



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

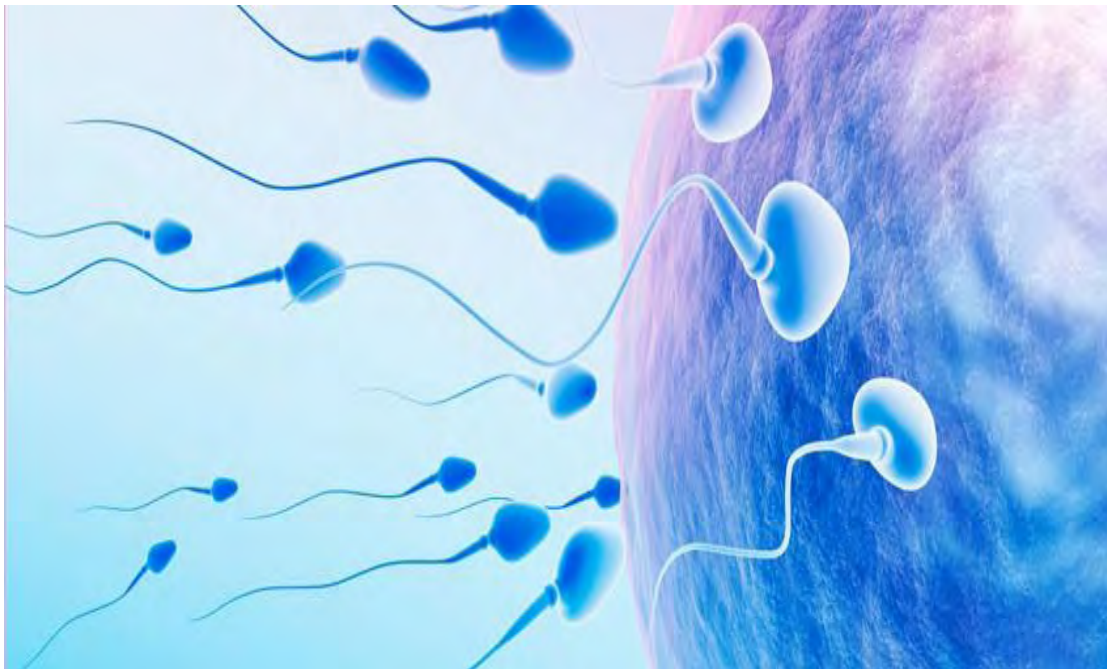
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση και πρόβλεψη λειτουργιών lncRNAs στην ανδρική υπογονιμότητα στον Ελληνικό πληθυσμό

LncRNAs and their association with male infertility in the Greek population

Διπλωματική εργασία

ΚΥΡΓΙΑΦΙΝΗ ΜΑΡΙΑ-ANNA



*Λάρισα,
Ιούνιος 2019*

Τριμελής Επιτροπή

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

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

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

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

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

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

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλλαν στην υλοποίησή της και με βοήθησαν με κάθε τρόπο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ζήση Μαμούρη ο οποίος με τη διδασκαλία των ακαδημαϊκών του μαθημάτων, μου κίνησε το ενδιαφέρον για τη γενετική και με έκανε να την αγαπήσω. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, όπως και για το ενδιαφέρον του, τις συμβουλές του αλλά και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για να με καθοδηγήσει σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

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

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κα Μούτου Αικατερίνη γιατί η παρουσία της στο εργαστήριο ήταν πολύ σημαντική για μένα. Ήταν συνέχεια εκεί, με τις πολύτιμες γνώσεις της και την αφοσίωσή της, για να αντιμετωπίσει οποιαδήποτε δυσκολία προέκυπτε, να διαθέσει το χρόνο της για να παρέχει συμβουλές και να λύσει οποιαδήποτε απορία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Μαρκαντώνη με την οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω γιατί με εμπιστεύτηκε από την αρχή και ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα με τις πολύτιμες συμβουλές της, να με καθοδηγεί και να με οργανώνει. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για όλες τις υπέροχες στιγμές που περάσαμε μαζί, εντός και εκτός εργαστηρίου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες χρωστάω στην επίσης προπτυχιακή φοιτήτρια, Έλενα Γιαλινάκη, με την οποία ξεκινήσαμε μαζί αυτό τον όμορφο κύκλο και συνεργαστήκαμε στο project της ανδρικής υπογονιμότητας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου γιατί χωρίς αυτή δεν θα είχα φτάσει μέχρι εδώ. Ευχαριστώ τη μαμά μου, Κατερίνα, και το μπαμπά μου, Γιάννη, γιατί είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε μου επιλογή. Ευχαριστώ και τους δύο για την προσπάθειά τους να μην μας λείψει τίποτε όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω και στην αδερφή μου, Μιμή, γιατί κάνει κάθε μέρα μου λίγο πιο διασκεδαστική και όμορφη και με στηρίζει με κάθε πιθανό και απίστευτο τρόπο.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	7
Abstract	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
Ανδρική υπογονιμότητα.....	9
1.1. Ορισμός και γενικές πληροφορίες.....	9
1.2. Διαδικασία της σπερματογένεσης	10
1.3. Μειωτική απενεργοποίηση φυλετικών χρωμοσωμάτων – Meiotic Sex Chromosome Inactivation	12
1.4. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας	13
1.5. Ταξινόμηση ανδρικής υπογονιμότητας	14
1.6. Μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας και προβλήματα	15
1.7. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας	17
Μη κωδικοποιητικά RNAs (Non-coding RNAs)	19
2.1. Γενικές πληροφορίες και κατηγορίες non-coding RNAs	19
2.2. Long non-coding RNAs.....	20
2.2.1. Βιογένεση lncRNAs.....	21
2.2.2. Λειτουργία-ρόλος lncRNAs.....	22
2.3. miRNAs	23
2.3.1. Βιογένεση miRNAs.....	24
2.3.2. Λειτουργία-ρόλος miRNAs	24
2.4. Αλληλεπιδράσεις lncRNAs-miRNAs.....	25
2.5. Ρόλος των non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα	26

2.6. Εργαλεία και μέθοδοι μελέτης των non-coding RNAs (miRNAs, lncRNAs).....	28
2.7. Χρήση non-coding RNAs ως βιοδείκτες (miRNAs, lncRNAs)	30
B. ΣΚΟΠΟΣ	32
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
1. Βιολογικό υλικό	33
2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα	33
3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων.....	34
3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο	34
3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη	35
4. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA	35
4.1. Με χρήση φασματοφωτόμετρου	35
4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	36
5. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA.....	37
6. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK	38
6.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης	39
6.2. Quality control.....	41
6.3. Ανάλυση συσχέτισης - Association analysis.....	42
7. Annotation των SNPs με SNPnexus.....	44
8. Διερεύνηση λειτουργιών lncRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα	46
9. Αλληλεπίδραση miRNAs-lncRNAs και συσχέτιση με ανδρική υπογονιμότητα	48
9.1. Εντοπισμός miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs με τη βάση δεδομένων DIANA tools-LncBase Predicted v.2.....	48
9.2. Διερεύνηση λειτουργιών miRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα	50
10. Εντοπισμός των γονιδίων-στόχων των miRNAs και διερεύνηση πιθανής λειτουργίας τους που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα	51
10.1. Εύρεση γονιδίων-στόχων των miRNAs με miRTargetLinkHuman.....	51

10.2. Διερεύνηση λειτουργίας των γονιδίων που στοχεύονται από τα miRNAs με GeneCards	52
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
1. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA.....	54
2. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK	54
2.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης	54
2.2. Quality control.....	54
2.3. Ανάλυση συσχέτισης – Association Analysis.....	55
3. Annotation των SNPs με SNPnexus	56
4. Διερεύνηση λειτουργιών lncRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα.....	58
5. Αλληλεπίδραση miRNAs-lncRNAs και συσχέτιση με ανδρική υπογονιμότητα	61
5.1. Εντοπισμός miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs με τη βάση δεδομένων DIANA tools-lncBase Predicted v.2.	61
5.2. Διερεύνηση λειτουργιών miRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα.....	61
6. Εντοπισμός των γονιδίων-στόχων των miRNAs και διερεύνηση πιθανής λειτουργίας τους που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα	68
6.1. Εύρεση γονιδίων-στόχων των miRNAs με miRTargetLinkHuman.....	68
6.2. Διερεύνηση λειτουργίας των γονιδίων που στοχεύονται από τα miRNAs με GeneCards	78
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	110

Περίληψη

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα που απασχολεί πολλά ζευγάρια παγκοσμίως και μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα οικονομικά, ψυχολογικά αλλά και κοινωνικά προβλήματα. Συγκεκριμένα, η υπογονιμότητα παρατηρείται στο 15% των ζευγαριών και ο ανδρικός παράγοντας συνεισφέρει στο 50% των περιπτώσεων. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή, στην οποία περιβαλλοντικοί παράγοντες αλλά και μεγάλος αριθμός γονιδίων συνεισφέρει στην εμφάνιση του φαινοτύπου. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν non-coding RNAs με την ανδρική υπογονιμότητα. Πολλές κατηγορίες ncRNAs, μεταξύ των οποίων τα miRNAs και τα lncRNAs, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων της διαδικασίας της σπερματογένεσης και ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί διαφορετικό προφίλ έκφρασης των lncRNAs και των miRNAs μεταξύ υγιών και ατόμων με φαινότυπο υπογονιμότητας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε lncRNAs προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην ποιότητα και τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη lncRNAs έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών. Προέκυψε ότι μερικά lncRNAs συσχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με miRNAs. Εντοπίστηκαν συγκεκριμένα αλληλεπιδράσεις με miRNAs που επηρεάζουν τη διαδικασία της σπερματογένεσης και πολλά από αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες. Ακόμη, τα miRNAs ασκούν τη δράση τους κυρίως μέσω της στόχευσης mRNAs. Πολλά από τα γονίδια-στόχοι των miRNAs που εντοπίστηκαν σχετίζονται με το μηχανισμό γονιμοποίησης στα αρσενικά. Επομένως, η διερεύνηση του ρόλου των lncRNAs, πέρα από το γεγονός ότι είναι άκρως σημαντική, ίσως συμβάλλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών στους οποίους βασίζεται η ανδρική υπογονιμότητα, ενώ μπορεί να οδηγήσει σε έγκαιρη διάγνωση, στην κατάλληλη αντιμετώπιση και σε μια επιτυχή κύηση.

Abstract

Infertility is a major public health problem that affects many couples worldwide and can lead to a variety of economic, psychological and social problems. In particular, approximately 15% of couples have difficulty or are unable to conceive, whereas, 50% of all infertility cases are due to a male factor. Male infertility is a complex disorder, in which environmental factors and a large number of genes contribute to the appearance of the phenotype. Of particular interest, is the fact that more and more studies associate non-coding RNAs with male infertility. Many classes of ncRNAs, including miRNAs and lncRNAs, are involved in the regulation of gene expression in spermatogenesis and different expression profiles of lncRNAs and miRNAs have been observed between healthy individuals and individuals with a subfertile phenotype. In the current thesis, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in lncRNAs were studied to determine their effect on sperm quality and fertilization. Sperm from normospermic and non-normospermic men of the Greek population was used for DNA genotyping and bioinformatics analysis, which continuously gains ground in the study of lncRNAs versus time-consuming and expensive experimental procedures. As a result, we detected lncRNAs that are associated with male infertility through their interaction with miRNAs. In particular, interactions with miRNAs that affect the process of spermatogenesis have been identified and many of these miRNAs could be used as biomarkers. Furthermore, miRNAs exert their activity primarily through targeting mRNAs. Many of the target-genes of the miRNAs detected are related to the fertilization mechanism and process in males. Therefore, exploring the role of lncRNAs, apart from being a remarkable field of research, indicates that the investigation of lncRNAs is very important and it may contribute in the understanding of the molecular mechanisms underlying male infertility and may lead to an early diagnosis, appropriate treatment and a successful pregnancy.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανδρική υπογονιμότητα

1.1. Ορισμός και γενικές πληροφορίες

Η υπογονιμότητα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ορίζεται κλινικά ως η αδυναμία σύλληψης από ένα ζευγάρι, έπειτα από τουλάχιστον ένα χρόνο τακτικής σεξουαλικής επαφής χωρίς προφυλάξεις (Mascarenhas et al., 2012). Μπορεί ακόμη να γίνει διάκριση ανάμεσα σε πρωτογενή και δευτερογενή υπογονιμότητα. Χαρακτηρίζεται ως πρωτογενής όταν δεν έχει προκύψει κύηση ποτέ στο παρελθόν και ως δευτερογενής όταν έχει υπάρξει κύηση ανεξαρτήτου αποτελέσματος. Η πρωτογενής υπογονιμότητα εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα ζευγάρια (Poongothai et al., 2009). Υπολογίζεται επίσης, ότι η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 15% των ζευγαριών, δηλαδή 48,5 εκατομμύρια ζευγάρια παγκοσμίως (Agarwal et al., 2015).

Παρόλο που η υπογονιμότητα είναι ένα πρόβλημα που αφορά τόσο το ανδρικό όσο και το γυναικείο φύλο (Mascarenhas et al., 2012), η συνεισφορά του ανδρικού παράγοντα αγγίζει το 50% των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα, το 30% των περιπτώσεων οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα ενώ το 20% οφείλεται σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα (Katz et al, 2017).

Όσον αφορά την καταγραφή των περιστατικών ανδρικής υπογονιμότητας και τον υπολογισμό της συχνότητας εμφάνισής της, προκύπτει ότι αυτό δεν είναι εύκολη υπόθεση αφού σε πολλές περιοχές κοινωνικοί και πολιτισμικοί παράγοντες, όπως η πολυγαμία και η υπεροχή του ανδρικού φύλου, οδηγούν σε μη αναφορά και καταγραφή όλων των περιστατικών. Ακόμη, μέχρι αρκετά πρόσφατα, η μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τα αίτια και τη διάγνωση είχε ως αποτέλεσμα την ύπαρξη πολλών ορισμών που χρησιμοποιούνταν σε διαφορετικές μελέτες και αφορούσαν κυρίως το χρονικό διάστημα των προσπαθειών σύλληψης. Παρά αυτές τις δυσκολίες ωστόσο, υπολογίζεται ότι περίπου 30 εκατομμύρια άνδρες παγκοσμίως εμφανίζουν υπογονιμότητα και τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρούνται σε Αφρική και Ανατολική Ευρώπη (Agarwal et al., 2015).

Είναι γνωστό ότι η ανδρική γονιμότητα εξαρτάται από τις διαδικασίες παραγωγής και μεταφοράς του σπέρματος, τις διαδικασίες δηλαδή της σπερματογένεσης, οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και εμπλέκουν το νευρικό, το ενδοκρινικό αλλά και το ανοσοποιητικό σύστημα (Katz et al., 2017). Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των μηχανισμών που εμπλέκονται, η ανδρική υπογονιμότητα έχει χαρακτηριστεί ως ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο. Οφείλεται δηλαδή τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι στο 30% των περιπτώσεων, η προέλευση της ανδρικής υπογονιμότητας είναι άγνωστη ενώ στο 10% των περιπτώσεων δεν μπορεί καν να εξηγηθεί ιατρικά (Poongothai J et al, 2009).

Είναι επομένως ξεκάθαρο ότι η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, που επηρεάζει πάρα πολλά ζευγάρια παγκοσμίως και είναι απαραίτητο

να μελετηθεί περαιτέρω προκειμένου να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή (Agarwal et al., 2015).

1.2. Διαδικασία της σπερματογένεσης

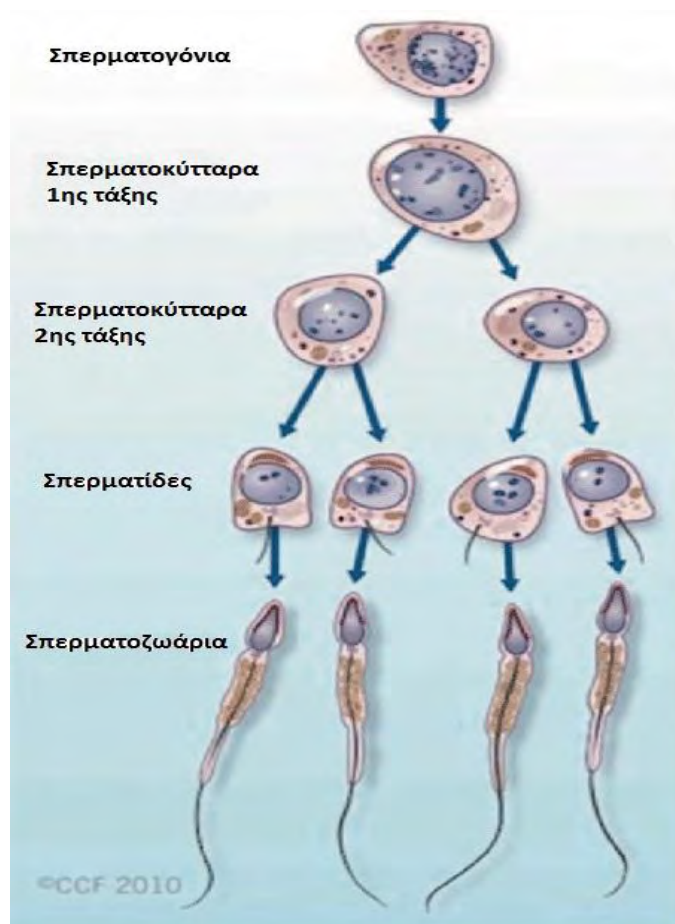
Η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που οδηγεί στην παραγωγή των ώριμων γαμετικών κυττάρων του αρσενικού φύλου (Tenorio et al., 2016). Περιλαμβάνει τη μετατροπή των πρόδρομων γεννητικών κυττάρων σε αρσενικούς γαμέτες, δηλαδή σπερματοζωάρια.

Η σπερματογένεση πραγματοποιείται στους όρχεις και συγκεκριμένα σε όλα τα επίπεδα των σπερματικών σωληναρίων (Ζίφα et al, 2008). Τα σπερματικά σωληνάκια αποτελούν τις λειτουργικές μονάδες των όρχεων και αποτελούνται από τη βασική μεμβράνη, τα κύτταρα Sertoli και τα γαμετικά κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Τα κύτταρα Sertoli θεωρούνται απαραίτητοι ρυθμιστές της σπερματογένεσης καθώς θρέφουν και υποστηρίζουν τα γαμετικά κύτταρα στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Επίσης, λειτουργούν ως μακροφάγα που μέσω της φαγοκυττάρωσης απομακρύνουν εκφυλισμένα γαμετικά κύτταρα ώστε να ολοκληρωθεί ομαλά η διαδικασία της σπερματογένεσης. Ακόμη, σημαντικό κύτταρο παίζουν τα κύτταρα Leydig. Βρίσκονται ανάμεσα σε αγγεία και σπερματικά σωληνάκια και αποτελούν τη βασική πηγή ανδρογόνων στα αρσενικά, όπως η τεστοστερόνη (Tenorio et al., 2016)

Η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά από τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα που βρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα των σπερματοφόρων σωληναρίων και πολλαπλασιάζονται μιτωτικά. Μερικά από αυτά παραμένουν ως πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, διατηρώντας ένα σταθερό απόθεμα, ενώ άλλα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια. Στη ζώνη ανάπτυξης των σπερματοφόρων σωληναρίων τα διπλοειδή σπερματογόνια αρχίζουν τη μείωση κι έτσι κατά την πρόφαση I προκύπτουν τα σπερματοκύτταρα 1^{nc} τάξεως, τα οποία είναι επίσης διπλοειδή ($2n$). Με την ολοκλήρωση της μείωσης για κάθε σπερματοκύτταρο 1^{nc} τάξεως, στη ζώνη ωρίμανσης, προκύπτουν δύο σπερματοκύτταρα 2^{nc} τάξεως (n). Καθένα από αυτά εισέρχεται σε μια ακόμη διαδικασία μείωσης (μείωση II) και τελικά προκύπτουν δύο απλοειδείς σπερματίδες (n) από κάθε σπερματοκύτταρο 2^{nc} τάξεως (Ζίφα et al., 2008).

Ακολουθεί η διαδικασία της σπερμιογένεσης, δηλαδή η μετατροπή των σπερματίδων σε ώριμα σπερματοζωάρια που φέρουν όλα τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται ώστε να καταφέρουν να μετακινηθούν και να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Χαρακτηρίζεται κυρίως από κυτταροπλασματικές αλλαγές αλλά και αλλαγές στον πυρήνα (Tenorio et al., 2016). Συγκεκριμένα, η ουρά του κάθε σπερματιδίου αρχίζει να αυξάνεται ώστε να προκύψει το μαστίγιο-ουρά που φέρει στη βάση του πολλά μιτοχόνδρια, τα οποία παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια μετακίνησης του (Ζίφα et al., 2008). Ακόμη, ο πυρήνας τοποθετείται έκκεντρα και συμπυκνώνεται (Tenorio et al., 2016). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας παρατηρείται αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνας, μικρές πρωτεΐνες που προκαλούν υπερσυμπύκνωση και πλήρη παύση της μεταγραφής στον πυρήνα (Gilbert, 2000). Επίσης, δημιουργείται στο μπροστινό τμήμα το ακρόσωμα, ένα κυστίδιο με ένζυμα

και πρωτεΐνες που επιτρέπει στο σπερματοζωάριο να καταστρέψει τον προστατευτικό φάκελο του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση.



Εικόνα 1: Απεικόνιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης (Sharma R & Agarwal A, 2011).

Στη συνέχεια τα σπερματοζωάρια μένουν στα σπερματικά σωληνάκια με την κεφαλή τους καθηλωμένη στα κύτταρα Sertoli μέχρι να απελευθερωθούν στον αυλό των σωληναρίων και να φτάσουν στην επιδιδυμίδα, ένα σωλήνα που είναι εξαιρετικά περιελιγμένος και προκύπτει από τη συνένωση των σπερματοφόρων σωληναρίων. Εκεί, τα σπερματοζωάρια ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους και αποθηκεύονται. Τέλος, φτάνουν στον προστάτη, έναν σημαντικό αρσενικό αδέν, και εμπλουτίζονται με το προστατικό υγρό ώστε να σχηματιστεί το σπέρμα. Η προώθηση του σπέρματος γίνεται μέσω της σύσης και της εκσπερμάτωσης (Ζίφα et al., 2008).

Ακόμη, η σπερματογένεση είναι μια πολύ καλά ρυθμισμένη διαδικασία που εξαρτάται από την εξαιρετικά ακριβή αλλά και χρονικά συγκεκριμένη έκφραση πολλών διαφορετικών γονιδίων και τη δράση πρωτεϊνών (Mukherjee et al., 2014) καθώς ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων ξεκινά κατά την εμβρυϊκή ζωή και σταματά κατά τη γέννηση. Στη συνέχεια, η ολοκληρωμένη σπερματογένεση ξεκινά κατά την εφηβική ηλικία και συνεχίζεται μέχρι το θάνατο του ατόμου (Ζίφα et al., 2008).

Η διαδικασία παραγωγής σπέρματος μπορεί να διαρκέσει από 42 έως 76 μέρες και η ημερήσια παραγωγή σπέρματος σε έναν άντρα ποικίλλει από 150 μέχρι και 275 εκατομμύρια σπερματοζωαρίων (Tenorio et al., 2016).

1.3. Μειωτική απενεργοποίηση φυλετικών χρωμοσωμάτων – Meiotic Sex Chromosome Inactivation

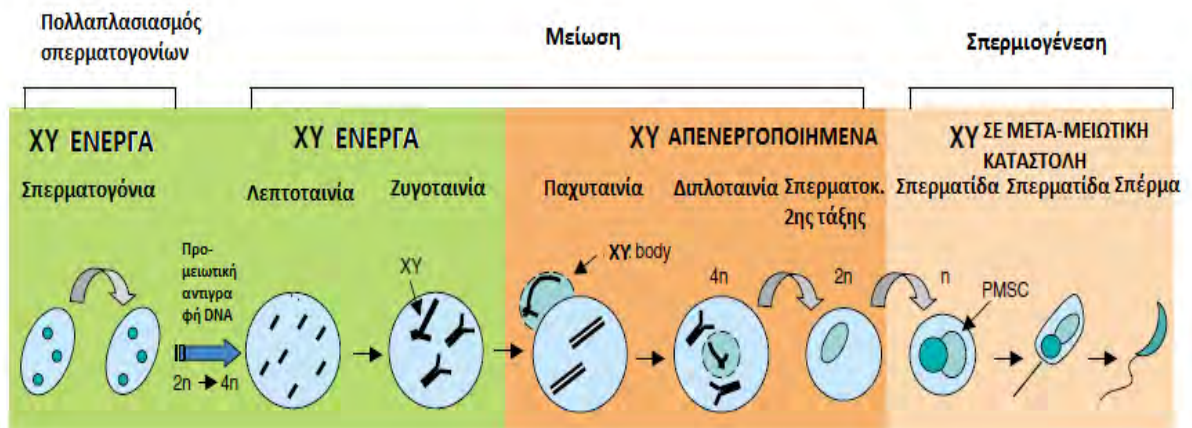
Είναι γνωστό ότι κατά την ανάπτυξη των θηλυκών στα θηλαστικά πραγματοποιείται μια διαδικασία γνωστή ως απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X προκειμένου να γίνει αντιστάθμιση της γονιδιακής δόσης. Στα αρσενικά όμως, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, πραγματοποιείται ένας άλλος τύπος απενεργοποίησης που καλείται μειωτική απενεργοποίηση φυλετικών χρωμοσωμάτων (Meiotic Sex Chromosome Inactivation –MSCI) και αφορά τη μεταγραφική σίγηση των χρωμοσωμάτων X και Y στο στάδιο της παχυταινίας (Turner, 2007).

Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε, η σπερματογένεση αποτελείται από τη μείωση I και τη μείωση II. Η μείωση I είναι πολύ πιο πολύπλοκη από τη μείωση II και περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά σημεία ελέγχου (Tenorio et al., 2016). Η μείωση I επίσης αποτελείται από τέσσερα στάδια: την πρόφαση I, τη μετάφαση I, την ανάφαση I και την τελόφαση I (Russell, 2006). Η πρόφαση I μπορεί επίσης να διακριθεί σε ενδιάμεσα στάδια: τη λεπτοταινία, τη ζυγοταινία, την παχυταινία, τη διπλοταινία και τη διακίνηση (Wichman et al., 2017, Russell, 2006). Στη ζυγοταινία τα ομόλογα χρωμοσώματα στοιχίζονται το ένα δίπλα στο άλλο και υπόκεινται σε σύναψη, σχηματίζεται δηλαδή μια πρωτεϊνική δομή που καλείται συναπτονημικό σύμπλοκο. Έπειτα στο στάδιο της παχυταινίας πραγματοποιούνται οι διασκελισμοί, δηλαδή ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων ανάμεσα σε ομόλογα χρωμοσώματα (Russell, 2006).

Όμως, τα φυλετικά χρωμοσώματα έχουν μικρό βαθμό ομολογίας κι έτσι στοιχίζονται μόνο στις ομόλογες ψευδοαυτοσωμικές περιοχές που βρίσκονται στα άκρα του χρωμοσώματος Y (Wichman et al., 2017). Επομένως, το μεγαλύτερο μέρος των φυλετικών χρωμοσωμάτων δεν βρίσκεται σε σύναψη κατά τη διάρκεια της παχυταινίας. Στη συνέχεια, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό απενεργοποίησης των φυλετικών χρωμοσωμάτων (MSCI) μετακινούνται στις θηλιές DNA που σχηματίζονται και προκαλούν τροποποιήσεις των ιστονών αλλάζοντας τη δομή της χρωματίνης. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται σίγηση των χρωμοσωμικών περιοχών που δεν βρίσκονται σε σύναψη κατά τη μείωση, στα πλαίσια ενός γενικότερου μηχανισμού σίγησης χρωμοσωμάτων που αδυνατούν να σχηματίσουν ομόλογο ζεύγος, πιθανόν προστατεύοντας την επόμενη γενιά από ανευπλοειδία. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας επίσης, τα φυλετικά χρωμοσώματα διαμερισματοποιούνται στην περιφέρεια του πυρήνα, στο XY σώμα (XY body). Η σίγηση διατηρείται μέσω τροποποιήσεων των ιστονών σε όλη τη διάρκεια της μείωσης.

Μετά το τέλος της μείωσης, δηλαδή στις σπερματίδες, τα φυλετικά χρωμοσώματα φαίνεται ότι βρίσκονται σε κατάσταση μετα-μειωτικής καταστολής (Post Meiotic Sex Chromatin) διατηρώντας μερικές από τις τροποποιήσεις των ιστονών που σχετίζονται με καταστολή της μεταγραφής. Παρόλα αυτά, μερικά από τα γονίδια του X ή Y χρωμοσώματος φαίνεται να μεταγράφονται κατά τη διάρκεια της σπερμιόγένεσης εξαιτίας του ιδιαίτερα σημαντικού

τους ρόλου στη διαδικασία. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι όμως ακόμη γνωστός (Turner, 2007).



Εικόνα 2: Απεικόνιση της μεταγραφικής δραστηριότητας των φυλετικών χρωμοσωμάτων στα διάφορα στάδια της μείωσης (Turner, 2007).

Το ιδιαίτερα ενδιαφέρον κατά τη μειωτική απενεργοποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι ότι ορισμένα mRNAs αλλά και lncRNAs, τα οποία μάλιστα εκφράζονται κυρίως στους όρχεις, καταφέρνουν να ‘ξεφύγουν’ από τη μεταγραφική σίγηση και μεταγράφονται κανονικά πιθανόν εξαιτίας του ρυθμιστικού τους ρόλου στη διαδικασία της σπερματογένεσης και της γονιμότητας γενικότερα. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για ορισμένα miRNAs που μεταγράφονται παρά τη σίγηση (Wichman et al., 2017).

1.4. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Η εμφάνιση υπογονιμότητας σε ένα ζευγάρι απαιτεί την περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγηση της κατάστασης προκειμένου να γίνει διάγνωση (Katz et al., 2017). Στόχος είναι να γίνει ανίχνευση διαφόρων ανωμαλιών που μπορούν πιθανόν να θεραπευτούν, να εντοπιστούν πιθανοί παράγοντες που σχετίζονται με την υπογονιμότητα και ίσως θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του ατόμου και τέλος να ανιχνευτούν γενετικές διαταραχές που μπορούν να μεταβιβαστούν στους απογόνους σε περίπτωση υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Schlegel, 2009).

Η διάγνωση και εκτίμηση των παραγόντων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα βασίζεται στα εξής (Katz et al., 2017):

- Λήψη λεπτομερούς ιστορικού. Αφορά την απόκτηση πληροφοριών που σχετίζονται με τη σεξουαλική ζωή του ατόμου, ασθένειες και χειρουργικές επεμβάσεις, έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης διαφόρων ασθενειών.
- Κλινική εξέταση. Περιλαμβάνει γενικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη φυσιολογία του ατόμου αλλά και παρατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου ώστε να εντοπιστούν διάφορες πιθανές ανωμαλίες.

- Ορμονικές εξετάσεις. Η βασική εξέταση που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει τη μέτρηση των επιπέδων FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη) η οποία διεγείρει τη σπερματογένεση δρώντας στα κύτταρα Sertoli και τη μέτρηση της τεστοστερόνης που αποτελεί το κυριότερο ανδρογόνο.
- Ανάλυση σπέρματος. Αποτελεί το σημαντικότερο στάδιο της διαδικασίας και περιλαμβάνει τη μέτρηση διαφόρων παραγόντων που αφορούν τόσο τα σπερματοζωάρια όσο και το σπερματικό υγρό προκειμένου να γίνει εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος (Roongothai et al., 2009). Προκειμένου να γίνει πιο εύκολα η διάγνωση ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει ορίσει μια σειρά από κατώτερες τιμές αναφοράς για τις διάφορες παραμέτρους που μετρώνται (Katz et al., 2017).

Πίνακας 1: Παράγοντες που μετρώνται στην ανάλυση σπέρματος και κατώτερες τιμές αναφοράς σύμφωνα με τον WHO (Katz et al., 2017).

Παράγοντες	Κατώτερες τιμές αναφοράς
Όγκος	≥1.5 mL
pH	≥7.2
Συγκέντρωση σπέρματος	≥15 εκατομ./mL
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥39 εκατομμύρια
Συνολική κινητικότητα	≥40%
Προοδευτική κινητικότητα	≥32%
Βιωσιμότητα	≥58%
Φυσιολογική μορφολογία	≥4%
Λευκοκύτταρα	<1.0 x 10 ⁶ /mL

1.5. Ταξινόμηση ανδρικής υπογονιμότητας

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης σπέρματος, αν επηρεάζεται δηλαδή ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, η ποιότητα του σπέρματος (κινητικότητα και μορφολογία) ή και τα δύο (Roongothai et al., 2009) μπορεί να γίνει ταξινόμηση της κάθε περίπτωσης ανδρικής υπογονιμότητας σε μία από τις εξής κατηγορίες (Colaco & Modi, 2018):

- Αζωοσπερμία: Χαρακτηρίζεται ως η απουσία σπερματοζωαρίων από το σπέρμα και διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες. Η αποφρακτική αζωοσπερμία (obstructive azoospermia - OA) οφείλεται σε διάφορα προβλήματα που αφορούν τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων και του σπέρματος ενώ η μη αποφρακτική οφείλεται σε

κάποιο πρόβλημα κατά την παραγωγή των σπερματοζωαρίων (non obstructive azoospermia – NOA). Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία συναντάται πιο συχνά από την αποφρακτική.

- Ολιγοζωοσπερμία: Παρατηρούνται λιγότερα από $15-20 \times 10^6$ σπερματοζωάρια στο σπέρμα.
- Σοβαρή ολιγοζωοσπερμία: Παρατηρούνται λιγότερα από 5×10^6 σπερματοζωάρια στο σπέρμα.
- Ασθενοζωοσπερμία: Παρατηρείται χαμηλή κινητικότητα σε λιγότερο από το 50% των σπερματοζωαρίων.
- Τερατοζωοσπερμία: Παρατηρείται ότι λιγότερο από 30% των σπερματοζωαρίων έχουν φυσιολογική μορφολογία.
- Ασπερμία: Είναι η απουσία σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση.
- Νορμοζωοσπερμία: Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων στο σπέρμα.

1.6. Μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας και προβλήματα

Η ανδρική υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται από ένα πρότυπο πολυπαραγοντικής ή σύνθετης κληρονομίας (Krausz et al., 2015). Είναι το αποτέλεσμα δηλαδή, πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων (Thompson & Thompson, 2011).

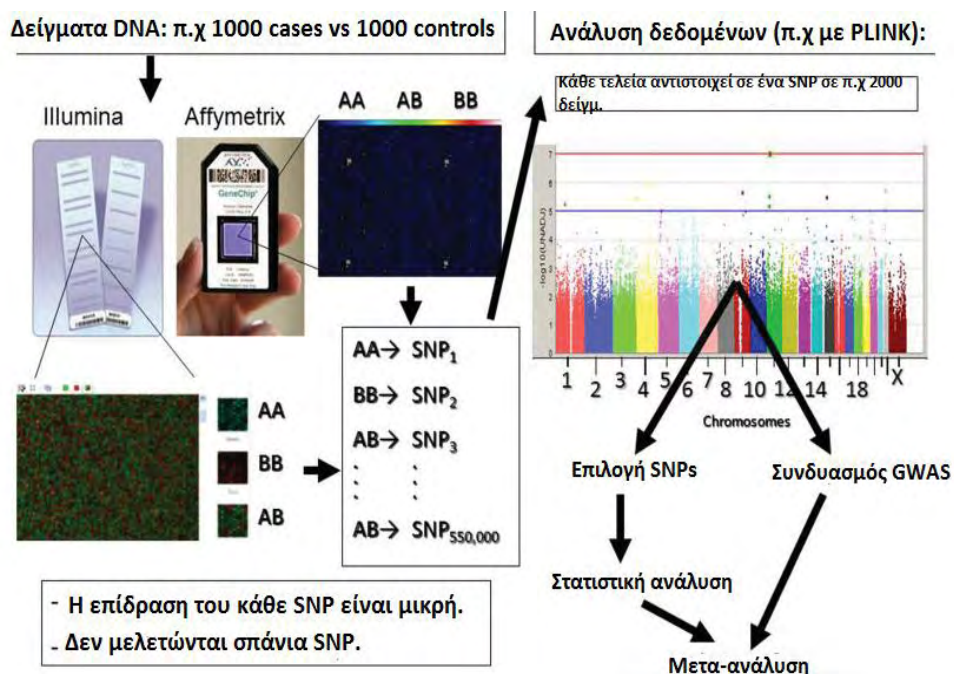
Συγκεκριμένα, ο αριθμός των γονιδίων που συνεισφέρουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου φαίνεται να είναι αρκετά μεγάλος καθώς η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη συντονισμένη δράση χιλιάδων γονιδίων (Hotelling, 2013). Ακόμη, μια σειρά από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και παραμέτρους που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος. Τέτοιοι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης υπογονιμότητας είναι το κάπνισμα, το αλκοόλ, η κατανάλωση καφεΐνης αλλά και η παχυσαρκία (Durairajanayagam, 2017). Η ηλικία του πατέρα επίσης αλλά και η έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες είναι σημαντικοί παράγοντες (Leaver, 2016). Τέλος, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι άνδρες με ανδρική υπογονιμότητα εμφανίζουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις (O'Flynn O' Brien et al., 2010).

Επομένως, γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας αποτελεί μια πρόκληση. Παρόλο που έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην αποσαφήνιση των μηχανισμών της σπερματογένεσης χρησιμοποιώντας knock out ζωικά μοντέλα, πολλές φορές παράγοντες που συσχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα σε ποντίκια δεν οδηγούν σε παρόμοιο φαινότυπο στον άνθρωπο (Miyamoto et al., 2016). Ακόμη, εφόσον δεν πρόκειται για μια κλασική μονογονιδιακή διαταραχή, που οφείλεται δηλαδή σε μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο, οι αναλύσεις σύνδεσης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν

για την ταυτοποίηση των υπεύθυνων γονιδίων που καθένα από αυτά δρα αθροιστικά στην εμφάνιση του φαινοτύπου (Uitterlinden, 2016).

Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη μελέτη πολυπαραγοντικών διαταραχών, όπως και η ανδρική υπογονιμότητα, αποτελούν οι αναλύσεις συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association studies – GWAS). Έχουν ήδη μάλιστα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη πολλών ασθενειών και τη διερεύνηση μονοπατιών που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες (Krausz et al., 2015).

Οι GWAS βασίζονται συνήθως στη συλλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων DNA από άτομα που φέρουν την ασθένεια ή τη διαταραχή αλλά και υγιή άτομα (case-control analysis). Στη συνέχεια, ακολουθεί γονοτύπηση για αρκετές χιλιάδες SNPs που καλύπτουν ολόκληρο το γονιδίωμα και το επόμενο στάδιο είναι ο έλεγχος ποιότητας (quality control) που περιλαμβάνει την αφαίρεση δειγμάτων αλλά και SNPs που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη συσχέτιση, ανάλογα με τα thresholds τα οποία τίθενται για τις συγκεκριμένες αναλύσεις. Τέλος, πραγματοποιείται ανάλυση (association analysis) των δεδομένων ώστε να εντοπιστούν πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την υπό μελέτη διαταραχή ή ασθένεια. Πρόκειται ουσιαστικά για εφαρμογή στατιστικών δοκιμών οι οποίες συγκρίνουν συχνότητες αλληλομόρφων στα cases και στα controls, αναδεικνύοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μόλις εντοπιστεί ένα τέτοιο SNP μπορεί να ακολουθήσει περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση ώστε να μελετηθεί η περιοχή στην οποία βρίσκεται το SNP καθώς και άλλα SNPs που βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με αυτό και ίσως συνεισφέρουν στο φαινότυπο. Ακόμη, μπορεί να ακολουθήσει μετα-ανάλυση όλων των δεδομένων. (Uitterlinden, 2016).



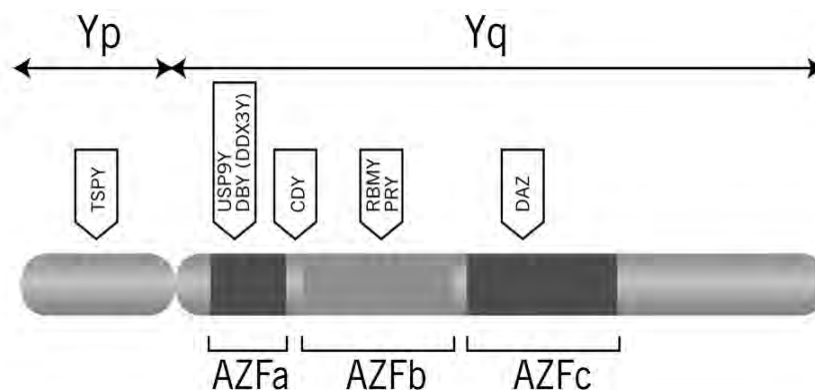
Εικόνα 3: Βασικές αρχές και στάδια GWAS. Απεικονίζονται οι πλατφόρμες αλληλούχισης αλλά και ένα Manhattan plot που βοηθά στην απεικόνιση και ανάλυση των αποτελεσμάτων (Uitterlinden, 2016).

1.7. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας

Παρά τις δυσκολίες στην έρευνα της ανδρικής υπογονιμότητας, διάφορες γενετικές ανωμαλίες έχουν συσχετιστεί με αυτή και υπολογίζεται ότι αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες συμβάλλοντας σε ποσοστό 15-30%.

Είναι ακόμη πολύ σημαντικό να γίνει διερεύνηση της γενετικής βάσης της ανδρικής υπογονιμότητας καθώς μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και η ενδοκυτταροπλασματική σπερματέγχυση (ICSI), επιτρέποντας πολλές φορές την κληρονομία μεταλλάξεων στους απογόνους. Επομένως, στόχος είναι η κάθε περίπτωση ανδρικής υπογονιμότητας να αντιμετωπίζεται ξεχωριστά με βάση τη γενετική βάση, ώστε να προτείνεται η καλύτερη λύση με τη μικρότερη δυνατή επίδραση στην επόμενη γενιά. Οι πιο συχνές γενετικές ανωμαλίες σε άνδρες με υπογονιμότητα είναι οι εξής (O'Flynn O' Brien et al., 2010):

- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Προκαλούνται από την απώλεια, το πλεόνασμα ή τη μη σωστή διάταξη ενός από τα 46 χρωμοσώματα. Διακρίνονται σε αριθμητικές και δομικές (Hotaling, 2013). Συναντώνται με συχνότητα 5% στους υπογόνιμους άνδρες και με συχνότητα 15% στους αζωοσπερμικούς άνδρες. Το σύνδρομο Klinefelter και οι μεταθέσεις κατά Robertson είναι οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε άνδρες με υπογονιμότητα (O'Flynn O' Brien et al., 2010).
- Χρωμόσωμα Y. Το χρωμόσωμα Y περιέχει την πλειοψηφία των γονιδίων που είναι σημαντικά για τις διαδικασίες της σπερματογένεσης και του καθορισμού του αρσενικού φύλου. Μικροελλείμματα του χρωμοσώματος Y συχνά παρατηρούνται σε αζωοσπερμικούς αλλά και ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες. Τα πιο συχνά μικροελλείμματα παρατηρούνται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Yq και συγκεκριμένα στην περιοχή AZF (azoospermia factor region), η οποία διακρίνεται σε τρεις υποπεριοχές: AZFa, AZFb, AZFc. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές περιέχει γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Ένα ακόμη γονίδιο που εμπλέκεται στη σπερματογένεση είναι το *CDY*, εδράζεται στο βραχίονα Yq και ανάμεσα στις περιοχές AZFa και AZFb, αλλά και το *TSPY* που εδράζεται στο βραχίονα Yp.



Εικόνα 4: Γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας στο χρωμόσωμα Y (O'Flynn O' Brien et al., 2010).

- Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί σε αυτοσωμικά γονίδια. Πολλά αυτοσωμικά γονίδια μελετώνται για τον πιθανό τους ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το γονίδιο *CFTR*, στο χρωμόσωμα 7, φέρει μεταλλάξεις στο 60-90% των ατόμων με αζωοσπερμία. Ακόμη, το γονίδιο *SHBG* (sex-hormone binding globulin) έχει μελετηθεί για τον πιθανό του ρόλο στη σπερματογένεση καθώς συμμετέχει στη μεταφορά ορμονών που καθορίζουν το φύλο σε διάφορους ιστούς-στόχους και στη ρύθμιση της συγκέντρωσης ανδρογόνων στους όρχεις. Άλλα γονίδια που ίσως εμπλέκονται είναι τα γονίδια υποδοχέων οιστρογόνων *ESR1*, *ESR2* και το γονίδιο του υποδοχέα FSH, *FSHR*.
- Γονίδια του χρωμοσώματος Χ. Πολλά γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμα Χ εκφράζονται στους όρχεις και ίσως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση. Ένα από τα πιο σημαντικά είναι το γονίδιο του υποδοχέα ανδρογόνων, *AR*. Συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι περίπου 2% των ανδρών με πρόβλημα υπογονιμότητας φέρουν κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο ενώ οι υγιείς άνδρες δεν φέρουν καμία. Στο γονίδιο μάλιστα έχουν μελετηθεί δυο διαφορετικοί πολυμορφισμοί. Τέλος, ένα ακόμη γονίδιο με πιθανό ρόλο είναι το *USP26* που εκφράζεται στους όρχεις κατά τα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης (O'Flynn O' Brien et al., 2010).

Μη κωδικοποιητικά RNAs (Non-coding RNAs)

2.1. Γενικές πληροφορίες και κατηγορίες non-coding RNAs

Μέχρι αρκετά πρόσφατα, θεωρούνταν ότι οι αλληλουχίες του γονιδιώματος που δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες αποτελούν το λεγόμενο 'junk DNA'. Ως 'junk DNA' χαρακτηρίζονται εξελικτικά περιοχές του γονιδιώματος χωρίς κάποια λειτουργικότητα, των οποίων η απώλεια ή η απόκτηση δεν επηρεάζει την αρμοστικότητα των οργανισμών (Niu & Jiang, 2013). Με την αλληλούχηση όμως του ανθρώπινου γονιδιώματος αποκαλύφθηκε ότι το ποσοστό που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες είναι μόλις 1-2%. Ακόμη, με το πέρασμα του χρόνου ανακαλύφθηκε ότι περιοχές του γονιδιώματος που χαρακτηρίζονταν ως junk DNA εμφάνιζαν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά συντήρησης μεταξύ των οργανισμών. Καθώς λοιπόν άρχισε να διερευνάται ο ρόλος αυτός των αλληλουχιών, προέκυψε τελικά ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος μεταγράφεται και έτσι προκύπτουν τα μη κωδικοποιητικά RNAs.

Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στη διάκριση των μορίων RNA σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία κατατάχθηκαν τα μέχρι τότε γνωστά μόρια RNA που έχουν την ικανότητα να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες, τα mRNAs, ενώ στη δεύτερη κατηγορία κατατάχθηκαν τα μόρια RNA που δεν έχουν την ικανότητα να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες και ονομάστηκαν non-coding RNAs. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα non-coding RNAs διακρίνονται με τη σειρά τους σε δυο υποκατηγορίες με βάση το μέγεθός τους: στην πρώτη συναντώνται αυτά με μέγεθος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια που χαρακτηρίζονται ως small non-coding RNAs και στη δεύτερη εκείνα με μέγεθος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια που χαρακτηρίζονται ως long non-coding RNAs (Beermann et al., 2016). Στην κατηγορία των μικρών μορίων RNA ανήκουν τα ενδογενή μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (endo-siRNAs) και τα PIWI-interacting RNAs (piRNAs). Η πιο γνωστή βέβαια κατηγορία είναι τα miRNAs (Yang et al., 2016).

Όσον αφορά το ρόλο των non-coding RNAs, ο αριθμός των non-coding RNAs συσχετίστηκε αρκετά νωρίς με την πολυπλοκότητα των οργανισμών. Παρατηρήθηκε δηλαδή ότι μεγάλος αριθμός ncRNAs τείνει να συναντάται σε οργανισμούς με αυξημένη πολυπλοκότητα και πολλά επίπεδα οργάνωσης (Beermann et al., 2016). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του *C. elegans* ο οποίος έχει ίδιο περίπου αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με τον άνθρωπο παρόλο που τα επίπεδα πολυπλοκότητάς τους είναι εξαιρετικά διαφορετικά. Αυτό που βρέθηκε ότι διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο οργανισμών είναι ο αριθμός των μορίων ncRNAs. Επομένως, το 'κλειδί' που εξηγεί την πολυπλοκότητα των οργανισμών φαίνεται ότι βρίσκεται στα non-coding RNAs.

Τελικά, ο ρόλος των ncRNAs στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επιβεβαιώθηκε. Συγκεκριμένα, τα ncRNAs εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε διαδικασία στο εσωτερικό του κυττάρου και μεταξύ των σημαντικότερων βιολογικών διαδικασιών που ρυθμίζονται από ncRNAs είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και οι επιγενετικές τροποποιήσεις (Yang et al., 2016).

Η εκτενέστερα μελετημένη κατηγορία non-coding RNAs είναι τα miRNAs για τα οποία υπάρχει πλέον πληθώρα πληροφοριών. Όσον αφορά την έρευνα για τα lncRNAs είναι ακόμη περιορισμένη καθώς φαίνεται ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε πολλά επίπεδα και μέσω πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών. Ακόμη, παρόλο που lncRNAs συναντώνται σε πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς, όπως φυτά, ζώα, προκαρυώτες και ιούς, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τους σπάνια εμφανίζουν συντήρηση μεταξύ των ειδών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η μελέτη τους με τη χρήση οργανισμών-μοντέλων να περιορίζεται σε σημαντικό βαθμό.

Επομένως, παρά τους περιορισμούς στη μελέτη συγκεκριμένων κατηγοριών ncRNAs, φαίνεται ότι εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε πιθανή κυτταρική διαδικασία. Αυτός είναι και ο λόγος που αλλαγές στην έκφρασή τους, συχνά διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και οδηγούν στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων (Beer mann et al., 2016).

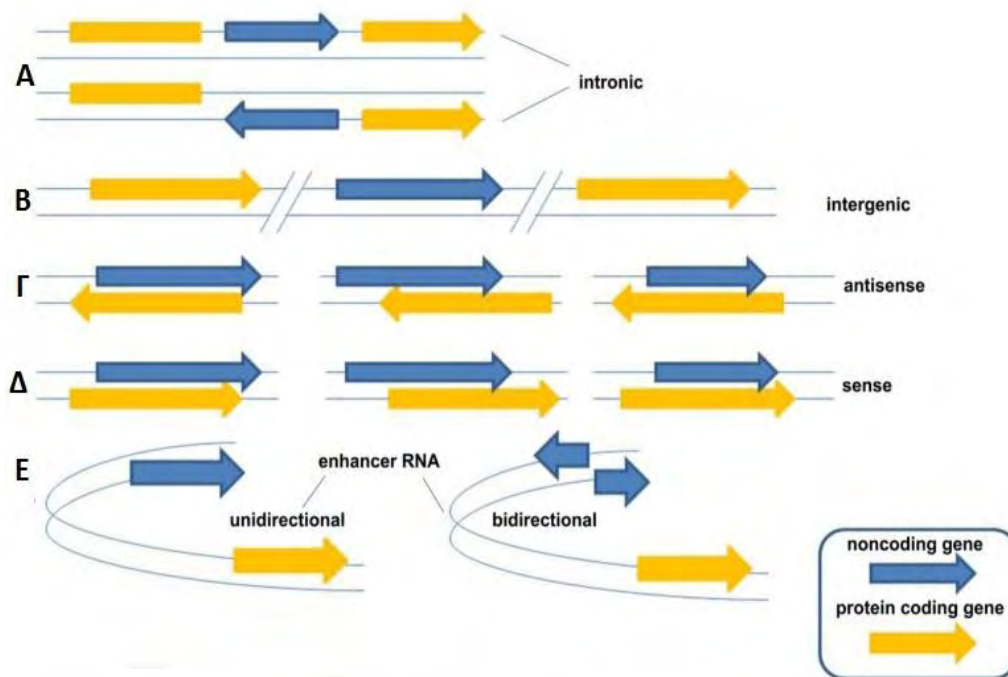
2.2. Long non-coding RNAs

Τα long non-coding RNAs αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα non-coding RNAs αλλά ταυτόχρονα και την πιο ετερογενή. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των καταχωρήσεων σε σχετική με αυτά βάση δεδομένων αγγίζει τα 118.770 lncRNAs. Ο γενικά αποδεκτός ορισμός είναι ότι πρόκειται για μόρια RNAs με μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια τα οποία δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Αρκετοί βέβαια θεωρούν ότι ο συγκεκριμένος ορισμός χαρακτηρίζεται από αρκετή ασάφεια καθώς μόρια long non-coding RNAs φτάνουν μέχρι και τις 90 kb ενώ επίσης έχει ανακαλυφθεί ότι πολλά από αυτά τα μετάγραφα έχουν την ικανότητα να συνδέονται με το ριβόσωμα και να παράγουν μικρά πεπτιδία. Παρόλα αυτά, η ικανότητα κωδικοποίησης αυτών των μικρών πεπτιδίων δεν αναιρεί ταυτόχρονα το λειτουργικό ρόλο των lncRNAs (Beer mann et al., 2016).

Εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειάς τους αλλά και των πολλών διαφορετικών κυτταρικών λειτουργιών, η ταξινόμησή τους είναι αρκετά δύσκολη. Το ευρέως αποδεκτό σύστημα ταξινόμησής τους βασίζεται στη θέση των περιοχών από τις οποίες μεταγράφονται πάνω στο γονιδίωμα, καθώς και στη χωρική σχέση τους με γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Προκύπτουν επομένως οι εξής κατηγορίες lncRNAs (Wu & Du, 2017):

- Sense lncRNAs: Επικαλύπτονται με ένα ή περισσότερα εξόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.
- Antisense lncRNAs: Εμφανίζουν μερική ή πλήρη συμπληρωματικότητα με μετάγραφα του αντίθετου κλώνου.
- Ιντρονικά (intronic) lncRNAs: Προκύπτουν από το ιντρόνιο ενός γονιδίου.
- Intergenic lncRNAs (lincRNAs): Προκύπτουν από περιοχές του γονιδιώματος που βρίσκονται ανάμεσα σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και μεταγράφονται ανεξάρτητα.

- Enhancer RNAs (eRNAs): Προκύπτουν από περιοχές ενισχυτών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Ανάλογα με την κατεύθυνσή τους διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες (unidirectional, bidirectional).
- CircRNAs (Circular non-protein coding RNAs): Προκύπτουν από γεγονότα κοπής των pre-mRNAs και σχηματίζουν κλειστούς συνεχόμενους βρόχους.



Εικόνα 5: Κατηγορίες ταξινόμησης lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα. Με μπλε βέλη απεικονίζονται οι μη κωδικοποιητικές περιοχές από τις οποίες προκύπτουν τα lncRNAs και με κίτρινα βέλη απεικονίζονται τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Wu & Du, 2017).

2.2.1. Βιογένεση lncRNAs

Η βιογένεση των lncRNAs είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται στον πυρήνα και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τη σύνθεση των μεταγράφων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των lncRNAs μεταγράφεται από την πολυμεράση II (Pol II) ενώ μερικά lncRNAs είναι πιθανόν να μεταγράφονται από την πολυμεράση III (Pol III). Η έκφρασή τους ρυθμίζεται αυστηρά με την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές τους και παρόλο που τα επίπεδα έκφρασής τους είναι αρκετά χαμηλά, εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση έκφρασης ως προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Beermann et al., 2016).

Τα lncRNAs μπορούν επίσης να υποστούν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις όπως πολυαδενυλίωση, προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο και RNA editing, αλλαγές δηλαδή σε νουκλεοτίδια του μορίου RNA (Yoon et al., 2014). Επίσης, τα περισσότερα διαθέτουν θέσεις ματίσματος που οδηγούν στη δημιουργία τουλάχιστον δύο διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων.

Τέλος, μετά την επεξεργασία τους, ορισμένα lncRNAs εγκαταλείπουν τον πυρήνα και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα όπου παίρνουν την τελική διαμόρφωσή τους στο χώρο σχηματίζοντας θερμοδυναμικά σταθερές δομές. Συγκεκριμένα, η πρωτοταγής δομή αφορά τη δημιουργία ζευγών βάσεων με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Σε αυτό το στάδιο μπορούν να σχηματιστούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ lncRNAs και άλλων μορίων RNA ή DNA. Έπειτα, η δευτεροταγής δομή αφορά την αναδίπλωση στο χώρο και το σχηματισμό δομής έλικας, φουρκέτας κ.α. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς σε πολλές περιπτώσεις αυτό που καθορίζει τη λειτουργία των lncRNAs είναι η δομή και όχι η αλληλουχία τους (Beer mann et al., 2016).

2.2.2. Λειτουργία-ρόλος lncRNAs

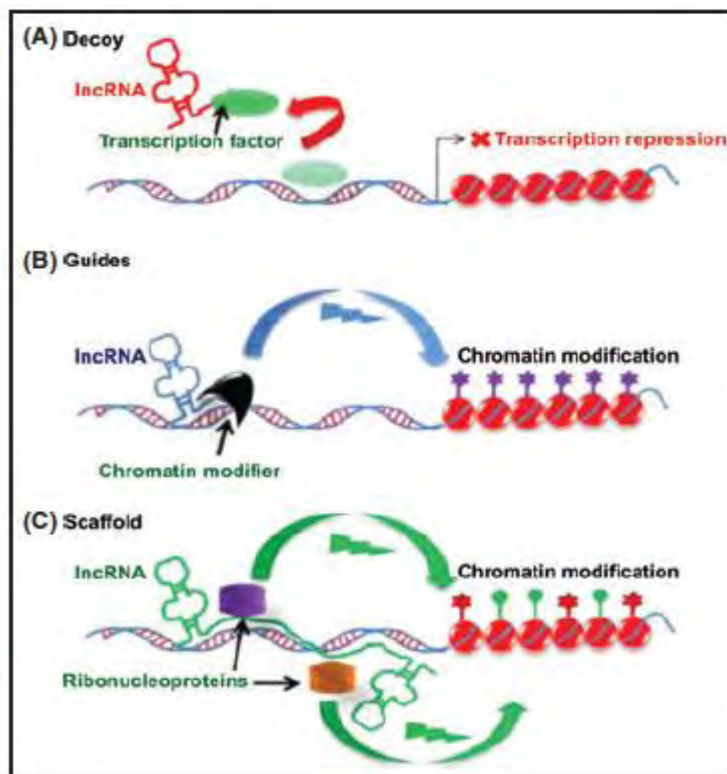
Τα lncRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών. Δρουν σε επίπεδο μεταγραφής, μετα-μεταγραφής, μετάφρασης αλλά και σε μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης. Έτσι, επιδρούν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Zhou et al., 2019).

Συγκεκριμένα, σε επίπεδο μεταγραφής, δρουν *in cis* μέσω της πρόσδεσής τους σε υποκινητές γονιδίων και εμποδίζοντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε αυτούς. Ακόμη, μπορούν να δράσουν *in trans* μέσω της πρόσδεσής τους με μεταγραφικούς παράγοντες εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους με τους υποκινητές των γονιδίων (Mukherjee et al., 2014). Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, επηρεάζουν την επεξεργασία των RNAs, όπως είναι η διαδικασία ματίσματος, η κυτταροπλασματική μεταφορά, η σταθερότητα και η αποικοδόμηση των μορίων mRNAs και τέλος η μετάφρασή τους (Beer mann et al., 2016). Όσον αφορά τους μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης, τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και εμποδίζουν τη DNA μεθυλίωση των περιοχών τις οποίες στοχεύουν (Zhou et al., 2019).

Γενικά, με βάση τον τρόπο δράσης τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τα lncRNAs μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες (Mukherjee et al., 2014):

- 1) 'Decoys' lncRNAs: Τα συγκεκριμένα lncRNAs ασκούν τη δράση τους εμποδίζοντας διάφορες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και μεταγραφικοί παράγοντες, να προσδεθούν στο DNA. Συγκεκριμένα, προσδέονται με αυτές τις πρωτεΐνες κι έτσι τις εμποδίζουν να φτάσουν στο στόχο τους και να προκαλέσουν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση.
- 2) 'Guides' lncRNAs: Αυτός ο τύπος lncRNAs προσδέεται σε πρωτεΐνες και τις κατευθύνει σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος ώστε να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση. Οι περιοχές αυτές μπορεί να είναι κοντινά γονίδια (*cis* ρύθμιση) ή ιδιαίτερα απομακρυσμένα γονίδια (*trans* ρύθμιση). Ακόμη, οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι μεταγραφικοί παράγοντες και να καταστείλουν ή να προάγουν τη γονιδιακή έκφραση. Οι πρωτεΐνες επίσης, ίσως προκαλούν διάφορες αλλαγές στη χρωματίνη.
- 3) 'Scaffold' lncRNAs: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν lncRNAs που μπορούν να προσελκύσουν δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες και να σχηματίσουν ένα

πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο πιθανόν να μπορεί να προκαλέσει αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ή τροποποιήσεις ιστονών.



Εικόνα 6: Αναπαράσταση του τρόπου δράσης των lncRNAs κατά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Mukherjee et al., 2014).

Τέλος, τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με miRNAs και συχνά αποτελούν πρόδρομα μόρια για small non-coding RNAs. Επίσης, εξαιτίας των ομοιοτήτων τους με τα mRNAs, αποτελούν στόχους για άλλα small non-coding RNAs και πολλές φορές ρυθμίζονται από αυτά (Zhou et al., 2019).

2.3. miRNAs

Τα miRNAs αποτελούν την πιο καλά μελετημένη κλάση μη κωδικοποιητικών RNAs και είναι μόρια μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων. Εκφράζονται ενδογενώς και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Beer mann et al., 2016). Τα πρώτα miRNAs που ανακαλύφθηκαν ήταν τα lin-4 και let-7 τα οποία συμμετείχαν στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων υπεύθυνων για αναπτυξιακές διαδικασίες στον *C.elegans* (Skourti et al., 2013). Από τότε, πλήθος μορίων miRNAs ανακαλύφθηκε σε πάρα πολλούς οργανισμούς, όπως τα φυτά, τα έντομα και τα θηλαστικά. Τα υψηλά ποσοστά συντήρησης μεταξύ των ειδών αποτέλεσαν το 'κλειδί' για την ανακάλυψη των λειτουργιών τους και το ρόλο τους σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Beer mann et al., 2016).

2.3.1. Βιογένεση miRNAs

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNAs βρίσκονται διασκορπισμένα σε όλο το γονιδίωμα και συχνά επικαλύπτονται με περιοχές γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Beer mann et al., 2016). Η πλειοψηφία τους βρίσκεται σε ιντρόνια τέτοιων γονιδίων και πιο σπάνια σε εξώνια (Skourti et al., 2013). Επίσης, miRNAs μπορούν να προκύψουν από αυτόνομες μεταγραφικές μονάδες. Η βιογένεσή τους περιλαμβάνει μια σειρά διαφορετικών βημάτων όπως μεταγραφή, ωρίμανση στον πυρήνα, εξαγωγή και κυτταροπλασματική επεξεργασία προτού αποτελέσουν λειτουργικά μόρια.

Τα περισσότερα miRNAs μεταγράφονται από την RNA Πολυμεράση II ενώ ελάχιστα μεταγράφονται και από την RNA Πολυμεράση III. Έτσι, προκύπτουν τα pri-miRNAs που διαθέτουν 5' καλύπτρα και 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά και σχηματίζουν μια δομή φουρκέτας με την αλληλουχία του ώριμου miRNA να βρίσκεται στο βρόχο. Στη συνέχεια, ένα πυρηνικό σύμπλοκο που αποτελείται από την πρωτεΐνη DGCR8, αναγνωρίζει το pri-miRNA και κατευθύνει την πέψη του από την RNAάση-ενδονουκλεάση Drosha. Έτσι προκύπτει το pre-miRNA με δομή φουρκέτας που αποτελείται περίπου από 60 νουκλεοτιδία και μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, η RNAάση-ενδονουκλεάση Dicer πραγματοποιεί πέψη και τελικά προκύπτουν δίκλινα μόρια RNA, περίπου 22 νουκλεοτιδίων, που συνδέονται με πρωτεΐνες Αργοναύτες και σχηματίζουν τα σύμπλοκα miRISC. Ο κλώνος που αποτελεί το ώριμο miRNA παραμένει στο σύμπλοκο ενώ ο άλλος αποικοδομείται.

Εκτός από το συγκεκριμένο μονοπάτι βιογένεσης, miRNAs μπορούν να προκύψουν και από άλλα μονοπάτια (Beer mann et al., 2016).

2.3.2. Λειτουργία-ρόλος miRNAs

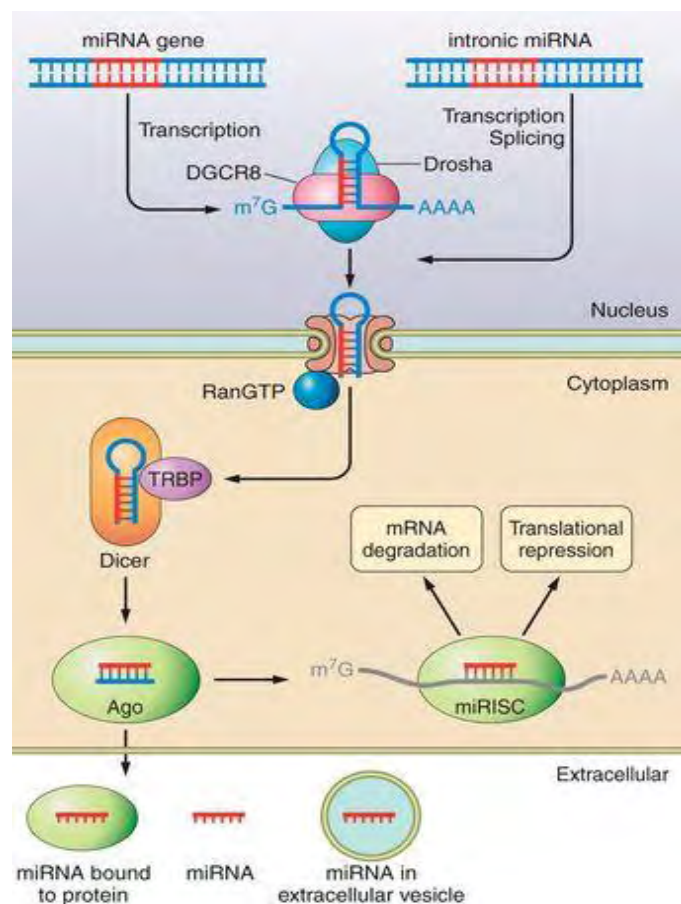
Τα miRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κυρίως μέσω δύο μηχανισμών: αποικοδόμηση του mRNA και καταστολή της μετάφρασης.

Το βασικό στοιχείο της λειτουργίας τους είναι ότι έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο mRNA-στόχο εξαιτίας της αναγνώρισης που προκύπτει από τη συμπληρωματικότητα των νουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, απαιτείται συμπληρωματικότητα μεταξύ του miRNA και της 3' UTR του mRNA-στόχου. Ακόμη, η στόχευση δεν εξαρτάται μόνο από την αλληλεπίδραση miRNA-mRNA αλλά και από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου miRISC. Ουσιαστικά, τα miRNAs ενεργοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο και το καθοδηγούν στο στόχο. Στη συνέχεια, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ στόχου, miRNA και RISC οδηγούν σε καταστολή του γονιδίου-στόχου είτε μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασης είτε μέσω αποικοδόμησης του mRNA.

Συγκεκριμένα, η αναστολή της μετάφρασης ρυθμίζεται από πρωτεΐνες Αργοναύτες που συναγωνίζονται με παράγοντες που κατευθύνουν τις ριβοσωμικές υπομονάδες ή προκαλούν αποδιοργάνωση του εξοπλισμού που απαιτείται για τη μετάφραση. Η αποικοδόμηση των mRNAs μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αποαδενυλίωσης του 3' άκρου ή αφαίρεση της καλύπτρας στο 5' άκρο. Έτσι, μειώνεται η σταθερότητα του mRNA

και έλκονται παράγοντες με ενδονουκλεολυτική και εξωνουκλεολυτική δράση που οδηγούν στην αποικοδόμησή του.

Τέλος, τα miRNAs μπορούν να κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά είτε συνδεδεμένα με διάφορες πρωτεΐνες είτε έγκλειστα σε μικροσωμάτια (Beermann et al., 2016).



Εικόνα 7: Απεικόνιση της διαδικασίας βιογένεσης και των λειτουργιών των miRNAs (Beermann et al., 2016).

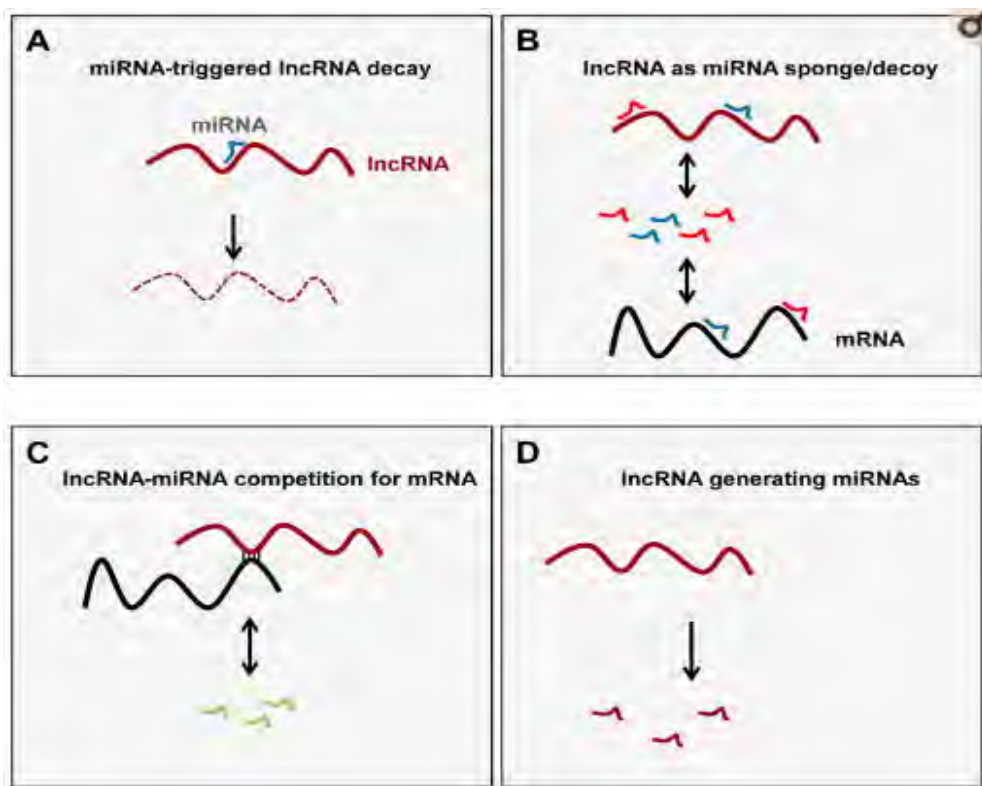
2.4. Αλληλεπιδράσεις lncRNAs-miRNAs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα lncRNAs έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια RNA και DNA. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες είναι οι αλληλεπιδράσεις τους με τα miRNAs με τα οποία εμπλέκονται με διάφορους τρόπους στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων.

Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται πιο συχνά είναι οι εξής:

- 1) Αποικοδόμηση lncRNAs μέσω στόχευσης από miRNAs. Τα lncRNAs παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα mRNAs επομένως συχνά στοχεύονται από small non-coding RNAs. Η πρόσδεση lncRNAs-miRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση των πρώτων με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων τους. Αλλαγές στα επίπεδα των lncRNAs συχνά σχετίζονται με τροποποίηση της κυτταρικής απόκρισης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

- 2) lncRNAs που προσελκύουν miRNAs ('sponge/decoys'). Πρόκειται για lncRNAs που ρυθμίζουν τα επίπεδα και τη λειτουργία των miRNAs καθώς έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ως 'σφουγγάρια' που τα προσελκύουν και τα απομακρύνουν από τους mRNA-στόχους τους. Με αυτό τον τρόπο επηρεάζονται τα επίπεδα των miRNAs τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα.
- 3) Ανταγωνισμός lncRNAs-miRNAs για πρόσδεση στον ίδιο στόχο. Αρκετά συχνά, τα lncRNAs και τα miRNAs έχουν το ίδιο mRNA ως στόχο και ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση σε αυτό.
- 4) Βιογένεση miRNAs από lncRNAs. Ορισμένα μόρια lncRNAs έχουν τη δυνατότητα να δώσουν γένεση σε μόρια miRNAs, οδηγώντας συχνά μάλιστα στην παραγωγή δύο ή και περισσότερων miRNAs από ένα και μόνο lncRNA (Yoon et al., 2014).



Εικόνα 8: Απεικόνιση των τρόπων αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNAs-lncRNAs (Yoon et al., 2014).

2.5. Ρόλος των non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η σπερματογένεση είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία που απαιτεί εξειδικευμένη έκφραση γονιδίων σε κάθε στάδιο. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης παίζουν τα non-coding RNAs (Mukherjee et al., 2014). Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές κατηγορίες non-coding RNAs εκφράζονται στους γαμέτες και είναι απαραίτητα για τη διαδικασία της σπερματογένεσης (Gou et al., 2014).

Οι πρώτες ενδείξεις για το ρόλο των non-coding RNAs στην ανδρική υπογονιμότητα εμφανίστηκαν όταν τρεις διαφορετικές μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι απενεργοποίηση της Dicer (knock-out), η οποία απαιτείται για τη βιογένεση των miRNAs, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινοτύπου υπογονιμότητας. Στη συνέχεια, αποδείχτηκε ότι η λειτουργικότητα της Dicer είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των σπερματιδίων και τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων Sertoli (Mukherjee et al., 2014).

Ακολούθησαν πολλές μελέτες που αποκάλυψαν το ρόλο των miRNAs σε διάφορα στάδια της σπερματογένεσης. Αρχικά, έχει αποδειχθεί ότι μια ομάδα μορίων miRNAs απαιτούνται για τη διατήρηση των σπερματογονίων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, όπως το miR-21 και το miR-34c. Επίσης, η διαφοροποίηση των σπερματογονίων φαίνεται επίσης να ρυθμίζεται από άλλα miRNAs. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένα miRNAs υποεκφράζονται κατά την επαγόμενη από ρετινοϊκό οξύ διαφοροποίηση των σπερματογονίων. Ως αποτέλεσμα, οι στόχοι των miRNAs, δηλαδή τα mRNAs των Bim, Kit, Soc3, Stat3 ρυθμίζονται θετικά και επιδρούν στη διαδικασία διαφοροποίησης των σπερματογονίων. Τα συγκεκριμένα miRNAs επομένως, φαίνεται ότι τροποποιούν τα επίπεδά τους ρυθμίζοντας τη διαδικασία διαφοροποίησης των σπερματογονίων. Άλλα miRNAs ακόμη, εμπλέκονται στην απόπτωση των γαμετικών κυττάρων στοχεύοντας διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Τέλος, τα miRNAs εμπλέκονται στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων στην ανάπτυξη των σπερματιδίων.

Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι απορρυθμισμό της έκφρασης miRNA σχετίζεται με προβλήματα υπογονιμότητας. Χαρακτηριστικά, συγκρίσεις του προφίλ των miRNAs των όρχεων ανάμεσα σε υγιή και άτομα με προβλήματα υπογονιμότητας οδήγησε στον εντοπισμό μεγάλου αριθμού miRNAs που απορρυθμίζονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ασθενοζωοσπερμία και η αποφρακτική αζωοσπερμία. Ακόμη, μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) έχουν βρεθεί στις θέσεις πρόσδεσης των miRNAs σε γονίδια που παίζουν ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της έκφρασης αυτών των γονιδίων και τελικά την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ανδρικής υπογονιμότητας (Gou et al., 2014).

Μια ακόμη κατηγορία μορίων non-coding RNAs που εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης είναι τα piRNAs. Τα piRNAs σχηματίζουν σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα με PIWI πρωτεΐνες και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω επιγενετικών μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση του DNA, ή καταστέλλοντας τη μετάφραση μεταγράφων με τη βοήθεια ενός παράγοντα, του EIF (eukaryotic initiation factor).

Είναι γνωστό ότι η ακεραιότητα του γονιδιώματος κινδυνεύει όχι μόνο από μια σειρά εξωτερικών, περιβαλλοντικών παραγόντων που μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις, αλλά και από συστατικά του γονιδιώματος όπως είναι τα μεταθετά στοιχεία. Τα μεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται από μια περιοχή του γονιδιώματος σε μια άλλη, να ενσωματώνονται εκεί και να αντιγράφονται. Τα μεταθετά στοιχεία ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης επομένως, είναι πολύ σημαντικό αυτά να κατασταλούν καθώς διαταράσσουν τη δομή της γενετικής πληροφορίας και μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβίβαση μεταλλάξεων στους απογόνους. Ακόμη, μπορεί να

προκαλέσουν αλλαγές που οδηγούν σε θάνατο ή απόπτωση των γαμετικών κυττάρων και τελικά υπογονιμότητα. Προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα της γενετικής πληροφορίας τα γαμετικά κύτταρα είναι εξοπλισμένα με piRNAs (Mukherjee et al., 2014). Τέλος, πολυμορφισμοί σε γονίδια PIWI σχετίζονται με αδυναμία ολοκλήρωσης της σπερματογένεσης και εμφάνιση ολιγοζωοσπερμίας (Gou et al., 2014).

Όσον αφορά το ρόλο των lncRNAs στη διαδικασία της σπερματογένεσης, φαίνεται ότι δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Έχει παρατηρηθεί ωστόσο, η έκφραση χιλιάδων lncRNAs στα γαμετικά κύτταρα ποντικών αλλά και στους όρχεις ενήλικων ατόμων. Το πιο πιθανό είναι να τα lncRNAs να συμμετέχουν στη σπερματογένεση, μέσω της ρύθμισης των αλλαγών στην επιγενετική κατάσταση των γαμετικών κυττάρων κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξής τους. Ακόμη, πιθανόν εμπλέκονται στη διατήρηση των αποθεμάτων των πρόδρομων γεννητικών κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους.

Επίσης, μελέτες δείχνουν ότι τα lncRNAs ρυθμίζουν τη διαδικασία γονιδιωματικού εντυπώματος. Τις περισσότερες φορές, τα δύο αλληλόμορφα, μητρικής και πατρικής προέλευσης, εκφράζονται εξίσου. Για ορισμένα όμως γονίδια, παρατηρείται έκφραση του ενός μόνο αλληλομόρφου ανάλογα με την κατάσταση μεθυλίωσής του που εξαρτάται από ποιον γονέα κληρονομήθηκε. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει μεθυλίωση του DNA και τροποποιήσεις των ιστονών. Λάθη στη διαδικασία του γονιδιωματικού εντυπώματος συχνά εμφανίζονται σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας. Τέλος, η διαδικασία της μείωσης χαρακτηρίζεται από ζευγάρωμα και σύναψη των χρωμοσωμάτων. Βασικό στοιχείο αυτής της διαδικασίας αποτελεί η μεθυλίωση του DNA ώστε η χρωματίνη να αποκτήσει μια μεταγραφικά ανενεργή κατάσταση. Συγκεκριμένα, lncRNAs όπως το Air έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στη μεταγραφική σίγηση πολλών γονιδίων μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Mukherjee et al., 2013).

Μία ακόμη ένδειξη ότι τα lncRNAs εμπλέκονται στη σπερματογένεση είναι η ανακάλυψη διαφορετικών προτύπων έκφρασης lncRNAs στα διάφορα στάδιά της. Ακόμη, ορισμένα lncRNAs, αλλά και miRNAs, 'ξεφεύγουν' από το μηχανισμό που καλείται MSCI και εξακολουθούν να εκφράζονται στο στάδιο της παχυταινίας. Αυτό ίσως οφείλεται στη συμμετοχή τους στη ρύθμιση γονιδίων που είναι απαραίτητα στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Τα περισσότερα από αυτά τα lncRNAs εμφανίζουν επίσης ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης στους όρχεις. Η δημιουργία ενός ποντικού knock out για ένα από αυτά τα lncRNAs, οδήγησε σε μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, χωρίς όμως ιδιαίτερη επίδραση στη γονιμότητά του (Wichman et al., 2017).

Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να μελετηθεί η βιολογική λειτουργία όσο το δυνατόν περισσότερων ncRNAs και να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί δράσης τους, προκειμένου να αναπτυχθούν μέθοδοι πρόγνωσης, διάγνωσης και αντιμετώπισης της ανδρικής υπογονιμότητας με κλινική εφαρμογή. (Gou et al., 2014).

2.6. Εργαλεία και μέθοδοι μελέτης των non-coding RNAs (miRNAs, lncRNAs)

Όσον αφορά τα εργαλεία μελέτης των non-coding RNAs, καθοριστική εξέλιξη αποτέλεσε η ανάπτυξη των τεχνολογιών next-generation sequencing, οι οποίες μπορούν να προσφέρουν

πληθώρα δεδομένων με μεγάλη ακρίβεια και σχετικά χαμηλό κόστος (Beermann et al., 2016, Mukherjee et al., 2014). Συγκεκριμένα, με τη χρήση αυτών των τεχνολογιών μπορεί να γίνει ανάλυση μεταγραφώματος, δηλαδή ανάλυση όλων των μεταγράφων ενός κυττάρου σε μια δεδομένη συνθήκη, όπως ένα αναπτυξιακό στάδιο ή μια παθολογική κατάσταση (Yan et al., 2012). Έτσι, γίνεται εντοπισμός των μεταγράφων που σχετίζονται με τη συνθήκη ή πολλές φορές ανακαλύπτονται νέα RNAs.

Η πιο μελετημένη κατηγορία non-coding RNAs, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι τα miRNAs καθώς υπάρχει μια πληθώρα τεχνικών για την ανίχνευσή τους αλλά και τον εντοπισμό των λειτουργιών τους. Η ανίχνευσή τους γίνεται συνήθως με μικροσυστοιχίες ή μεθόδους αλληλούχισης. Στη συνέχεια, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει εύκολα και με σχετικά χαμηλό κόστος με τη βοήθεια qRT-PCR. Ακόμη, προκειμένου να εντοπιστούν γονίδια-στόχοι των miRNAs συχνά πραγματοποιείται βιοπληροφορική ανάλυση και χρησιμοποιούνται διάφορες βάσεις δεδομένων (Targetscan, PicTar κ.α.) που παρέχουν μεγάλο όγκο πληροφοριών. Επίσης, πειραματική επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μπορεί να γίνει με τη δοκιμασία λουσιφεράσης. Απαιτείται δηλαδή, κλωνοποίηση της περιοχής 3' UTR του γονιδίου-στόχου σε πλασμίδιο και καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Έπειτα, γίνεται εισαγωγή του πλασμιδίου και του miRNA σε κυτταρική σειρά ώστε αν το miRNA προσδεθεί στο γονιδια-στόχο να κατασταλεί η έκφραση της λουσιφεράσης (Beermann et al., 2016).

Στη μελέτη των lncRNAs εμφανίζονται αρκετές δυσκολίες. Η απουσία συντήρησης μεταξύ διαφορετικών ειδών καθιστά δύσκολη την έρευνα και πολλές φορές, αποτελέσματα που αφορούν ένα συγκεκριμένο είδος, δεν επιβεβαιώνονται σε άλλα είδη. Ακόμη, αυτό οδηγεί σε αβεβαιότητα σχετικά με την πιθανή λειτουργικότητα των lncRNAs (Yan et al., 2012).

Παρόλο λοιπόν, που τα δεδομένα από διάφορα πειράματα next-generation sequencing συγκεντρώνονται σε βάσεις δεδομένων με πρόσβαση σε όλους, το δύσκολο έργο είναι η εύρεση των λειτουργιών των μορίων lncRNAs που αποτελεί μια πρόκληση τόσο για τους υπολογιστικούς βιολόγους όσο και για τους πειραματικούς. Η υπολογιστική βιολογία και η βιοπληροφορική παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μελέτη των lncRNAs καθώς προτιμάται η βιοπληροφορική ανάλυση έναντι άλλων πιο ακριβών και χρονοβόρων πειραματικών διαδικασιών (Yan et al., 2012). Ταυτόχρονα, αναπτύσσονται διάφοροι αλγόριθμοι που μπορούν να πραγματοποιήσουν μια σειρά διαφορετικών προβλέψεων.

Αξίζει να τονιστεί ότι βιοπληροφορική ανάλυση και αλγόριθμοι χρησιμοποιούνται και για τη μελέτη των miRNAs. Συγκεκριμένα, οι προβλέψεις των mRNA που στοχεύονται από τα miRNA βασίζονται στην εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως η σταθερότητα miRNA-mRNA, η δευτεροταγής δομή, τα επίπεδα συντήρησης και η συμπληρωματικότητα των νουκλεοτιδίων. Η έλλειψη συντηρημένων αλληλουχιών στα lncRNAs καθιστά τη δημιουργία αλγορίθμων ακόμη πιο δύσκολη (Mukherjee et al., 2013).

Τέλος, αν και η βιοπληροφορική κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη των lncRNAs, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη τους και διάφορες πειραματικές τεχνικές. Για την ανίχνευσή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικροσυστοιχίες και για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί η RT-PCR αλλά και FISH η οποία βασίζεται

στον εντοπισμό συγκεκριμένων μεταγράφων σε δείγματα ιστών με τη χρήση φθορισμού (Yan et al., 2012).

2.7. Χρήση non-coding RNAs ως βιοδείκτες (miRNAs, lncRNAs)

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ως βιοδείκτης ορίζεται 'ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και να αξιολογηθεί ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθολογικών διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε θεραπευτική παρέμβαση'. Ένας βιοδείκτης επίσης, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση και ευαισθησία (Strimbu & Tavel, 2010).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα non-coding RNAs εμπλέκονται σε πλήθος διεργασιών και η έκφρασή τους συσχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ακόμη, σε διάφορες ασθένειες παρατηρούνται συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης non-coding RNAs, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο στην κλινική πράξη και συγκεκριμένα στη διάγνωση και στην πρόγνωση ασθενειών (Beerthmann et al., 2016). Οι δύο βασικές κατηγορίες μορίων RNAs που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες είναι τα Cell-Free RNAs και τα ενδοκυτταρικά RNAs.



Εικόνα 9: Τα βήματα της έρευνας που ακολουθείται για την εύρεση miRNAs βιοδεικτών για τη διάγνωση ασθενειών (Xu et al., 2014).

Τα cell-free RNAs είναι μόρια RNA που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος από νεκρά ή αποπτωτικά αλλά και από ζωντανά κύτταρα. Ως cell-free RNAs έχει αποδειχθεί ότι κυκλοφορούν και miRNAs (Boissière et al., 2017). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η έκκριση miRNAs από κύτταρα πιθανόν ως τρόπος επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων ή/και οργάνων. Επίσης, τα miRNAs προστατεύονται από αποικοδόμηση από RNAάσες εξαιτίας του εγκλεισμού τους σε μικροσωμάτια, εξωσώματα, αποπτωτικά σωμάτια αλλά και σχηματισμού συμπλόκων με πρωτεΐνες. Επομένως, είναι πολύ σταθερά μόρια και τα επίπεδά τους μπορούν να μετρηθούν εύκολα σε πολλά σωματικά υγρά, όπως το αίμα, το

εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τα ούρα. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αποτελέσει μια μη επεμβατική προσέγγιση για τη διάγνωση πολλών ασθενειών.

Ακόμη, τα lncRNAs φαίνεται ότι και αυτά έχουν τη δυνατότητα να κυκλοφορούν σε σωματικά υγρά αλλά ο ακριβής μηχανισμός εξωκυττάριας έκκρισής τους δεν είναι ακόμη γνωστός. Παρόλα αυτά, υπάρχουν περιπτώσεις lncRNAs που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση ασθενειών όπως το καρκινικό αντιγόνο του προστάτη, PCA3, που αποτελεί έναν από τους πιο εξειδικευμένους βιοδείκτες για διάγνωση του καρκίνου του προστάτη. Περαιτέρω έρευνα βέβαια απαιτείται, προκειμένου να εξακριβωθούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα lncRNAs κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά ώστε να γίνει αξιολόγηση της χρήσης τους ως βιοδείκτες (Beermann et al., 2016).

Όσον αφορά τη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας, δεν υπάρχει ακόμη αξιόπιστη μοριακή τεχνική για αυτή (Abu-Halima et al., 2014). Έρευνες όμως αποδεικνύουν ότι τα προφίλ έκφρασης των miRNAs σε ιστούς όρχεων είναι αρκετά διαφορετικά ανάμεσα σε υγιή και άτομα με προβλήματα υπογονιμότητας. Συναντώνται μάλιστα διαφορετικά προφίλ έκφρασης ακόμη και μεταξύ διαφορετικών υποκατηγοριών της ανδρικής υπογονιμότητας, όπως π.χ. στη μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Boissière et al., 2017).

Επίσης, τα σπερματοζωάρια διαθέτουν μια σειρά από RNAs τα οποία πρόκειται να μεταφερθούν στο ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης, συμβάλλοντας σε διάφορες διαδικασίες όπως η πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου, η αναγνώριση των δύο διαφορετικών γονιδιωμάτων, οι επιγενετικές ρυθμίσεις κ.α. Το προφίλ των RNA στα σπερματοζωάρια μπορεί επομένως, να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη για τη διάγνωση της υπογονιμότητας. Επίσης, στα ώριμα σπερματοζωάρια συναντώνται και lncRNAs. (Jodar et al., 2013). Όσον αφορά το cell-free RNA στο ανθρώπινο σπέρμα, αποτελείται από ένα μίγμα μεταγράφων που προκύπτουν από τα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα. Είναι σταθερό και περισσότερο συμπυκνωμένο από ότι είναι σε άλλα σωματικά υγρά (Kotaja, 2014).

Επομένως, τα non-coding RNAs θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανό βιοδείκτη για τη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας ενώ εξαιρετικό ενδιαφέρον θα είχε ο συνδυασμός παραδοσιακών βιοδεικτών με καινούριους ncRNAs βιοδείκτες για την εκτίμηση της ανδρικής υπογονιμότητας και τη διάκριση των επιμέρους υποκατηγοριών της (Beermann et al., 2016).

Τέλος, για να θεωρηθεί ότι ένα non-coding RNA αποτελεί πιθανό βιοδείκτη για μια παθολογική κατάσταση θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι απορρυθμίζεται η έκφρασή του και παρουσιάζει συγκεκριμένο και ίδιο προφίλ έκφρασης σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές μελέτες ή αυτό να αποδεικνύεται με τη χρήση δύο διαφορετικών τεχνικών όπως είναι οι μικροσυστοιχίες και η RT-qPCR. Ακόμη, θα πρέπει να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή διαφορά έκφρασης ανάμεσα σε υγιή και άτομα με παθολογικό φαινότυπο και να έχει πραγματοποιηθεί δοκιμή και επικύρωση των αποτελεσμάτων (validation) σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό κλινικών δειγμάτων (Boissière et al., 2017).

B. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανδρική υπογονιμότητα απασχολεί καθημερινά, όλο και περισσότερα ζευγάρια σε ολόκληρο τον κόσμο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον για έγκαιρη και αποτελεσματική πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας να έχει αυξηθεί σημαντικά. Επομένως, είναι απαραίτητη η μελέτη και ο εντοπισμός των γενετικών αιτιών της. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική διαταραχή, άρα μεγάλος αριθμός γονιδίων συνεισφέρει στην εμφάνιση του φαινοτύπου.

Συγκεκριμένα, όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν non-coding RNAs με την ανδρική υπογονιμότητα. Πολλές κατηγορίες ncRNAs, μεταξύ των οποίων τα miRNAs και τα lncRNAs, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων της διαδικασίας της σπερματογένεσης και ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί διαφορετικό προφίλ έκφρασης των lncRNAs και των miRNAs μεταξύ υγιών και ατόμων με φαινότυπο υπογονιμότητας. Διαφορές στην έκφραση εμφανίζονται ακόμη και μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της σπερματογένεσης. Τέλος, ορισμένα lncRNAs και miRNAs με ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης στους όρχεις, 'ξεφεύγουν' κατά τη μειωτική απενεργοποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων (MSCI) και εκφράζονται, πιθανόν εξαιτίας του ρυθμιστικού τους ρόλου στη διαδικασία της σπερματογένεσης και της γονιμότητας γενικότερα.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση, καταγραφή και ανάδειξη πολυμορφισμών σε περιοχές lncRNAs που πιθανόν εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε lncRNAs προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην ποιότητα και τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη lncRNAs έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών.

Η ενδεδειγμένη και ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα γονιμότητας, πρόκειται να συμβάλει σε μία ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με το προφίλ του ασθενή ώστε να προταθούν κατάλληλες τεχνικές αντιμετώπισης που θα οδηγήσουν σε μια επιτυχή κύηση. Ακόμη, είναι πιθανό να προκύψουν δεδομένα που θα διευκολύνουν τη διάγνωση και την πρόγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό που απομονώθηκε από βιολογικό δείγμα σπέρματος τόσο από μη νορμοσπερμικούς, όσο και από νορμοσπερμικούς άνδρες που ανήκουν στον ελληνικό πληθυσμό. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης 'EMBRYOLAB'.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και του εργαστηρίου, η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από την αρχή της συναίνεσης ύστερα από πληροφόρηση του δότη και από την αρχή της προστασίας των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων που συλλέγονται και υπόκεινται σε επεξεργασία.

2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα

Υλικά

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

Μεθοδολογία

Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο 'Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm' (Weyrich, 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα.

Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζωάρια. Η βασική διαφορά επίσης από άλλους ιστούς είναι ότι πλήθος δισουλφιδικών δεσμών συναντώνται στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων περικυκλώνοντας το γενετικό υλικό.

Το σπερματικό υγρό επίσης, περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά, όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Επομένως, συνίσταται η χρήση αιθανόλης για απομάκρυνση του σπερματικού υγρού. Ακόμη, οι δισουλφιδικοί δεσμοί της λιπιδικής μεμβράνης εμποδίζουν τη λύση των κυττάρων και δυσκολεύουν την απομόνωση του γενετικού υλικού. Για να γίνει παράκαμψη του εμποδίου αυτού, χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DTT. Επιπλέον, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει τη ρήξη των κυτταρικών /πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει EDTA, δηλαδή έναν χηλικό υποκαταστάτη που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα αποτελούν συμπαράγοντα

για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επιπρόσθετα, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή. Τέλος, το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

Παρόλα αυτά, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

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

3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Μεθοδολογία

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

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

4. Στη συνέχεια η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Έπειτα, το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

Υλικά

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

Μεθοδολογία

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα των νουκλεϊκών οξέων και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na⁺, τα οποία συνδέονται με αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων, ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa), όγκου V/10, συγκέντρωσης 3M και αιθανόλη όγκου 2V.
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται στους -80^oC για 1-2 ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 20 λεπτά στους 4^oC.
3. Στη συνέχεια, απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500μl αιθανόλης 75%.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
5. Το ίζημα ξεραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε TE- buffer ή υδατικό διάλυμα.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

4.1. Με χρήση φασματοφωτόμετρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή οπτικής απορρόφησης 1 (OD₂₆₀ = 1) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 μg/ml δίκλωνου DNA, 40 μg/ml μονόκλωνου DNA ή και ~20μg/ml για μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια.

Ακόμη, ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή δείχνει κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος OD_{260}/OD_{280} κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

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

4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά

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

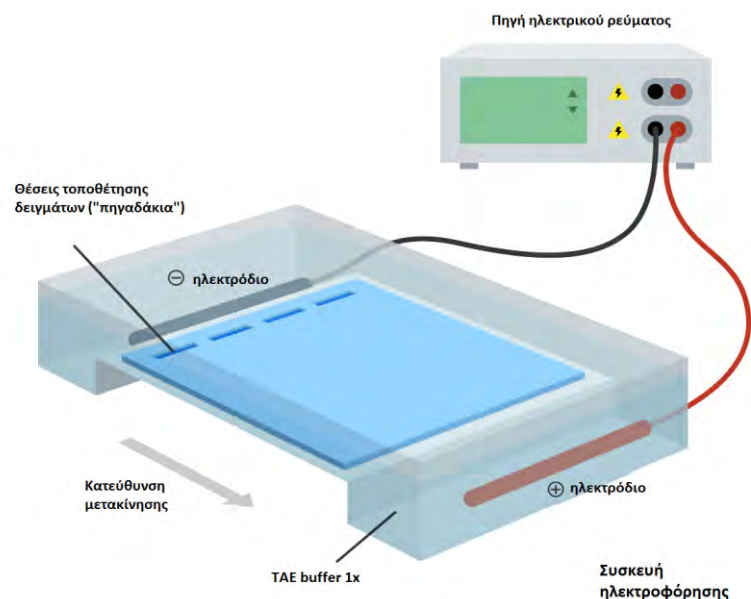
Μεθοδολογία

Μία από τις κύριες μεθόδους ποσοτικοποίησης δειγμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με κυμαινόμενη συγκέντρωση, ανάλογα με το μέγεθος του ηλεκτροφορούμενου DNA. Πρόκειται για μια τεχνική διαχωρισμού φορτισμένων μορίων και συγκεκριμένα του DNA στο πείραμα αυτό. Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο το οποίο κινείται διαμέσου της πηκτής της αγαρόζης από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με τη χρωστική SERVA, τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή, κι επομένως η ένταση φθορισμού, είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder).

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

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

1. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αгарόζης 1% w/v αναμειγνύεται αгарόζη σε σκόνη (0,3 γρ.) με 45 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές και να διαλυθεί η αгарόζη.
2. Γίνεται προσθήκη 4 μl χρωστικής SERVA και ακολουθεί ήπια ανάδευση.
3. Το μίγμα προστίθεται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται ειδικά εξαρτήματα που ονομάζονται «χτενάκια». Το κάθε «χτενάκι» αποτελείται από έναν οριζόντιο άξονα κατά μήκος του οποίου ξεκινούν 12 κάθετοι άξονες -θέσεις και χρησιμοποιείται για την δημιουργία θέσεων («πηγαδάκια») στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα DNA.
4. Το μίγμα αφήνεται να κρυώσει ώστε να δημιουργηθεί το πήκτωμα (πολυμερισμός αгарόζης).
5. Το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται σε αυτή TAE buffer 1x.
6. Προκειμένου να είναι εφικτή η παρατήρηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιούνται 3 μl Agarose Loading buffer για κάθε δείγμα DNA (5 μl). Έπειτα, γίνεται προσθήκη των δειγμάτων στις θέσεις («πηγαδάκια») του πηκτώματος.
7. Ακολουθεί εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης και ηλεκτροφόρηση για περίπου 15-20 λεπτά.
8. Τέλος, πραγματοποιείται παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός.



Εικόνα 10: Αναπαράσταση συσκευής ηλεκτροφόρησης για την ποσοτικοποίηση μορίων DNA.

5. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

Η αλληλούχιση των δειγμάτων DNA έγινε μέσω γονοτύπησης και πραγματοποιήθηκε από το κέντρο HuGeF στην Ολλανδία. Πιο συγκεκριμένα, η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του chip της Illumina, Infinium® Global Screening Array. Το συγκεκριμένο chip προσφέρει πληροφορίες για 642.824 δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (SNPs), και ως εκ τούτου προσφέρει μια αρκετά μεγάλη κάλυψη του γονιδιώματος και ιδιαιτέρως των

περιοχών των ιντρονίων, καθώς οι 256.673 δείκτες ανήκουν σε αυτές τις περιοχές. Έτσι, αναδεικνύεται πιο αντιπροσωπευτικά ο πολυμορφισμός των non-coding περιοχών.

Η γονοτύπηση με τέτοια chips βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για μια συγκεκριμένη περιοχή, περίπου 50 bp γύρω από τα SNPs, τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε γυάλινη πλάκα. Αρχικά, γίνεται πολλαπλασιασμός και προετοιμασία του DNA-στόχου και ακολουθεί υβριδοποίηση και επιμήκυνση με νουκλεοτιδικές βάσεις οι οποίες είναι σημασμένες με διαφορετικές φθορίζουσες. Έπειτα από διαδοχικά στάδια πλύσης πραγματοποιείται ανίχνευση των φθορίζόντων προϊόντων που προκύπτουν με ειδικό laser. Διαφορετικά χρώματα φθορισμού οδηγούν στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης.

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

6. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK

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

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

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

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

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

και η τέταρτη στήλη αντιστοιχεί στη θέση του ζεύγους βάσεων (μέτρηση σε bp units).

```
1 rs6587445 0 6757
1 rs6681339 0 6758
1 rs4916176 0 6759
1 rs14851 0 6760
1 rs6587759 0 6761
1 rs7521920 0 6762
2 rs7594567 0 6763
2 rs4438516 0 6764
2 rs1870693 0 6765
```

Εικόνα 11: Παράδειγμα μορφής αρχείου MAP.

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

```
FAM001 1 0 0 1 2 A A G G A C
FAM001 2 0 0 1 2 A A A G 0 0
...
```

Εικόνα 12: Παράδειγμα μορφής αρχείου PED. Στις τελευταίες στήλες φαίνονται οι γονότυποι.

Στα αρχεία που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ωστόσο, η πρώτη στήλη αντιστοιχεί σε έναν αύξοντα αριθμό για την αρίθμηση των δειγμάτων ενώ η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί σε έναν αύξοντα αριθμό που δείχνει τη σειρά αλληλούχισης των δειγμάτων.

6.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση φαινοτύπων και γονοτύπων απαιτείται η δημιουργία ενός αρχείου που προκύπτει από την ένωση των δύο επιμέρους αρχείων που αντιστοιχούν σε αποτελέσματα αλληλούχισης δύο διαφορετικών plates. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση τόσο μεγαλύτερη είναι η στατιστική δύναμη των αποτελεσμάτων καθώς μελέτες που γίνονται σε μικρό αριθμό δειγμάτων μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα και λανθασμένες συσχετίσεις.

Τα αποτελέσματα από το 1^ο plate ονομάζονται GSA1pheno και ουσιαστικά πρόκειται για δύο αρχεία (GSA1pheno.map, GSA1pheno.ped).

```

C:\Users\Mapióvva\PLINK>plink --file GSA1pheno
-----
          PLINK!          |          v1.07          |          10/Aug/2009          |
-----
(C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----

Web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... failed connection
Problem connecting to web

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Tue May 28 23:39:27 2019

Options in effect:
  --file GSA1pheno

692366 (of 692366) markers to be included from [ GSA1pheno.map ]
96 individuals read from [ GSA1pheno.ped ]
96 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
52 cases, 44 controls and 0 missing
96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
96 founders and 0 non-founders found
14961 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
10 SNPs with no founder genotypes observed
Warning, MAF set to 0 for these SNPs (see --nonfounders)
Writing list of these SNPs to [ plink.nof ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.992454
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
After filtering, 52 cases, 44 controls and 0 missing
After filtering, 96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex

```

Εικόνα 13: Άνοιγμα αρχείου GSA1pheno (.map, .ped) με PLINK.

Τα αποτελέσματα από το 2^ο plate ονομάζονται GSA2pheno και πρόκειται επίσης για δύο αρχεία (GSA2pheno.map, GSA2pheno.ped)

```

C:\Users\Mapióvva\PLINK>plink --file GSA2pheno
-----
          PLINK!          |          v1.07          |          10/Aug/2009          |
-----
(C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----

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

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Tue May 28 23:58:51 2019

Options in effect:
  --file GSA2pheno

692366 (of 692366) markers to be included from [ GSA2pheno.map ]
96 individuals read from [ GSA2pheno.ped ]
96 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
48 cases, 48 controls and 0 missing
96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
96 founders and 0 non-founders found
19228 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
7 SNPs with no founder genotypes observed
Warning, MAF set to 0 for these SNPs (see --nonfounders)
Writing list of these SNPs to [ plink.nof ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.99018
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 692366 SNPs
After filtering, 48 cases, 48 controls and 0 missing
After filtering, 96 males, 0 females, and 0 of unspecified sex

```

Εικόνα 14: Άνοιγμα αρχείου GSA2pheno (.map,.ped) με PLINK.

Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα χειρισμού γενετικών δεδομένων μέσω μια σειράς εντολών με τις οποίες ο χρήστης μπορεί να αναδιατάξει, αποκωδικοποιήσει και συγχωνεύσει δεδομένα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι:

```
plink - - file GSA1pheno - -merge GSA2pheno.ped GSA2pheno.map - - recode - - out GSAmerged
```


Με τη συγκεκριμένη εντολή το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα του αρχείου GSA1rpheno (.map, .ped) και τα ενώνει (- - merge) με τα δεδομένα των αρχείων GSA2rpheno (.map, .ped). Η εντολή - - recode - - out απαιτείται ώστε το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εντολή merge να κωδικοποιηθεί σε ένα νέο αρχείο, το GSAMerged (.map, .ped).

6.2. Quality control

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

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

```
plink - - geno 0.01
```

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

Στο επόμενο στάδιο του quality control χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - mind 0.01
```

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

Τέλος, χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - maf 0.05
```

Η συγκεκριμένη εντολή διατηρεί στην ανάλυση μόνο SNPs με minor allele frequency, δηλαδή συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου, ≥ 0.05 . Ουσιαστικά με αυτή την εντολή

αφαιρούνται τα πολύ σπάνια αλληλόμορφα για τα οποία η στατιστική δύναμη είναι πολύ χαμηλή και απαιτείται τεράστιος αριθμός δειγμάτων για να γίνει σωστή συσχέτισή τους. Επομένως μελέτες με πολύ μεγάλο αριθμό δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιήσουν χαμηλότερο maf threshold. Εφόσον όμως ο αριθμός δειγμάτων στην ανάλυση είναι μικρός, επιλέγεται το τυπικό threshold 0.05. Ακόμη, είναι σημαντικό να αφαιρεθούν τα σπάνια αλληλόμορφα επειδή είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε λάθη αλληλούχισης, ιδιαίτερα αν δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός δειγμάτων ώστε να γίνει επαλήθευση.

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

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

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

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

6.3. Ανάλυση συσχέτισης - Association analysis

Αμέσως μετά το στάδιο του quality control, τα δεδομένα είναι έτοιμα για να χρησιμοποιηθούν σε μια ανάλυση συσχέτισης ώστε να εντοπιστούν SNPs με διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων ανάμεσα σε cases και controls. Προκειμένου να γίνει αυτό, χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα στατιστικά τεστ ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας που μελετάται κάθε φορά, δηλαδή αν τα χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από την ασθένεια είναι ποιοτικά ή ποσοτικά (Marees et al., 2017).

Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα πραγματοποίησης ανάλυσης συσχέτισης με την εξής εντολή:

```
plink --assoc
```

Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποιεί τη δοκιμασία χ^2 για να συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε control και cases για κάθε SNP. SNPs που συνεισφέρουν στην

εμφάνιση του φαινοτύπου αναμένεται να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στις συχνότητες αλληλομόρφων ανάμεσα σε controls και cases. Το αρχείο που προκύπτει από την ανάλυση δίνει τις συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε SNP σε controls και cases, την τιμή του χ^2 αλλά και τις τιμές p-value και odds ratio.

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHI2	P	OR
1	rs6681049	1	1	0.1591	0.2667	2	3.067	0.07991	0.5203
1	rs4074137	2	1	0.07955	0.07778	2	0.001919	0.9651	1.025
1	rs1891905	4	1	0.4091	0.4	2	0.01527	0.9017	1.038
1	rs9729550	5	1	0.1705	0.08889	2	2.631	0.1048	2.106
1	rs3813196	6	1	0.03409	0.02222	2	0.2296	0.6318	1.553
1	rs12044597	11	1	0.5	0.4889	2	0.02198	0.8822	1.045
1	rs10907185	12	1	0.3068	0.2667	2	0.3509	0.5536	1.217
1	rs11260616	13	1	0.2326	0.2	2	0.2754	0.5998	1.212
1	rs745910	14	1	0.1395	0.1932	2	0.9013	0.3424	0.6773
1	rs262688	17	1	0.2045	0.1667	2	0.4227	0.5156	1.286
1	rs2460000	18	1	0.25	0.2778	2	0.1767	0.6742	0.8667
1	rs260509	19	1	0.125	0.2	2	1.835	0.1755	0.5714
1	rs2645091	20	1	0.1818	0.1444	2	0.4557	0.4996	1.316
1	rs2643895	21	1	0.05682	0.1111	2	1.7	0.1923	0.4819
1	rs2840529	22	2	0.4432	0.4667	1	0.09896	0.7531	0.9096
1	rs3736330	23	2	0.4432	0.5222	1	1.113	0.2914	0.7282
1	rs4233033	24	1	0.125	0.1222	2	0.00317	0.9551	1.026
1	rs942817	25	1	0.1477	0.2333	2	2.11	0.1463	0.5695
1	rs2236395	26	1	0.5114	0.4222	2	1.421	0.2333	1.432
1	rs7550231	27	1	0.3977	0.4556	2	0.6082	0.4355	0.7892
1	rs735000	28	1	0.06818	0.1	2	0.5837	0.4449	0.6585
1	rs6679232	29	1	0.1023	0.06667	2	0.731	0.3926	1.595

Εικόνα 15: Παράδειγμα αρχείου αποτελεσμάτων που προκύπτει με την εντολή `--assoc`. Οι στήλες αντιστοιχούν (1) στο χρωμόσωμα όπου βρίσκεται το SNP, (2) στο rs# του SNP, (3) στη θέση του ζεύγους βάσεων, (4) στον κωδικό του αλληλομόρφου A1, (5) στη συχνότητα εμφάνισης του A1 στα δείγματα cases, (6) στη συχνότητα εμφάνισης του A1 στα δείγματα controls, (7) στον κωδικό του αλληλομόρφου A2, (8) στην τιμή του χ^2 , (9) στην τιμή του p-value και (10) στο odds ratio.

Η τιμή p-value (Observed level of significance ή probability value) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων και η τιμή του δηλώνει πόσο πιθανό είναι η συσχέτιση ενός αλληλομόρφου με την ασθένεια να οφείλεται στην τύχη. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του τόσο λιγότερο πιθανό είναι η συσχέτιση να οφείλεται στην τύχη.

Η τιμή odds ratio ή λόγος σχετικών πιθανοτήτων δείχνει πόσο πιθανό είναι να ανήκει κανείς στην ομάδα cases αν φέρει το αλληλομόρφο που συσχετίζεται με τη νόσο (risk allele). Αποτελεί ουσιαστικά ένα μέτρο της δύναμης της συσχέτισης. Ακόμη, τιμές odds ratio ίσες με τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης και μη εμφάνισης της νόσου είναι ίσες, δηλαδή δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και εμφάνισης της ασθένειας, ενώ τιμές μεγαλύτερες από τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης είναι μεγαλύτερες από τις πιθανότητες μη εμφάνισης. Τέλος τιμές odds ratio μικρότερες από τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης της νόσου είναι μικρότερες από τις πιθανότητες μη εμφάνισης.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση είναι:

`plink --file GSAQC --assoc`

η οποία με βάση τα δεδομένα του αρχείου GSAQC παράγει ένα νέο αρχείο που περιέχει τις πληροφορίες που αναφέρονται παραπάνω και ονομάζεται GSAQC.assoc. Από το συγκεκριμένο αρχείο επιλέχθηκαν τα SNPs με p-value value ≤ 0.05 και odds ratio >1 . Η συγκεκριμένη τιμή p-value δηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη

συχνότητα των αλληλομόρφων η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί από την τύχη και η τιμή odds ratio μεγαλύτερης της μονάδας δηλώνει ότι τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης του χαρακτήρα που μελετάται, δηλαδή της ανδρικής υπογονιμότητας. Οι τιμές αυτές επίσης επιλέχθηκαν ώστε ο αριθμός των αποτελεσμάτων να μην είναι εξαιρετικά μεγάλος αλλά να έχει μέγεθος που επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυση στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά το στάδιο του Quality Control τα SNPs που διατηρήθηκαν είχαν p-value της τάξης του 10^{-4} .

7. Annotation των SNPs με SNPnexus

Σε αυτό το βήμα γίνεται ταξινόμηση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης (association analysis), ώστε να γίνει επιλογή των SNPs που θα συμπεριληφθούν στην περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην ανδρική υπογονιμότητα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκαν SNPs που βρίσκονται σε περιοχές που μεταγράφονται και προκύπτουν long non-coding RNAs.

Τα lncRNAs επιλέχθηκαν ως αντικείμενο μελέτης και διερεύνησης του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα καθώς, όπως τονίζεται και στην εισαγωγή, εμπλέκονται σε μια πληθώρα βιολογικών διαδικασιών και μάλιστα δημοσιεύονται συνεχώς άρθρα που υποδεικνύουν μηχανισμούς με τους οποίους τα lncRNAs συνεισφέρουν άμεσα ή έμμεσα στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Οι περισσότερες αναλύσεις συσχέτισης επίσης, δείχνουν ότι SNPs με πιθανό ρόλο στην υπογονιμότητα βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά είναι μεταξύ γονιδίων (intergenic). Επομένως, το πεδίο μελέτης για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας περιορίστηκε στα lncRNAs και το ρόλο τους στην ανδρική υπογονιμότητα.

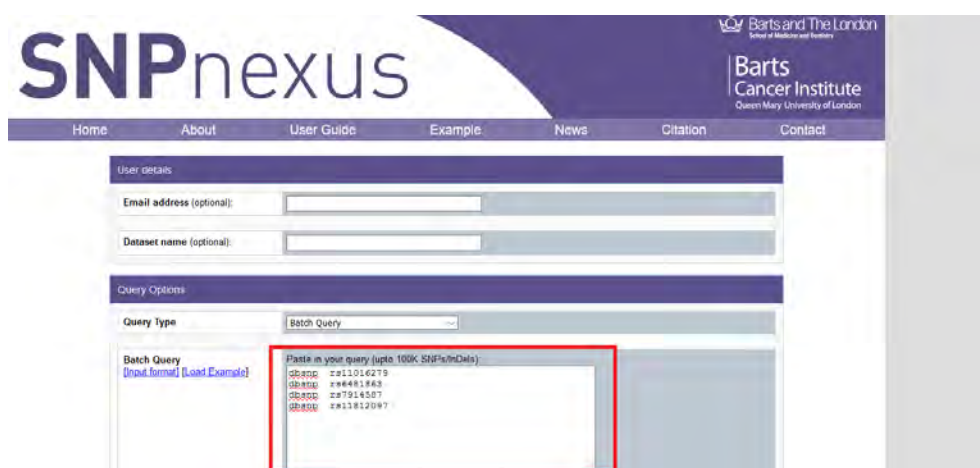
Για να γίνει εντοπισμός των SNPs, που επιλέχθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, και βρίσκονται σε περιοχές που αντιστοιχούν σε lncRNAs χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων SNPnexus. Η SNPnexus είναι μια βάση δεδομένων που προσφέρει πληροφορίες για SNPs συνδυάζοντας δεδομένα από διαφορετικές πηγές πραγματοποιώντας μεταξύ άλλων και annotation. (Dayem Ullah et al., 2018).

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

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

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

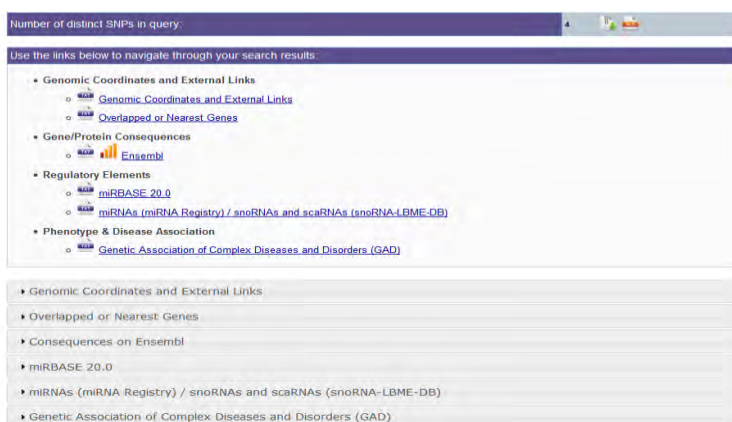
Η ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων είναι <https://snp-nexus.org/> και η αναζήτηση γίνεται από την υποενότητα Query Options επιλέγοντας μεμονωμένη αναζήτηση κάθε SNP (Single Query) ή μαζική (Batch Query). Για να γίνει η αναζήτηση, τα δεδομένα που θα εισαχθούν θα πρέπει να είναι της μορφής dbSNP rs#. Στη συνέχεια, από την υποενότητα Annotation categories επιλέγεται η έκδοση γονιδιώματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά και ορίζονται οι διάφοροι παράμετροι που θέλει να αναζητήσει ο χρήστης. Για την έναρξη της αναζήτησης χρησιμοποιείται η επιλογή RUN.



Εικόνα 16: Παράδειγμα αναζήτησης SNPs στην αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων SNPnexus. Με κόκκινο πλαίσιο φαίνεται το πλαίσιο αναζήτησης.

Στη συγκεκριμένη ανάλυση επιλέχθηκε η έκδοση GRCh37/hg19 και οι παράμετροι miRBASE 20.0 και microRNAs (miRNA Registry) / snoRNAs and scaRNAs (snoRNA-LBME-DB) από την ενότητα Regulatory elements και Genetic Association of Complex Diseases and Disorders (GAD) από την ενότητα Phenotype and Disease Association. Η συγκεκριμένη έκδοση (GRCh37/hg19) επιλέχθηκε επειδή τα plates γονοτυπήθηκαν σε αυτό το assembly της Ensembl ενώ η υποενότητα Regulatory elements χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστεί αν κάποιο από τα SNPs επιδρά στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων. Έγινε δηλαδή αναζήτηση ώστε να εντοπιστούν SNPs που βρίσκονται σε θέσεις πρόσδεσης miRNAs αλλά και SNPs που επηρεάζουν άμεσα μικρά ρυθμιστικά RNAs όπως miRNAs, snoRNAs και scaRNAs. Η επιλογή GAD χρησιμοποιήθηκε ώστε να εντοπιστεί βιβλιογραφία που αφορά

συσχέτιση των SNPs με ασθένειες και πιθανόν συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε ξεχωριστή σελίδα χωρισμένα σε υποενότητες ώστε να είναι πιο εύκολη η πλοήγηση σε αυτά.



Εικόνα 17: Παράδειγμα εμφάνισης αποτελεσμάτων στη βάση δεδομένων SNP Nexus.

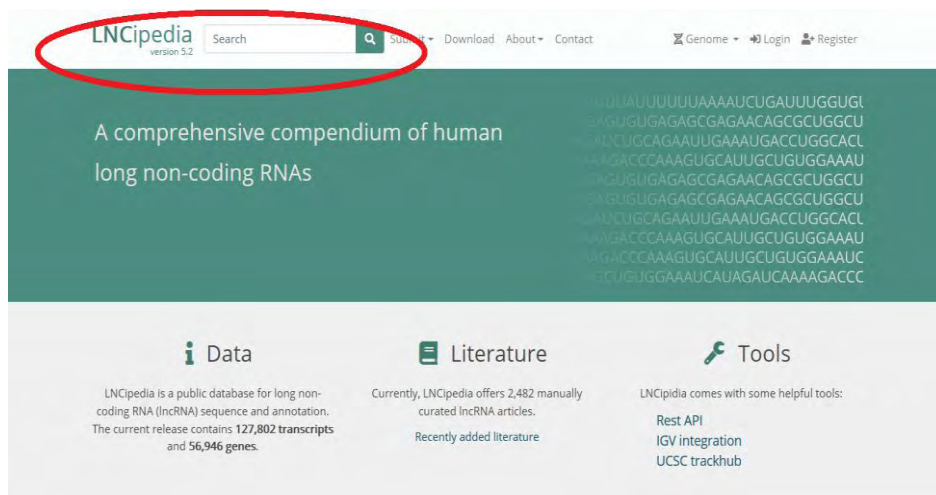
8. Διερεύνηση λειτουργιών lncRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα

Το συγκεκριμένο στάδιο της ανάλυσης αφορά τη διερεύνηση των λειτουργιών των lncRNAs, στα οποία εντοπίστηκαν SNPs στο προηγούμενο στάδιο, προκειμένου να βρεθούν αυτά με πιθανό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης, που στη συνέχεια θα επιλεγθούν για περαιτέρω μελέτη ώστε να εντοπιστούν τελικά SNPs που πιθανόν συνεισφέρουν στο φαινότυπο της ανδρικής υπογονιμότητας.

Για να μελετηθεί η πιθανή λειτουργία κάθε lncRNA αλλά και να διαπιστωθεί αν εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην εμφάνιση υπογονιμότητας ή τη διαδικασία της σπερματογένεσης χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων LNCipedia version 5.2 (Volders et al., 2019).

Η LNCipedia είναι μια βάση δεδομένων για ανθρώπινα long non-coding μετάγραφα αλλά και γονίδια (Volders et al., 2013). Καθώς όλο και περισσότερες μελέτες που αφορούν lncRNAs, σχεδόν χιλιάδες, δημοσιεύονται κάθε χρόνο, είναι πολύ σημαντικό να υπάρχει μια βάση δεδομένων που ανανεώνεται τακτικά και συγκεντρώνει όλη τη διαθέσιμη πληροφορία που αφορά το λειτουργικό χαρακτηρισμό των lncRNAs. Συγκεκριμένα, η πιο πρόσφατη έκδοση της βάσης δεδομένων επιτρέπει την εύρεση 2.482 δημοσιευμένων άρθρων που αφορούν lncRNAs (Volders et al., 2019).

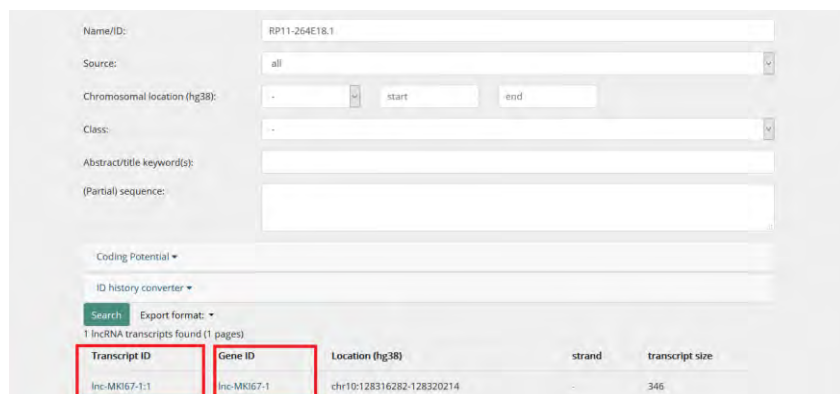
Ακόμη, στη βάση δεδομένων μπορεί κανείς να βρει πληροφορίες για 21.488 lncRNAs οι οποίες προέρχονται από πολλές διαφορετικές πηγές. Εκτός από τις βασικές πληροφορίες που αφορούν τα μετάγραφα και τη θέση τους στο γονιδίωμα, παρέχονται οι αλληλουχίες τους, στατιστικά στοιχεία, πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή τους, θέσεις πρόσδεσης microRNAs αλλά και πληροφορίες για τη συντήρηση μεταξύ των οργανισμών. (Volders et al., 2013).



Εικόνα 18: Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων στην οποία με κόκκινο κύκλο φαίνεται το πλαίσιο που επιτρέπει την αναζήτηση των lncRNAs.

Επομένως, για κάθε lncRNA έγινε αναζήτηση με βάση το Name/ID ώστε να εντοπιστεί ένας κωδικός γνωστός ως Ensembl Gene ID, απαραίτητος για τα επόμενα στάδια της ανάλυσης, αλλά και για να εντοπιστεί βιβλιογραφία που δείχνει πιθανή συσχέτιση κάποιου lncRNA με την ανδρική υπογονιμότητα. Το Ensembl Gene ID είναι ένας κωδικός μοναδικός για το κάθε μετάγραφο ή γονίδιο που χρησιμοποιείται για εύκολη αναζήτηση τους σε διάφορες βάσεις δεδομένων.

Η ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων είναι <https://www.lncipedia.org/> και η αναζήτηση του κάθε lncRNA γίνεται από το πλαίσιο Search στο πάνω μέρος της σελίδας. Έπειτα, εμφανίζεται μια σελίδα με το αποτέλεσμα της αναζήτησης που επιτρέπει στο χρήστη να αντλήσει πρόσθετες πληροφορίες για το μετάγραφο ή το γονίδιο επιλέγοντας Transcript ID ή Gene ID αντίστοιχα. Γίνεται επιλογή του Transcript ID και τελικά εμφανίζεται μια ακόμη σελίδα στην οποία μπορεί να γίνει εντοπισμός του Ensembl Gene ID στην υποενότητα Basic Information των αποτελεσμάτων ενώ η σχετική με το lncRNA βιβλιογραφία βρίσκεται στην υποενότητα των αποτελεσμάτων Available literature.



Εικόνα 19: Παράδειγμα του τρόπου εμφάνισης αποτελεσμάτων αναζήτησης ενός lncRNA. Επιλέγοντας το Transcript ID ή Gene ID που απεικονίζονται με κόκκινα πλαίσια επιτρέπεται η εμφάνιση περισσότερων πληροφοριών.

Transcript: LINC02279:3

Basic information

LINCpedia transcript ID: LINC02279:3
HGNC Gene Symbol: LINC02279
HGNC Full Gene Name: long intergenic non-protein coding RNA 2279
Ensembl Gene ID: ENSG00000258933

Ensembl Transcript ID: ENST00000553435
Location (hg38): chr14:94960271-94962976
Strand: -
Class: intergenic
Sequence Ontology term: lincRNA
Transcript size: 737 bp
Exons: 5
Sources: Ensembl release 64 - Sep 2011; Gencode v13; Ensembl release 68 - Jul 2012; NONCODE v4; Ensembl release 75 - Feb 2014; Ensembl release 83 - Dec 2015; Ensembl release 87 - Dec 2016; Ensembl release 90 - Aug 2017; Ensembl release 92 - Apr 2018
Alternative transcript names: ENST00000553435.1; ENST00000553435.1; RP11-991C1.1-001; OTTHUMT00000414511.1; NONHSAT029410
Alternative gene names: ENSG00000258933; RP11-991C1.1; ENSG00000258933.1; OTTHUMG00000171626.1; LINC02279

RNA sequence:
GAAACCGAATATTGAAGAGATGGGAAATGGTGTGACCTGCACTGCCAATTCATGATGGCTCGAGCTCAGCTCAGTGTCTATAGTCTGACAAGGAACTGAG
GTTTGGAGTTAKCGACTTTCCTCTCTGATGATGATGACAAATCAGCTGTCTCTGGGCCACACCTGAGGCTCTAGGCACTGTCTCTGAGCAAGGCCAAGGC
GGGCTGCTGCTCTGGGCGAGCCACTGGGGGCTGTGGAGCTGTCTGCACTGAGGAGCTGGTATGAGTCTCTCTCCCGGGGAAATCACAAGAAATCTCCCAT
TTTCATCTCTCTGAGGACGCTCTCTCTAGAGAGGAGTCTCCCTGGGAGGATGCTAGGTCCCTGTGGACCTGGGAGTCTCTGGAGGATGTCCTCTCTCTCTCTCTGTC
GAAATCTCTCGGGTTATCCGCTCTGCGCAAGCCACCTCTGCTTCAATTCACCTGAAATATGCAACAGCAAAATCCACAACATTGACGGAACTCTGCAAGGTC
CAGAACCATGTTGAGGAATGGTCCACATTCCTCAATTTACCCTACTGTAATCTCAGAGGCCACTTTATCATTTCATTATAGAAATCCAGAGGATGAGAGGACTGTC
CAGGCAACTTGGCTAATAAAATTAATACCCGCAATTTATGGGCATCTACGA

Εικόνα 20: Παράδειγμα του τρόπου εμφάνισης αποτελεσμάτων με επιλογή του Transcript ID. Διακρίνεται η υποενότητα των αποτελεσμάτων Basic Information.

Structure:

Protein coding potential

Metric	Raw result	Interpretation
PRIDE reprocessing 2.0	0	non-coding
Lee translation initiation sites	0	non-coding
PhyloCSF score	-140.6242	non-coding
CPAT coding probability	9.86%	non-coding
Bazzini small ORFs	0	non-coding

In stringent set: yes

Locus conservation

Locus conservation? LINC02279:3 no no no no

Available literature
No linked literature available at this time.

Εικόνα 21: Παράδειγμα του τρόπου εμφάνισης αποτελεσμάτων με επιλογή του Transcript ID. Διακρίνεται η υποενότητα των αποτελεσμάτων Available literature.

9. Αλληλεπίδραση miRNAs-lncRNAs και συσχέτιση με ανδρική υπογονιμότητα

Σε αυτό το βήμα γίνεται εντοπισμός των miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs που έχουν επιλεγεί προηγουμένως, ώστε αυτά να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτη και να εντοπιστεί πιθανή συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα.

9.1. Εντοπισμός miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs με τη βάση δεδομένων DIANA tools-LncBase Predicted v.2.

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες ασχολούνται με το ρόλο των lncRNAs σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Έχει αποδειχθεί ότι τα lncRNAs μπορούν να συμβάλλουν έμμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με miRNAs. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδράσεις lncRNAs-miRNAs έχουν παρατηρηθεί τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Τα

lncRNAs συχνά, δρουν ως ‘σφουγγάρι’ που προσελκύει miRNAs τα οποία με τη σειρά τους στοχεύουν μεταγραφικούς παράγοντες. Ακόμη, σε άλλες περιπτώσεις, τα lncRNAs δεσμεύονται με miRNAs μειώνοντας την αλληλεπίδραση των δεύτερων με τους διάφορους στόχους τους, μεταξύ των οποίων συναντώνται και μεταγραφικοί παράγοντες (Paraskevoroulou et al., 2013). Επομένως, είναι πολύ πιθανό ορισμένα lncRNAs να εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με miRNAs.

Για να εντοπιστούν τα miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs που επιλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων DIANA tools-LncBase Predicted v.2. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων περιέχει αλληλεπιδράσεις που έχουν αποδειχθεί πειραματικά αλλά προσφέρει και τη δυνατότητα *in silico* πρόβλεψης των αλληλεπιδράσεων με βάση έναν αλγόριθμο που αναλύει την έκφραση miRNAs και lncRNAs σε διάφορους ιστούς, τη δομή των περιοχών αναγνώρισης miRNAs (miRNA recognition elements-MREs) αλλά και τη συντήρηση αυτών των περιοχών μεταξύ διαφορετικών ειδών (Paraskevoroulou et al., 2016).

Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων είναι: http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=lncbasev2%2Findex-predicted και η αναζήτηση γίνεται εισάγοντας το Ensembl Gene ID στο πλαίσιο lncRNA. Επίσης, στα πλαίσια της μελέτης, από την ενότητα Filters ορίστηκε Threshold 0.9, που αποτελεί το πιο αυστηρό κριτήριο για την εμφάνιση αποτελεσμάτων, ώστε να επιλεγθούν μόνο τα miRNAs με πολύ υψηλό σκορ πρόβλεψης αλληλεπίδρασης. Όσο μεγαλύτερο είναι το Threshold τόσο λιγότερα miRNAs που αλληλεπιδρούν εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της αναζήτησης. Στη σελίδα των αποτελεσμάτων εμφανίζεται μια λίστα με όλα τα miRNAs που αλληλεπιδρούν με πληροφορίες που αφορούν την αλληλουχία του miRNA, τη θέση πρόσδεσης αλλά και τη συντήρηση της περιοχής μεταξύ διαφόρων οργανισμών.

The screenshot shows the LncBase Predicted v.2 web interface. At the top, there is a search bar with 'miRNA' and 'lncRNA' tabs. The 'lncRNA' tab is active, and the search term 'ENSG00000226412' is entered. Below the search bar, there are filters for 'Threshold' (set to 0.9) and 'Cell Types'. The search results are displayed in a table with the following columns: Gene, miRNA, Score, and DIANA Links.

Gene	miRNA	Score	DIANA Links
RP11-476F14.1	hsa-miR-5699-5p	0.973	mT TB InE mP
RP11-476F14.1	hsa-miR-587	0.968	mT TB InE mP
RP11-476F14.1	hsa-miR-653-3p	0.924	mT TB InE mP
RP11-476F14.1	hsa-miR-3065-3p	0.917	mT TB InE mP

At the bottom of the interface, there is a footer with copyright information: © 2019 Univ. of Thessaly, Pasteur Institute & IMIS - "Athena" RC. It also mentions 'Google Analytics is On. To disable them click here.' and 'Powered by Yii Framework'.

Εικόνα 22: Παράδειγμα εμφάνιση αποτελεσμάτων στη DIANA tools-LncBase Predicted v.2.

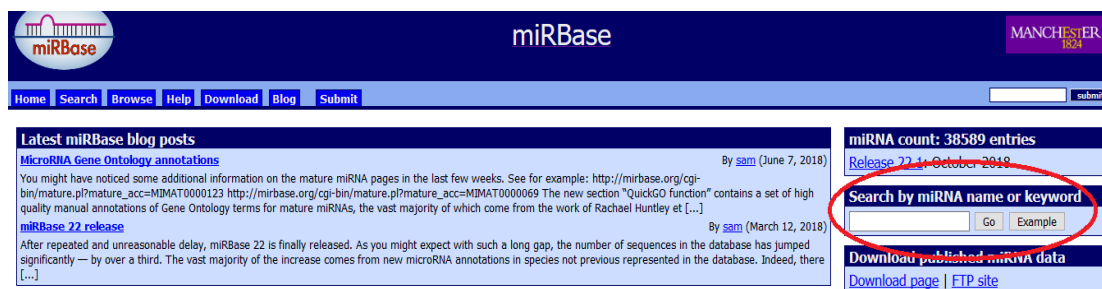
9.2. Διερεύνηση λειτουργιών miRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα

Για να μελετηθεί η πιθανή λειτουργία κάθε miRNA που αλληλεπιδρά με τα lncRNAs αλλά και να διαπιστωθεί αν εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην εμφάνιση υπογονιμότητας ή τη διαδικασία της σπερματογένεσης χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRBase.

Η miRBase είναι μια βάση δεδομένων που λειτουργεί από το 2002 και συγκεντρώνει ένα τεράστιο όγκο πληροφοριών που αφορούν τα miRNAs. Συγκεκριμένα, περιέχει 38.589 καταχωρήσεις miRNAs από 271 διαφορετικούς οργανισμούς. Εκτός από τις αλληλουχίες δίνονται επίσης πληροφορίες για τα πρόδρομα μόρια που απαιτούνται κατά τη βιογένεση των miRNAs, οι γονιδιωματικές συντεταγμένες, δεδομένα που αφορούν την έκφραση και προέρχονται από πειράματα αλληλούχισης και βιβλιογραφία σχετική με τα miRNAs. Ακόμη, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να μεταβεί σε άλλες βάσεις δεδομένων για κάθε miRNA που αναζητεί και αυτές αφορούν πρόσθετες πληροφορίες όπως τους πιθανούς στόχους των miRNAs (Kozomara et al., 2019).

Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων είναι η: <http://www.mirbase.org/> και η αναζήτηση γίνεται από το πλαίσιο Search by miRNA name or keyword στο πλαϊνό μέρος της σελίδας. Με το πλήκτρο Go εμφανίζεται η σελίδα των αποτελεσμάτων.

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, έγινε αναζήτηση των miRNAs που εντοπίστηκαν στο προηγούμενο στάδιο και μελέτη της βιβλιογραφίας που εμφανίζεται στην υποενότητα References των αποτελεσμάτων, ώστε να βρεθούν miRNAs που συσχετίζονται με τη διαδικασία της σπερματογένεσης ή την ανδρική υπογονιμότητα.



miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed *mir* in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed *miR*). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about the naming service.

To receive email notification of data updates and feature changes please subscribe to the [miRBase announcements mailing list](#). Any queries about the website or naming service should be directed at mirbase@manchester.ac.uk.

miRBase is managed by the [Griffiths-Jones lab](#) at the [Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester](#) with funding from the [BBSRC](#). miRBase was previously hosted and supported by the [Wellcome Trust Sanger Institute](#).

Εικόνα 23: Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων miRBase. Με κόκκινο κύκλο φαίνεται το πλαίσιο αναζήτησης.

10. Εντοπισμός των γονιδίων-στόχων των miRNAs και διερεύνηση πιθανής λειτουργίας τους που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα

Είναι γνωστό, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ότι τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω διαφόρων μηχανισμών. Μεταξύ αυτών, τα miRNAs δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων καθώς προσδένονται σε μόρια-στόχους mRNA και επάγουν την αποικοδόμησή τους ή εμποδίζουν τη μετάφρασή τους. Είναι επομένως ιδιαίτερα σημαντικό, να εντοπιστούν οι στόχοι των miRNAs, που αλληλεπιδρούν στη συγκεκριμένη περίπτωση με τα lncRNAs, και να διερευνηθεί αν κάποιος από αυτά στοχεύει το μετάγραφο γονιδίου που εμπλέκεται στη διαδικασία της σπερματογένεσης ή έχει αναφερθεί πιθανός ρόλος του στην ανδρική υπογονιμότητα.

10.1. Εύρεση γονιδίων-στόχων των miRNAs με miRTargetLinkHuman

Η miRTargetLinkHuman είναι μια βάση δεδομένων που παρέχει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων miRNAs και mRNAs στον άνθρωπο. Τα βιοχημικά και βιολογικά δίκτυα αποτελούσαν πάντα ένα βασικό εργαλείο για τις επιστήμες ζωής. Τη δυνατότητα δημιουργίας ενός τέτοιου δικτύου παρέχει η miRTargetLink Human.

Συγκεκριμένα, αναζήτηση στη βάση δεδομένων μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ένα μόνο μόριο miRNA ή mRNA ή πολλά ταυτόχρονα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας πληροφορίες από διάφορες βάσεις δεδομένων οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNAs και mRNAs παρουσιάζονται σε μορφή δικτύου. Προσφέρεται μάλιστα η δυνατότητα εύρεσης αλληλεπιδράσεων που έχουν αποδειχθεί πειραματικά και διακρίνονται σε ισχυρές και αδύναμες αλλά και η εύρεση προβλεπόμενων αλληλεπιδράσεων με βάση έναν αλγόριθμο. Ιδιαίτερα χρηστικός είναι ο τρόπος εμφάνισης και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων καθώς είναι πολύ εύκολο για το χρήστη να περιηγηθεί στους διάφορους στόχους και να εντοπίσει πώς αυτοί συνδέονται μεταξύ τους αλλά και με το μόριο αναζήτησης (Hamborg et al., 2016).

Στην υποενότητα Search by miRNA, ο χρήστης μπορεί να εισάγει τα δεδομένα του μεμονωμένα ή μαζικά και στη συνέχεια με το πλήκτρο Search εμφανίζεται η σελίδα των αποτελεσμάτων στην οποία αναφέρονται τα γονίδια τα οποία αλληλεπιδρούν ισχυρά με το miRNA, εκείνα που αλληλεπιδρούν αδύναμα αλλά και οι προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα συνοδεύει ένα οπτικοποιημένο δίκτυο που απεικονίζει όλες τις αλληλεπιδράσεις.

miRTargetLink Human offers detailed information on human microRNA-mRNA interactions in the form of interactive interaction networks. Perform a microRNA or target gene search in the search areas on the right to get started, or [view the manual](#).

Data and features

The interaction networks generated by miRTargetLink contain experimentally validated interactions as present in the latest version of miRTarBase¹ (Release 6.0, Sept. 15, 2015) as well as from in-house generated data. Next to these experimentally validated interactions, false positive interactions will be integrated into miRTargetLink. These are interactions that were experimentally verified not to participate in the predicted interaction. The data on these false leads will be of great value for researchers in genetics and related fields and is collected and continuously updated by the people of the Chair for Clinical Bioinformatics at the University of Saarland.

Networks

There are two types of networks that can be generated by miRTargetLink. Firstly, for single microRNA or gene queries it can generate an interaction landscape which is a 'one to many' visualization of the complete interaction library for that specific microRNA or Gene. This view shows information about the experimental support for each interaction in the landscape. Secondly, for queries with multiple microRNAs or genes it can generate a 'many

Search by microRNA

Interaction landscape for a single microRNA:

Example: hsa-let

Target-gene overlap between multiple microRNAs:

Example: let-7,hsa-miR-30,...

To view an example, leave fields empty and [click search](#)

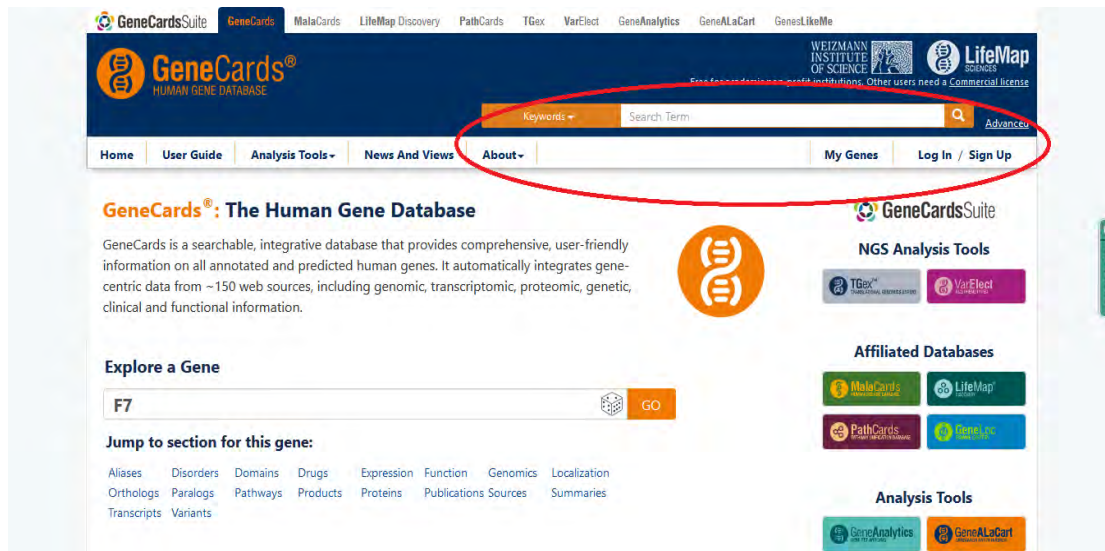
Εικόνα 24: Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων miRTargetLink Human. Στο δεξί μέρος της σελίδας και με κόκκινο πλαίσιο φαίνονται οι δυνατότητες αναζήτησης miRNAs που προσφέρονται (μεμονωμένα ή μαζικά).

Στην παρούσα εργασία, έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων miRTargetLink Human για τα miRNAs τα οποία σε προηγούμενο βήμα συσχετίστηκαν με τη διαδικασία της σπερματογένεσης ή την υπογονιμότητα με βάση τη βιβλιογραφία που προέκυψε. Αυτό έγινε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας ώστε να εξοικονομηθεί χρόνος, καθώς ο αριθμός των δεδομένων θα ήταν τεράστιος αν γίνονταν αναζήτηση για όλα τα miRNAs και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων θα ήταν εξαιρετικά χρονοβόρα. Επίσης, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε miRNA επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση μόνο γονίδια με ισχυρές και αποδεδειγμένες πειραματικά αλληλεπιδράσεις ώστε τα αποτελέσματα να είναι όσο τον δυνατόν πιο αξιόπιστα.

10.2. Διερεύνηση λειτουργίας των γονιδίων που στοχεύονται από τα miRNAs με GeneCards

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν κάποιο από τα mRNAs που στοχεύονται από τα miRNAs επηρεάζουν με κάποιο τρόπο την ανδρική γονιμότητα χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων GeneCards.

Η GeneCards είναι μια βάση δεδομένων που προσφέρει τεράστιο όγκο πληροφοριών για κάθε ανθρώπινο γονίδιο. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την αναζήτηση είναι οργανωμένα σε υποενότητες ώστε να γίνεται εύκολη πλοήγηση σε αυτά και να είναι όσο το δυνατόν πιο κατανοητά. Ακόμη, οι πληροφορίες που προσφέρονται για κάθε γονίδιο προκύπτουν από το συνδυασμό δεδομένων περίπου 150 διαφορετικών πηγών και αφορούν δεδομένα πρωτεομικής, μεταγραφομικής, λειτουργικές πληροφορίες, κλινικές κ.α. (Stelzer et al., 2016).



Εικόνα 25: Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων GeneCards. Με κόκκινο κύκλο φαίνεται το πλαίσιο αναζήτησης.

Η αναζήτηση του επιθυμητού γονιδίου γίνεται από το πλαίσιο στο πάνω μέρος της σελίδας και στη συνέχεια, από τη σελίδα των αποτελεσμάτων, μπορεί κανείς εύκολα να μεταβεί στις πληροφορίες που τον ενδιαφέρουν ή να πλοηγηθεί σε όλες συνολικά.

Συγκεκριμένα, έγινε αναζήτηση στη GeneCards για καθένα από τα γονίδια που εντοπίστηκε ότι αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα miRNAs και στη συνέχεια από την υποενότητα των αποτελεσμάτων Publications και Summaries εντοπίστηκαν γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα σε διάφορες δημοσιεύσεις και καταγράφηκε ο ρόλος των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας chip της Illumina. Συγκεκριμένα, έγιναν γονοτυπήσεις σε δύο plates κι έτσι προέκυψαν δύο διαφορετικά αρχεία με τα αποτελέσματα γονοτύπησης για κάθε plate. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται πληροφορίες για τα δύο αρχεία που περιλαμβάνουν τα αποτελέσματα της γονοτύπησης, σχετικά με τον αριθμό των δειγμάτων, τον αριθμό cases-controls καθώς και τον αριθμό των SNPs που γονοτυπήθηκαν.

Πίνακας 2: Απεικόνιση πληροφοριών που αφορούν τα δύο αρχεία των αποτελεσμάτων γονοτύπησης.

Όνομα αρχείου (.map, .ped)	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός cases	Αριθμός controls	Αριθμός SNPs
<i>GSA1pheno</i>	96	52	44	692.368
<i>GSA2pheno</i>	96	48	48	692.366

Όπως παρατηρείται, τα δύο αρχεία έχουν ίδιο αριθμό δειγμάτων και περίπου ίδιο αριθμό controls και cases ώστε να υπάρχει ίση αντιπροσώπευση από τις δύο ομάδες και τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από τη μελέτη να είναι αξιόπιστα. Ο αριθμός των SNPs που γονοτυπήθηκαν είναι επίσης ίδιος στα δύο αρχεία.

2. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK

Για να γίνει η ανάλυση των αποτελεσμάτων των δύο παραπάνω αρχείων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PLINK που με κατάλληλες εντολές επεξεργάζεται αρχεία MAP και PED, εξάγει τα επιθυμητά αποτελέσματα και πραγματοποιεί αναλύσεις.

2.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης

Προκειμένου να γίνει πιο εύκολη η ανάλυση, έγινε ένωση των δεδομένων των δύο αρχείων (*GSA1pheno*, *GSA2pheno*) σε ένα ενιαίο αρχείο που ονομάστηκε *GSAmerged* με χρήση της εντολής - *-plink - -merge*.

Το αρχείο *GSAmerged* περιέχει τελικά τα αποτελέσματα γονοτύπησης για 192 δείγματα και πιο συγκεκριμένα, 100 cases και 92 controls.

Σε όλα τα στάδια της ανάλυσης που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε αυτό το αρχείο.

2.2. Quality control

Ο στόχος μιας ανάλυσης συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος είναι να υπολογιστούν οι διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε cases και controls, ώστε να εντοπιστούν SNPs που συνεισφέρουν στο φαινότυπο. Καθώς όμως μελετώνται πάρα πολλά

δείγματα και χιλιάδες πολυμορφισμοί προκειμένου να εντοπιστούν SNPs που το καθένα επιδρά σε μικρό βαθμό στην εμφάνιση του χαρακτηριστικού, ακόμη και μικρές ‘τεχνητές’ διαφορές στις συχνότητες αλληλομόρφων, που οφείλονται σε κακή ποιότητα δείγματος ή λάθη κατά τη γονοτύπηση, μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα και λανθασμένες συσχετίσεις. Επομένως, για να εξασφαλιστεί η ποιότητα των δεδομένων, προηγείται της ανάλυσης το στάδιο του quality control.

Συγκεκριμένα, με χρήση των κατάλληλων εντολών του PLINK αφαιρέθηκαν τα δείγματα για τα οποία έλειπε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% των γονοτύπων από το σύνολο των SNPs που γονοτυπήθηκαν, αφαιρέθηκαν τα πολύ σπάνια αλληλόμορφα που απαιτούν τεράστιο αριθμό δειγμάτων για να προκύψουν σωστές συσχετίσεις και αφαιρέθηκαν SNPs που γονοτυπήθηκαν σε λιγότερο από 99% των δειγμάτων.

Έτσι, προέκυψε το αρχείο GSA_QC με αποτελέσματα γονοτύπησης για 159 δείγματα, 83 cases και 76 controls, και 308.495 SNPs.

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

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

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Fri Jun 14 11:56:17 2019

Options in effect:
  --file GSA_QC

308495 (of 308495) markers to be included from [ GSA_QC.map ]
159 individuals read from [ GSA_QC.ped ]
159 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
83 cases, 76 controls and 0 missing
159 males, 0 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 308495 SNPs
159 founders and 0 non-founders found
948 heterozygous haploid genotypes; set to missing
Writing list of heterozygous haploid genotypes to [ plink.hh ]
Total genotyping rate in remaining individuals is 0.996399
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 308495 SNPs
After filtering, 83 cases, 76 controls and 0 missing
After filtering, 159 males, 0 females, and 0 of unspecified sex

Analysis finished: Fri Jun 14 11:57:32 2019
```

Εικόνα 26: Άνοιγμα αρχείου GSA_QC με PLINK.

Παρατηρείται ότι ο αριθμός δειγμάτων cases και controls εξακολουθεί να είναι περίπου ίδιος, άρα οι δυο ομάδες αντιπροσωπεύονται εξίσου, ενώ ο αριθμός των SNPs μειώθηκε περίπου στο μισό. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να αποτελεί έναν ικανοποιητικό αριθμό για την πραγματοποίηση της ανάλυσης και την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

2.3. Ανάλυση συσχέτισης – Association Analysis

Εφόσον εξασφαλίστηκε η ποιότητα των δεδομένων με το στάδιο του Quality Control, ακολούθησε η συσχέτιση ανάλυσης που βασίζεται στη δοκιμασία χ^2 για να συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε control και cases για κάθε SNP.

Το αρχείο που προέκυψε από την ανάλυση δίνει τις συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε SNP σε controls και cases, την τιμή του χ^2 αλλά και τις τιμές p -

value και odd ratio. Από το συγκεκριμένο αρχείο επιλέχθηκαν SNPs με $p\text{-value} \leq 0.05$ και $\text{odd ratio} > 1$. Το $p\text{-value}$ αποτελεί δείκτη στατιστικής σημαντικότητας και το odd ratio μέτρο της δύναμης της συσχέτισης. Τα SNPs που επιλέχθηκαν με βάση αυτά τα κριτήρια φαίνονται στον Πίνακα 13 του Παραρτήματος.

Όπως παρατηρείται, ο αριθμός των SNPs που επιλέχθηκαν είναι περίπου 860 από το σύνολο των 308.495 που συμπεριλαμβάνονταν στην ανάλυση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα κριτήρια $p\text{-value}$ και odd ratio, ώστε να μην προκύψει τεράστιος όγκος δεδομένων για επεξεργασία στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας αλλά ταυτόχρονα ο αριθμός τους να είναι ικανοποιητικός για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.

3. Annotation των SNPs με SNPnexus

Το επόμενο στάδιο είχε ως στόχο την επιλογή των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) οι οποίοι βρίσκονται σε περιοχές ενδιαφέροντος. Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, αντικείμενο μελέτης αποτελούν τα lncRNAs, άρα οι περιοχές που κωδικοποιούν για αυτά.

Προκειμένου να γίνει επιλογή των SNPs χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων SNPnexus που προσφέρει πληροφορίες που αφορούν την επίδραση κάθε SNP σε επίπεδο μεταγράφου ή πρωτεϊνικό επίπεδο, δεδομένα HarMap, βιβλιογραφία που συσχετίζει τους πολυμορφισμούς με συγκεκριμένο φαινότυπο ή ασθένεια κ.α.

Επομένως, έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων για τα 860 περίπου SNPs που επιλέχθηκαν παραπάνω και από το αρχείο αποτελεσμάτων SNPnexus-Overlapped or Nearest Genes επιλέχθηκαν τα SNPs που βρίσκονται σε περιοχές από τις οποίες προκύπτουν lncRNAs. Συγκεκριμένα, πρόκειται για 92 SNPs που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Η επιλογή τους με βάση αυτά τα κριτήρια έγινε και πάλι προκειμένου να προκύψει ικανοποιητικός αριθμός αποτελεσμάτων για εξαγωγή συμπερασμάτων, αλλά όχι και πολύ μεγάλος προκειμένου να διεξαχθεί η ανάλυση στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας.

Πίνακας 3: Πίνακας των SNPs που βρίσκονται σε περιοχή ενδιαφέροντος (lncRNAs).

SNPs	
rs11016279	rs16825349
rs6481863	rs816884
rs7914587	rs13405989
rs11812097	rs10495699
rs4765481	rs17574702
rs12425149	rs4674431
rs10878327	rs1424341
rs12309527	rs11892518

rs7960972	rs1517240
rs331984	rs2729324
rs9315332	rs7648418
rs1458276	rs369145
rs9572694	rs115913570
rs960621	rs13152779
rs75561824	rs116669694
rs7334899	rs11099266
rs538034	rs295240
rs9544122	rs73871504
rs17529436	rs12507442
rs10141127	rs7690576
rs11848918	rs6825814
rs74078723	rs13127970
rs234604	rs3109166
rs74377316	rs59714449
rs17705275	rs62390587
rs34387846	rs77726272
rs4307931	rs10057544
rs80112443	rs58485094
rs9925381	rs17165277
rs883794	rs6931622
rs3924409	rs1247000
rs237291	rs17460313
rs9890751	rs41502546
rs11081188	rs4566937
rs1012680	rs11765437
rs7529824	rs77064312
rs1890734	rs1354365
rs76237371	rs2565116
rs12732389	rs10982910
rs10779404	rs10756497
rs6663920	rs1888109
rs72672087	rs11793053
rs17105542	rs423826
rs6047591	rs4933145

rs6027995	rs12843591
rs2824534	rs7876156

Ακόμη, οι άλλες παράμετροι που περιγράφονται στα υλικά και μέθοδοι δεν οδήγησαν σε κάποιο αποτέλεσμα καθώς δεν βρέθηκαν SNPs που να επιδρούν άμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων αλλά ούτε και βιβλιογραφία που να συσχετίζει κάποιο SNP με την ανδρική υπογονιμότητα.

4. Διερεύνηση λειτουργιών lncRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα

Στη συνέχεια, για να διερευνηθεί η λειτουργία των lncRNAs, στα οποία βρέθηκαν SNPs στο προηγούμενο στάδιο, και να εντοπιστούν αυτά με πιθανό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης ώστε να μελετηθούν περαιτέρω, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων LNCipedia version 5.2.

Συγκεκριμένα, έγινε αναζήτηση για καθένα από τα 92 lncRNAs με βάση το Name/ID, που προέκυψε από το αρχείο αποτελεσμάτων της βάσης δεδομένων SNP Nexus, ώστε να βρεθούν τα Ensembl Gene ID και βιβλιογραφία σχετική με τη σπερματογένεση ή την ανδρική υπογονιμότητα. Το Ensembl Gene ID αποτελεί έναν μοναδικό κωδικό για κάθε μετάγραφο ο οποίος απαιτείται για τα επόμενα στάδια της ανάλυσης.

Από την αναζήτηση στη βάση δεδομένων LNCipedia, όπως αναφέρεται παραπάνω, προέκυψε ως αποτέλεσμα η εξής αντιστοίχιση lncRNA-Ensembl Gene ID:

Πίνακας 4: Εμφάνιση αποτελεσμάτων αναζήτησης στη βάση δεδομένων LNCipedia με βάση το Name/ID για εύρεση του Ensembl Gene ID.

SNP	Name/ID	Ensembl Gene ID
rs11016279	RP11-264E18.1	ENSG00000234640
rs6481863	RP11-476F14.1	ENSG00000226412
rs7914587	RP11-482E14.2	ENSG00000236892
rs11812097	RP11-482E14.2	ENSG00000236892
rs4765481	RP11-983C2.3	ENSG00000256286
rs12425149	RP11-766N7.4	ENSG00000248995
rs10878327	RP11-221N13.4	ENSG00000256915
rs12309527	RP11-384P14.1	ENSG00000257124
rs7960972	RP11-384P14.1	ENSG00000257124
rs331984	LINC00399	ENSG00000229792
rs9315332	LINC01072	ENSG00000236076
rs1458276	LINC00558	ENSG00000261517
rs9572694	LINC00348	ENSG00000226846
rs960621	LINC00347	ENSG00000236678
rs75561824	LINC00347	ENSG00000236678
rs7334899	LINC00347	ENSG00000236678
rs538034	LINC01078	ENSG00000223880
rs9544122	LINC01034	ENSG00000224933

rs17529436	RP11-384J4.2	ENSG00000258081
rs10141127	RP11-1141N12.1	ENSG00000258496
rs11848918	LINC00642	ENSG00000233208
rs74078723	RP11-991C1.1	ENSG00000258933
rs234604	RP11-433J8.1	ENSG00000258702
rs74377316	RP11-30G8.1	ENSG00000258853
rs17705275	RP11-475A13.1	ENSG00000259737
rs34387846	RP11-358L4.1	ENSG00000261712
rs4307931	CTD-2544M6.1	ENSG00000259199
rs80112443	RP11-523L20.1	ENSG00000260450
rs9925381	RP11-7O14.1	ENSG00000260057
rs883794	RP11-542M13.2	ENSG00000269667
rs3924409	RP11-542M13.2	ENSG00000269667
rs237291	RP11-471L13.2	ENSG00000265400
rs9890751	CTB-75G16.3	ENSG00000267067
rs11081188	CTD-3096M3.1	ENSG00000264254
rs1012680	RP11-389J22.3	ENSG00000263622
rs7529824	RP5-968D22.3	ENSG00000237658
rs1890734	RP11-309G3.3	ENSG00000272198
rs76237371	RP11-316I3.1	ENSG00000237283
rs12732389	RP11-302I18.3	ENSG00000226927
rs10779404	RP11-302I18.3	ENSG00000226927
rs6663920	RP11-5P4.3	ENSG00000229225
rs72672087	RP11-550H2.2	ENSG00000230027
rs17105542	RP5-887A10.1	ENSG00000234184
rs6047591	RP11-128M1.1	ENSG00000226644
rs6027995	RP11-151E14.1	ENSG00000261035
rs2824534	CHODL-AS1	ENSG00000231755
rs16825349	AC079163.1	ENSG00000226218
rs816884	AC016682.1	ENSG00000230645
rs13405989	AC113608.1	ENSG00000237326
rs10495699	AC019055.1	ENSG00000235911
rs17574702	RP11-256I23.3	ENSG00000267919
rs4674431	AC009502.4	ENSG00000227308
rs1424341	AC068489.1	ENSG00000234446
rs11892518	AC010729.2	ENSG00000236106
rs1517240	RP11-788A4.1	ENSG00000244545
rs2729324	RP11-204C23.1	ENSG00000225044
rs7648418	AC116035.1	ENSG00000227260
rs369145	RP11-520A21.1	ENSG00000233096
rs115913570	RP11-61G19.1	ENSG00000249334
rs13152779	RP11-61G19.1	ENSG00000249334
rs116669694	RP11-422J15.1	ENSG00000249618
rs11099266	RP11-427M20.1	ENSG00000251388
rs295240	RP11-6C14.1	ENSG00000250488
rs73871504	RP11-294O2.2	ENSG00000248771
rs12507442	RP11-576E20.1	ENSG00000250819
rs7690576	RP11-665I14.1	ENSG00000249882
rs6825814	RP11-103J17.2	ENSG00000261761

rs13127970	LINC00989	ENSG00000250334
rs3109166	RP11-234K19.1	ENSG00000251399
rs59714449	CTD-2143L24.1	ENSG00000249781
rs62390587	CTC-281M20.1	ENSG00000204754
rs77726272	RP11-774D14.1	ENSG00000251629
rs10057544	CTD-2007H13.3	ENSG00000248489
rs58485094	LINC01013	ENSG00000228495
rs17165277	RP5-933K21.3	ENSG00000271040
rs6931622	RP3-495K2.3	ENSG00000225879
rs1247000	RP11-428J1.4	ENSG00000271978
rs17460313	AC068610.5	ENSG00000233607
rs41502546	AC068610.5	ENSG00000233607
rs4566937	AC006458.3	ENSG00000227489
rs11765437	AC005022.1	ENSG00000224017
rs77064312	RP11-369K17.1	ENSG00000253619
rs1354365	RP11-157E21.1	ENSG00000253593
rs2565116	CTA-392C11.2	ENSG00000253354
rs10982910	RP11-284G10.1	ENSG00000228714
rs10756497	RP11-536O18.1	ENSG00000226197
rs1888109	RP11-321L2.2	ENSG00000237414
rs11793053	RP11-397D12.4	ENSG00000224648
rs423826	AC004070.1	ENSG00000231110
rs4933145	RP13-297E16.5	ENSG00000234622
rs12843591	RP11-524P6.1	ENSG00000233103
rs7876156	RP11-571E6.3	ENSG00000203402

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρώτη στήλη με τον κωδικό που είναι μοναδικό για κάθε SNP, προέκυψε από προηγούμενα στάδια της ανάλυσης αλλά χρησιμοποιήθηκε στον πίνακα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ lncRNA και μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) και να είναι πιο εύκολος στο τέλος της ανάλυσης ο εντοπισμός των πολυμορφισμών που πιθανόν συσχετιστούν με το φαινότυπο, αν διαπιστωθεί ότι κάποιο από τα lncRNA εμπλέκεται στη διαδικασία της σπερματογένεσης και το μηχανισμό εμφάνισης της ανδρικής υπογονιμότητας.

Ακόμη, από την αναζήτηση για τον εντοπισμό βιβλιογραφίας στην ίδια βάση δεδομένων δεν προέκυψε κανένα αποτέλεσμα, δηλαδή για κανένα από τα lncRNA δεν υπάρχει δημοσιευμένη μελέτη που να αποδεικνύει την εμπλοκή τους ή το ρόλο τους στη διαδικασία της σπερματογένεσης και της ανδρικής υπογονιμότητας. Τα χαμηλά ποσοστά συντήρησης των lncRNA μεταξύ των ειδών καθιστούν δύσκολη τη μελέτη τους εξαιτίας της έλλειψης οργανισμών-μοντέλων. Επίσης, όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, η ανακάλυψη της λειτουργίας ενός lncRNA σε έναν οργανισμό σπάνια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων σε άλλον οργανισμό. Επομένως, παρόλο που είναι γνωστός μεγάλος αριθμός lncRNA, πολύ λίγα από αυτά έχουν μελετηθεί λειτουργικά.

5. Αλληλεπίδραση miRNAs-lncRNAs και συσχέτιση με ανδρική υπογονιμότητα

Εφόσον στο προηγούμενο βήμα δεν βρέθηκε για κάποιο lncRNA βιβλιογραφία σχετική με την ανδρική υπογονιμότητα, έγινε η υπόθεση ότι τα lncRNAs μπορεί να εμπλέκονται στο μηχανισμό της σπερματογένεσης και της εμφάνισης υπογονιμότητας έμμεσα, μέσω δηλαδή αλληλεπίδρασής τους με miRNAs που αποτελούν ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων με διάφορους μηχανισμούς.

5.1. Εντοπισμός miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs με τη βάση δεδομένων DIANA tools-LncBase Predicted v.2.

Όπως αναφέρεται αναλυτικά στην εισαγωγή, τα lncRNAs αλληλεπιδρούν συχνά με τα miRNAs και συμβάλλουν έμμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων.

Για τον εντοπισμό των miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα 92 lncRNAs, που προέκυψαν από προηγούμενο βήμα, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων DIANA tools-LncBase Predicted v.2. Χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο που συνυπολογίζει πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες, η βάση δεδομένων κάνει *in silico* πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται. Συγκεκριμένα, έγινε αναζήτηση για καθένα από τα 92 lncRNAs και χρησιμοποιήθηκε ιδιαίτερα αυστηρό Filter Threshold (0.9) ώστε να βρεθούν τα miRNAs που αλληλεπιδρούν με αυτά και εμφανίζουν υψηλό σκορ αλληλεπίδρασης. Η αναζήτηση έγινε με βάση το Ensembl Gene ID που προέκυψε σε προηγούμενο βήμα.

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης συγκεντρώνονται στον Πίνακα 14 του Παραρτήματος, ο οποίος περιλαμβάνει όλες τις αλληλεπιδράσεις που εντοπίστηκαν. Ο αριθμός των miRNAs είναι αρκετά μεγάλος καθώς περίπου 1000 miRNAs βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs. Ορισμένα lncRNAs δεν εντοπίστηκαν καθόλου στη βάση δεδομένων άρα δεν προέκυψε αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης.

5.2. Διερεύνηση λειτουργιών miRNAs και του ρόλου τους στην ανδρική υπογονιμότητα

Στη συνέχεια, για να μελετηθεί η πιθανή λειτουργία κάθε miRNA που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τα lncRNAs αλλά και να διαπιστωθεί αν εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην εμφάνιση υπογονιμότητας ή τη διαδικασία της σπερματογένεσης, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRBase. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων συγκεντρώνει πληροφορίες που αφορούν τη δομή των miRNAs, την αλληλουχία τους, πιθανούς στόχους των miRNAs, σχετική βιβλιογραφία κ.α.

Συγκεκριμένα, έγινε αναζήτηση για καθένα από τα 1000 miRNAs που εντοπίστηκαν παραπάνω ώστε να βρεθούν δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν τη συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα, τη διαδικασία της σπερματογένεσης ή γενικότερα το ρόλο τους στην αναπαραγωγική διαδικασία.

Έτσι, εντοπίστηκαν 7 δημοσιευμένες μελέτες σχετικές με το θέμα αναζήτησης, στις οποίες αναφέρονταν περίπου 90 από τα 1000 miRNAs που αναζητήθηκαν. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά παρακάτω.

1) Άρθρο 1: Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes

Πίνακας 5: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000226412	hsa-miR-5699-5p
	hsa-miR-653-3p
ENSG00000248995	hsa-miR-410-3p
ENSG00000261517	hsa-miR-6720-5p
	hsa-miR-3192-3p
ENSG00000236678	hsa-miR-7154-5p
	hsa-miR-579-3p
	hsa-miR-190a-5p
	hsa-miR-579-3p
ENSG00000258081	hsa-miR-7161-3p
ENSG00000233208	hsa-miR-520g-5p
ENSG00000259737	hsa-miR-7156-5p
	hsa-miR-208a-5p
	hsa-miR-656-3p
	hsa-miR-670-3p
ENSG00000259199	hsa-miR-7160-3p
	hsa-miR-1296-5p
ENSG00000260450	hsa-miR-181d-5p
	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-670-3p
ENSG00000237658	hsa-miR-7161-5p
ENSG00000237283	hsa-miR-653-3p
ENSG00000226927	hsa-miR-653-3p
	hsa-miR-1180-5p
	hsa-miR-7156-3p
ENSG00000234184	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-370-3p
ENSG00000261035	hsa-miR-891a-3p
	hsa-miR-7152-5p
ENSG00000226218	hsa-miR-7152-5p
ENSG00000249334	hsa-miR-1288-3p
ENSG00000249618	hsa-miR-942-5p
	hsa-miR-597-3p
ENSG00000251388	hsa-miR-7160-5p
ENSG00000248771	hsa-miR-1301-3p
	hsa-miR-1301-3p
	hsa-miR-651-3p
	hsa-miR-651-3p

	hsa-miR-520f-5p
ENSG00000250334	hsa-miR-7160-5p
	hsa-miR-597-5p
	hsa-miR-889-3p
	hsa-miR-548f-3p
ENSG00000249781	hsa-miR-7153-5p
ENSG00000251629	hsa-miR-670-3p
ENSG00000228495	hsa-miR-7156-5p
	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-7160-5p
ENSG00000271040	hsa-miR-1298-5p
ENSG00000225879	hsa-miR-7160-3p
ENSG00000271978	hsa-miR-597-3p
	hsa-miR-889-3p
	hsa-miR-7152-5p
	hsa-miR-7152-5p
ENSG00000224017	hsa-miR-7159-5p
	hsa-miR-7156-5p
ENSG00000253619	hsa-miR-3192-5p
ENSG00000253593	hsa-miR-5699-3p
ENSG00000231110	hsa-miR-942-5p
ENSG00000233103	hsa-miR-580-5p
	hsa-miR-1252-3p
ENSG00000203402	hsa-miR-370-3p
	hsa-miR-7161-5p

Στο συγκεκριμένο άρθρο μελετήθηκε η εξέλιξη των microRNAs στα θηλαστικά χρησιμοποιώντας δεδομένα RNA sequencing από έξι διαφορετικά είδη. Τα miRNAs που φαίνονται στον πίνακα και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs, όπως προέκυψε στο προηγούμενο βήμα, συμπεριλαμβάνονταν σε αυτή τη μελέτη.

Έτσι, από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψε ότι η πυκνότητα των miRNA γονιδίων είναι πολύ υψηλότερη στο χρωμόσωμα X σε σχέση με τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Επίσης, αυτά τα miRNAs οργανώνονται σε 'συστοιχίες' (clusters) και συναντώνται σε πολλά αντίγραφα καθώς εξελίχθηκαν γρήγορα μέσω γονιδιακών διπλασιασμών. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα miRNAs στο χρωμόσωμα X επεκτάθηκαν μέσω πολλών ανεξάρτητων γεγονότων διπλασιασμού. Τα συγκεκριμένα miRNAs παρουσιάζουν ακόμη πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης στους όρχεις συγκριτικά με άλλες κατηγορίες miRNAs. Τα ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασής τους στα σπερματοκύτταρα επιβεβαιώνουν ευρήματα που προέκυψαν από άλλες μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι οικογένειες γονιδίων που επεκτάθηκαν μέσω γονιδιακού διπλασιασμού καταφέρνουν να αποφύγουν τη μεταγραφική σίγηση και συνεχίζουν να εκφράζονται παρά τη μειωτική απενεργοποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων (MSCI).

Προκύπτει επομένως, ότι τα παραπάνω miRNAs που εντοπίστηκαν ως στόχοι των μελετώμενων lncRNAs, εξελίχθηκαν μέσω γονιδιακών διπλασιασμών και τελικά η ύπαρξη

πολλών αντιγράφων τους δίνει τη δυνατότητα να ‘ξεφεύγουν’ από το MSCI πιθανόν εξαιτίας του σημαντικού τους ρόλου στη διαδικασία της σπερματογένεσης μέσω της ρύθμισης απαραίτητων γονιδίων (Meunier et al., 2013).

2) Άρθρο 2: Rapid evolution of an X-linked microRNA cluster in primates

Πίνακας 6: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000256286	hsa-miR-513c-5p
ENSG00000258702	hsa-miR-513b-5p
	hsa-miR-513c-3p
ENSG00000260450	hsa-miR-513b-5p
ENSG00000237283	hsa-miR-513c-5p
ENSG00000226218	hsa-miR-513c-3p
ENSG00000227308	hsa-miR-513c-5p
ENSG00000233607	hsa-miR-513c-5p
ENSG00000227489	hsa-miR-513c-3p

Το άρθρο μελετά δύο ‘συστοιχίες’ (clusters) miRNA στα πρωτεύοντα για τις οποίες παρατηρήθηκε ότι συναντώνται αντίγραφα τα οποία δεν διαθέτουν τα τρωκτικά και ο σκύλος, πιθανόν λόγω επέκτασης αυτών των οικογενειών miRNA κατά τη διάρκεια της εξέλιξης στα πρωτεύοντα. Το ένα από τα δύο cluster βρίσκεται στο X χρωμόσωμα και περιλαμβάνει 10 miRNAs τα οποία εκφράζονται κυρίως στους όρχεις. Τα πολλαπλά αντίγραφα προέκυψαν μέσω διπλασιασμών και φαίνεται ότι είναι σχεδόν όλα λειτουργικά και όχι ψευδογονίδια. Επίσης, παρατηρείται αυξημένος ρυθμός σημειακών μεταλλάξεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων miRNAs. Όσον αφορά το διπλασιασμένο αντίγραφο, πρόβλεψη των γονιδίων-στόχων τους έδειξε ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση καθώς στοχεύουν λιγότερα γονίδια από το αρχικό. Τα νέα γονίδια-στόχοι είναι επίσης διαφορετικά από τα αρχικά.

Ακόμη, η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs σε ενήλικες μαϊμούδες και βρέφη έδειξε ότι σχεδόν όλα τα miRNAs εκφράζονταν σε υψηλά επίπεδα στα βρέφη ενώ στα ενήλικα άτομα η έκφραση μειωνόταν σημαντικά. Άρα, τα συγκεκριμένα miRNAs πιθανόν παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στις διαδικασίες της σπερματογένεσης και της ανάπτυξης των όρχεων.

Επομένως, τα miRNAs του πίνακα συσχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα και έχουν υποστεί μια σειρά από προσαρμοστικές αλλαγές λόγω της φυσικής επιλογής, οι οποίες συνεισφέρουν στην εμφάνιση λειτουργικών καινοτομιών στη διάρκεια της εξέλιξης (Zhang et al., 2007).

3) Άρθρο 3: Deep sequencing analysis of small non-coding RNAs reveals the diversity of miRNAs and piRNAs in the human epididymis

Πίνακας 7: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000261517	hsa-miR-6720-5p
ENSG00000236678	hsa-miR-6509-3p
ENSG00000233208	hsa-miR-6719-3p
ENSG00000258702	hsa-miR-6718-5p
ENSG00000259737	hsa-miR-6515-3p
ENSG00000231755	hsa-miR-6515-5p
ENSG00000250819	hsa-miR-6715a-3p
ENSG00000261761	hsa-miR-6716-5p
ENSG00000204754	hsa-miR-6515-5p

Η επιδιδυμίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, τη μεταφορά και την αποθήκευση. Τα non-coding RNAs επίσης, ρυθμίζουν μια σειρά από διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες και εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις κυρίως εξαιτίας του ρόλου της στη ρύθμιση γονιδίων. Επομένως, προκειμένου να διευκρινιστούν καλύτερα οι μηχανισμοί της υπογονιμότητας και της σπερματογένεσης είναι πολύ σημαντικό αρχικά να ταυτοποιηθούν τα miRNAs που εκφράζονται στην επιδιδυμίδα, ώστε να διερευνηθούν στη συνέχεια διάφορα ρυθμιστικά δίκτυα που αφορούν την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και την αποθήκευσή τους. Η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση αυτών των miRNAs με χρήση τεχνολογίας αλληλούχισης νέας γενιάς. Με αυτή τη μέθοδο, εντοπίστηκαν 527 συντηρημένα miRNAs και 18 νέα miRNAs τα οποία πιθανόν εμπλέκονται στην ανδρική αναπαραγωγή.

Επομένως, τα miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs, εκφράζονται στην επιδιδυμίδα και πιθανόν συμμετέχουν σε διαδικασίες που αφορούν την ωρίμανση και την αποθήκευση των σπερματοζωαρίων (Li et al., 2012).

4) Άρθρο 4: Spermatogenesis in humans and its affecting factors

Πίνακας 8: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000236678	hsa-miR-429
ENSG00000260450	hsa-miR-181a-5p
ENSG00000250819	hsa-miR-6715a-3p

Το άρθρο αναφέρεται στη διαδικασία της σπερματογένεσης και την πολυπλοκότητα που τη χαρακτηρίζει. Συγκεκριμένα, υπογραμμίζει ότι επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς, όσο και από γενετικούς παράγοντες, ενώ ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να παίζουν τα miRNAs. Τα παραπάνω είναι τα πιο μελετημένα miRNAs στην περίπτωση της ανδρικής

υπογονιμότητας και εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες όπως είναι η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των σπερματοκυττάρων. Ειδικότερα, το hsa-miR-513a-5p εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης (Tenorio et al., 2016).

- 5) Άρθρο 5: Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p

Πίνακας 9: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000236678	hsa-miR-429
ENSG00000250819	hsa-miR-34b-3p

Το άρθρο αυτό μελετά το προφίλ των miRNAs στο σπερματικό υγρό των ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA). Μελετήθηκε πλήθος miRNAs αλλά από τα αποτελέσματα της έρευνας προκύπτει ότι τα συγκεκριμένα miRNAs είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε ασθενείς με NOA κι επομένως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της ασθένειας. Ελέγχθηκε μάλιστα η ευαισθησία και η εξειδίκευση της μεθόδου και διαπιστώθηκε ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους βιοδείκτες.

Συγκεκριμένα, για να διερευνηθεί η πιθανή λειτουργία τους εντοπίστηκαν τα γονίδια-στόχοι τους. Στη συνέχεια, πειράματα υπερέκφρασης τους έδειξαν ότι επηρεάζονται κυρίως γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση των γαμετικών κυττάρων. Επηρεάστηκαν κυρίως τα *Rb1*, *Cbl*, *Tgfβ2* και *Pik3r3*. Παρόλα αυτά, απαιτείται μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και περαιτέρω έρευνα της λειτουργίας τους σε ζωικά μοντέλα προκειμένου να εκτιμηθεί η αξία τους ως βιοδείκτες. (Wu et al., 2013).

- 6) Άρθρο 6: Altered profile of Seminal Plasma MicroRNAs in the Molecular Diagnosis of Male Infertility

Πίνακας 10: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000260450	hsa-miR-181a-5p
ENSG00000271978	hsa-miR-513a-5p

Η συγκεκριμένη έρευνα μελετά το προφίλ των miRNAs στο σπερματικό υγρό ανδρών με υπογονιμότητα και αξιολογεί τη διαγνωστική τους αξία. Για 7 από τα miRNAs που μελετήθηκαν παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με ασθενοζωοσπερμία αλλά μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με αζωοσπερμία. Επομένως, τα συγκεκριμένα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες για τη διάκριση γόνιμων-υπογόνιμων ανδρών αλλά και για διάκριση

ανάμεσα στις διάφορες υποπεριπτώσεις υπογονιμότητας όπως είναι η αζωοσπερμία και η ασθενοζωοσπερμία.

Ακόμη, είναι γνωστό ότι η εμφάνιση μόλυνσης, η πρόκληση φλεγμονής και τελικά η απόπτωση κυττάρων της αναπαραγωγικής οδού στον άνδρα αποτελούν βασικούς παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε ανδρική υπογονιμότητα. Σε αυτές τις διαδικασίες φαίνεται ότι εμπλέκονται και τα miRNAs που εντοπίστηκαν. Συγκεκριμένα, το hsa-miR-181a εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και στη μεταγωγή σήματος των Τ-λεμφοκυττάρων. Οι δύο κατηγορίες κυττάρων αποτελούν μέρη του ανοσολογικού συστήματος του οργανισμού και συνεισφέρουν στην άμυνα. Ειδικότερα, τα Β-λεμφοκύτταρα ευθύνονται για την απελευθέρωση των αντισωμάτων και τα Τ-λεμφοκύτταρα ρυθμίζουν την διαδικασία της ανοσολογικής απόκρισης ή επιτίθενται σε μολυσμένα κύτταρα. Το hsa-miR-513a-5p ρυθμίζει επίσης την άμυνα του οργανισμού (Wang et al., 2011).

7) Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility.

Πίνακας 11: Λίστα των miRNAs που αναφέρονται στο άρθρο και αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs όπως προέκυψε παραπάνω.

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000236678	hsa-miR-429
ENSG00000250819	hsa-miR-34b-3p

Το άρθρο εξετάζει την έκφραση ορισμένων miRNAs σε απομονωμένα σπερματοζωάρια και ιστούς όρχεων και αξιολογεί την πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες. Συγκεκριμένα, τα miRNAs που μελετήθηκαν παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) με εξαίρεση το hsa-miR-429 που παρουσίαζε αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Ακόμη, η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ευαισθησία και την εξειδίκευσή της.

Όσον αφορά τη βιολογική λειτουργία των miRNAs, για πολλά από αυτά έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος τους στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Ειδικότερα, τα miRNAs που ανήκουν στην οικογένεια hsa-miR-34b-3p εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις ενήλικων ατόμων ή ατόμων μετά το στάδιο της εφηβείας. Επομένως, είναι πολύ πιθανό να εμπλέκονται στη διαδικασία διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων.

Ακόμη, το hsa-miR-429 έχει μελετηθεί σημαντικά και φαίνεται ότι εκφράζεται σε διαφορετικά επίπεδα ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων των όρχεων. Συγκεκριμένα, εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης κατά τα τελευταία στάδια της σπερματογένεσης στα σπερματοζωάρια, μέτρια επίπεδα έκφρασης στο σπερματικό υγρό και χαμηλά επίπεδα έκφρασης στους όρχεις, που αποτελούνται από σωματικά και γαμετικά κύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης και διαφορετικά επίπεδα miRNAs που εκφράζονται στους όρχεις. Άρα, τα επίπεδα του hsa-miR-429 στα σπερματοζωάρια και το σπερματικό

υγρό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης της προόδου της σπερματογένεσης. Μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων απαιτούνται προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αξία των miRNAs στη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας (Abu-Halima et al., 2014).

Επομένως, από την αναζήτηση στη βιβλιογραφία με τη χρήση της βάσης δεδομένων miRBase, προέκυψε ότι περίπου 90 από τα 1000 miRNAs που αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs συσχετίζονται με το μηχανισμό της γονιμότητας στα αρσενικά ή τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Αρκετά μάλιστα από αυτά αναφέρονται σε περισσότερα από ένα άρθρα. Ακόμη, στους πίνακες εμφανίζονται και τα lncRNAs με τα οποία αλληλεπιδρούν καθώς βασικός στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής είναι η διερεύνηση του ρόλου των lncRNAs στην ανδρική υπογονιμότητα.

6. Εντοπισμός των γονιδίων-στόχων των miRNAs και διερεύνηση πιθανής λειτουργίας τους που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα

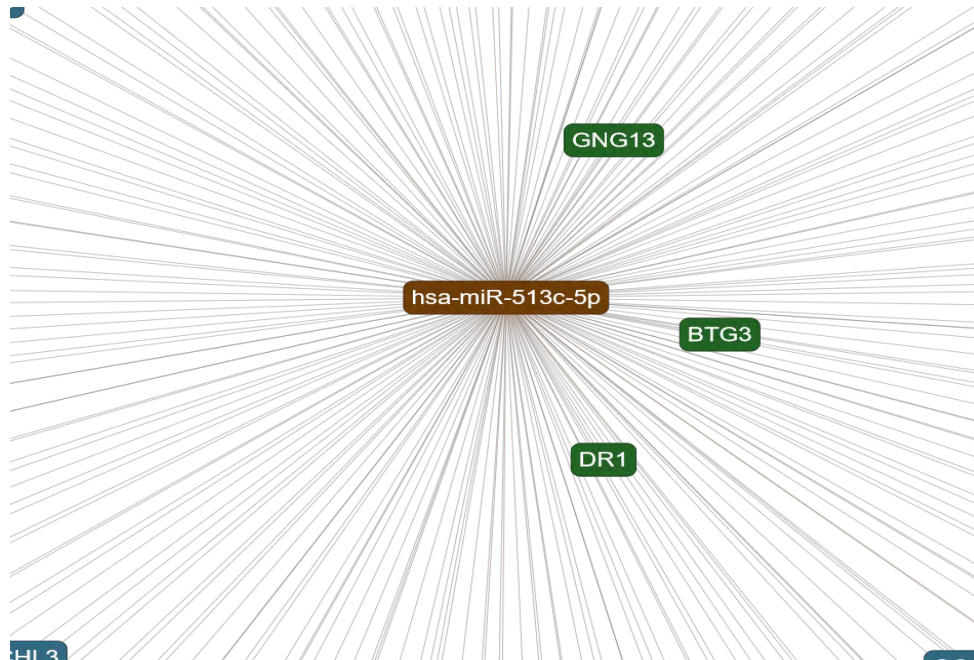
Τα miRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονδιακής έκφρασης μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα mRNAs. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρεται στην εισαγωγή, στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs-στόχους και επιφέρουν αλλαγές στην έκφρασή τους με διάφορους μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων και η αποικοδόμηση των μορίων mRNAs. Επομένως, εφόσον 90 περίπου miRNAs συσχετίστηκαν με την ανδρική υπογονιμότητα, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διερευνηθεί η λειτουργία τους και να εντοπιστούν πιθανά γονίδια-στόχοι τους που σχετίζονται με τη διαδικασία της σπερματογένεσης.

6.1. Εύρεση γονιδίων-στόχων των miRNAs με miRTargetLinkHuman

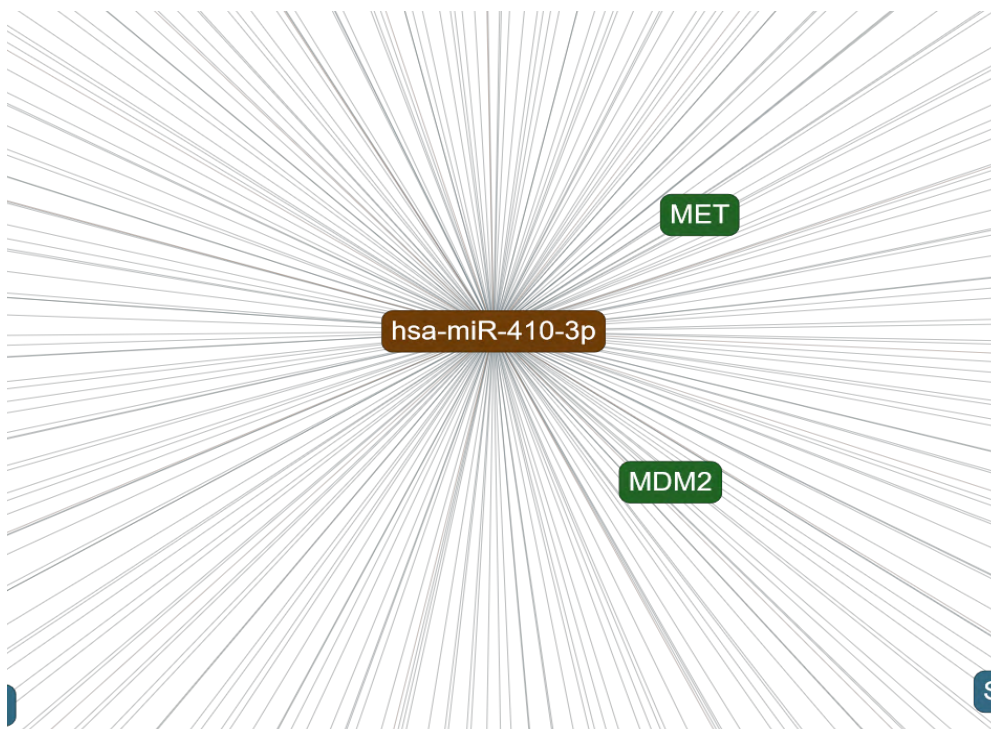
Για να εντοπιστούν τα γονίδια-στόχοι των miRNAs χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων miRTargetLinkHuman που παρουσιάζει σε οπτικοποιημένα δίκτυα τις αλληλεπιδράσεις miRNAs-mRNAs. Συγκεκριμένα, παρέχει πληροφορίες για ισχυρές αλληλεπιδράσεις, πιο αδύναμες αλληλεπιδράσεις αλλά κάνει και πρόβλεψη πιθανών αλληλεπιδράσεων με βάση συγκεκριμένους παράγοντες και παραμέτρους.

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, έγινε αναζήτηση για καθένα από τα 90 miRNAs που επιλέχθηκαν στο προηγούμενο βήμα εξαιτίας της συσχέτισής τους με την ανδρική υπογονιμότητα. Ακόμη, έγινε αναζήτηση μόνο για ισχυρές και επιβεβαιωμένες πειραματικά αλληλεπιδράσεις ώστε να προκύψουν όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

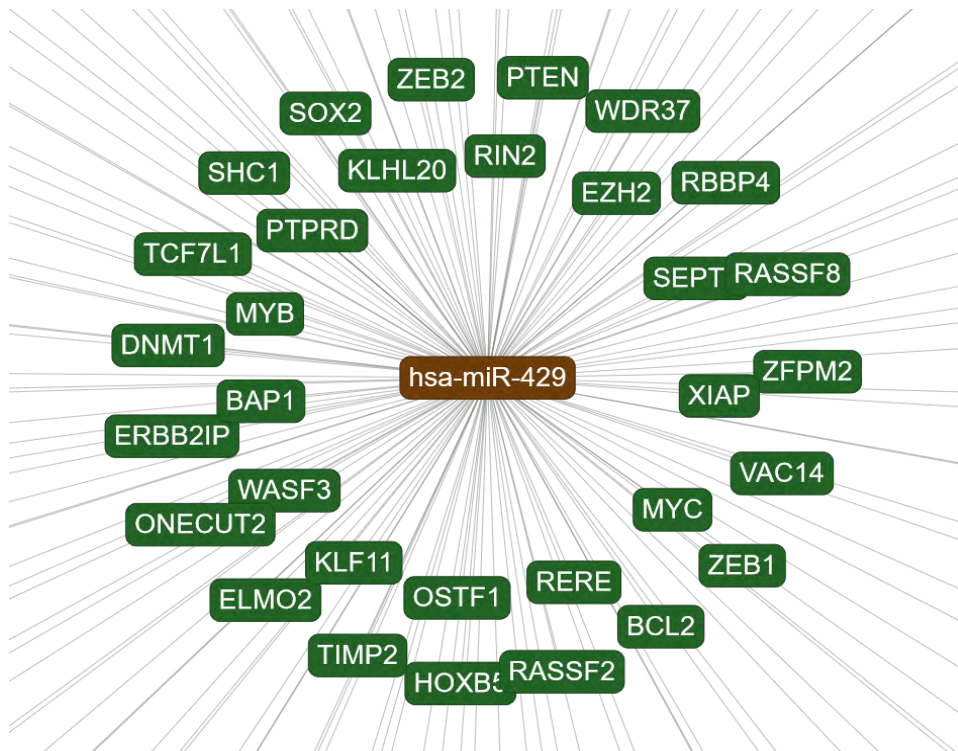
Προέκυψαν τελικά, για 21 από τα 90 miRNAs, τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων που απεικονίζονται παρακάτω. Για τα υπόλοιπα miRNAs δεν προέκυψαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις, παρά μόνο ασθενείς.



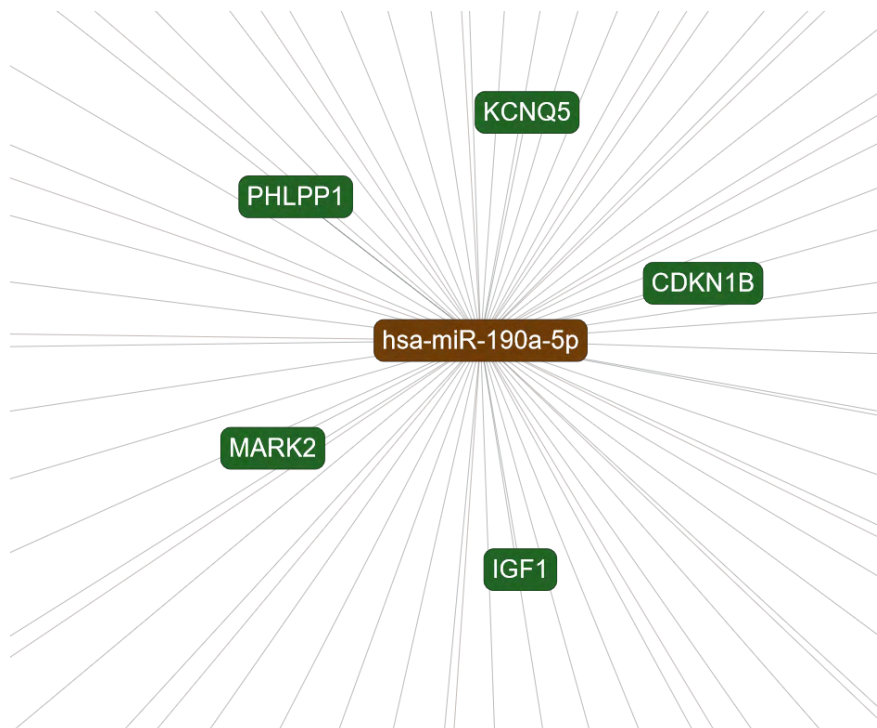
Εικόνα 27: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513c-5p με γονίδια-στόχους.



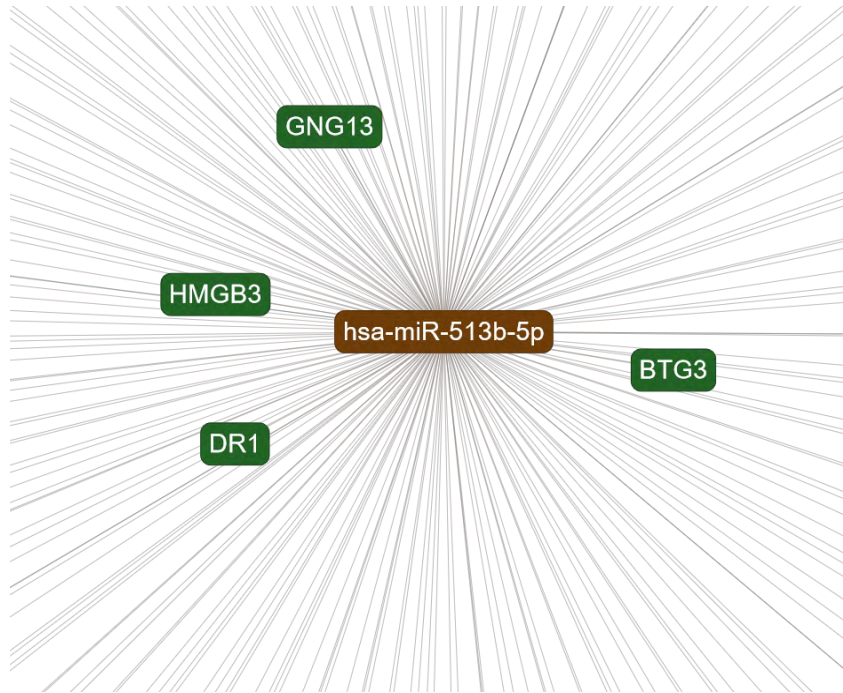
Εικόνα 28: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-410-3p με γονίδια-στόχους.



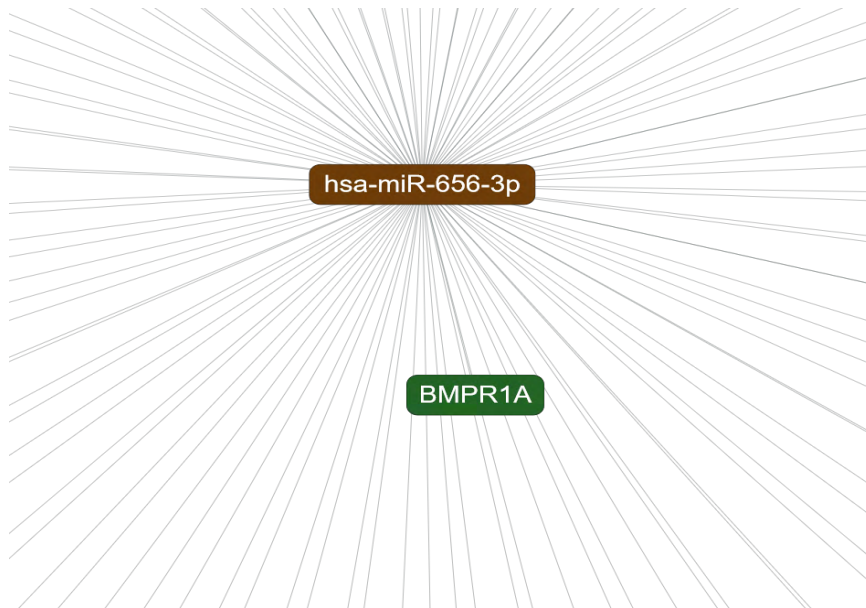
Εικόνα 29: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-429 με γονίδια-στόχους.



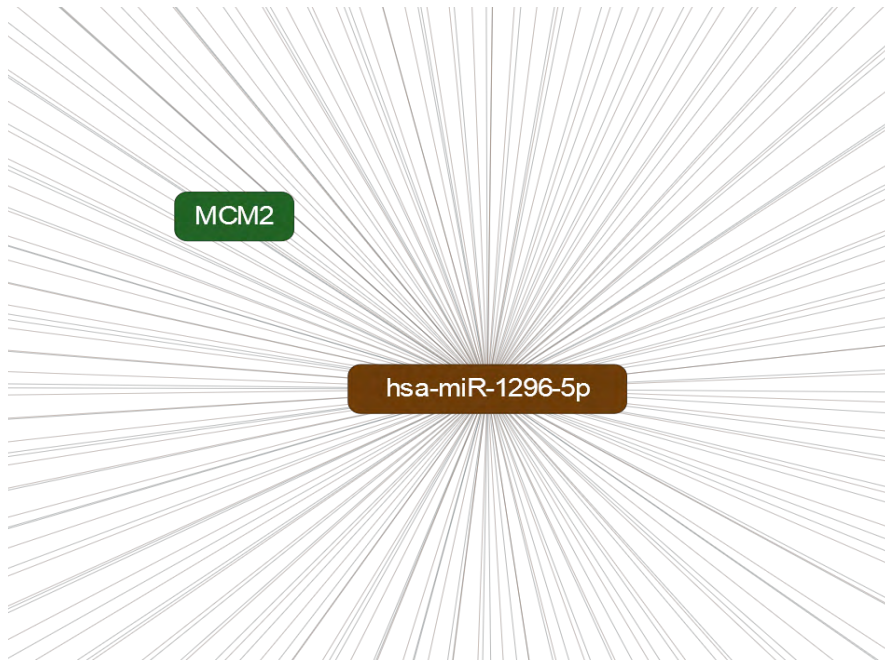
Εικόνα 30: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-190a-5p με γονίδια-στόχους.



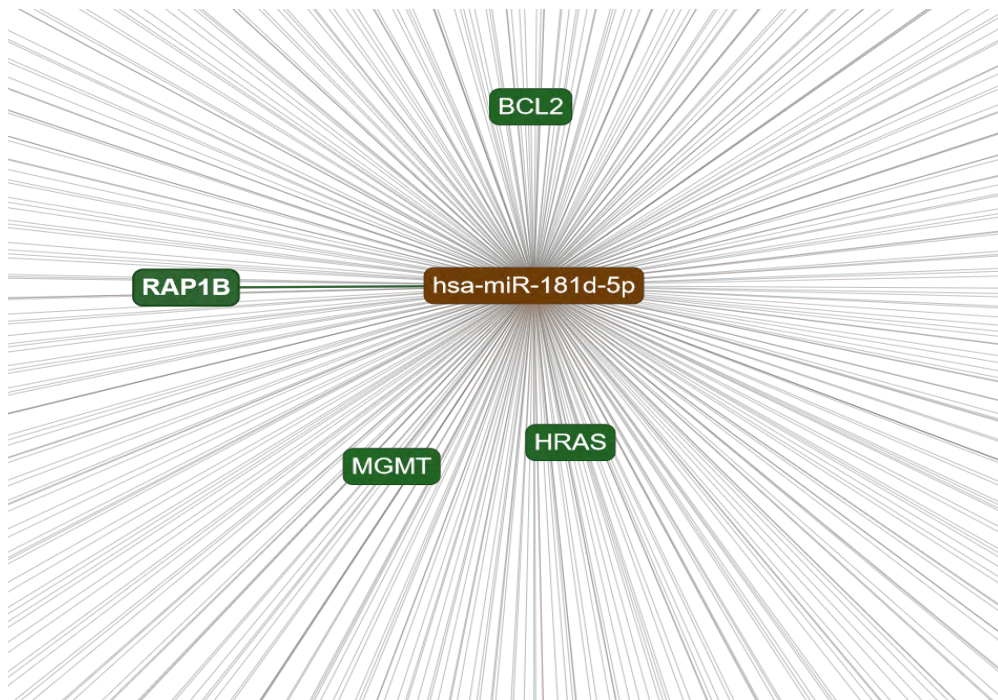
Εικόνα 31: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513b-5p με γονίδια-στόχους.



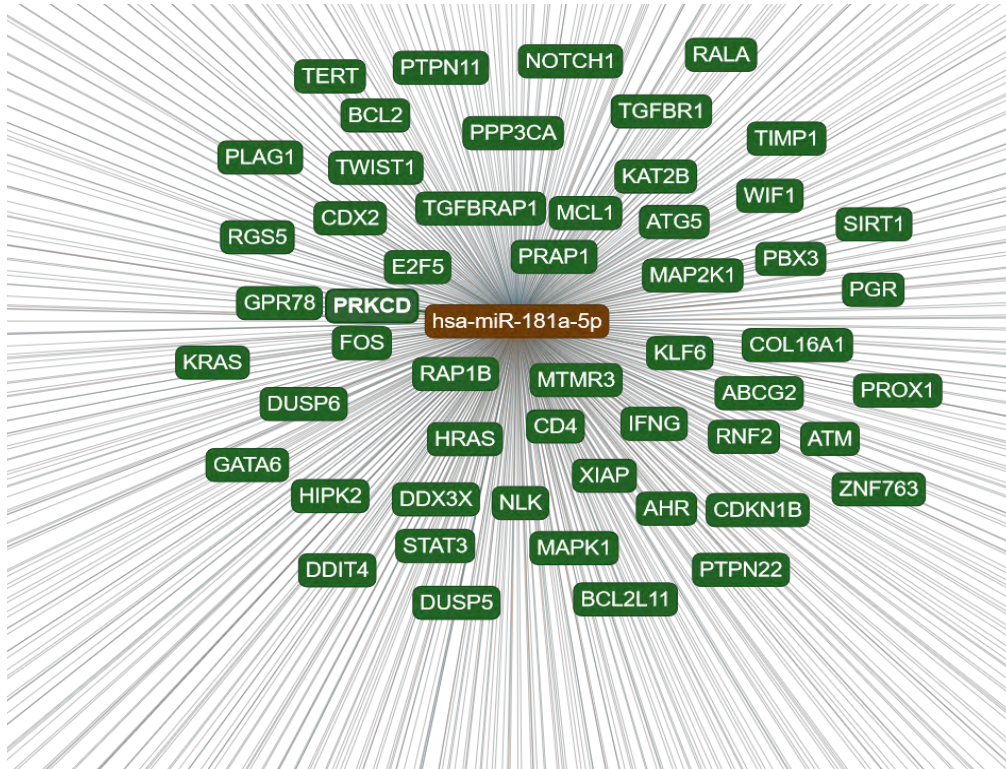
Εικόνα 32: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-656-3p με γονίδια-στόχους.



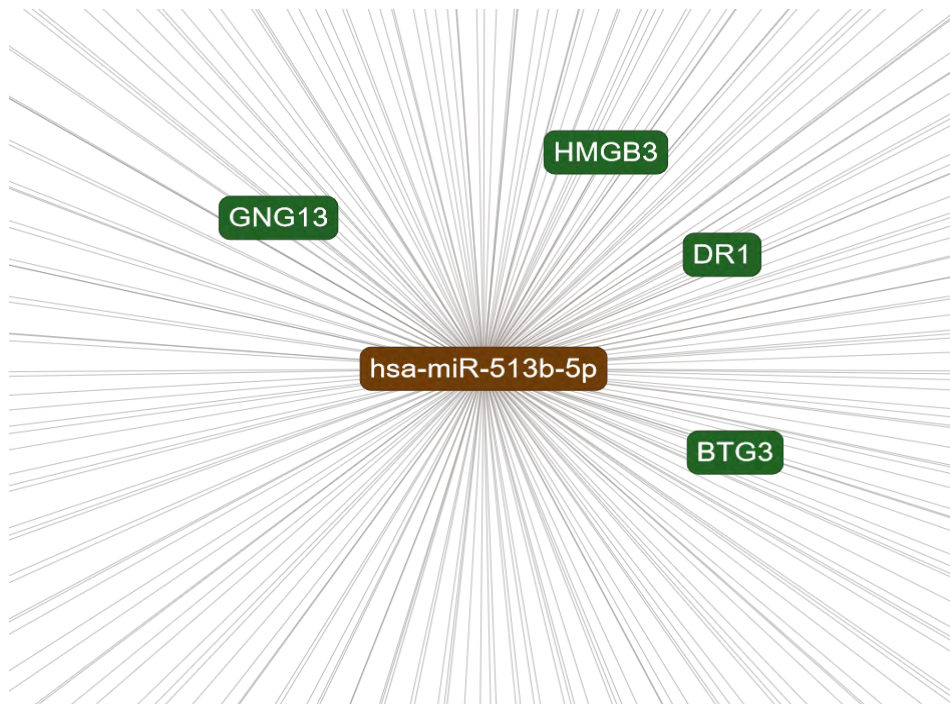
Εικόνα 33: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-1296-5p με γονίδια-στόχους.



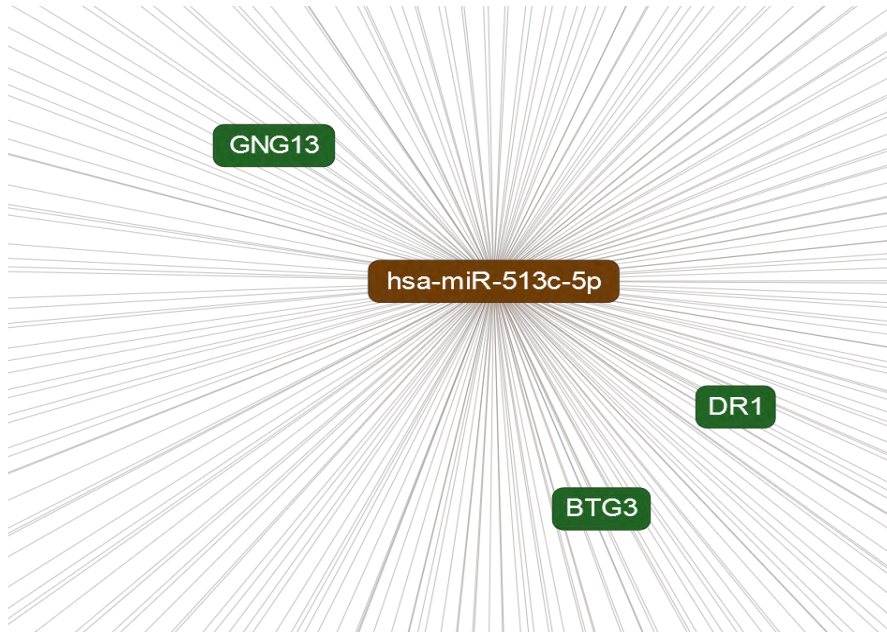
Εικόνα 34: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-181d-5p με γονίδια-στόχους.



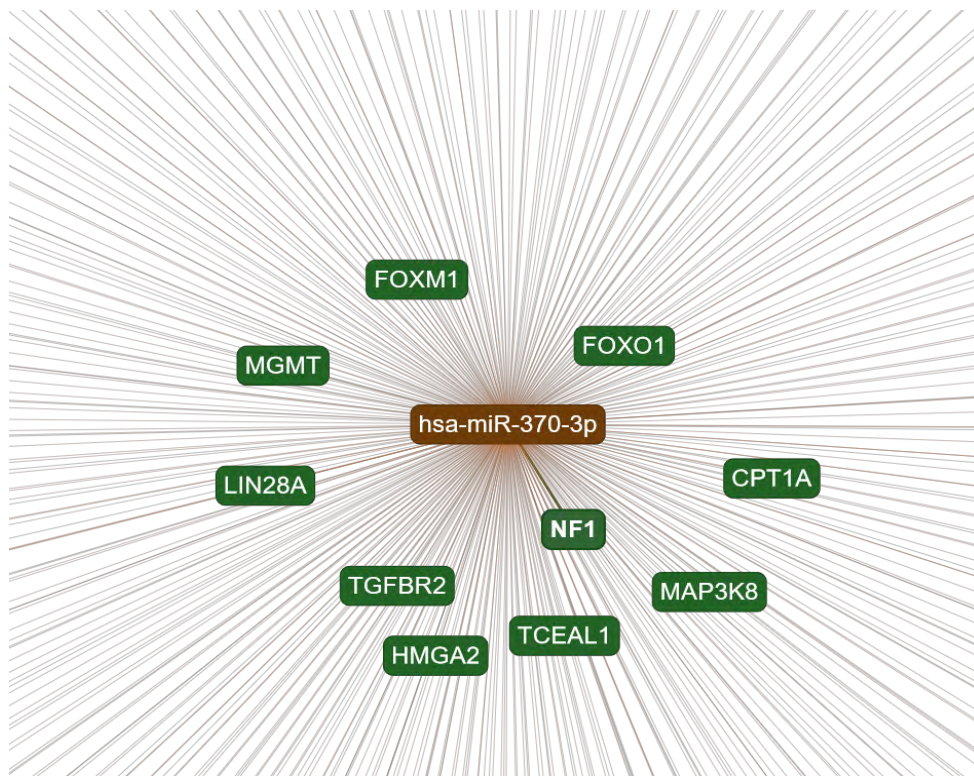
Εικόνα 35: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-181a-5p με γονίδια-στόχους.



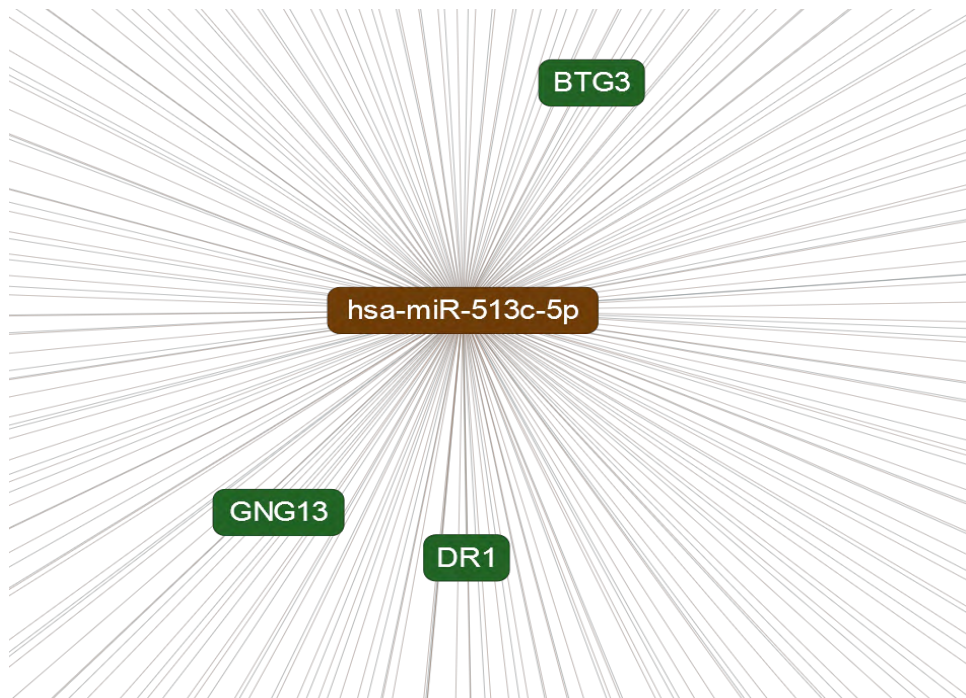
Εικόνα 36: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513b-5p με γονίδια-στόχους.



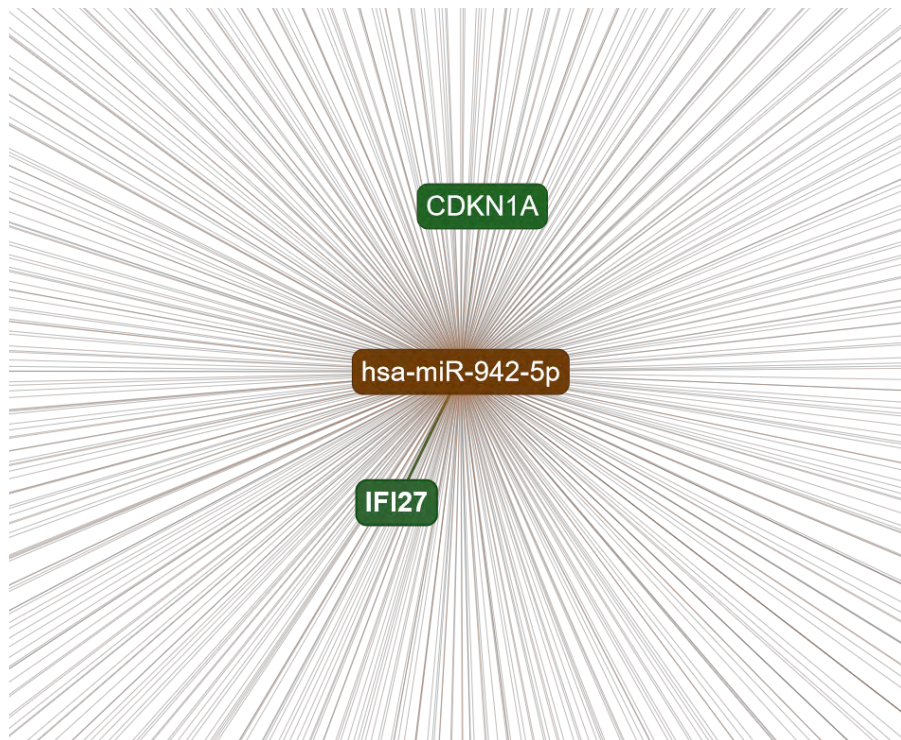
Εικόνα 37: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513c-5p με γονίδια-στόχους.



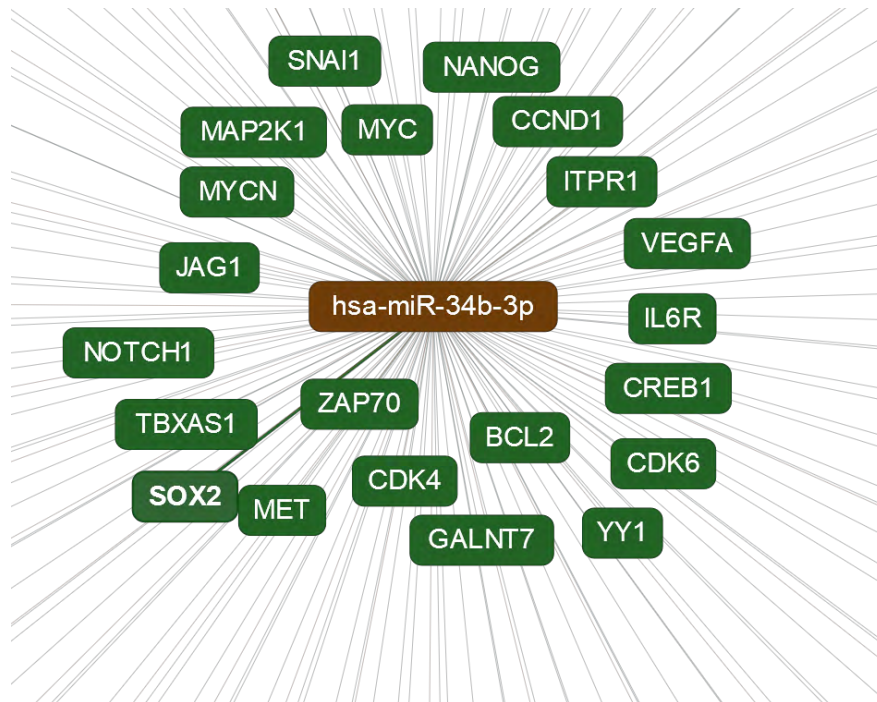
Εικόνα 38: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-370-3p με γονίδια-στόχους.



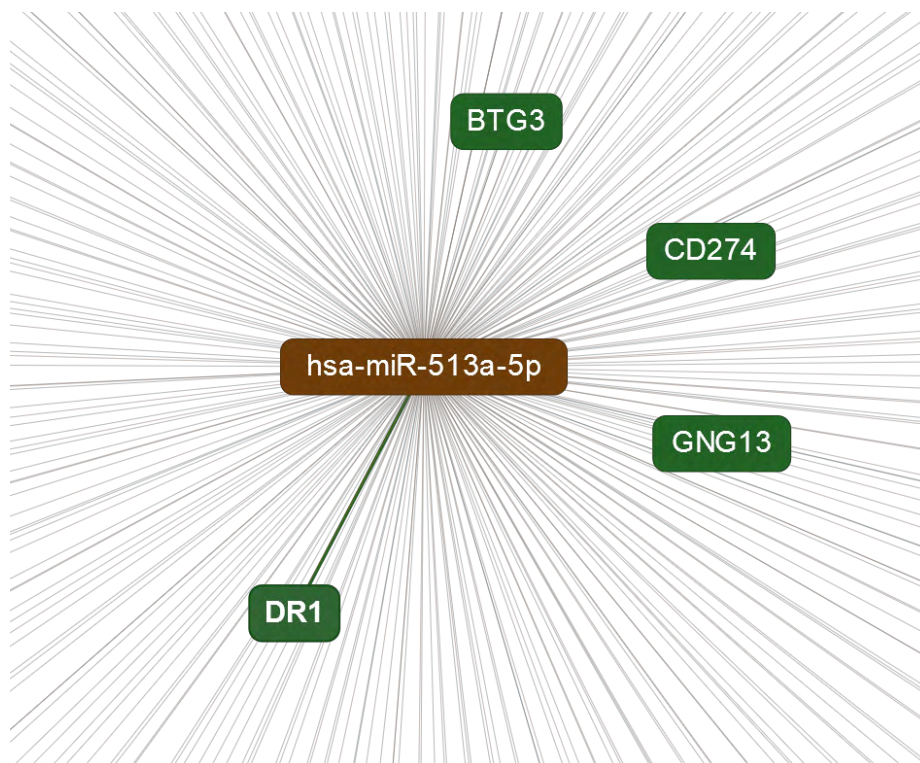
Εικόνα 39: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513c-5p με γονίδια-στόχους.



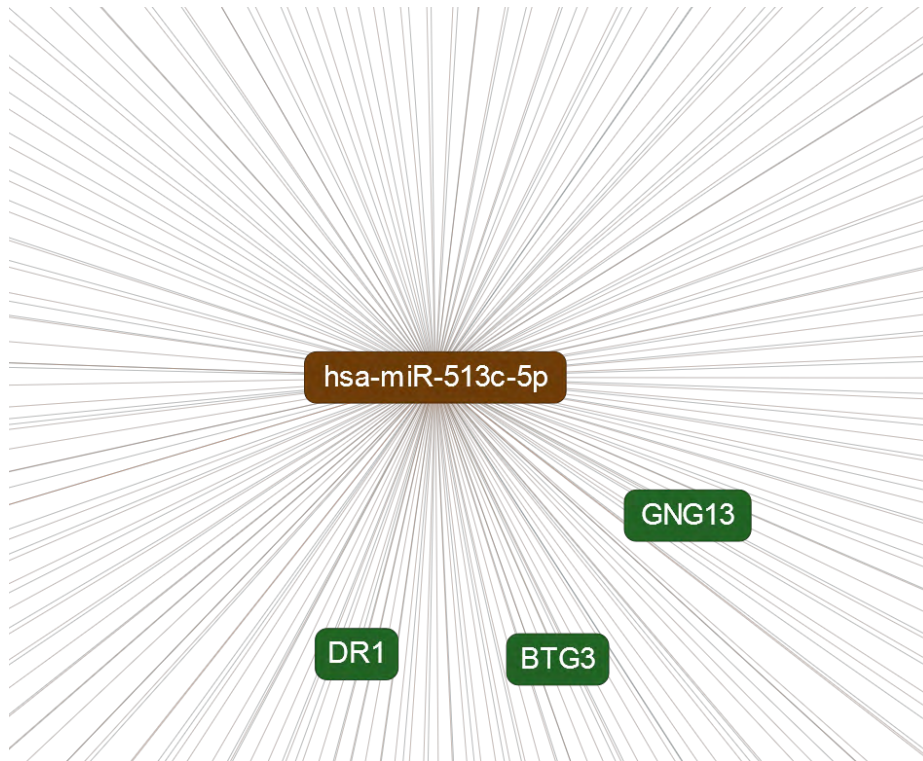
Εικόνα 40: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-942-5p με γονίδια-στόχους.



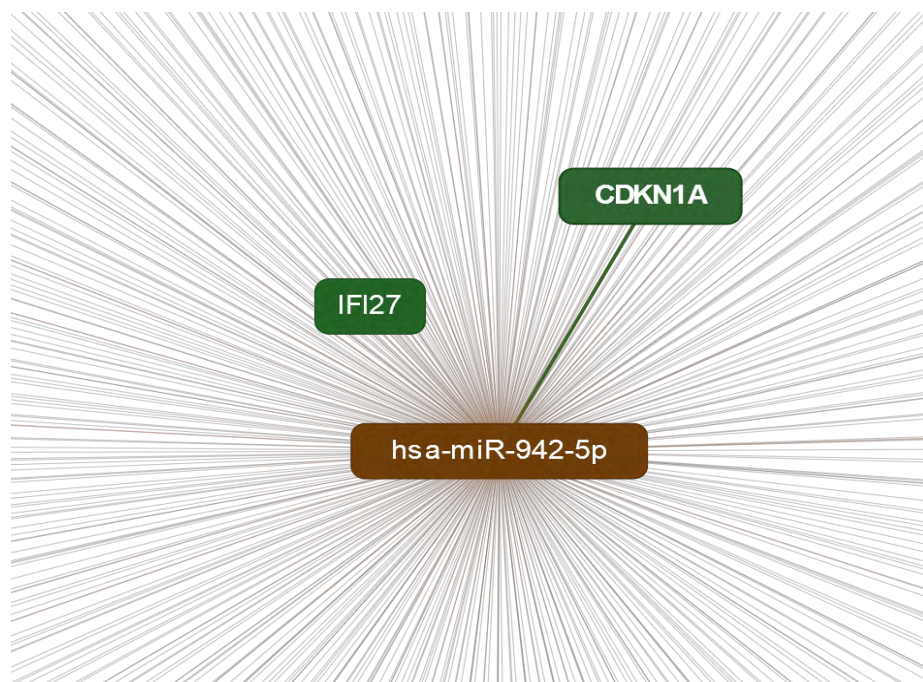
Εικόνα 41: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-34b-3p με γονίδια-στόχους.



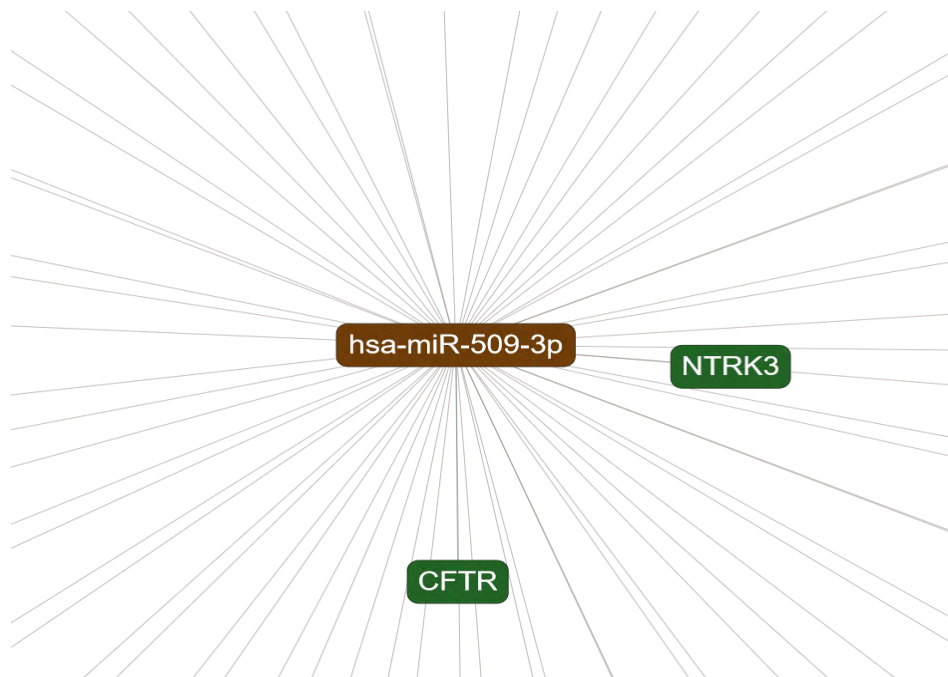
Εικόνα 42: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513a-5p με γονίδια-στόχους.



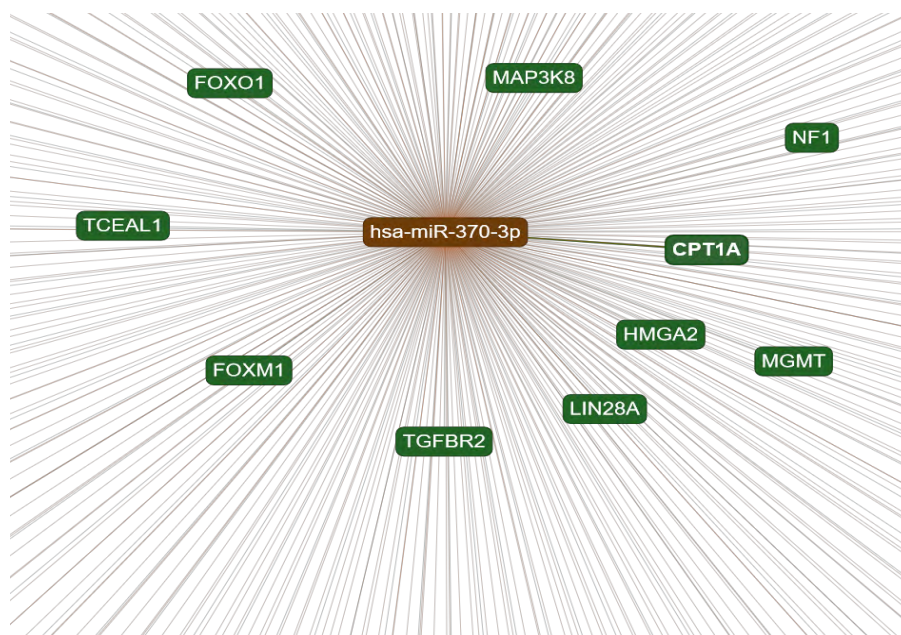
Εικόνα 43: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-513c-5p με γονίδια-στόχους.



Εικόνα 44: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-942-5p με γονίδια-στόχους.



Εικόνα 45: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-509-3p με γονίδια-στόχους.



Εικόνα 46: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του hsa-miR-370-3p με γονίδια-στόχους.

6.2. Διερεύνηση λειτουργίας των γονιδίων που στοχεύονται από τα miRNAs με GeneCards

Έπειτα, διερευνήθηκε αν κάποιο από τα γονίδια-στόχους που εντοπίστηκαν παραπάνω συσχετίζεται με τη διαδικασία της σπερματογένεσης και της ανδρικής υπογονιμότητας. Για

να πραγματοποιηθεί αυτή η αναζήτηση χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων GeneCards που προσφέρει τεράστιο όγκο πληροφοριών για κάθε γονίδιο.

Τα γονίδια που συσχετίστηκαν με βιβλιογραφία σχετική με ανδρική υπογονιμότητα, όπως και τα miRNAs από τα οποία στοχεύονται, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα επίσης συμπεριλαμβάνονται και τα lncRNAs που αλληλεπιδρούν με τα miRNAs, προκειμένου να είναι καλύτερα οργανωμένα τα αποτελέσματα και να μπορούν να διατυπωθούν πιο εύκολα συμπεράσματα που αφορούν τη συσχέτιση lncRNAs με την ανδρική υπογονιμότητα.

lncRNAs	miRNAs	Γονίδια-στόχοι
ENSG00000248995	hsa-miR-410-3p	MDM2
ENSG00000236678	hsa-miR-429	BCL2
		SEPT7
		DNMT1
		TIMP2
	hsa-miR-190a-5p	IGF1
ENSG00000260450	hsa-miR-181d-5p	BCL2
	hsa-miR-181a-5p	BCL2
		ATM
		SIRT1
		PRAP1
		PGR
		TERT
		IFNG
		AHR
		STAT3
ENSG00000231755	hsa-miR-509-3p	CFTR
ENSG00000250819	hsa-miR-34b-3p	BCL2
		VEGFA
		NANOG
		CREB1
ENSG00000233103	hsa-miR-509-3p	CFTR

Όσον αφορά τα γονίδια-στόχους, προκύπτει από τη βιβλιογραφία, η οποία προέκυψε από τη βάση δεδομένων GeneCards, ότι όλα εμπλέκονται με κάποιο τρόπο στην ανδρική υπογονιμότητα.

Ειδικότερα, το γονίδιο *MDM2* είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο καθώς κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που επάγει την ογκογένεση μέσω της απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως είναι η p53. Ακόμη, έχει αποδειχθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης στην απόπτωση των γαμετικών κυττάρων και διάφοροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα στον Κινεζικό πληθυσμό (Huang et al., 2012).

Το γονίδιο *BCL2* επίσης, που παρατηρείται πολύ συχνά στον παραπάνω πίνακα, κωδικοποιεί για μια μεμβρανική πρωτεΐνη που εμποδίζει την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων. Εμπλέκεται και στην απόπτωση των γαμετικών κυττάρων και πολυμορφισμοί στο γονίδιο φαίνεται ότι δρουν προστατευτικά εναντίων της αζωοσπερμίας στον Κινεζικό-Χαν πληθυσμό (Ma et al, 2010). Ένα ακόμη γονίδιο με σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης είναι το *SEPT7* που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της στεφάνης του σπερματοζωαρίου. Η στεφάνη είναι ένα είδος υπομεμβρανικού δαχτυλιδιού που απαιτείται για τη σωστή δομή και την κινητικότητα της ουράς του σπερματοζωαρίου. Ακόμη, το *DNMT1* γονίδιο κωδικοποιεί για μια μεθυλοτρανσφεράση η οποία εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης διατηρώντας το πρότυπο μεθυλίωσης, πιθανόν προκειμένου να αποφευχθεί η κληρονόμηση διαφόρων ανωμαλιών που αφορούν το εντύπωμα στους απογόνους (Marques et al., 2011). Επίσης, πολυμορφισμοί στο γονίδιο *TIMP2* επηρεάζουν διάφορους παράγοντες που αφορούν το σπέρμα χωρίς όμως να έχουν ιδιαίτερη επίδραση στη γονιμότητα σε Πολωνούς άνδρες (Kurzwski et al., 2017). Ο IGF1 σχετίζεται με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας εξαιτίας κισσοκήλης (Naderi et al., 2015).

Ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση του γονιδίου *ATM*. Όσον αφορά το γονίδιο *ATM*, έχει βρεθεί ένας πολυμορφισμός στον υποκινητή του, ο οποίος συσχετίστηκε με την ανδρική υπογονιμότητα καθώς φαίνεται ότι εμποδίζεται η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και τελικά το γονίδιο *ATM* αδυνατεί να εκφραστεί (Li et al., 2013). Επίσης, το γονίδιο *SIRT1* έχει συσχετιστεί με την υπογονιμότητα και συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμικούς άνδρες (Mostafa et al., 2018). Το *PRAP1* ακόμη, κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που συναντώνται στα σπερματοζωάρια και συνήθως εμπλέκονται στο μονοπάτι της αυτοφαγίας. Το *PGR* είναι ένα εξίσου συχνό γονίδιο σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας καθώς κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της προγεστερόνης. Η σπερματογένεση άλλωστε, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που ρυθμίζεται ακόμη και από ορμονικά σήματα. Επίσης, το *IFNG* γονίδιο κωδικοποιεί για έναν παράγοντα που επηρεάζει διάφορες παραμέτρους του σπέρματος όπως είναι η κινητικότητα και τελικά η επιβίωσή του.

Ένα ακόμη γονίδιο με ιδιαίτερα σημαντική λειτουργία είναι το *TERT*. Το γονίδιο *TERT* σχετίζεται με τη σπερματογένεση μέσω των τελομερών. Τα τελομερή ευθύνονται για τη διατήρηση της σταθερότητας και του ακεραιότητας του γονιδιώματος. Η έκφραση της τελομεράσης είναι απαραίτητη στα γαμετικά κύτταρα ώστε να διατηρηθεί το μήκος των τελομερών και η σταθερότητα των χρωμοσωμάτων. Επομένως, διάφοροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της τελομεράσης επηρεάζουν τη διαδικασία της σπερματογένεσης (Yan et al., 2014).

Επίσης, το γονίδιο *AHR* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες στο σπέρμα και τελικά με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας (Mostafa et al., 2017). Μεταλλάξεις ακόμη στο γονίδιο *CFTR* όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση αζωοσπερμίας. Το *STAT3* γονίδιο επίσης, κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στη λειτουργία του σπέρματος μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων (Lachance et al., 2013).

Ανάμεσα στα γονίδια-στόχους συναντάται επίσης το *VEGFA* που επηρεάζει την κινητικότητα και την επιβίωση των σπερματοζωαρίων ενώ το *NANOG* παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό προφίλ έκφρασης στους όρχεις των θηλαστικών, γεγονός που αποδεικνύει το συντηρημένο ρόλο του στη διαδικασία της σπερματογένεσης (Kuijk et al., 2010). Τέλος, το *CREB1* κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στη διαδικασία της σπερματογένεσης.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία καθώς συχνά οδηγεί στην εμφάνιση οικονομικών, ψυχολογικών αλλά και κοινωνικών προβλημάτων. Συγκεκριμένα, απασχολεί περίπου το 15% των ζευγαριών παγκοσμίως και ο ανδρικός παράγοντας συνεισφέρει περίπου στο 50% των περιπτώσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ενδιαφέρον για έγκαιρη και αποτελεσματική πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας να έχει αυξηθεί σημαντικά.

Η ανδρική υπογονιμότητα όμως, αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαταραχή που επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από γενετικούς παράγοντες. Η διαδικασία της σπερματογένεσης άλλωστε, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί αυστηρή ρύθμιση και έκφραση γονιδίων σε συγκεκριμένα επίπεδα και συγκεκριμένο χρόνο. Μεταξύ των γενετικών αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας έχουν αναφερθεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y αλλά και στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα.

Μελέτες τα τελευταία χρόνια, δείχνουν ότι σημαντική μπορεί να είναι η συσχέτιση των non-coding RNAs με την ανδρική υπογονιμότητα. Τα non-coding RNAs αποτελούν μόρια RNA που δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες αλλά εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Με την ανακάλυψή τους παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός τους σχετίζεται με την πολυπλοκότητα των οργανισμών και γρήγορα επιβεβαιώθηκε ότι τα non-coding RNAs συμμετέχουν σχεδόν σε κάθε κυτταρική λειτουργία και ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η απόπτωση και ο κυτταρικός κύκλος.

Όσον αφορά την ανδρική υπογονιμότητα, πολλές κατηγορίες ncRNAs, μεταξύ των οποίων τα miRNAs και τα lncRNAs, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων της διαδικασίας της σπερματογένεσης και ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί διαφορετικό προφίλ έκφρασης των lncRNAs και των miRNAs μεταξύ υγιών και ατόμων με φαινότυπο υπογονιμότητας. Διαφορές στην έκφραση εμφανίζονται ακόμη και μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της σπερματογένεσης. Τέλος, ορισμένα lncRNAs και miRNAs με ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης στους όρχεις, 'ξεφεύγουν' κατά τη μειωτική απενεργοποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων (MSCI) και εκφράζονται, πιθανόν εξαιτίας του ρυθμιστικού τους ρόλου στη διαδικασία της σπερματογένεσης και της γονιμότητας γενικότερα. Οι ενδείξεις αυτές οδήγησαν στην επιλογή των lncRNAs ως αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, προκειμένου να γίνει διερεύνηση και πρόβλεψη των λειτουργιών τους στην ανδρική υπογονιμότητα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε lncRNAs προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην ποιότητα και τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη lncRNAs έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών.

Ειδικότερα, με ανάλυση συσχέτισης (association analysis) εντοπίστηκαν SNPs με σημαντική διαφορά στη συχνότητα αλληλομόρφων μεταξύ υγιών ατόμων και ατόμων με προβλήματα υπογονιμότητας και στη συνέχεια μελετήθηκαν περαιτέρω οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν σε περιοχές που κωδικοποιούν για lncRNAs. Αναζήτηση στη βιβλιογραφία για αυτά τα lncRNAs δεν έδειξε κάποια συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα. Παρόλα αυτά, η μη εύρεση βιβλιογραφίας δεν αποτελεί έκπληξη καθώς τα lncRNAs αποτελούν τη λιγότερο μελετημένη κατηγορία non-coding RNAs. Παρόλο που έχει εντοπιστεί τεράστιος αριθμός τους, η μελέτη της λειτουργίας τους αποτελεί δύσκολη υπόθεση εξαιτίας των χαμηλών ποσοστών συντήρησης και άρα της έλλειψης οργανισμών-μοντέλων.

Διερευνήθηκε έτσι στη συνέχεια η πιθανή επίδρασή τους στη διαδικασία της σπερματογένεσης, η οποία καθορίζει την ανδρική υπογονιμότητα, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα miRNAs. Συγκεκριμένα, τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με τα miRNAs και συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, κυρίως μέσω της ικανότητάς τους να έλκουν τα miRNAs και να τα απομακρύνουν από τα mRNA-στόχους τους.

Πολλά από τα miRNAs που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs συσχετίζονται με την αναπαραγωγική ικανότητα στα αρσενικά. Μερικά από αυτά βρίσκονται στο Χ χρωμόσωμα και εκφράζονται κυρίως στους όρχεις, ενώ φαίνεται ότι εξελίχθηκαν μέσω γονιδιακών διπλασιασμών. Οι γονιδιακοί διπλασιασμοί επέτρεψαν στα επιπλέον αντίγραφα μεγαλύτερη εξειδίκευση μέσω των γονιδίων-στόχων τους, όπως και τη δυνατότητα έκφρασης τους παρά τη μειωτική απενεργοποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων (MSCI). Η ικανότητα τους να 'ξεφεύγουν' από το MSCI υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο τους στη ρύθμιση γονιδίων απαραίτητων για τη σπερματογένεση. Ακόμη, πολλά από τα miRNAs, που εντοπίστηκε ότι αλληλεπιδρούν με τα lncRNAs, παρουσιάζουν χαρακτηριστικό προφίλ έκφρασης στους ιστούς όρχεων και το σπερματικό υγρό και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάκριση μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών αλλά και για τη διάκριση μεταξύ των υποκατηγοριών υπογονιμότητας (μη αποφρακτική αζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία κ.α.). Η λειτουργία επίσης πολλών από αυτά τα miRNAs έχει προσδιοριστεί και φαίνεται ότι εμπλέκονται στην απόπτωση των γαμετικών κυττάρων αλλά και στους μηχανισμούς εμφάνισης μόλυνσης και φλεγμονής της αναπαραγωγικής οδού.

Επίσης, πολλά από τα γονίδια-στόχους των miRNAs σχετίζονται με τη διαδικασία της σπερματογένεσης και μελέτες αποδεικνύουν ότι πολυμορφισμοί σε αυτά επηρεάζουν τη γονιμότητα ανδρών. Μερικά από αυτά σχετίζονται με την απόπτωση των γαμετικών κυττάρων, όπως το *BCL2* και το *MDM2*, ενώ άλλα απαιτούνται για το σχηματισμό απαραίτητων δομών των σπερματοζωαρίων, όπως το *SEPT7*. Επίσης, το *DNMT1*, διατηρεί το πρότυπο μεθυλίωσης και εμπλέκεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Εξίσου ενδιαφέρον γονίδιο-στόχο αποτελεί το *TERT1* που συμμετέχει στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων, μέσω της διατήρησης του μήκους των τελομερών. Ακόμη, συναντώνται γονίδια που συμμετέχουν στην ορμονική ρύθμιση της σπερματογένεσης, όπως το *PGR*, αλλά και το γονίδιο *CFTR*, μεταλλάξεις στο οποίο έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας.

Συμπερασματικά, έξι lncRNAs αποδείχθηκε ότι εμπλέκονται έμμεσα, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με miRNAs, στην ανδρική γονιμότητα και πιο συγκεκριμένα στη σωστή λειτουργία της διαδικασίας της σπερματογένεσης και στην ανάπτυξη κατάλληλων σπερματοζωαρίων, ως προς την κινητικότητα, τον αριθμό και τη μορφολογία τους, ώστε να οδηγήσουν ένα ζευγάρι στην απόκτηση απογόνου.

Τα lncRNAs αποτελούν μια ελάχιστα μελετημένη κατηγορία non-coding RNAs αλλά στην παρούσα διπλωματική αποδεικνύεται ο ρόλος τους στην ανδρική υπογονιμότητα. Η διερεύνηση των lncRNAs σε μεγαλύτερη κλίμακα και σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων παρουσιάζει ενδιαφέρον και πέρα από το γεγονός ότι αποτελεί αφορμή για περαιτέρω έρευνα, μπορεί να εξελιχθεί σε ένα διαγνωστικό εργαλείο, κυρίως στην περίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας, και να οδηγήσει στην αποτελεσματική της αντιμετώπιση.

Ακόμη, η ενδεδειγμένη και ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα γονιμότητας, πρόκειται να συμβάλει σε μία ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με το προφίλ του ασθενή ώστε να προταθούν κατάλληλες τεχνικές αντιμετώπισης που θα οδηγήσουν σε μια επιτυχή κύηση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 12: Πίνακας των SNPs που επιλέχθηκαν στο στάδιο ανάλυσης συσχέτισης (association analysis) με βάση το p-value και το odd ratio.

SNPs				
rs3006964	rs939281	rs17553108	rs11545029	rs11128202
rs3006964	rs2030351	rs10514128	rs2185080	rs9292777
rs115087733	rs1364951	rs4958063	rs4670152	rs4976278
rs16831840	rs2637713	rs6939368	rs816884	rs255142
rs6427515	rs1247000	rs17082237	rs3943533	rs7124405
rs16827314	rs565296	rs111670116	rs76716007	rs1552580
rs41271864	rs670906	rs10960805	rs10499314	rs17115614
rs11062241	rs17255668	rs16926471	rs1636255	rs1550335
rs12148769	rs67809660	rs9664915	rs6481863	rs237462
rs4591053	rs2619980	rs11216158	rs34433085	rs458255
rs17025180	rs7283506	rs4586176	rs10831277	rs28672729
rs6663920	rs55691635	rs11838826	rs17120682	rs11765437
rs77780595	rs73176636	rs1458276	rs3851681	rs2030786
rs4640343	rs16870076	rs9572694	rs9925381	rs2631431
rs74624011	rs78551343	rs6099886	rs6501880	rs238963
rs76078428	rs6862753	rs12848362	rs11132103	rs308754
rs79988608	rs12654468	rs7669686	rs42318	rs9634278
rs74454750	rs10066478	rs7862788	exm2265890	rs1189449
rs2366558	rs2747680	rs4934042	rs72672087	rs10462961
rs67379953	rs2722924	rs2599644	rs1917519	rs6714541
rs111648690	rs1711882	rs10117696	rs7616998	rs798309
rs57902904	rs11067981	rs10893691	rs1978916	rs705540
rs1320571	rs960621	rs4783799	rs164496	rs59434896
rs72723151	rs34056052	rs163588	rs6924957	rs7529824
rs80297713	rs1977932	rs10065961	rs7819976	rs1933105
rs76237371	rs10920360	rs9350032	exm2266746	rs702909
rs17520554	rs9990104	rs2527506	exm2271194	rs4664493
rs901670	rs72816061	rs5953392	rs12867825	rs2639280
rs114931920	rs4509122	rs4674431	rs9544122	rs2889789
rs75346744	rs10878327	rs1398817	rs1535099	rs17392334
rs78426187	rs2049850	rs10878332	rs4780476	rs3846633
rs116372234	rs4598387	rs6931622	rs2655121	rs1925793
rs115432784	rs1890734	rs13408428	rs8045161	rs1167796
rs2060830	rs256550	rs4855980	rs927107	rs12353207
rs114050050	rs6715284	rs6940789	rs13096639	rs2579747
rs75242939	rs13110943	rs13278062	rs112166231	rs12098748
rs73098799	rs17644023	rs12843591	rs2830749	rs9553623
rs77839488	rs4868515	rs6610918	rs2824534	rs9571713

rs12643157	rs117746313	rs5921690	rs849898	rs1987549
rs73234456	rs16929812	rs16932785	rs67629927	rs2192423
rs11932261	rs6999027	rs1534325	rs2348904	rs1956661
rs9998874	rs10982910	rs7987399	rs4758482	rs59561728
rs1014867	rs72788085	rs1178039	rs4982492	rs11874148
rs75842075	rs12279469	rs2243874	rs234604	rs347464
rs10519631	rs60666964	rs1937451	rs8031522	rs2822391
rs2636663	rs12425149	rs1877937	rs2094877	rs10927676
rs72967365	rs1032520	rs9290557	rs7521130	rs11209716
rs73871504	rs10138163	rs11710343	rs11917403	rs10495699
rs3796693	rs74078723	rs6822076	rs74544356	rs1424341
rs76033048	rs4906654	rs6816625	rs6945082	rs6764193
rs42278	rs8051912	rs444697	rs10231005	rs17448036
rs17065407	rs3848809	rs723307	rs10890742	rs12209546
rs72811665	rs17745316	rs35884192	rs55744337	rs4566937
rs73724881	rs4933145	rs10256440	rs9936752	rs241177
rs3094622	rs7699960	rs4872056	rs12933693	rs13265648
rs3094621	rs10072700	rs4401921	rs2898182	rs10756497
rs3129817	rs13276184	rs4841989	rs375095241	rs4936964
rs4946400	rs2909001	rs12779498	rs875859	rs4570722
rs7755670	rs34387846	rs688501	rs7130768	rs9530487
rs79162002	rs6500814	rs656707	rs7162460	rs1753613
rs140306630	rs2214261	rs58841489	rs902968	rs405460
rs41280699	rs5973341	rs7124593	rs7560149	rs430605
rs80211763	rs7876156	rs10859807	seq_rs1056893_du p2	rs12599165
rs117295470	rs12840672	rs1352048	rs7821358	rs166655
rs117009523	rs5956634	rs60780105	rs4348458	rs7690576
rs118120076	rs2878329	rs5998693	rs10812114	rs17861768
rs71511421	rs5955616	rs2107595	rs1631637	rs10894577
rs143915551	rs5006481	rs6760764	rs10765176	rs4886286
rs78362464	rs75134956	rs920864	rs9544316	rs756303
rs7921661	rs17046921	rs2460042	rs9574952	rs1914748
rs10794012	rs5933995	rs4982740	rs945268	rs10182438
rs72873948	rs17529436	rs4462573	rs6069927	
rs78280624	rs1119040	rs1784732	rs2212824	
rs61905187	rs2215023	rs10753536	rs2838438	
rs58989823	rs13152779	rs2675181	rs6000507	
rs75000107	rs1895778	rs178323	rs628594	
rs7973929	rs13215600	rs1358278	rs10798277	
rs77698643	rs2799573	rs17105542	rs6722685	
rs118140727	rs9671417	rs1233827	rs3770146	
rs79025180	rs5959221	rs2050512	rs1046208	
rs34025389	rs1965704	rs17574702	rs7640070	

rs2133206	rs1678383	rs35573107	rs1875455	
rs191793	rs7109826	rs9845025	rs10947832	
rs4307931	rs34661019	rs28726245	rs830444	
rs11644348	rs35182733	rs6825814	rs1984456	
rs72831434	rs768989	rs35262963	rs12351184	
rs57185637	rs6522637	rs3109166	rs11848918	
rs7247390	rs6075791	rs11946604	rs10852009	
rs417786	rs5961314	rs11099266	rs12594283	
rs79420125	rs5909424	rs112521156	rs3751987	
rs62197836	rs12008625	rs13142152	rs2846642	
rs7267600	rs114087369	rs1039243	rs1563188	
rs11536940	rs9681041	rs4143683	rs2268278	
rs73228129	rs17165277	rs17802112	rs2206981	
rs75306008	rs416168	rs2270570	rs858951	
rs73509348	rs766432	rs1361859	rs1320225	
rs62272166	rs1896295	rs649651	rs1421094	
rs3820366	rs1896296	seq- rs371654758	rs10487624	
rs113139368	rs17079652	rs6486069	rs2617014	
rs11735840	rs4875730	rs11263536	rs650258	
rs4836057	rs1490051	rs719750	rs9521538	
rs13179900	rs1860261	rs10846995	rs1209188	
rs73024912	rs74377316	rs34171526	rs883794	
rs57727250	rs2239961	rs17705275	rs3924409	
rs28669979	rs7391249	rs368835	rs11077738	
rs77064312	rs8066279	rs281423	rs6047591	
rs76718681	rs5935919	rs10470023	rs1816955	
rs12309527	JHU_X.1470389 28	rs28861531	rs9832727	
rs71351741	rs11136374	rs13405989	rs13152069	
rs6108256	rs10810175	rs10458092	rs295240	
rs80112443	rs2738553	rs671555	rs58976078	
rs116669694	rs12056882	rs78330206	rs2652492	
rs7960972	kgp22730548	rs1415385	rs62390587	
rs8028043	rs2872573	rs3121309	rs7713983	
rs112411485	rs5921922	rs2360957	rs742109	
rs73198770	rs13258239	rs7648418	rs255155	
rs34641429	rs6615509	rs62288163	rs886774	
rs145713273	rs1516558	rs2275519	rs1354365	
rs2332617	rs2753596	rs1441922	rs7093917	
rs1704171	rs4314428	rs7660014	rs1378738	
rs2504779	rs11997323	rs17696019	rs4963442	
rs115550387	rs5949508	rs35474642	rs1945119	
rs12843243	rs212989	rs458752	rs12144380	

rs4345726	rs3922806	rs3094893	rs893811	
rs2994339	rs4434872	rs10817189	rs4416346	
rs6897456	rs2965012	rs1616784	rs9844835	
rs4892613	rs12732389	rs7147946	rs11737226	
rs17311586	rs10779404	rs4784754	rs1264323	
rs12745436	rs10916323	rs75443592	rs17767186	
rs72776130	rs16825349	rs169828	rs2565116	
rs17155499	rs13018441	rs1410996	rs7900873	
rs10508558	rs56834703	rs1329428	rs17141297	
rs1604717	rs12186107	rs6816573	rs2478085	
rs8142270	rs62270797	rs495336	rs7902184	
rs9890751	rs7668810	rs2929986	rs2725427	
rs7056849	rs59714449	rs2220691	rs2725433	
rs77726272	rs34436204	rs425139	rs7157077	
rs58485094	rs13270872	rs1012680	rs662592	
rs57929150	rs12379295	rs62242237	rs7190048	
rs2494287	rs10983505	rs6855453	rs4986765	
rs78839880	rs11601368	rs35478841	chr19:52026600	
rs7774316	rs331984	rs28507313	rs9626993	
rs195077	rs16970633	rs369145	rs6470708	
rs9398511	rs2048485	rs10141127	rs10800762	
rs16937662	rs423826	rs6594321	rs1517240	
rs75333528	rs11805194	kgp22805727	rs4235323	
rs11016279	rs825662	rs237291	rs11099493	
rs59167237	rs2729324	rs2358443	rs34015011	
rs7961706	rs2912500	rs759691	rs987371	
rs1795669	rs2805063	rs331089	rs55916244	
rs17060071	rs1918674	rs12677791	rs884272	
rs144932192	rs4807854	rs4977586	rs530782	
rs1403589	rs4765481	rs17460313	rs11213890	
rs11865596	rs7337921	rs2100623	rs11063870	
rs11861379	rs850139	rs6907872	rs12810587	
rs76165343	rs11786105	rs6813806	rs11855311	
rs17309233	rs4933800	rs2214935	rs11657201	
kgp22772929	rs9315332	rs6559441	rs7504974	
kgp22769099	rs12605097	rs11140345	rs34611736	
kgp22834926	rs72867511	rs4979180	rs34193306	
rs6647628	rs77009082	rs2101069	rs6969188	
rs5937944	rs115913570	rs39635	rs1320978	
rs4148837	rs2321176	rs11519979	rs900569	
rs6647669	rs6631366	rs7954735	rs12507442	
rs55658875	JHU_X.93172209	rs11866328	rs2935616	
JHU_X.1499369	rs4735551	rs11081188	rs263886	

70				
rs1363953	rs2521782	rs2226761	rs6920013	
rs62437138	rs6460259	rs12495406	rs418382	
rs201653	rs11793053	rs13170278	rs512064	
rs6607599	rs17552370	rs62242234	rs1991432	
rs1938011	rs6492498	rs4686964	rs4759324	
rs475717	rs9705446	rs9820108	rs8027648	
rs7064422	rs7334899	rs12188893	rs6035269	
rs2237142	rs7997543	rs6909610	rs10183266	
rs7687318	rs12119012	rs4074119	rs11892518	
rs623085	rs10217067	rs10005151	rs6780385	
rs2301953	rs7828331	rs16838070	rs11129541	
rs10925444	rs8045774	rs17694351	rs10462713	
rs74893722	rs966449	rs11759769	rs332811	
rs171980	rs3800876	rs6465084	rs608104	
rs10000991	rs6693438	rs41502546	rs10057544	
rs62521024	rs3930439	rs1888109	rs6901216	
rs75561824	rs2973628	rs11195091	rs7856692	
rs2293100	rs17081063	rs1459146	rs7929275	
exm2268135	rs56317803	rs11636777	rs3802793	
rs4477812	rs7914587	rs12710070	rs4526844	
rs28581	rs11812097	rs12983952	rs538034	
rs2472193	rs7105890	rs601196	rs2669502	
rs1056074	rs4797108	rs9859035	rs11848254	
rs11489680	rs4806815	rs28835644	rs3743024	
rs7303525	rs5935292	rs8071417	rs4924576	
rs66864675	rs1206231	rs1935058	rs9646256	
rs72676338	rs11683477	rs6027995	rs4783169	
rs2463700	rs7295310	rs13279837	rs16493	
rs5003450	rs35227427	rs9934836	rs73397184	
rs34069646	rs7514965	rs13127970	rs8110630	
rs6796064	rs250956	rs2120101	rs7150059	
rs28807715	rs250942	rs12205372	rs6856229	

Πίνακας 13: Αλληλεπιδράσεις lncRNAs-miRNAs που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων DIANA tools-LncBase Predicted v.2

lncRNAs	miRNAs
ENSG00000234640	hsa-miR-5194
	hsa-miR-590-3p
	hsa-miR-451b
ENSG00000226412	hsa-miR-5699-5p
	hsa-miR-587
	hsa-miR-653-3p

	hsa-miR-3065-3p
	hsa-miR-6754-3p
	hsa-miR-545-3p
	hsa-miR-664a-3p
ENSG00000236892	hsa-miR-1293
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-491-3p
	hsa-miR-335-3p
	hsa-miR-4659a-3p
ENSG00000256286	hsa-miR-513c-5p
ENSG00000248995	hsa-miR-410-3p
	hsa-miR-544b
	hsa-miR-3173-5p
	hsa-miR-6799-3p
	hsa-miR-6505-3p
	hsa-miR-6844
	hsa-miR-5100
ENSG00000256915	hsa-miR-7855-5p
	hsa-miR-9-5p
	hsa-miR-627-3p
	hsa-miR-205-3p
	hsa-miR-1910-5p
	hsa-miR-5582-3p
	hsa-miR-1284
	hsa-miR-9-5p
	hsa-miR-4742-3p
ENSG00000257124	hsa-miR-7114-5p
	hsa-miR-7-5p
	hsa-miR-5010-3p
	hsa-miR-548p
	hsa-miR-627-3p
ENSG00000229792	hsa-miR-6864-5p
	hsa-miR-6749-5p
	hsa-miR-3181
ENSG00000236076	hsa-miR-6826-5p
	hsa-miR-3161
ENSG00000261517	hsa-miR-4797-3p
	hsa-miR-6730-5p
	hsa-miR-135b-5p
	hsa-miR-3934-3p
	hsa-miR-135a-5p
	hsa-miR-6772-3p
	hsa-miR-3180-5p
	hsa-miR-338-5p
	hsa-miR-6720-5p
	hsa-miR-3192-3p
	hsa-miR-3617-5p
	hsa-miR-6512-3p
	hsa-miR-4762-3p

	hsa-miR-6867-5p
	hsa-miR-4639-3p
	hsa-miR-1277-5p
	hsa-miR-7154-5p
	hsa-miR-4699-5p
	hsa-miR-302c-5p
ENSG00000226846	hsa-miR-6513-3p
	hsa-miR-493-5p
	hsa-miR-6741-5p
	hsa-miR-5096
	hsa-miR-6780a-5p
	hsa-miR-4778-3p
	hsa-miR-155-5p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-26b-5p
ENSG00000236678	hsa-miR-6762-3p
	hsa-miR-488-3p
	hsa-miR-6839-3p
	hsa-miR-592
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-4482-3p
	hsa-miR-335-3p
	hsa-miR-6856-3p
	hsa-miR-335-3p
	hsa-miR-6830-3p
	hsa-miR-599
	hsa-miR-6857-3p
	hsa-miR-205-5p
	hsa-miR-519e-5p
	hsa-miR-6868-3p
	hsa-miR-4275
	hsa-miR-1178-3p
	hsa-miR-205-5p
	hsa-miR-4766-5p
	hsa-miR-515-5p
	hsa-miR-432-5p
	hsa-miR-4482-3p
	hsa-miR-3921
	hsa-miR-190b
	hsa-miR-140-3p
	hsa-miR-3921
	hsa-miR-205-5p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-1305
	hsa-miR-205-5p
	hsa-miR-4297

hsa-miR-218-2-3p
hsa-miR-5591-5p
hsa-miR-7154-5p
hsa-miR-143-5p
hsa-miR-3921
hsa-miR-5196-5p
hsa-miR-205-5p
hsa-miR-3135a
hsa-miR-429
hsa-miR-7847-3p
hsa-miR-664b-3p
hsa-miR-6856-3p
hsa-miR-6509-3p
hsa-miR-4773
hsa-miR-561-5p
hsa-miR-432-5p
hsa-miR-6856-3p
hsa-miR-4647
hsa-miR-4775
hsa-miR-3202
hsa-miR-577
hsa-miR-6856-3p
hsa-miR-642b-3p
hsa-miR-642a-3p
hsa-miR-143-5p
hsa-miR-890
hsa-miR-6856-3p
hsa-miR-4531
hsa-miR-3940-5p
hsa-miR-488-3p
hsa-miR-6756-3p
hsa-miR-4662b
hsa-miR-579-3p
hsa-miR-890
hsa-miR-4517
hsa-miR-4300
hsa-miR-432-5p
hsa-miR-890
hsa-miR-4507
hsa-miR-548as-3p
hsa-miR-6888-3p
hsa-miR-6751-3p
hsa-miR-432-5p
hsa-miR-3940-5p
hsa-miR-432-5p
hsa-miR-3127-3p
hsa-miR-374c-5p
hsa-miR-429
hsa-miR-190a-5p

	hsa-miR-664b-3p
	hsa-miR-4261
	hsa-miR-6777-3p
	hsa-miR-4426
	hsa-miR-592
	hsa-miR-5685
	hsa-miR-579-3p
ENSG00000223880	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000224933	hsa-miR-4685-3p
	hsa-miR-4753-3p
	hsa-miR-4287
	hsa-miR-875-5p
	hsa-miR-6867-3p
	hsa-miR-6728-3p
	hsa-miR-4667-3p
ENSG00000258081	hsa-miR-4713-5p
	hsa-miR-338-3p
	hsa-miR-7161-3p
	hsa-miR-629-3p
	hsa-miR-150-5p
	hsa-miR-4764-5p
ENSG00000258496	hsa-miR-4775
	hsa-miR-590-3p
	hsa-miR-1273e
	hsa-miR-518c-5p
	hsa-miR-3925-3p
	hsa-miR-3191-5p
ENSG00000233208	hsa-miR-3909
	hsa-miR-3619-5p
	hsa-miR-365b-5p
	hsa-miR-6866-5p
	hsa-miR-365a-5p
	hsa-miR-6852-3p
	hsa-miR-3619-5p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-3160-3p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-6866-5p
	hsa-miR-365b-5p
	hsa-miR-6719-3p
	hsa-miR-520g-5p
	hsa-miR-4695-5p
	hsa-miR-6866-5p
	hsa-miR-3661
	hsa-miR-4291
	hsa-miR-4291
	hsa-miR-3661
	hsa-miR-3160-3p
	hsa-miR-365a-5p

	hsa-miR-4695-5p
ENSG00000258933	hsa-miR-5093
	hsa-miR-876-5p
ENSG00000258702	hsa-miR-7106-5p
	hsa-miR-5095
	hsa-miR-6780a-5p
	hsa-miR-6872-3p
	hsa-miR-6872-3p
	hsa-miR-6878-3p
	hsa-miR-513b-5p
	hsa-miR-6718-5p
	hsa-miR-513c-3p
	hsa-miR-513a-3p
	hsa-miR-6894-5p
	hsa-miR-6846-5p
ENSG00000258853	hsa-miR-6814-5p
	hsa-miR-4257
	hsa-miR-6131
ENSG00000259737	hsa-miR-197-3p
	hsa-miR-3658
	hsa-miR-6515-3p
	hsa-miR-6739-3p
	hsa-miR-3184-3p
	hsa-miR-4652-3p
	hsa-miR-8068
	hsa-miR-3163
	hsa-miR-7156-5p
	hsa-miR-206
	hsa-miR-375
	hsa-miR-5096
	hsa-miR-1-3p
	hsa-miR-4282
	hsa-miR-4445-5p
	hsa-miR-5680
	hsa-miR-4677-5p
	hsa-miR-6835-3p
	hsa-miR-132-3p
	hsa-miR-340-5p
	hsa-miR-212-3p
	hsa-miR-5186
	hsa-miR-4459
	hsa-miR-664b-3p
	hsa-miR-590-3p
	hsa-miR-3674
	hsa-miR-5692c
	hsa-miR-5698
	hsa-miR-4522
	hsa-miR-3146
	hsa-miR-208a-5p

	hsa-miR-4778-3p
	hsa-miR-656-3p
	hsa-miR-6862-3p
	hsa-miR-1273g-3p
	hsa-miR-5692b
	hsa-miR-4755-3p
	hsa-miR-7109-5p
	hsa-miR-4472
	hsa-miR-8067
	hsa-miR-4778-3p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-6805-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-4796-3p
	hsa-miR-4778-3p
	hsa-miR-670-3p
	hsa-miR-7114-5p
	hsa-miR-3065-5p
	hsa-miR-1245b-3p
	hsa-miR-3944-5p
	hsa-miR-3944-5p
	hsa-miR-3146
	hsa-miR-7114-5p
ENSG00000259199	hsa-miR-4775
	hsa-miR-6845-3p
	hsa-miR-6749-3p
	hsa-miR-888-5p
	hsa-miR-5089-3p
	hsa-miR-7160-3p
	hsa-miR-7113-5p
	hsa-miR-1296-5p
ENSG00000261712	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000260450	hsa-miR-4538
	hsa-miR-6807-3p
	hsa-miR-1197
	hsa-miR-4786-5p
	hsa-miR-4673
	hsa-miR-5002-3p
	hsa-miR-4435
	hsa-miR-4708-5p
	hsa-miR-181c-5p
	hsa-miR-4528
	hsa-miR-4641
	hsa-miR-181d-5p
	hsa-miR-181a-5p
	hsa-miR-181b-5p
	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-365b-3p
	hsa-miR-365a-3p

	hsa-miR-6502-3p
	hsa-miR-3143
	hsa-miR-6744-5p
	hsa-miR-4749-3p
	hsa-miR-6874-5p
	hsa-miR-324-5p
	hsa-miR-543
	hsa-miR-765
	hsa-miR-6887-3p
	hsa-miR-4667-3p
	hsa-miR-217
	hsa-miR-670-3p
	hsa-miR-20a-3p
	hsa-miR-6512-5p
	hsa-miR-4461
	hsa-miR-4453
	hsa-miR-100-3p
	hsa-miR-302c-5p
	hsa-miR-1271-5p
	hsa-miR-143-3p
	hsa-miR-766-3p
	hsa-miR-3976
	hsa-miR-7843-3p
	hsa-miR-513b-5p
	hsa-miR-4786-3p
ENSG00000260057	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000269667	hsa-miR-4721
ENSG00000265400	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000267067	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000264254	hsa-miR-627-3p
	hsa-miR-8082
ENSG00000263622	hsa-miR-4283
ENSG00000237658	hsa-miR-7161-5p
	hsa-miR-4671-3p
	hsa-miR-6875-3p
	hsa-miR-3188
ENSG00000272198	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000237283	hsa-miR-4753-3p
	hsa-miR-3190-5p
	hsa-miR-1290
	hsa-miR-876-5p
	hsa-miR-1279
	hsa-miR-1236-5p
	hsa-miR-140-3p
	hsa-miR-653-3p
	hsa-miR-6833-3p
	hsa-miR-3926
	hsa-miR-3167
	hsa-miR-514b-5p

	hsa-miR-5581-3p
	hsa-miR-5582-3p
	hsa-miR-513c-5p
	hsa-miR-4774-3p
	hsa-miR-4327
ENSG00000226927	hsa-miR-338-3p
	hsa-miR-653-3p
	hsa-miR-4709-3p
	hsa-miR-6874-5p
	hsa-miR-590-3p
	hsa-miR-1180-5p
	hsa-miR-5197-5p
	hsa-miR-8082
	hsa-miR-7156-3p
	hsa-miR-4293
ENSG00000229225	hsa-miR-6081
ENSG00000230027	hsa-miR-6081
ENSG00000234184	hsa-miR-4764-3p
	hsa-miR-3692-5p
	hsa-miR-4652-3p
	hsa-miR-4764-3p
	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-6079
	hsa-miR-370-3p
	hsa-miR-4743-3p
	hsa-miR-4784
	hsa-miR-3150b-3p
	hsa-miR-4784
	hsa-miR-4743-3p
ENSG00000226644	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000261035	hsa-miR-7110-3p
	hsa-miR-3145-3p
	hsa-miR-6865-5p
	hsa-miR-6079
	hsa-miR-4282
	hsa-miR-6817-3p
	hsa-miR-4647
	hsa-miR-7515
	hsa-miR-6815-5p
	hsa-miR-6768-3p
	hsa-miR-4765
	hsa-miR-32-5p
	hsa-miR-499a-3p
	hsa-miR-6873-3p
	hsa-miR-3163
	hsa-miR-5589-3p
	hsa-miR-506-5p
	hsa-miR-891a-3p
	hsa-miR-4325

	hsa-miR-3065-5p
	hsa-miR-3689e
	hsa-miR-3689a-5p
	hsa-miR-3689b-5p
	hsa-miR-7152-5p
	hsa-miR-3689f
ENSG00000231755	hsa-miR-6797-5p
	hsa-miR-495-3p
	hsa-miR-5688
	hsa-miR-1293
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-509-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-4518
	hsa-miR-6515-5p
	hsa-miR-4653-5p
ENSG00000226218	hsa-miR-4290
	hsa-miR-7152-5p
	hsa-miR-513c-3p
	hsa-miR-513a-3p
	hsa-miR-6868-3p
ENSG00000230645	hsa-miR-545-5p
ENSG00000237326	hsa-miR-4640-5p
	hsa-miR-5683
ENSG00000235911	hsa-miR-7851-3p
	hsa-miR-5004-5p
	hsa-miR-3605-5p
ENSG00000267919	hsa-miR-3064-3p
	hsa-miR-3622b-3p
	hsa-miR-3622a-3p
	hsa-miR-211-5p
	hsa-miR-204-5p
	hsa-miR-875-3p
	hsa-miR-8081
	hsa-miR-186-3p
	hsa-miR-1202
ENSG00000227308	hsa-miR-513c-5p
	hsa-miR-1260b
	hsa-miR-627-3p
	hsa-miR-7851-3p
	hsa-miR-3613-3p
	hsa-miR-6127
	hsa-miR-4728-5p
	hsa-miR-1271-3p
	hsa-miR-6884-5p
	hsa-miR-4712-3p
	hsa-miR-6844
	hsa-miR-6733-3p
	hsa-miR-4716-3p

	hsa-miR-3133
	hsa-miR-27b-3p
	hsa-miR-27a-3p
	hsa-miR-6730-5p
	hsa-miR-186-5p
	hsa-miR-384
	hsa-miR-514b-5p
ENSG00000234446	hsa-miR-130a-5p
	hsa-miR-323a-3p
ENSG00000236106	hsa-miR-3934-3p
	hsa-miR-4276
	hsa-miR-219a-5p
	hsa-miR-7106-5p
	hsa-miR-6766-3p
	hsa-miR-605-5p
ENSG00000244545	hsa-miR-7855-5p
	hsa-miR-2355-3p
	hsa-miR-3189-5p
	hsa-miR-6879-3p
	hsa-miR-3619-5p
ENSG00000225044	hsa-miR-6827-5p
	hsa-miR-4648
ENSG00000227260	hsa-miR-6764-5p
	hsa-miR-519e-5p
	hsa-miR-515-5p
	hsa-miR-4326
ENSG00000233096	hsa-miR-765
	hsa-miR-8085
	hsa-miR-2467-3p
	hsa-miR-6780a-5p
	hsa-miR-648
ENSG00000249334	hsa-miR-6833-3p
	hsa-miR-7110-3p
	hsa-miR-450b-5p
	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-6882-3p
	hsa-miR-4515
	hsa-miR-593-3p
	hsa-miR-6758-3p
ENSG00000249618	hsa-miR-302f
	hsa-miR-1226-5p
	hsa-miR-8082
	hsa-miR-587
	hsa-miR-942-5p
	hsa-miR-4732-5p
	hsa-miR-1273e
	hsa-miR-942-5p
	hsa-miR-185-5p
	hsa-miR-4306

	hsa-miR-8082
	hsa-miR-4644
	hsa-miR-597-3p
	hsa-miR-5187-5p
	hsa-miR-4494
	hsa-miR-506-5p
	hsa-miR-185-5p
	hsa-miR-380-3p
	hsa-miR-4306
	hsa-miR-454-3p
	hsa-miR-5683
	hsa-miR-4644
	hsa-miR-5571-3p
	hsa-miR-5582-3p
	hsa-miR-4452
	hsa-miR-6818-5p
	hsa-miR-6885-3p
	hsa-miR-654-3p
	hsa-miR-5581-3p
	hsa-miR-3666
	hsa-miR-5581-3p
	hsa-miR-3663-5p
	hsa-miR-301b-3p
	hsa-miR-6873-5p
	hsa-miR-3663-5p
	hsa-miR-130a-3p
ENSG00000251388	hsa-miR-7-5p
	hsa-miR-7160-5p
ENSG00000250488	hsa-miR-6738-3p
	hsa-miR-5001-3p
	hsa-miR-6754-3p
ENSG00000248771	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-5047
	hsa-miR-6754-3p
	hsa-miR-1301-3p
	hsa-miR-877-3p
	hsa-miR-6754-3p
	hsa-miR-877-3p
	hsa-miR-4496
	hsa-miR-6875-3p
	hsa-miR-6875-3p
	hsa-miR-6733-3p
	hsa-miR-4786-3p
	hsa-miR-6733-3p
	hsa-miR-4778-3p
	hsa-miR-6734-3p

	hsa-miR-3942-3p
	hsa-miR-3662
	hsa-miR-5006-3p
	hsa-miR-4786-3p
	hsa-miR-3135b
	hsa-miR-1976
	hsa-miR-6734-3p
	hsa-miR-5047
	hsa-miR-6881-3p
	hsa-miR-1301-3p
	hsa-miR-651-3p
	hsa-miR-671-5p
	hsa-miR-3662
	hsa-miR-671-5p
	hsa-miR-651-3p
	hsa-miR-8068
	hsa-miR-136-3p
	hsa-miR-4778-3p
	hsa-miR-520f-5p
	hsa-miR-4755-5p
	hsa-miR-181b-3p
	hsa-miR-5006-3p
	hsa-miR-627-3p
	hsa-miR-1261
	hsa-miR-7843-3p
ENSG00000250819	hsa-miR-5706
	hsa-miR-4782-5p
	hsa-miR-1299
	hsa-miR-1273e
	hsa-miR-515-3p
	hsa-miR-4719
	hsa-miR-33b-3p
	hsa-miR-6740-3p
	hsa-miR-182-5p
	hsa-miR-1262
	hsa-miR-34b-3p
	hsa-miR-4701-3p
	hsa-miR-6715a-3p
	hsa-miR-137
	hsa-miR-4443
	hsa-miR-6839-5p
ENSG00000249882	hsa-miR-1304-5p
	hsa-miR-1255b-5p
	hsa-miR-6765-5p
	hsa-miR-1255a
	hsa-miR-516b-5p
ENSG00000261761	hsa-miR-17-3p
	hsa-miR-2110
	hsa-miR-6716-5p

	hsa-miR-2355-3p
	hsa-miR-17-3p
	hsa-miR-3074-5p
	hsa-miR-873-3p
	hsa-miR-4700-5p
	hsa-miR-1299
	hsa-miR-3074-5p
	hsa-miR-873-3p
	hsa-miR-7641
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-1299
	hsa-miR-2355-3p
	hsa-miR-1305
	hsa-miR-212-3p
	hsa-miR-1303
	hsa-miR-3671
	hsa-miR-132-3p
	hsa-miR-1279
	hsa-miR-8063
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-6851-3p
	hsa-miR-660-3p
	hsa-miR-5680
	hsa-miR-4659b-3p
ENSG00000250334	hsa-miR-6762-3p
	hsa-miR-7160-5p
	hsa-miR-4290
	hsa-miR-3140-5p
	hsa-miR-4999-3p
	hsa-miR-6513-5p
	hsa-miR-194-5p
	hsa-miR-3140-5p
	hsa-miR-4747-5p
	hsa-miR-6513-5p
	hsa-miR-194-5p
	hsa-miR-636
	hsa-miR-1305
	hsa-miR-4420
	hsa-miR-6780b-5p
	hsa-miR-607
	hsa-miR-4725-3p
	hsa-miR-4680-3p
	hsa-miR-1305
	hsa-miR-647
	hsa-miR-5196-5p
	hsa-miR-4747-5p
	hsa-miR-3160-3p
	hsa-miR-7975

	hsa-miR-548c-3p
	hsa-miR-607
	hsa-miR-597-5p
	hsa-miR-548c-3p
	hsa-miR-548aj-3p
	hsa-miR-216a-5p
	hsa-miR-6871-3p
	hsa-miR-216a-5p
	hsa-miR-548o-3p
	hsa-miR-548a-3p
	hsa-miR-548x-3p
	hsa-miR-6871-3p
	hsa-miR-6842-3p
	hsa-miR-671-5p
	hsa-miR-6842-3p
	hsa-miR-889-3p
	hsa-miR-548f-3p
	hsa-miR-181b-2-3p
ENSG00000251399	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000249781	hsa-miR-4802-3p
	hsa-miR-6773-3p
	hsa-miR-5010-3p
	hsa-miR-6773-3p
	hsa-miR-3925-5p
	hsa-miR-6773-3p
	hsa-miR-4802-3p
	hsa-miR-335-3p
	hsa-miR-3925-5p
	hsa-miR-4802-3p
	hsa-miR-4697-3p
	hsa-miR-4743-3p
	hsa-miR-1206
	hsa-miR-4704-3p
	hsa-miR-497-3p
	hsa-miR-4697-3p
	hsa-miR-4538
	hsa-miR-4429
	hsa-miR-7153-5p
	hsa-miR-4704-3p
	hsa-miR-223-3p
	hsa-miR-320b
	hsa-miR-320a
	hsa-miR-320d
	hsa-miR-320c
ENSG00000204754	hsa-miR-2115-3p
	hsa-miR-423-5p
	hsa-miR-4645-5p
	hsa-miR-548t-5p
	hsa-miR-6515-5p

	hsa-miR-548az-5p
	hsa-miR-4755-3p
	hsa-miR-607
	hsa-miR-3185
	hsa-miR-3132
	hsa-miR-4733-3p
	hsa-miR-548an
	hsa-miR-4775
	hsa-miR-548ah-5p
	hsa-miR-4531
	hsa-miR-4786-3p
	hsa-miR-7106-5p
	hsa-miR-6801-5p
	hsa-miR-421
	hsa-miR-2110
	hsa-miR-548l
ENSG00000251629	hsa-miR-6072
	hsa-miR-670-3p
	hsa-miR-92a-1-5p
	hsa-miR-6815-3p
	hsa-miR-550a-3-5p
	hsa-miR-550a-5p
	hsa-miR-514b-5p
	hsa-miR-149-5p
	hsa-miR-103a-2-5p
	hsa-miR-3074-5p
	hsa-miR-4641
	hsa-miR-6868-3p
	hsa-miR-4686
	hsa-miR-3074-5p
ENSG00000248489	hsa-miR-135b-5p
	hsa-miR-135a-5p
ENSG00000228495	hsa-miR-6795-5p
	hsa-miR-6887-5p
	hsa-miR-1324
	hsa-miR-4654
	hsa-miR-4713-5p
	hsa-miR-629-3p
	hsa-miR-1324
	hsa-miR-4713-5p
	hsa-miR-7977
	hsa-miR-3128
	hsa-miR-7109-5p
	hsa-miR-525-5p
	hsa-miR-520a-5p
	hsa-miR-7106-5p
	hsa-miR-299-3p
	hsa-miR-6748-5p
	hsa-miR-584-3p

	hsa-miR-3185
	hsa-miR-4673
	hsa-miR-4264
	hsa-miR-584-3p
	hsa-miR-92a-2-5p
	hsa-miR-625-5p
	hsa-miR-4264
	hsa-miR-92a-2-5p
	hsa-miR-4287
	hsa-miR-5704
	hsa-miR-629-3p
	hsa-miR-7977
	hsa-miR-6740-3p
	hsa-miR-7515
	hsa-miR-6751-5p
	hsa-miR-340-5p
	hsa-miR-7156-5p
	hsa-miR-6780b-5p
	hsa-miR-4685-3p
	hsa-miR-6754-3p
	hsa-miR-4721
	hsa-miR-4496
	hsa-miR-629-3p
	hsa-miR-1288-3p
	hsa-miR-2110
	hsa-miR-4685-3p
	hsa-miR-4271
	hsa-miR-5584-3p
	hsa-miR-412-3p
	hsa-miR-4429
	hsa-miR-150-5p
	hsa-miR-4699-5p
	hsa-miR-4725-3p
	hsa-miR-148b-5p
	hsa-miR-320b
	hsa-miR-320c
	hsa-miR-1273f
	hsa-miR-320a
	hsa-miR-320d
	hsa-miR-3916
	hsa-miR-4765
	hsa-miR-7160-5p
	hsa-miR-6847-5p
	hsa-miR-4699-3p
	hsa-miR-2861
	hsa-miR-32-3p
	hsa-miR-1273f
	hsa-miR-4731-5p
	hsa-miR-7977

	hsa-miR-5196-3p
	hsa-miR-450b-5p
	hsa-miR-6847-3p
ENSG00000271040	hsa-miR-1298-5p
ENSG00000225879	hsa-miR-1291
	hsa-miR-6775-3p
	hsa-miR-6755-5p
	hsa-miR-3132
	hsa-miR-6749-3p
	hsa-miR-6851-3p
	hsa-miR-197-5p
	hsa-miR-593-3p
	hsa-miR-7160-3p
	hsa-miR-4797-3p
	hsa-miR-6868-3p
ENSG00000271978	hsa-miR-597-3p
	hsa-miR-3685
	hsa-miR-4646-3p
	hsa-miR-889-3p
	hsa-miR-513a-5p
	hsa-miR-4482-3p
	hsa-miR-516a-3p
	hsa-miR-516b-3p
	hsa-miR-4433b-5p
	hsa-miR-4752
	hsa-miR-4677-5p
	hsa-miR-7152-5p
	hsa-miR-1285-5p
	hsa-miR-6831-5p
	hsa-miR-335-5p
	hsa-miR-7152-5p
	hsa-miR-4657
	hsa-miR-3074-5p
	hsa-miR-3118
	hsa-miR-1205
	hsa-miR-3646
	hsa-miR-6876-5p
	hsa-miR-4682
	hsa-miR-4261
	hsa-miR-6873-5p
ENSG00000233607	hsa-miR-5700
	hsa-miR-4755-5p
	hsa-miR-5006-3p
	hsa-miR-302b-5p
	hsa-miR-302d-5p
	hsa-miR-514b-5p
	hsa-miR-155-5p
	hsa-miR-513c-5p
	hsa-miR-937-5p

	hsa-miR-302c-5p
	hsa-miR-5009-5p
	hsa-miR-4446-5p
	hsa-miR-17-3p
	hsa-miR-4659b-5p
ENSG00000227489	hsa-miR-4709-3p
	hsa-miR-125b-2-3p
	hsa-miR-4264
	hsa-miR-4446-5p
	hsa-miR-513c-3p
	hsa-miR-3120-5p
	hsa-miR-513a-3p
	hsa-miR-4755-5p
ENSG00000224017	hsa-miR-6824-3p
	hsa-miR-6764-3p
	hsa-miR-203b-3p
	hsa-miR-1913
	hsa-miR-6818-3p
	hsa-miR-4490
	hsa-miR-515-5p
	hsa-miR-519e-5p
	hsa-miR-4677-5p
	hsa-miR-324-3p
	hsa-miR-518c-5p
	hsa-miR-7159-5p
	hsa-miR-4776-3p
	hsa-miR-330-5p
	hsa-miR-3191-5p
	hsa-miR-593-3p
	hsa-miR-627-3p
	hsa-miR-1303
	hsa-miR-3682-3p
	hsa-miR-335-3p
	hsa-miR-1305
	hsa-miR-491-3p
	hsa-miR-3065-5p
	hsa-miR-4743-3p
	hsa-miR-22-3p
	hsa-miR-3160-5p
	hsa-miR-6132
	hsa-miR-6895-3p
	hsa-miR-1272
	hsa-miR-7156-5p
	hsa-miR-877-3p
	hsa-miR-619-3p
ENSG00000253619	hsa-miR-423-5p
	hsa-miR-3192-5p
	hsa-miR-6747-3p
	hsa-miR-1226-3p

	hsa-miR-302f
	hsa-miR-574-5p
	hsa-miR-30c-1-3p
	hsa-miR-628-3p
	hsa-miR-3184-5p
	hsa-miR-6788-5p
	hsa-miR-30c-2-3p
ENSG00000253593	hsa-miR-5699-3p
	hsa-miR-361-3p
ENSG00000253354	hsa-miR-581
ENSG00000228714	hsa-miR-762
ENSG00000226197	hsa-miR-6817-3p
ENSG00000237414	hsa-miR-584-5p
ENSG00000224648	hsa-miR-3661
ENSG00000231110	hsa-miR-942-5p
	hsa-miR-4659b-3p
	hsa-miR-4659a-3p
	hsa-miR-218-5p
	hsa-miR-636
	hsa-miR-6868-3p
	hsa-miR-29a-5p
	hsa-miR-4762-3p
	hsa-miR-3179
	hsa-miR-1193
ENSG00000234622	Δεν εντοπίστηκε
ENSG00000233103	hsa-miR-580-5p
	hsa-miR-4743-3p
	hsa-miR-1272
	hsa-miR-509-3p
	hsa-miR-4663
	hsa-miR-3160-3p
	hsa-miR-183-5p
	hsa-miR-4450
	hsa-miR-6875-3p
	hsa-miR-4646-3p
	hsa-miR-6888-3p
	hsa-miR-22-5p
	hsa-miR-1252-3p
	hsa-miR-1290
	hsa-miR-3646
ENSG00000203402	hsa-miR-3688-3p
	hsa-miR-1206
	hsa-miR-6750-5p
	hsa-miR-3658
	hsa-miR-4637
	hsa-miR-6744-5p
	hsa-miR-5093
	hsa-miR-1179
	hsa-miR-370-3p

	hsa-miR-548ag
	hsa-miR-3667-5p
	hsa-miR-3613-3p
	hsa-miR-758-5p
	hsa-miR-624-3p
	hsa-miR-6834-5p
	hsa-miR-6849-3p
	hsa-miR-3692-5p
	hsa-miR-5589-5p
	hsa-miR-4422
	hsa-miR-6133
	hsa-miR-6129
	hsa-miR-4419a
	hsa-miR-4510
	hsa-miR-570-5p
	hsa-miR-548ai
	hsa-miR-6127
	hsa-miR-6875-5p
	hsa-miR-6130
	hsa-miR-3126-5p
	hsa-miR-6734-5p
	hsa-miR-3147
	hsa-miR-5587-5p
	hsa-miR-3664-5p
	hsa-miR-4457
	hsa-miR-125b-2-3p
	hsa-miR-1254
	hsa-miR-380-5p
	hsa-miR-4731-5p
	hsa-miR-5590-3p
	hsa-miR-6853-3p
	hsa-miR-3653-3p
	hsa-miR-1912
	hsa-miR-7161-5p
	hsa-miR-6822-5p

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Α. (2008). *Βιολογία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 785-790.
2. Μαρκαντώνη Μαρία (σε εξέλιξη). *Γονιδιωματική: Μελέτη των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
3. Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A.M., Keller, A., Meese, E. (2014). Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertility and Sterility*, 102(4), p.989-997.
4. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, 13(37).
5. 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.
6. Boissière, A., Gala, A., Ferrières-Hoa, A., Mullet, T., Baillet, S., Petiton, A., Hamamah, S. (2017). Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. *Basic and clinical andrology*, 27(7).
7. Chelala, C., Khan, A., Lemoine, R.N., (2009). SNPnexus: a web database for functional annotation of newly discovered and public domain single nucleotide polymorphisms, *Bioinformatics*, 25(5),p. 655–661.
8. Colaco, S., Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1):14.
9. Dayem Ullah, A.Z., Lemoine, R.N., Chelala, C., (2012), SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants, *Nucleic Acids Research*, 40(W1), p. W65–W70.
10. Dayem Ullah, A.Z., Oscanoa, J., Wang, J., Nagano, A., Lemoine, N. R., & Chelala, C. (2018). SNPnexus: assessing the functional relevance of genetic variation to facilitate the promise of precision medicine. *Nucleic acids research*, 46(W1), W109–W113.
11. Durairajanayagam, D. (2018). Lifestyle Causes of Male Infertility, *Arab Journal of Urology*, 16(1), p.10-20.
12. Gilbert SF (2000). *Developmental Biology* (6th edition). Sunderland (MA): Sinauer Associates. Spermatogenesis.
13. Gou, L., Dai, P., & Liu, M. (2014). Small noncoding RNAs and male infertility. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5(6), p. 733-745.
14. Hamberg, M., Backes, C., Fehlmann, T., Hart, M., Meder, B., Meese, E., & Keller, A. (2016). MiRTargetLink--miRNAs, Genes and Interaction Networks. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 564.
15. Hotaling, M.J. (2013). Genetics of Male Infertility. *Urol Clin North Am*, 41(1), p.1-17.

16. Huang, C., Liu, W., Ji, G. X., Gu, A. H., Qu, J. H., Song, L., & Wang, X. R. (2012). Genetic variants in TP53 and MDM2 associated with male infertility in Chinese population. *Asian journal of andrology*, 14(5), p. 691–694.
17. Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M. P., Krawetz, S. A., & Reproductive Medicine Network (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Human reproduction update*, 19(6), p. 604–624.
18. Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility – The other side of the equation, *Australian Fam Physician*, 46(9), p. 641–646.
19. Kotaja, N. (2014). MicroRNAs and Spermatogenesis, *Fertility and Sterility*, 101(6), p.1552-1562.
20. Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Research*, 47 (D1), D155-D162.
21. Krausz, C., Escamilla, A. R., & Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), p.159-174.
22. Kuijk, E. W., de Gier, J., Lopes, S. M., Chambers, I., van Pelt, A. M., Colenbrander, B., & Roelen, B. A. (2010). A distinct expression pattern in mammalian testes indicates a conserved role for NANOG in spermatogenesis. *PLoS one*, 5(6), e10987.
23. Kurzawski, M, Kaczmarek, M, Kłysz, M, Malinowski, D., Kazienko, A., Kurzawa, R., Drozdziak, M.(2017). MMP2, MMP9 and TIMP2 polymorphisms affect sperm parameters but not fertility in Polish males. *Andrologia*, 49(5).
24. Lachance, C. , Goupil, S. and Leclerc, P. (2013), Stattic V, a STAT3 inhibitor, affects human spermatozoa through regulation of mitochondrial activity. *J. Cell. Physiol.*, 228(4), p. 704-713.
25. Leaver, R. B. (2016). Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing*, 25(18), p. 35–40.
26. Li, Y., Wang, H., Wan, F., Liu, F., Liu, J., Zhang, N., Jin, S.H., Li, J. (2012). Deep sequencing analysis of small non-coding RNAs reveals the diversity of microRNAs and piRNAs in the human epididymis. *Gene*, 497(2), 330–335.
27. Li, Z., Yu, J., Zhang, T., Li, H., Ni, Y. (2013). rs189037, a functional variant in *ATM* gene promoter, is associated with idiopathic nonobstructive azoospermia, *Fertility and Sterility*, 100(6), p.1536-1541.
28. Ma, J., Lu, H.Y., Xia, Y.K., Dong, H.B., Gu, A.H., Li, Z.Y., Li, Z., Chen. A.M., Wang, X.R., Wang, S.L. (2010). BCL2 Ala43Thr Is a Functional Variant Associated with Protection Against Azoospermia in a Han-Chinese Population, *Biology of Reproduction*, 83(4), p.656-662.
29. Marees, A.T., de Kluiver, H., Stringer, S., Vorspan, F., Curis, E., Marie-Claire, C., Derks, E.M. (2018). A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis, *International journal of methods in psychiatric research*, 27(2), e1608.

30. Marques, C.J., Pinho, M.J., Carvalho, F., C., Bièche, I., Barros, A., Sousa, M. (2011). DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages, *Epigenetics*, 6(11), p. 1354-1361.
31. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356.
32. Meunier, J., Lemoine, F., Soumillon, M., Liechti, A., Weier, M., Guschanski, K., Hu, H., Khaitovich, P., Kaessmann, H. (2013). Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome research*, 23(1), p. 34–45.
33. Miyamoto, T., Minase, G., Shin, T., Ueda, H., Okada, H., & Sengoku, K. (2017). Human male infertility and its genetic causes. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), p. 81–88.
34. Mostafa, T., Fouad, H., Nabil, N., Rashed, L., Sabry, D., Abougabal, K., Gendy, B.S. (2017), Aryl hydrocarbon receptor (AhR) rs2066853 gene polymorphism association with infertile oligoasthenoteratozoospermic men and seminal oxidative stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (9), p. 8297-8301.
35. Mostafa, T. , Nabil, N. , Rashed, L. , Makeen, K. , El-Kasas, M. A. and Mohamaed, H. A. (2018), Seminal SIRT1 expression in infertile oligoasthenoteratozoospermic men with varicocele. *Andrology*, 6(2), p.301-305.
36. 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.
37. Naderi G.H., Rad, H.M., Tabassomi, F., Latif, A.H. (2015). Seminal insulin-like growth factor-I may be involved in the pathophysiology of infertility among patients with clinical varicocele, *Human Fertility*, 18(2), p. 92-95.
38. 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.
39. Novotny, G. W., Nielsen, J. E., Sonne, S. B., Skakkebaek, N. E., Meyts, E. R., & Leffers, H. (2007). Analysis of gene expression in normal and neoplastic human testis : new roles of RNA. *International Journal of Andrology*, 30(4), p. 316–327.
40. O’ Flynn O’Brien, K.L., Varghese, A.C, Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: A review, *Fertility and Sterility*, 93(1), p.1-12
41. Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Reczko, M., Maragkakis, M., Dalamagas, T. M., & Hatzigeorgiou, A. G. (2013). DIANA-LncBase: experimentally verified and computationally predicted microRNA targets on long non-coding RNAs. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D239–D245.
42. Paraskevopoulou, M. D., Vlachos, I. S., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Kanellos, I., Vergoulis, T., Hatzigeorgiou, A. G. (2016). DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic acids research*, 44(D1), D231–D238.
43. Poongothai, J., Gopenath, T. S., Manonayaki, S., (2009). Genetics of human male infertility, *Singapore Medical journal*, 50(4), p. 336-47.
44. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., de Bakker, P.I., Daly, M.J., Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome

- association and population-based linkage analyses, *American journal of human genetics*, 81(3), 559–575.
45. Rentería M.E., Cortes A., Medland S.E. (2013). Using PLINK for Genome-Wide Association Studies (GWAS) and Data Analysis. In: Gondro C., van der Werf J., Hayes B. (eds) *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1019. Humana Press, Totowa, NJ.
 46. Russell, P.J. (2006). *iGenetics, Μια Μεντελική Προσέγγιση* (μεταφρ.). Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα, σελ. 75-79.
 47. Schlegel, P. N. (2009). Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecol.*, 61(4), p. 261-283.
 48. 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.
 49. Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T.I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., and Lancet, D. (2016), The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* 54: 1.30.1- 1.30.33.
 50. Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers?. *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), p. 463–466.
 51. Tenorio, F., Neto, L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, p. 10–26.
 52. Turner, J. M. A. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, 134(10), p. 1823–1831.
 53. Turner, S., Armstrong, L. L., Bradford, Y., Carlson, C. S., Crawford, D. C., Crenshaw, A. T., Ritchie, M. D. (2011). Quality control procedures for genome-wide association studies. *Current protocols in human genetics, Chapter 1*, Unit 1.19.
 54. Sharma R., Agarwal A. (2011). Spermatogenesis: An Overview. In: Zini A., Agarwal A. (eds) *Sperm Chromatin*. Springer, New York, NY.
 55. Thompson & Thompson των Nussbaum, McInnes, Willard (2011). *Ιατρική Γενετική* (μεταφρ.). Εκδόσεις Π. Πασχαλίδη.
 56. Uitterlinden, A.G. (2016). An Introduction to Genome-Wide Association Studies: GWAS for Dummies, *Semin Reprod Med*, 34(4), p. 196-2014.
 57. Volders, P.J., Helsens, K., Wang, X., Menten, B., Martens, L., Gevaert, K., Vandesompele, J., Mestdagh, P. (2013). LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures. *Nucleic Acids Research*(41),D246-D251.
 58. Volders, P.J., Anckaert, J., Verheggen, K., Nuytens, J., Martens, L., Mestdagh, P., Vandesompele, J. (2019). LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*(47)D1, D135-D139.
 59. Wang, C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Yang, C., Zhu, C., & Li, L. (2011). Altered Profile of Seminal Plasma MicroRNAs in the Molecular Diagnosis of Male Infertility, *Clinical Chemistry*, 57(12), 1722–1731.

60. Weyrich, A. (2012), Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98: 2.13.1-2.13.3.
61. Wichman, L., Somasundaram, S., Breindel, C., Valerio, D. M., Mccarrey, J. R., Hodges, C. A., & Khalil, A. M. (2017). Dynamic expression of long noncoding RNAs reveals their potential roles in spermatogenesis and fertility, *Biology of Reproduction*, 97(2), p. 313–323.
62. Wu, T., & Du, Y. (2017). LncRNAs: From Basic Research to Medical Application. *International journal of biological sciences*, 13(3), p. 295–307.
63. Wu, W., Qin, Y., Li, Z., Dong, J., Dai, J., Lu, C., Zhao, Y., Zhu, Y., Zhang, W., Hang, B., Sha, J., Shen, H., Xia, Y., Hu, Z., Guo, X., Wang, X. (2013). Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141 , miR-429 and miR-7-1-3p. *Human Reproduction*, 28(7), p. 1827–1836.
64. Xu, L., Xiuli, Q., Shengliang, D., Yumei, X., Xinlei, R., Gaoyun, C., Xiacong, Y., Lili, H., Qirui, D. (2014). MicroRNAs: potential biomarkers for disease diagnosis. *Bio-Medical Materials and Engineering* , 24(6), p. 3917-3925.
65. Yan, B., Wang, Z., & Guo, J. (2012). The research strategies for probing the function of long noncoding RNAs. *Genomics*, 99(2), p. 76–80.
66. Yan, L., Wu, S., Zhang, S., Ji, G., Gu, A. (2014). Genetic variants in telomerase reverse transcriptase (TERT) and telomerase-associated protein 1 (TEP1) and the risk of male infertility. *Gene*, 534 (2), p.139-143.
67. 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.
68. Yoon, J. H., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2014). Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. *Seminars in cell & developmental biology*, 34, p. 9–14.
69. Zhang, R., Peng, Y., Wang, W., & Su, B. (2007). Rapid evolution of an X-linked microRNA cluster in primates. *Genome research*, 17(5), p. 612–617.
70. Zhou, F., Chen, W., Jiang, Y., He, Z. (2019). Regulation of long non-coding RNAs and circular RNAs in spermatogonial stem cells. *Reproduction*, 158(1), R15-R25.