένη μπορεί να επιφέρει πληθώρα προβλημάτων όπως δυσκολίες κίνησης ή προβλήματα στην ικανότητα γονιμοποίησης του σπερματοζωαρίου.

Στην προκειμένη περίπτωση οι πληροφορίες που λήφθηκαν δεν ήταν επαρκείς για να διαπιστωθεί η ακριβής αιτία που επηρεάζεται η μορφολογία τουλάχιστον με βάση τα δεδομένα τα οποία παρήχθησαν, δηλαδή για miRNAs. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανότατα να μην ευθύνονται αυτά ως προς την εκδήλωση της πάθησης αυτής άμεσα. Όμως, φαίνεται να έχουν έμμεση επιρροή μέσω της δημιουργίας επιπλοκών σε σημαντικούς μηχανισμούς του κυττάρου και κατά επέκταση του σπερματοζωαρίου.

Μεταξύ των μηχανισμών που φαίνεται να διαταράσσονται στην περίπτωση της τερατοσπερμίας είναι η απόπτωση. Η απόπτωση σαν διαδικασία αναλύθηκε στον υπότυπο της ολιγοσπερμίας και είναι η ίδια. Από την στιγμή που δημιουργείται ένα σπερματοζωάριο το οποίο είναι ανίκανο να επιτελέσει ορθά τη λειτουργία του και με παραμορφωμένη μορφολογία αυτό θα πρέπει να καταστρέφεται. Η απόπτωση πραγματοποιείται κυρίως από το σηματοδοτικό μονοπάτι του p53. Διαπιστώθηκε πως όταν η συγκέντρωση του p53 διαταράσσεται και δεν βρίσκεται εντός ορίων επηρεάζεται η διαδικασία αυτή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στην ολιγοσπερμία μη σωστή ρύθμιση των επιπέδων του p53 από τα miRNAs, δηλαδή μη σύνδεση αυτών με τα mRNAs του p53, έχοντας ως αποτέλεσμα την εκκίνηση της αυτοκαταστροφής του σπερματοζωαρίου οδηγώντας εν τέλει στην ολιγοσπερμία. Στον υπότυπο αυτόν συμβαίνει το ίδιο αλλά αντίστροφα, δηλαδή το σηματοδοτικό μονοπάτι δεν ενεργοποιείται παρότι θα έπρεπε δεδομένου της μη κατάλληλης φυσιολογίας του σπερματοζωαρίου. Αυτό γίνεται διότι λόγω μεταλλάξεων προκύπτουν miRNAs που συνδέονται στο mRNA του p53 μειώνοντας την

συγκέντρωσή του, ενώ κανονικά δεν θα έπρεπε. Επομένως, το σηματοδοτικό μονοπάτι δεν εκκινεί και τα σπερματοζωάρια με μορφολογικό πρόβλημα επιβιώνουν έχοντας ως αποτέλεσμα την εκδήλωση της τερατοσπερμίας.

4. Συμπέρασμα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε και εξετάστηκε ο ρόλος που διαδραματίζουν τα miRNAs στην εκδήλωση της олиγοσπερμίας, της ασθενοσπερμίας και της τερατοσπερμίας στους άνδρες. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε μέσω της αλληλούχησης νέας γενιάς η οποία παρέχει μία οικονομική, ταχύτατη και κυρίως αποτελεσματική χαρτογράφηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού, στην προκειμένη περίπτωση του ανθρώπου.

Παρόλο που έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζουν τα γονίδια σε πολλές παθήσεις, οι πληροφορίες όσον αφορά στα μη κωδικοποιητικά RNAs είναι σχετικά περιορισμένες. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί εξετάζοντας τον πίνακα του Παραρτήματος παρακάτω, όπου αναφέρονται όλοι οι πολυμορφισμοί σε miRNAs οι οποίοι δεν βρέθηκαν στις βάσεις δεδομένων. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως είτε δεν υφίστανται είτε πως δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμα μελέτες ως προς αυτά και κατά συνέπεια λείπουν από τις βάσεις δεδομένων. Επομένως, θεωρείται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση αυτών, αλλά και στο γενετικό υπόβαθρο των ανδρών με υπογονιμότητα ως προς όλους τους υπότυπους. Θα πρέπει να γίνει συλλογή περισσότερων δειγμάτων ώστε η σύγκριση να είναι αποτελεσματικότερη, διεξοδικότερη, αλλά και για την αύξηση της στατιστικής σημαντικότητας. Συγχρόνως, η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός πιο πολλών γονιδίων και αλληλομόρφων τους που παράγουν μη κωδικοποιητικά RNAs κρίνονται αναγκαία. Παρότι δεν αποτελούν κάποια σχετικά καινούρια ανακάλυψη, ο σημαντικός ρόλος που κατέχουν στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, καθώς και ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται για την επίτευξη αυτής της ρύθμισης τώρα αρχίζει να μελετάται πυρετωδώς. Εν ολίγοις, είναι σημαντική η πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών και ειδικότερα στο πεδίο της αναπαραγωγής και γονιμότητας.

Με αυτό τον τρόπο θα αυξηθεί ο όγκος των δεδομένων και κατ' εξακολούθηση η στατιστική σημαντικότητα στην επιβεβαίωση των αιτιών πρόκλησης. Η διεξαγωγή περισσότερων ερευνών θα δώσει εκτός της δυνατότητας έγκαιρης διάγνωσης και πλήρης κατανόηση των αιτιών. Συνεπώς, θα μπορούσαν να δημιουργηθούν αποτελεσματικές θεραπείες ώστε να περιοριστεί ή και να εξαλειφθεί εξ ολοκλήρου η πάθηση αυτή. Εν κατακλείδι, η επιστήμη είναι πάντα δίπλα στον άνθρωπο και συντρέπει στην αντιμετώπιση των προβλημάτων και των θεμάτων που προκύπτουν στα μέλη της κοινωνίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Παραρτήματος: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που δεν βρέθηκαν στις βάσεις δεδομένων

Μη καταχωρημένα SNPs
rs72829724 NOT FOUND
rs1409325 NOT FOUND
rs7100406 NOT FOUND
rs11007005 NOT FOUND
rs146727601 NOT FOUND
rs10894325 NOT FOUND
rs7131652 NOT FOUND
rs7102190 NOT FOUND
rs75539129 NOT FOUND
rs77274263 NOT FOUND
rs200981623 NOT FOUND
rs77777451 NOT FOUND
rs76741221 NOT FOUND
rs11177504 NOT FOUND
rs74738115 NOT FOUND
rs61996994 NOT FOUND
rs28798099 NOT FOUND
rs1004810481 NOT FOUND
rs1236239883 NOT FOUND
rs7156430 NOT FOUND
rs545700748 NOT FOUND
rs372207325 NOT FOUND
rs62038339 NOT FOUND
rs780542008 NOT FOUND
rs1424631341 NOT FOUND
rs2079662 NOT FOUND
rs148227330 NOT FOUND
rs144901811 NOT FOUND
rs2996929 NOT FOUND
rs1380875600 NOT FOUND
rs200471268 NOT FOUND
rs76003634 NOT FOUND
rs7418037 NOT FOUND
rs12563718 NOT FOUND
rs757479249 NOT FOUND
rs11466997 NOT FOUND
rs1558771633 NOT FOUND
rs1248177502 NOT FOUND
rs2624583 NOT FOUND
rs9828656 NOT FOUND
rs1485241738 NOT FOUND
rs7373100 NOT FOUND
rs200103713 NOT FOUND
rs1381886483 NOT FOUND
rs201465050 NOT FOUND
rs1272519625 NOT FOUND
rs9992482 NOT FOUND
rs114699543 NOT FOUND
rs112100953 NOT FOUND
rs4974826 NOT FOUND
rs138670170 NOT FOUND
rs1247875369 NOT FOUND
rs776450178 NOT FOUND
rs544476875 NOT FOUND
rs73424716 NOT FOUND
rs2965466 NOT FOUND
rs67627629 NOT FOUND
rs111215935 NOT FOUND
rs796368157 NOT FOUND
rs796983598 NOT FOUND

rs796782157 NOT FOUND
rs1298165351 NOT FOUND
rs78979172 NOT FOUND
rs375905274 NOT FOUND
rs749486374 NOT FOUND
rs79746415 NOT FOUND
rs2463122 NOT FOUND
rs12413779 NOT FOUND
rs11007005 NOT FOUND
rs139624428 NOT FOUND
rs3763675 NOT FOUND
rs117548198 NOT FOUND
rs7103202 NOT FOUND
rs73013007 NOT FOUND
rs17534580 NOT FOUND
rs111856373 NOT FOUND
rs4937770 NOT FOUND
rs56156123 NOT FOUND
rs186219082 NOT FOUND
rs116903521 NOT FOUND
rs7131652 NOT FOUND
rs7102190 NOT FOUND
rs147457579 NOT FOUND
rs1544272 NOT FOUND
rs199960361 NOT FOUND
rs72966994 NOT FOUND
rs6488250 NOT FOUND
rs3994131 NOT FOUND
rs12827335 NOT FOUND
rs142569053 NOT FOUND
rs140312674 NOT FOUND
rs7961402 NOT FOUND
rs1858982 NOT FOUND
rs1700393 NOT FOUND
rs78897441 NOT FOUND
rs7965754 NOT FOUND
rs7965760 NOT FOUND
rs6581552 NOT FOUND
rs61932682 NOT FOUND
rs7305961 NOT FOUND
rs573117602 NOT FOUND
rs2893281 NOT FOUND
rs148827229 NOT FOUND
rs141335252 NOT FOUND
rs2126366 NOT FOUND
rs73206166 NOT FOUND
rs7322439 NOT FOUND
rs1019431766 NOT FOUND
rs73350964 NOT FOUND
rs61996994 NOT FOUND
rs62010950 NOT FOUND
rs35319427 NOT FOUND
rs12432203 NOT FOUND
rs2878169 NOT FOUND
rs12101105 NOT FOUND
rs144320303 NOT FOUND
rs112050449 NOT FOUND
rs7140377 NOT FOUND
rs7156430 NOT FOUND
rs371647814 NOT FOUND
rs1186528685 NOT FOUND
rs7402542 NOT FOUND
rs79423059 NOT FOUND
rs72546400 NOT FOUND
rs7170049 NOT FOUND
rs55828351 NOT FOUND
rs1555407035 NOT FOUND

rs62027568 NOT FOUND
rs992377646 NOT FOUND
rs73550108 NOT FOUND
rs9807003 NOT FOUND
rs7404924 NOT FOUND
rs62038339 NOT FOUND
rs1407559919 NOT FOUND
rs12921061 NOT FOUND
rs145669577 NOT FOUND
rs200098680 NOT FOUND
rs1054715 NOT FOUND
rs74921415 NOT FOUND
rs754607677 NOT FOUND
rs111673118 NOT FOUND
rs4791293 NOT FOUND
rs72847913 NOT FOUND
rs72886675 NOT FOUND
rs113119319 NOT FOUND
rs1179381517 NOT FOUND
rs12607480 NOT FOUND
rs4319836 NOT FOUND
rs113310037 NOT FOUND
rs112112904 NOT FOUND
rs8087795 NOT FOUND
rs35252149 NOT FOUND
rs62129534 NOT FOUND
rs58496446 NOT FOUND
rs55813323 NOT FOUND
rs56974957 NOT FOUND
rs112837068 NOT FOUND
rs111241257 NOT FOUND
rs11878870 NOT FOUND
rs1419570888 NOT FOUND
rs2996929 NOT FOUND
rs55773147 NOT FOUND
rs56367504 NOT FOUND
rs74761498 NOT FOUND
rs200471268 NOT FOUND
rs558717681 NOT FOUND
rs181006863 NOT FOUND
rs10917815 NOT FOUND
rs71125214 NOT FOUND
rs10911174 NOT FOUND
rs10911175 NOT FOUND
rs1304631868 NOT FOUND
rs12760033 NOT FOUND
rs184826684 NOT FOUND
rs12035375 NOT FOUND
rs6665692 NOT FOUND
rs2479528 NOT FOUND
rs138697869 NOT FOUND
rs76973380 NOT FOUND
rs57719158 NOT FOUND
rs112787135 NOT FOUND
rs757479249 NOT FOUND
rs763418135 NOT FOUND
rs11466997 NOT FOUND
rs539650443 NOT FOUND
rs62224694 NOT FOUND
rs6017180 NOT FOUND
rs2425665 NOT FOUND
rs111413138 NOT FOUND
rs146422353 NOT FOUND
rs2040167 NOT FOUND
rs73154363 NOT FOUND
rs6725658 NOT FOUND
rs55728517 NOT FOUND

rs4396769 NOT FOUND
rs1558771633 NOT FOUND
rs115347591 NOT FOUND
rs1455990187 NOT FOUND
rs143533937 NOT FOUND
rs67982913 NOT FOUND
rs10930092 NOT FOUND
rs11673796 NOT FOUND
rs1461103045 NOT FOUND
rs13019380 NOT FOUND
rs56722161 NOT FOUND
rs66727383 NOT FOUND
rs1023648260 NOT FOUND
rs62139662 NOT FOUND
rs73940368 NOT FOUND
rs17477871 NOT FOUND
rs115612179 NOT FOUND
rs62127516 NOT FOUND
rs79002000 NOT FOUND
rs117318620 NOT FOUND
rs369103795 NOT FOUND
rs9854597 NOT FOUND
rs531512469 NOT FOUND
rs77264282 NOT FOUND
rs111316404 NOT FOUND
rs7643063 NOT FOUND
rs9828656 NOT FOUND
rs191256913 NOT FOUND
rs13090011 NOT FOUND
rs57803044 NOT FOUND
rs8179904 NOT FOUND
rs73838258 NOT FOUND
rs139360128 NOT FOUND
rs73188365 NOT FOUND
rs201465050 NOT FOUND
rs7664138 NOT FOUND
rs1272519625 NOT FOUND
rs56731034 NOT FOUND
rs13140616 NOT FOUND
rs769062171 NOT FOUND
rs4126522 NOT FOUND
rs114699543 NOT FOUND
rs79693382 NOT FOUND
rs376528860 NOT FOUND
rs113072243 NOT FOUND
rs1560429186 NOT FOUND
rs4374618 NOT FOUND
rs4374619 NOT FOUND
rs58337898 NOT FOUND
rs4974826 NOT FOUND
rs138670170 NOT FOUND
rs7443988 NOT FOUND
rs111538072 NOT FOUND
rs60689100 NOT FOUND
rs764379297 NOT FOUND
rs73054809 NOT FOUND
rs199639593 NOT FOUND
rs13161161 NOT FOUND
rs554849986 NOT FOUND
rs6892475 NOT FOUND
rs11953199 NOT FOUND
rs4869544 NOT FOUND
rs76261642 NOT FOUND
rs115434367 NOT FOUND
rs11742403 NOT FOUND
rs776450178 NOT FOUND
rs221713 NOT FOUND

rs17072046 NOT FOUND
rs45544136 NOT FOUND
rs7758187 NOT FOUND
rs4367415 NOT FOUND
rs202078806 NOT FOUND
rs12203549 NOT FOUND
rs72854550 NOT FOUND
rs554586420 NOT FOUND
rs79337760 NOT FOUND
rs116434388 NOT FOUND
rs12192799 NOT FOUND
rs144294698 NOT FOUND
rs143503129 NOT FOUND
rs62429106 NOT FOUND
rs183821049 NOT FOUND
rs117672187 NOT FOUND
rs116848023 NOT FOUND
rs12536266 NOT FOUND
rs12671106 NOT FOUND
rs6464258 NOT FOUND
rs143333198 NOT FOUND
rs2965466 NOT FOUND
rs1347024 NOT FOUND
rs6987018 NOT FOUND
rs796368157 NOT FOUND
rs186281418 NOT FOUND
rs76217929 NOT FOUND
rs79363684 NOT FOUND
rs878488 NOT FOUND
rs66478924 NOT FOUND
rs1222603045 NOT FOUND
rs10966725 NOT FOUND
rs759276290 NOT FOUND
rs386414854 NOT FOUND
rs7021642 NOT FOUND
rs10973468 NOT FOUND
rs375905274 NOT FOUND
rs5982503 NOT FOUND
rs7054209 NOT FOUND
rs149975254 NOT FOUND
rs775993371 NOT FOUND
rs1162083438 NOT FOUND
rs758475553 NOT FOUND
rs903754069 NOT FOUND
rs1000636288 NOT FOUND
rs11177504 NOT FOUND
rs61996994 NOT FOUND
rs2893281 NOT FOUND
rs28798099 NOT FOUND
rs7156430 NOT FOUND
rs3826020 NOT FOUND
rs13329393 NOT FOUND
rs569922794 NOT FOUND
rs7404924 NOT FOUND
rs201772357 NOT FOUND
rs372207325 NOT FOUND
rs1424631341 NOT FOUND
rs1204067008 NOT FOUND
rs754140011 NOT FOUND
rs2079662 NOT FOUND
rs1175423208 NOT FOUND
rs1491430885 NOT FOUND
rs200471268 NOT FOUND
rs8192600 NOT FOUND
rs9426768 NOT FOUND
rs757479249 NOT FOUND
rs763418135 NOT FOUND

rs148967064 NOT FOUND
rs1229124539 NOT FOUND
rs1455990187 NOT FOUND
rs371181654 NOT FOUND
rs112606498 NOT FOUND
rs114915853 NOT FOUND
rs9828656 NOT FOUND
rs1485241738 NOT FOUND
rs13106035 NOT FOUND
rs9992482 NOT FOUND
rs1382023210 NOT FOUND
rs769062171 NOT FOUND
rs113072243 NOT FOUND
rs76967305 NOT FOUND
rs112100953 NOT FOUND
rs138670170 NOT FOUND
rs369070312 NOT FOUND
rs199639593 NOT FOUND
rs13161161 NOT FOUND
rs1247875369 NOT FOUND
rs1317441031 NOT FOUND
rs372609022 NOT FOUND
rs544476875 NOT FOUND
rs537621130 NOT FOUND
rs73424716 NOT FOUND
rs575887009 NOT FOUND
rs6948285 NOT FOUND
rs2965466 NOT FOUND
rs34967184 NOT FOUND
rs142637369 NOT FOUND
rs67627629 NOT FOUND
rs111215935 NOT FOUND
rs1394778673 NOT FOUND
rs796368157 NOT FOUND
rs796983598 NOT FOUND
rs796097728 NOT FOUND
rs796782157 NOT FOUND
rs1401931759 NOT FOUND
rs16904717 NOT FOUND
rs377556122 NOT FOUND
rs1283127958 NOT FOUND
rs1222603045 NOT FOUND
rs375905274 NOT FOUND
rs775993371 NOT FOUND
rs1162083438 NOT FOUND
rs749486374 NOT FOUND

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kyrgiagini, 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>
2. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10271, pp. 319–333). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
3. Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. <https://doi.org/10.1038/s41585>
4. Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility – The other side of the equation. *Australian Family Physician*, 46(9), 641-646.
5. Poongothai, J., Gopenath, T. S., Manonayaki, S., (2009). Genetics of human male infertility, *Singapore Medical journal*, 50(4), p. 336-47.
6. Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., & Khodadadian, A. (2020). Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. *International Journal of General Medicine* (Vol. 13, pp. 29-41). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S241099>
7. Corradi PF, Corradi RB, Greene LW. Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male. *Urol Clin*. 2016;43(2):151–162. doi: 10.1016/j.ucl.2016.01.001
8. Niu, D.K., Jiang, L., (2013). Can ENCODE tell us how much junk DNA we carry in our genome?, *Biochem Biophys Res Commun.*, 430(4), p.1340-3.
9. Beermann, J., Piccoli, M.T, Viereck, J., Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches, *Physiological Reviews*, 96(4), p.1297-1325.
10. Yang J.X., Rastetter R.H., Wilhelm D. (2016) Non-coding RNAs: An Introduction. In: Wilhelm D., Bernard P. (eds) *Non-coding RNA and the Reproductive System. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 886. Springer, Dordrecht.
11. Skourti, E., Christodoulou, I., Logotheti, S., Zoumbourlis, V., (2013). MicroRNAs, cancer and cancer stem cells: From research to therapy. *Archives of Hellenic Medicine*, 30(4), p.391-405.
12. Leitao, A.L., Enguita, F.J. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-Coding RNA* 2022, 8, 10. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010010>
13. Joshi S.R., McLendon J.M., Comer B.S., Gerthoffer W.T. *MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. Pulmonary circulation*. 2011. 1:357-64.
14. Mukherjee, A., Koli, S., & Reddy, K. V. R. (2014). Regulatory non-coding transcripts in spermatogenesis: shedding light on ‘dark matter’. *Andrology*, 2, p. 360-369.
15. Gou, L., Dai, P., & Liu, M. (2014). Small noncoding RNAs and male infertility. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5(6), p. 733-745.

16. Wang T., Gao H., Li W., Liu C. (2019). Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. *Front. Genet.* 10:962. doi: 10.3389/fgene.2019.00962
17. Aubrey, B., Kelly, G., Janic, A. *et al.* How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. *Cell Death Differ* **25**, 104–113 (2018). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
18. Joana D Amaral, Joana M Xavier, Clifford J Steer, Cecilia M Rodrigues. (2010). The Role of p53 in Apoptosis. *Discovery Medicine*, 9(45):145-152.
19. Alireza Panahi, M.Sc., Sina Mirza Ahmadi, Ph.D., * and Golnaz Asaadi Tehrani, Ph.D. (2022) Comparison between SPATA18 and P53 Gene Expressions in The Sperm Cells Obtained from Normospermic and Asthenospermic Samples: A Case-Control Study. *International Journal of Fertility & Sterility*, 16(2):122-127.
20. Salvatore Raimondo, Tommaso Gentile, Mariacira Gentile, Alessia Morelli, Francesca Donnarumma, Felice Cuomo, Stefania De Filippo, and Luigi Montano. (2019). p53 Protein Evaluation on Spermatozoa DNA in Fertile and Infertile Males. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(2):114-121.
21. Santiago Vidal, Yanis Hichem Bouzaher, Ahmed El Motiam, Rocío Seoane, Carmen Rivas. (2022). Overview of the regulation of the class IA PI3K/AKT pathway by SUMO. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 132, pages 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2021.10.012>
22. Deng CY, Lv M, Luo BH, Zhao SZ, Mo ZC, Xie YJ. The Role of the PI3K/AKT/mTOR Signalling Pathway in Male Reproduction. *Curr Mol Med.* 2021;21(7):539-548. doi: 10.2174/1566524020666201203164910. PMID: 33272176.
23. Michelle W. M. Li, Dolores D. Mruk and C. Yan Cheng. (2009) Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. *Trends in Molecular Medicine*, 15(4): 159-168.
24. Li, L., & Chen, S. (2021). Screening, identification and interaction analysis of key microRNAs and genes in asthenozoospermia. *International Journal of Medical Sciences*, 18(7), 1670–1679. <https://doi.org/10.7150/ijms.54460>
25. Wu B, Yu X, Liu C, Wang L, Huang T, Lu G, Chen ZJ, Li W, Liu H. Essential Role of CFAP53 in Sperm Flagellum Biogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2021 May 28;9:676910. doi: 10.3389/fcell.2021.676910. PMID: 34124066; PMCID: PMC8195676.