

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Anett Michelle Valdner

**MEESTE VILJAKUSEGA SEOTUD GEENIDE KOOPIAARVU
VARIEERUVUSED**

Bakalaureusetöö
Geenitehnoloogia
12 EAP

Juhendajad: Laura Kasak, MSc
Anna Maria Punab
Prof. Maris Laan

TARTU 2017

INFOLEHT

Meeste viljakusega seotud geenide koopiarvu varieeruvused

Antud bakalaureusetöös anti ülevaade peamistest mehepoolse viljatuse põhjustest ning keskenduti geneetilistele põhjustele. Meeste viljatuse peamiseks põhjuseks on spermatogeneesis osalevate geenide ekspressiooni muutused, mida võivad tekitada mitmesugused struktuursed ümberkorraldused. Käesolevas töös kinnitati ülegenoomse uuringu andmete põhjal ühte väljavalitud CNV lookust *TaqMan qPCR* meetodiga. Valideerimisega kinnitusid kõik CNV-d, mis olid ennustatud idiopaatilistel Eesti viljatutel meestel, kuid kandjate sagedus ei olnud võrreldes kontrollgrupiga (REPROmeta ja rasedate naiste mehed) statistiliselt oluline. Edaspidiselt oleks vaja replikatsioonikatse jaoks laiendada valimit, et kinnitada CNV seost mehepoolse viljatusega.

Mehepoolne viljatus, *TaqMan qPCR*, CNV

B790 Kliiniline geneetika

Copy number variations in male infertility

In this bachelor thesis an overview of the main genetic causes of male infertility was given. One of the genetic causes of male infertility are CNVs in genes that are participating in spermatogenesis. According to this study, a novel CNV that was previously predicted by whole-genome screening of CNVs, was validated using *TaqMan qPCR*. All the predicted CNV carriers were confirmed. However, the frequency in Estonian idiopathic men was 2.5%, which is not statistically significant compared to the control group (REPROmeta and partners of pregnant women). A replication study in a larger sample set should be carried out in order to elucidate the CNVs role in male infertility.

Male infertility, *TaqMan qPCR*, CNV

B790 Clinical genetics

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Meestepoolne viljatus.....	9
1.1.1 Definitsioon ja levimus.....	9
1.1.2 Etioloogia.....	9
1.2 Genoomi struktuursed varieeruvused.....	12
1.3 Koopiaarvu varieeruvuste detekteerimine.....	14
1.3.1 Ülegenoomsed meetodid.....	15
1.3.2 Lookuspõhised meetodid.....	16
1.4 Koopiaarvu varieeruvuste seos meeste viljatusega.....	18
1.4.1 Y kromosoom.....	18
1.4.2 X kromosoom.....	20
1.4.3 Autosoomid.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ.....	25
2.1 Töö eesmärgid.....	25
2.2 Materjal ja metoodika.....	26
2.2.1 Töö ülesehitus.....	26
2.2.2 Valimi kirjeldus.....	27
2.2.3 DNA eraldamine verest.....	28
2.2.4 Eksperimentaalne validatsioon <i>TaqMan</i> meetodil uuele kandidaat CNV piirkonnale.....	28
2.2.5 Andmete analüüs.....	29
2.3 Tulemused.....	30
2.3.1 Eksperimentaalseks kinnitamiseks välja valitud deletsioon.....	30
2.3.2 <i>LRRC69</i> geeni iseloomustus.....	30
2.3.3 Eksperimentaalne validatsioon <i>TaqMan</i> meetodil uuele kandidaat CNV piirkonnale.....	31
2.4 Arutelu.....	33

2.4.1 Koopiaarvu varieeruvuste roll mehepoelses viljatuses.....	33
2.4.2 LRRC69 geeni tähtsus meeste viljakuses.....	35
KOKKUVÕTE.....	36
RESÜMEE/SUMMARY.....	37
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	49
LIHTLITSENTS.....	50

KASUTATUD LÜHENDID

AZF- azoospermia faktor

BAC- bakteri kunstlik kromosoom

BAC-aCGH- genoomsete BAC kloonide võrdlev genoomne hübridisatsioon

KMI- kehamassiindeks

bp- aluspaar

CNV- koopiaarvu varieeruvus

FISH- fluorestsents *in situ* hübridisatsioon

FoSTeS- replikatsioonikahvli peatumine ja matriitsi ümbervahetus

Kb- 10^3 aluspaari

MAPH- multipleks amplifitseeritavate proovide hübridisatsioon

Mb- 10^6 aluspaari

MEI- vahendatud retrotranspositsioon või mobiilse elemendi insertioon

MLPA- multipleksne ligatsioon-vahendatud proovi amplifikatsioon

MMBIR- mikrohomoloogia vahendatud katkemisest põhjustatud replikatsioon

NAHR- mittealleelne homoloogne rekombinatsioon

NGS- teise põlvkonna sekveneerimine

NHEJ- mittehomoloogne otsade liitmine

Oligo-aCGH- lühikeste unikaalsete oligote võrdlev genoomne hübridisatsioon

qPCR- kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

REPROMETA- *REPRO*grammed fetal and/or maternal *MET*abolism

SNP- ühe nukleotiidi polümorfism

UPD- uniparentaalne disoomia

WHO (*World Health Organisation*)- Maaailma Terviseorganisatsioon

SISSEJUHATUS

Viljatus on maailmas üha suurenev probleem, mille levimus paaride seas on hinnanguliselt 10-15% ja meeste seas umbes 7% (Krausz, 2011). Meeste viljatus on enamasti põhjustatud spermatogeneesi häiretest, mis viivad vähenenud või olematule spermide produktsioonile (Massart *et al.*, 2012). Kuigi viimaste aastate uuringud on toonud palju selgust meeste viljatuse teemasse, on teada vaid ligikaudu pooled häirete põhjustajatest. Teise poole haigetest moodustavad idiopaatilised viljatud, kellel haiguse põhjuseks loetakse veel tuvastamata geneetilisi aberratsioone (Hochstenbach ja Hackstein, 2000).

Geenid mängivad viljakuses väga olulist rolli. On leitud, et paarid, kes on saanud lapse kunstliku viljastamise teel, omasid meessoost sugulasi, kelle spermide hulk oli keskmisest näitajast tunduvalt madalam (Meschede *et al.*, 2000). Geenid osalevad nii meeste kui naise sugunäärmete ja organite arengus, spermatogeneesi ja oogeneesi parakriinses kontrollis ning viljastumises ja implanteerumises (Matzuk ja Lamb, 2008). Ainuüksi spermatogeneesist võtavad osa mitmed tuhanded geenid (Schultz *et al.*, 2003). Kui nende geenide funktsioon on mingil moel häiritud või pidurdunud võib see kaasa tuua viljakusega seotud probleeme (madal sperma kontsentratsioon, vähene spermide liikuvus, ebanormaalne morfoloogia jpm), mistõttu on rasestumine raskendatud (Kumar ja Singh, 2015). Geneetilised muudatused, mis moodustavad ligikaudu 8% kõikidest juhtudest (Punab *et al.*, 2016), võivad olla punktmutatsioonid, spermatogeneesiga seotud geenide polümorfismid, mikrodeletsioonid Y kromosoomil, kromosomaalsed translokatsioonid, deletsioonid ning duplikatsioonid (Kuroda-Kawaguchi *et al.*, 2001; Carrell *et al.*, 2006). Tuvastatud lookused moodustavad vaid väga väikese osa haiguse mõjutajatest, mistõttu on oluline uurida veel tundmatuid ümberkorraldusi genoomis, mis võiksid olla seotud viljatusega.

Koopiaarvu varieeruvused (CNV, *copy number variation*) on vähemalt 50 aluspaari pikkused segmendid, mille koopiaarv erineb, kui võrrelda kahte või enamat genoomi. CNV-d, mida päritakse või tekivad *de novo*, on duplikatsioonid, deletsioonid, inversioonid ja translokatsioonid (Alkan *et al.*, 2011) ning nende tuvastamiseks kasutatakse erinevaid meetodeid. CNV-d võivad olla intergeensed või hõlmata geene, moodustades olulise osa inimese geneetilisest eripärast (Redon *et al.*, 2006). Kui CNV-d on seotud genoomi oluliste piirkondadega, võivad nad põhjustada diabeeti, vähki, astmat, autoimmuunhaiguseid, skisofreeniat, viljatust jpm (Ionita-Laza *et al.*, 2008).

Kui parendame teadmisi potentsiaalsetest viljakuse geneetilistest mõjutajatest, saaksid hakata spetsialistid ja arstid paremini nõustama viljatuid paare ning leidma ravi viljatuse ennetamiseks.

Käesolevas bakalaureusetöös kirjeldatakse meeste viljatuse fenotüüpi, etioloogiat, levimust ja haiguse taga olevaid geenisiseseid struktuurseid variatsioone, nende tekkemehhanisme ja analüüsimisvõimalusi.

Praktilise töö eesmärgiks oli struktuursete genoomsete variantide ehk koopiaarvu varieeruvuste ülegenoomsest analüüsist välja valitud viljatusega potentsiaalselt seotud kandidaatgeeni struktuurse ümberkorralduse ja bioloogilise tausta uurimine ja kirjeldamine.

Märksõnad: meestepoolne viljatus, koopiaarvu varieeruvus (CNV)

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Meestepoolne viljatus

1.1.1 Definiitsioon ja levimus

Viljatus on haigus, mille puhul last sooviv paar ei rasestu pärast ühte aastat regulaarset kaitsmata vahekorda. 15% kõikidest paaridest on viljatud ning 50% neist juhtudest on seotud mehepoolse faktoriga (Jungwirth *et al.*, 2012). Meeste viljatuse levimus maailmas varieerub 2,5%-lt Aafrikas (Agarwal *et al.*, 2015) 12%-ni Ida-Euroopas (Sanocka *et al.*, 2003). Analüüsid on näidanud aastate lõikes mitmes maailma piirkonnas sperma kvaliteedi langust. Siiski jääb selgusetuks, miks mõnes geograafilises piirkonnas on mehed viljakamad kui teises (Kumar ja Singh, 2015).

Viljatust põhjustavad mitmed tegurid. Esiteks võib probleem olla seotud spermide liikuvuse, morfoloogia või madala spermide arvuga. Teisalt on mehepoolne viljatus tingitud erinevatest keskkonnateguritest ning seotud muude haiguste ja sündroomidega nagu näiteks krüptorhism, hüpospaadia, munandivähk jpm (Skakkebaek *et al.*, 2001).

Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) on määranud kriteeriumid sperma kvaliteedile. Nende kriteeriumite järgi saab patsiendid jagada peamiselt viite erinevasse klassi. On patsiendid, kellel on diagnoositud aspermia (seemnevedelik puudub täielikult), azoospermia (ejakulaadis puuduvad spermid), asthenozoospermia (liikuvaid sperme <40%), oligozoospermia (<39 miljonit spermi ejakulaadis) või teratozoospermia (normaalse morfoloogiaga sperme <12%) (Massart *et al.*, 2012; WHO laboratory manual, 2010). Nende kriteeriumitega saab enamikel juhtudest määratleda mehepoolset viljatust, kuid on ka erandeid. Mõnel juhul võivad inimese sperma kvaliteedi hinnangu väärtused olla üle kriteeriumite, kuid haigus on põhjustatud muude, geneetiliste, biokeemiliste, kliiniliste ja keskkonnafaktorite poolt (suitsetamine, narkootikumid, alkohol, ülekaal). Need patsiendid, kelle haiguse põhjus ei ole teada, on määratletud idiopaatiliste (põhjuseta) viljatute meestena ning nad moodustavad umbes kolmandiku kõikidest viljatutest meestest (McLachlan, 2013).

1.1.2 Etioloogia

Eestis on teada umbes 40% viljatute meeste haiguse põhjustajaid, kuid 60% jäävad selgusetuks (Punab *et al.*, 2016). Võrreldes sarnase värse uuringuga Taanis, on haiguse

põhjuseid teada 2/3 juhtudest (Olesen *et al.*, 2017). Tegelikult jääb nende kahe (põhjusega/põhjuseta) osakaal umbes 50% kanti, kuid eelnevalt mainitud väärtuste erinevus võib-olla selles, et Taanis jõudsid vastavasse kliinikusse juba eel-selekteeritud patsiendid, samas kui Eestis osalevaid viljatuid mehi analüüsiti peale viljatuse kaebusega pöördumist androloogiakliinikusse. Täpsemalt saab Eesti meeste viljatuse põhjuste jaotumist näha joonisel 1.

Ühe osa põhjusega viljatutest moodustavad kaasasündinud urogenitaalsüsteemi väärarenguga mehed, kelle hulgas levinuimad haigused on krüptorhism ja hüpospaadia. Krüptorhism puudutab 1-3% vastsündinud poisse (Chung ja Brock, 2011) ning on Eesti elanikkonnas levinud 10% viljatutel ning 2% viljakatel meestel (Punab *et al.*, 2016). Enamikel juhtudel langevad munandid esimese eluaasta jooksul skrootumisse ning viljatust ei teki. Krüptorhismi puhul ei toimu langust või siis tõusevad munandid hilisemas elujärgus skrootumi põhjast üles. Krüptorhism on Taani meeste hulgas sageduselt teine viljatuse põhjus, moodustades umbes 16% kõikidest viljatusjuhtumitest. Hüpospaadia on peenise kaasasündinud väärareng, mille puhul kusiti avaneb peenise ventraalses pooles. Hiljutiste andmete järgi kasvab hüpospaadia juhtumite arv iga aastaga (Skakkebaek *et al.*, 2016).

Kümnendiku viljatusjuhtumitest moodustavad nii Eesti kui Taani meeste seas teadaolevad geneetilised põhjused, mille hulka kuuluvad autosomaalsed ja sugukromosomaalsed aberratsioonid, *CTFR* geeni mutatsioonid ja Y kromosoomi mikroleletsioonid. Geneetilised aberratsioonid mõjutavad negatiivselt testiste ja sugurakkude arengut ning spermide küpsemist, põhjustades viljakuse langust (Punab *et al.*, 2016; Skakkebaek *et al.*, 2016).

Kolmandaks viljatuse põhjuseks võib tuua seemnejuhade ummistuse. Haigus moodustab 5-6% kõikidest viljatusega seotud juhtumitest nii eestlastel kui ka taanlastel (Punab *et al.*, 2016; Skakkebaek *et al.*, 2016). On leitud, et uretriit ja prostatiit võivad olla selle haiguse peamised tekkeallikad (Kayser *et al.*, 2012).

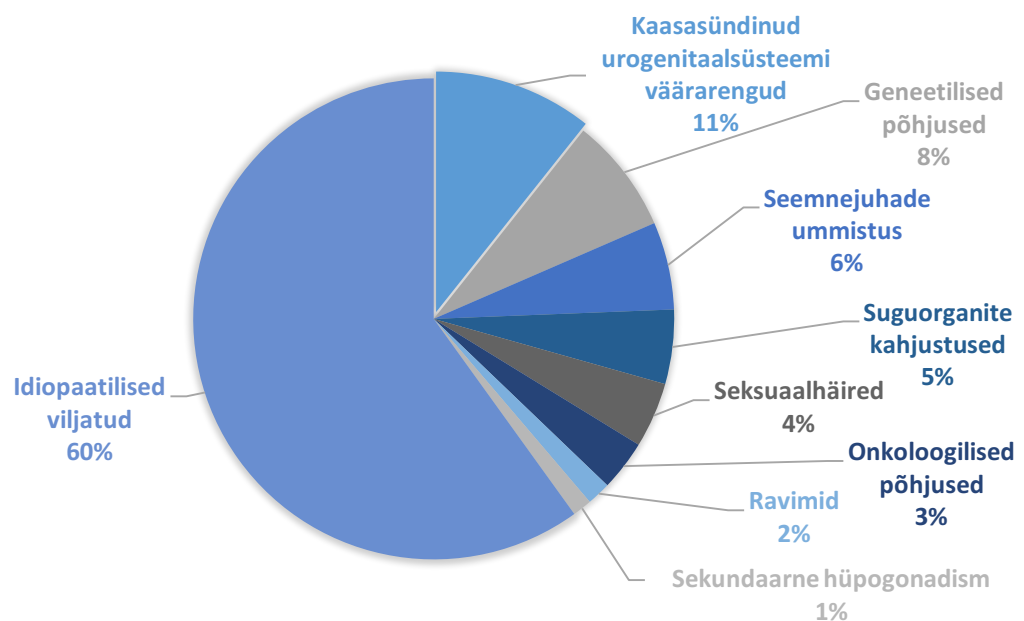
5% eestlaste viljatuse põhjustest moodustavad suguorganite kahjustused, sealhulgas kiirgus, orhiit, munandite torsioon, tsüstid ja veenilaiendid (Punab *et al.*, 2016). Taanis on leitud suguorganite kahjustusi igal viiendal viljatul mehel (Skakkebaek *et al.*, 2016).

Üheks viljatuse põhjuseks on seksuaalhäired, mis esinevad neljal protsendil Eesti viljatutest meestest. Sagedamini on esindatud anorgasmia ehk võimetus orgasmi saada ja anejakulatsioon ehk võimetus ejakuleerida. Nende haiguste põhjuseks võivad olla erinevad traumad nagu näiteks Sclerosis multiplex, epilepsia, operatsioonid jpm (Punab *et al.*, 2016).

Umbes kolmel protsendil viljatutest meestest võivad olla haiguse põhjuseks onkoloogilised haigused, sagedamini munandivähk (Punab *et al.*, 2016). On leitud, et Taani meestel on taolise vähi esinemissagedus veelgi kõrgem. Munandivähil on kõrge geneetiline komponent. Seda põdenud meeste poegadel on näidatud kõrgemat riski haigestuda munandivähki (Skakkebaek *et al.*, 2016). Ka muudel vähivormidel nagu leukeemial, luu-, aju-, jämesoole- ja kilpnäärmevähil on leitud seos mehepoolse viljatusega (Punab *et al.*, 2016).

Mõne protsendi mehepoolse viljatuse põhjustest Eesti elanikkonnas moodustavad ka teatud ravimite ja toidulisandite tarbimine. Ravimitest põhjustatud viljatuse levimust on hinnatud taanlastel isegi kuni 12%, mille hulka kuuluvad nii ravimiteraapiad kui anaboolsed steroidid (Olesen *et al.*, 2017).

Sekundaarset hüpogonadismi on Eesti meestel tuvastatud vaid ühel protsendil ja taanlastel alla 1% (Olesen *et al.*, 2017). Põhjuseks võivad olla Kallmanni sündroom, gonadotropiini vabastava hormooni puudus, eesnäärme hüperplaasia jmt.



Joonis 1. Viljatuse tekkepõhjused Eesti meeste seas (Punab *et al.*, 2016 andmetel)

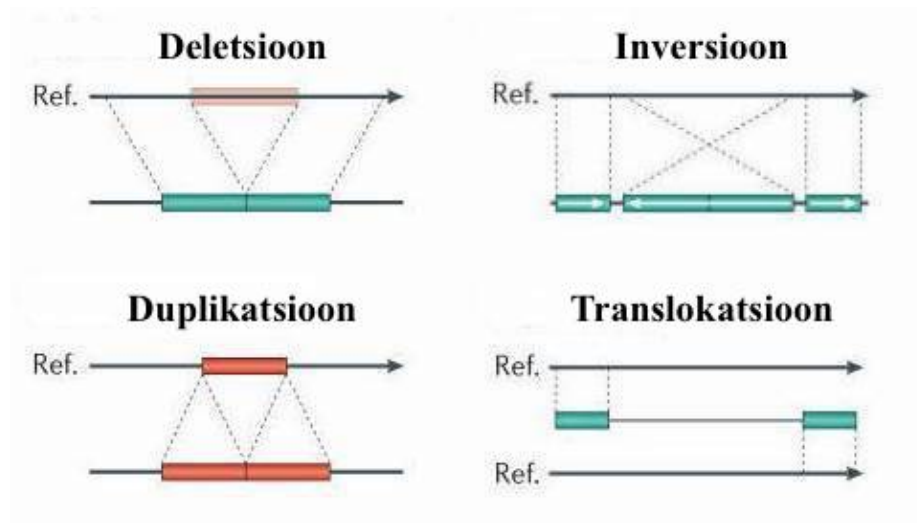
Idiopaatiliste patsientide viljatuse põhjuseks võivad olla mitmed biokeemilised, geneetilised ja keskkonnaga seotud tegurid. Kuna mehepoolne viljatus on enamasti põhjustatud spermatogeneesi vigadest, mille protsessi edukuse tagavad tuhanded erinevad geenid, siis läbi nende geenide uurimise saaks paremini mõista ja vähendada mehepoolse viljatuse esinemist (Punab *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2015). Seetõttu on teaduse suunaks praegu leida uusi põhjuseid näiteks genoomi struktuursete varieeruvuste ja viljatuse vahel.

1.2 Genoomi struktuursed varieeruvused

CNV-d on struktuursete varieeruvuste klass, mis hõlmab umbes 15% genoomist (Li ja Olivier, 2013). Need on vähemalt 50 aluspaari pikkused lõigud, mille koopiaarv varieerub indiviiditi (Zarrei *et al.*, 2015). Selline DNA järjestuse muutus võimaldab meil kohaneda ja areneda ning ka erineda inimestena üksteisest (Li ja Olivier, 2013; Redon *et al.*, 2006).

Koopiaarvu varieeruvused jaotatakse duplikatsioonideks, deletsioonideks, inversioonideks ja translokatsioonideks (Alkan *et al.*, 2011; joonis 2). Suurem osa neist päritakse vanematelt, kuid osa tekib *de novo*. Koopiaarvu varieeruvuste tekke põhilisteks allikateks on meioosi, mitoosi või replikatsiooni vead. Neist järgmisesse põlvkonda päranduvad CNV-d, mis on tekkinud sugurakkude küpsemise käigus (Sun *et al.*, 2013). CNV-sid on oluline uurida, sest umbes 41% neist kattuvad teadaolevate geenidega, mis viitab sellele, et nad võivad mõjutada geenide avaldumist (Strassberg *et al.*, 2011).

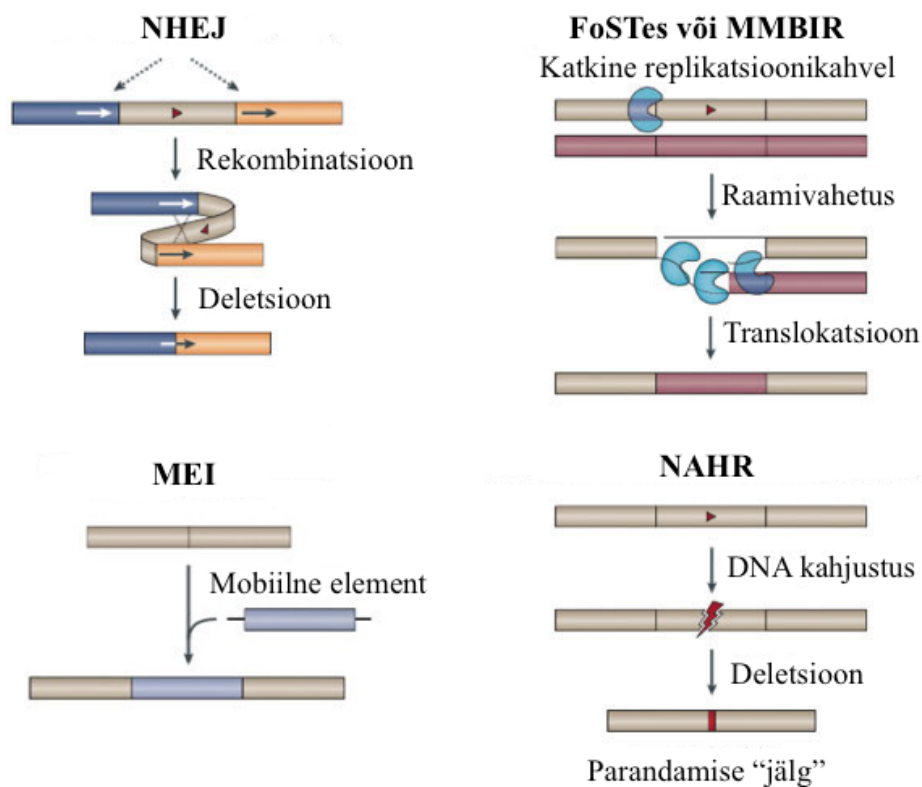
On leitud, et DNA järjestuse muutus võib tuua endaga kaasa erinevaid haiguslikke fenotüüpe nagu Alzheimer, vaimne alaareng, skisofreenia, rasvumine ja vähk (Li ja Olivier, 2013; Ionita-Laza *et al.*, 2008). Nüüdseks on leitud ka mitmeid CNV piirkondi, mida on seostatud meeste viljatusega (Nuti ja Krausz, 2008; Krausz *et al.* 2012; Krausz, 2011; Fröhmes *et al.*, 2013; Stouffs *et al.*, 2012; Tüttelmann *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013).



Joonis 2. CNV-d on deletsioonid, duplikatsioonid, inversioonid ja translokatsioonid (Alkan *et al.*, 2011 järgi).

Molekulaarsed mehhanismid, mis tekitavad CNV-sid on (joonis 3):

1. Mittehomoloogne otste liitmine (NHEJ, *Nonhomologous End-Joining*)
2. Mitteleelne homologne rekombinatsioon (NAHR, *Nonallelic Homologous Recombination*)
3. Vahendatud retrotranspositsioon või mobiilse elemendi insertioon (MEI, *Mobile Element Insertion*)
4. Replikatsioonikahvli peatumine ja matriitsi ümbervahetus (FoSTes, *Fork Stalling and Template Switching*)
5. Mikrohomoloogia vahendatud katkemisest põhjustatud replikatsioon (MMBIR, *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*)



Joonis 3. CNV-de tekkemehhanismid: mittehomoloogne otste liitmine (NHEJ), mobiilse elemendi insertioon (MEI), replikatsioonikahvli peatumine ja matriitsi vahetus (FoSTes), mikrohomoloogia vahendatud katkemisest põhjustatud replikatsioon (MMBIR), mitteleelne homologne rekombinatsioon (NAHR) (Weischenfeldt *et al.*, 2013 järgi).

1.3 Koopiaarvu varieeruvuste detekteerimine

Struktuursete varieeruvuste uurimiseks kasutatakse erinevaid meetodeid. Kui ei ole teada täpsemalt, millised geenid haigust põhjustavad, siis analüüsitakse CNV-de profiili hüpoteesivabalt kogu genoomi ulatuses. Sageli järgneb sellele mõne hüpoteesil põhineva ehk lookuspõhise meetodiga tulemuste kinnitamine. Igal meetodil on omad positiivsed ja negatiivsed küljed ning neid kasutatakse kindlates valdkondades (Vandeweyer ja Kooy, 2013; tabel 1).

Tabel 1. Koopiaarvu varieeruvuste detekteerimise meetodite kirjeldus (Massaia ja Xue, 2017; Patsalis *et al.*, 2007; Schouten *et al.*, 2002; Bernardini *et al.*, 2010)

Meetod	Metoodiline lähenemine	Inversioon	Deletsioon	Duplikatsioon	UPD ^a	Resolutsioon ^b
Ülegenoomsed meetodid						
Kariotüpi-seerimine	Mikroskoop	Jah	Jah	Jah	Ei	5 Mb
BAC-aCGH	Kiip	Ei	Jah	Jah	Ei	100 kb
Oligo-aCGH	Kiip	Ei	Jah	Jah	Ei	500 bp
SNP kiibid	Kiip	Ei	Jah	Jah	Jah	500 bp
NGS	Sekveneeri-mine	Jah	Jah	Jah	Jah	1 bp
Lookuspõhised meetodid						
FISH	Mikroskoop	Jah	Jah	Jah	Ei	10 kb-1Mb
qPCR	PCR	Ei	Jah	Jah	Ei	200 bp
MAPH	PCR	Ei	Jah	Jah	Ei	100 bp
MLPA	PCR	Ei	Jah	Jah	Ei	50 bp

^aUPD ehk uniparentaalne disoomia on juhtum, kus mõlemad kromosoomid pärinevad samalt vanemalt

^bResolutsioon näitab (umbkaudset) miinimum suurust, mida meetod on võimeline detekteerima v.a juhud, kus on ette antud vahemik.

BAC-aCGH, genoomsete BAC kloonide võrdlev genoomne hübridisatsioon; Oligo-aCGH, lühikeste unikaalsete oligote võrdlev genoome hübridisatsioon; NGS, teise põlvkonna sekveneerimine; FISH, fluorestsents in situ hübridisatsioon; qPCR, kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon; MAPH, multipleks amplifitseeritavate proovide hübridisatsioon; MLPA, multipleksne ligatsioon-vahendatud proovi amplifikatsioon

1.3.1 Ülegenoomsed meetodid

Karüotüüpiseerimine on meetod, mis sobib kõigi aneüploidiate ja suuremate struktuursete varieeruvuste tuvastamiseks. Samuti on võimalik tuvastada genotüübilist mosaiiksust (Poznik *et al.*, 2016). Karüotüüpiseerimist kasutatakse sageli koos teiste ülegenoomsete meetoditega, sest see võimaldab tuvastada vaid suuri ja teadaolevaid muutuseid genoomis (Massaia ja Xue, 2017). Põhilised ülegenoomsed meetodid, mida kasutatakse, on CGH (*comparative genomic hybridization*), SNP (*single nucleotide polymorphism*) kiibid ning NGS (*next-generation sequencing*).

aCGH ehk mikrokiipidel põhinev võrdlev genoomne *in situ* hübridisatsioon on kasvanud välja FISH meetodist. aCGH puhul on referents ja sihtmärk DNA-d märgistatud erinevate värvidega ning neid kohübridiseeritakse mikrokiibi järjestustele. Tulemuste saamiseks võrreldakse signaalide intensiivsust ning seeläbi saab näha duplitseeritud ja deleteerunud piirkondi genoomis (Solinas-Toldo *et al.*, 1997). aCGH eelisteks on karüotüüpiseerimisest suurem resolutsioon kui karüotüüpiseerimisel, kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus, kerge käsitletavus ja automatiseeritus (Greshock *et al.*, 2007; Massaia ja Xue, 2017; Snijders *et al.*, 2003). Puuduseks peetakse nii madalat ruumilist resolutsiooni ja proovide sisestamise arvu, kuid ka seda, et võrdluseks peab kasutama referents DNA-d või DNA segu kontrollindiviididest, mille suhtes uuritavat genoomi võrreldakse (Kallioniemi *et al.*, 1993). Sellest tulenevalt CGH meetod ei asenda, vaid pigem toetab teisi meetodeid (Stouffs *et al.*, 2012). **BAC-aCGH** puhul kasutatakse bakteri kunstlike kromosoomide kloone, millesse mahuvad suured genoomi osad ning selle resolutsioon on umbkaudu 100 kb (Vandeweyer ja Kooy, 2013; Massaia ja Xue, 2017). **Oligo-aCGH** on uuem aCGH meetod, mille puhul kasutatakse proovidena oligonukleotiide. Meetod on suurema resolutsiooniga ja väiksema taustamüraga, võimaldades avastada ka väikeseid aberratsioone (Vandeweyer ja Kooy, 2013; Lucito *et al.*, 2003).

SNP kiibid kasutavad lühikesi oligonukleotiide DNA fragmentide püüdmiseks. Koopiaarvu varieeruvusi tuvastatakse hübridisatsiooni intensiivsusega võrreldes tulemusi *in silico* referents andmetega (Li ja Olivier, 2013). Võrreldes CGH meetoditega vajavad SNP kiibid vähem DNA-d ning on ka odavamad. Lisaks sellele on kiibid tundlikud, täpsed ja kõrge resolutsiooniga. Meetodi puuduseks on see, et kiibid ei suuda tuvastada inversioone ja translokatsioone. Kaks suurimat SNP kiipide tootjat on Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA, USA) ja Illumina, Inc. (San Diego, CA, USA). Mõlemad kasutavad samu biokeemilisi

printsiipe, kuid erinevaid keemilisi meetodeid. Nende tehnoloogia hõlmab fluorestsents signaalide analüüsimist, mille põhjal leitakse $\log_2$ väärtus. $\log_2$ -l on 3 võimalikku väärtust: 0, +1 ja -1, mis vastab normaalsele, duplitseerunud või deleteerunud osale genoomis (Iacobucci *et al.*, 2013).

NGS (*next-generation sequencing*) ehk teise põlvkonna sekveneerimine on tänapäeval lisaks SNP kiipidele saanud põhiliseks andmeanalüüsi meetodiks, sest võimaldab analüüsida isegi suuremaid kohorte kui mikrokiibi põhised meetodid ning selle suur resolutsioon võimaldab detekteerida ka 1 bp suuruseid vigu (Vandeweyer ja Kooy, 2013). Teise põlvkonna sekveneerimismeetodid viivad läbi miljoneid reaktsioone paralleelselt, võimaldades detekteerida lisaks deletsioonidele ja duplikatsioonidele ka inversioone ja translokatsioone (Kidd *et al.*, 2008). Meetod on väga paljulubav ja kiire, kuid kallid ning analüüsimine on ajamahukas (Mardis, 2008). Põhilisteks NGS meetoditeks on eksoomi ja kogu genoomi sekveneerimine. Eksoomi sekveneerimine, mis on kasutatavaim NGS meetod, hõlmab endas genoomi kodeerivate osade amplifitseerimist ning nende sekveneerimist. Taoline strateegia on odavam, sest välistatakse mittekodeeriv osa ehk 98-99% genoomist. Teisalt, pole võimalik tuvastada muutusi mittekodeerivates alades ning CNV-de määramiseks pole ükski loodud eksoomi sekveneerimise algoritm 100% usaldusväärne (Krumm *et al.*, 2012). Tuntumad NSG tehnoloogiaid pakuvad ettevõtted on Agilent (Santa Clara, CA, USA), Illumina (San Diego, CA, USA), Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) ja NimbleGen (Madison, WI, USA) (Aston, 2014).

1.3.2 Lookuspõhised meetodid

FISH ehk fluorestsents in situ hübridisatsioon on madala resolutsiooniga meetod, mis võimaldab detekteerida mõne kuni mõnesaja kb suuruseid anomaaliaid. FISHi saab kasutada nii interfaasis kui ka metafaasis olevatel fluorestsentsmärgisega kromosoomidel ning töötada saab ka suurte valimitega. Mikroskoobiga on võimalik detekteerida deletsioone, duplikatsioone, inversioone ja translokatsioone. FISHi kasutatakse enamasti mõne ülegenoomse meetodiga leitud tulemuste kinnitamiseks (Vandeweyer ja Kooy, 2013). Sellest välja kasvanud Fibre-FISH suudab detekteerida väga väikeseid, mõne kb suuruseid muutusi, kuid meetodit ei kasutata diagnostikalaborites oma tehnilise keerukuse pärast (Massaia ja Xue, 2017; Vandeweyer ja Kooy, 2013).

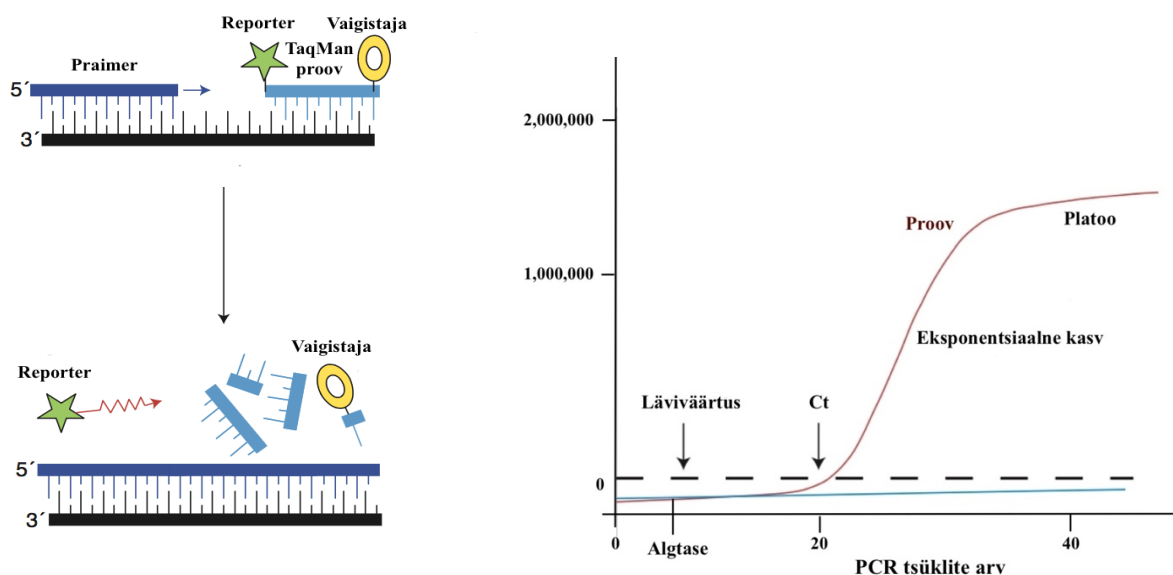
MAPH ehk multipleks amplifitseeritavate proovide hübridisatsioon detekteerib CNVsid isegi 100 bp resolutsiooniga. Uuritav denatureeritud DNA immobiliseeritakse nailonfiltrile ja hübridiseeritakse vastavate proovidega. Üks praimeritest on spetsiifilise märkega, mis võimaldab hiljem proove detekteerida. Amplifitseerimine toimub kvantitatiivse PCR-i abil ning signaalitugevuste võrdlusel saab määratleda DNA koopiaarvu varieeruvusi (Patsalis *et al.*, 2007). Meetodi puuduseks on see, et heade tulemuste saamiseks peaksid analüüsitavate proovide pikkused olema võimalikult erinevad teineteisest (Sellner ja Taylor, 2004). MAPH eeliseks on kiirus, odavus, spetsiifilisus ja tundlikkus. Lisaks ei vaja see meetod analüüsimiseks erilisi masinaid (Hollox *et al.*, 2002).

MLPA tuvastab väga väikeseid koopiaarvu muutuseid ilma DNA immobilisatsioonita. MLPA proovid koosnevad oligonukleotiididest, mida hübridiseeritakse sihtmärkjärjestustele. CNV-d tuvastatakse signaali intensiivsuse järgi, mida saadakse pärast ligeerimist, PCR-iga amplifitseerimist ja elektroforeesiga produktide omavahelist eraldamist. Meetodi eeliseks on odavus, kõrge tundlikkus ja lihtne käsitletavus. Võrreldes kiipidel põhinevate meetoditega, vajab vähem aega proovide ettevalmistamiseks ning samuti suudab reaktsiooni läbi viia juba 100-200 ng DNA kogustega. Võrreldes MAPH-iga ei kontamineeru proovid nii kergelt, kuid proovide ettevalmistamine on keerukam (Sellner ja Taylor, 2004). Lisaks on puuduseks see, et MLPA-ga on vaja eelnevalt teada informatsiooni lookuste kohta ning korraga saab läbi viia vaid 40 reaktsiooni (Schouten *et al.*, 2002; Hollox *et al.*, 2002).

qPCR on peamine meetod, mida kasutatakse CNV-de valideerimisel, sest seda on lihtne käsitleda ning võimaldab läbi töötada palju proove ühe tsükli jooksul. Koopiaarvu varieeruvusi saab määrata võrreldes sihtmärgi ja referentsi järjestuse fluorestsentssignaali muutusi.

qPCR-i puhul kasutatakse enamasti *TaqMan* (Applied Biosystems, USA) proove ning *Taq* (*Thermus aquaticus*'e ensüüm) polümeraasi, millel on 5'-3' eksonukleasne aktiivsus. *TaqMan* hübridisatsiooniproovid, mis on 5' otsast seotud reporteriga ja 3' otsast vaigistajaga, on võimalised seonduma praimerite vahele ning hüdrolüüsitakse DNA ahela pikendamise käigus *Taq* polümeraasi poolt (joonis 4A.). Selle tulemusena fluorestsentssignaal tugevneb vastavalt olemasoleva transkripti kogusele.

Reaktsioon algab eksponentsiaalse faasiga ning jõuab platooni kui reagentid hakkavad otsa saama. Moodustub amplifikatsioonikõver (joonis 4B.), kust leitakse Ct ehk läviväärtus, mis näitab tsükli arvu, kus fluorestsents on tugevam kui minimaalne detektsioonitase, kui signaal üles tuli. Mida vähem on materjali, seda kiiremini jõuab proov platooni. Produkti fluorestsentsi taset mõõdetakse iga tsükli ajal (Arya *et al.*, 2005).



Joonis 4. Kvantitatiivne PCR. **A.** *Taq* polümeraasi töö *TaqMan* proovil. *TaqMan* proov, mille 5'otsas on reportervärv ja 3'otsas vaigistaja on loodud hübridiseeruma sihtmärk DNA-ga. Kui proov peaks kinnituma PCR produktile, siis *Taq* polümeraas lõikab järjestuse väikesteks tükkideks. Kuna reporter ja vaigistaja eemalduvad teineteisest, siis fluorestsentssignaal tugevneb ja reaalaaja instrument detekteerib fluorestsentsi. **B.** *qPCR*-i amplifikatsioonikõver. Tulemused arvutatakse välja kalibraatori suhtes valemiga $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{uuritav}) - \Delta Ct(\text{kalibraator})$ (Arya *et al.*, 2005)

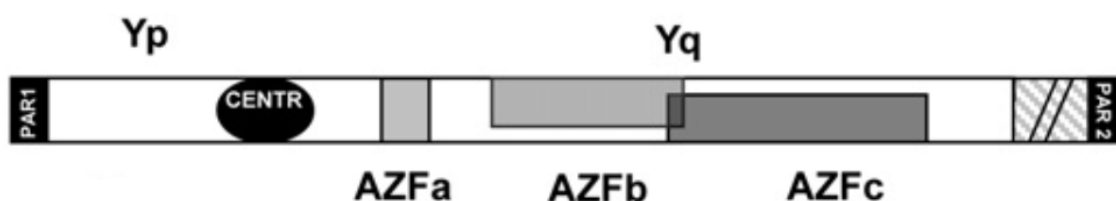
1.4 Koopiaarvu varieeruvuste seos meeste viljatusega

1.4.1 Y kromosoom

Y kromosoomis asub palju geene, mis on olulised spermatogeneesis ja sugunäärmete arengus. Spermatogeneesi eest vastutav lookus *AZF* (azoospermia faktor) paikneb meestel Y kromosoomi pikas õlas (Krausz *et al.*, 2003; Skaletsky *et al.*, 2003) ja jaguneb omakorda kolmeks alamlookuseks: *AZF_a*, *AZF_b* ja *AZF_c* (joonis 5). Lookused on aktiivsed erinevatel

spermatogeneesi etappidel ning CNV-d nendes piirkondades põhjustavad meestel viljatust (Krausz *et al.*, 2011).

Üheks uuritumaks nähtuseks *AZF* piirkonnas on mikroleetsioonid, mis esinevad umbes 10% azoospermiaga ja 3-5% oligozoospermiaga patsientidel. Tegemist on väikeste deletsioonidega, mida on keeruline tuvastada, kuid nad võivad hõlmata mitmeid geene ning kanduvad edasi meessoost järglastele põhjustades mehepoolset viljatust (Tournaye *et al.*, 2016).



Joonis 5. Y kromosoom AZF alamlookustega. Yp tähistab lühikest õlga; Yq pikka õlga. AZF: Azoospermia faktor. PAR1 ja PAR2: Pseudoautosomaalsed piirkonnad. CENTR: tsentromeer (Krausz *et al.*, 2011).

Kaks peamist geeni *AZFa* piirkonnas, mis osalevad spermatogeneesis ja vastutavad ka premeiootiliste sugurakkude arengu eest on *USP9Y* (probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y) ja *DBY* (ATP-dependent RNA helicase DDX3Y) (Krausz *et al.*, 2011; Vogt, 2005). CNV-d neis piirkondades häirivad spermatogeneesi ja võivad ka harvadel juhtudel põhjustada ka Sertoli rakkude sündroomi, mille puhul ejakulaadis puuduvad spermid (Ferlin *et al.*, 2007).

AZFb piirkonda on koopiaarvu varieeruvuste poole pealt vähe uuritud, kuid on leitud kaks võimalikku kliinilise tähtsusega geeni. *RBMY1* (*RNA-binding motif protein, Y chromosome, family 1 member F/J*) kodeerib testisespetsiifilist splaissingufaktorit, mis kontrollib meessugurakkude arengut (Elliott, 2004). Koopiaarvu varieeruvused *RBMY1* piirkonnas mõjutavad spermide liikuvust häirides Ca^{2+} kanalite normaalset funktsioneerimist, mis viib omakorda spermide hüperaktivatsioonini (Yan *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2003). Teine *AZFb* geen, *PRY* (*PTPN13-like protein, Y-linked*) reguleerib apoptoosi eemaldades ebanormaalsed spermid populatsioonist. Deletsioonid selles piirkonnas võivad põhjustada spermatogeneesi peatumist spermatotsüütide arengu staadiumis (Vogt, 2005).

Lisaks on leitud, et deletsioonid, mis eemaldavad nii *AZFa* kui ka *AZFb* piirkonna, viivad SCOS-i (*Sertoli cell-only syndrome*) ja sugurakkude arestini, mistõttu rakud ei saa küpseda lõpuni (Krausz *et al.*, 2011).

AZFc piirkonnas on leitud olulisi geene, mida hõlmavaid deletsioone on seostatud madala sperma kontsentratsiooniga. *DAZ* (*deleted in azoospermia*) on testisespetsiifiline geen, mida ekspresseeritakse sugurakkudes. Geen esineb 90% meestest nelja koopiana ja kodeerib testisespetsiifilisi RNA-d siduvaid valke. *CDY1* (*testis-specific chromodomain protein Y1*) reguleerib spermatogeneesis osalevaid histoone, indutseerides primaarseid sugurakke minema meioosi. *BPY2* (*basic protein, Y chromosome, 2*), mida ekspresseeritakse spermatogoonides, on sagedastel juhtudel deleteerunud nii oligozoospermiaga kui ka azoospermiaga meestel. Olulisim *AZFc* deletsioon on *gr/gr*, mis eemaldab poole *AZFc* piirkonnast, võttes endaga kaasa kaks *DAZ*, ühe *CDY1* ja ühe *BPY2* geenikoopia (Krausz *et al.*, 2011). Paljudel juhtudel on taolise deletsiooniga mehe spermid siiski võimelised viljastama munarakku (O’Flynn O’Brien *et al.*, 2010).

Yq piirkonnas on leitud mehepoolse viljatusega seotud geen *TSPY1* (*testis-specific Y-encoded protein 1*), mis on tugevalt ekspresseerunud testises ning selles olevad CNV-d võivad samuti mõjutada spermatogeneesi normaalset kulgu (Nuti ja Krausz, 2008; Massaia ja Xue, 2017).

1.4.2 X kromosoom

X kromosoomis olevaid koopiarvu varieeruvusi on seoses mehepoolse viljatusega tunduvalt vähem uuritud kui autosoomi ja Y kromosoomi, kuid selgeid näiteid on siiski olemas.

Deletsioonid Xq28 alas võivad mõjutada mitmeid CTA (*cancer testis antigens*) kasvaja/testisega seotud antigeenide perekonna geenide nagu *MAGEA9B* (*melanoma antigen family A, 9B*) ekspressiooni. CTA geene ekspresseeritakse tugevalt testises olevates spermatotsüütides ning samuti mõnes kasvajarakkude liinis (Fratta *et al.*, 2011). Lisaks CTA geenidele võivad CNV-d selles piirkonnas mõjutada ka *TMEM185A* (*transmembrane protein 185A*), *CXorf40A* (*chromosome X open reading frame 40A*) ja *HSFX* (*x-linked heat shock transcription factor family*) geenide ekspressiooni. Taoliste aberratsioonidega meeste fenotüübid varieeruvad oligospermias azoospermiani (Krausz *et al.*, 2012).

Deletsioonid Xq22.1 alas võivad mõjutada *ARMCX5* (*Armadillo repeat containing, X-Linked 5*) ja *GRASP2* (*general receptor for phosphoinositides 1 associated scaffold protein*) geenide funktsiooni ning viia azoospermiani (Krausz *et al.*, 2012).

Deletsioonid Xq27.2 alas võivad tekitada kahe CTA geeni *MAGEC3* (*melanoma antigen family C, 3*) ja *MAGEC1* (*melanoma antigen family C, 1*) ning *SPANXE* (*sperm protein associated with the nucleus, X linked, family E*) ekspressiooni muutuseid (Krauz *et al.*, 2012). Kallmanni sündroom on geneetiline haigus, mille puhul patsiendil ei esine või ei lõpe puberteet. Kõige sagedasemaks haigusega kaasnevaks sümptomiks on viljatus, mis esineb pigem meestel. Sündroomiga on seotud ka X kromosoomi *KALI* (*kallmann syndrome interval gene*) geenis olevad deletsioonid (OMIM: 300836) (O'Flynn O'Brien *et al.*, 2010).

1.4.3 Autosoomid

Lisaks X ja Y kromosoomidele on leitud ka seoseid autosomaalsete geenide ja mehepoolse viljatuse vahel. Autosomaalsed CNV-d, mida on seostatud mehepoolse viljatusega, asuvad üle kogu genoomi (tabel 2).

Kr.	Geen	Funktsioon reproduktiivsüsteemis	CNV-de mõju	Viide
1p22.3	<i>CLCA4</i> (<i>calcium-activated chloride channel regulator</i>)	vastutab soola ja vee transpordi regulatsiooni eest epiteelrakkude plasmamembraanis	deletsioonid häirivad regulatsiooni ja võivad tekitada spermatogeneesi häireid	Frühmesser <i>et al.</i> , 2013
2p16.3	<i>ALF</i> (<i>TFIIA-alpha/beta-like factor, 2</i>)	spermiogenees	deletsioone seostatud azoospermiaga	Huang <i>et al.</i> , 2006
2q13	<i>NPHP1</i> (<i>nephrocystin-1</i>)	spermatiidide areng spermideks	deletsioone seostatud oligoteratozoospermiaga	Dong <i>et al.</i> , 2015
6p24.2	<i>MAK</i> (<i>serine/threonine-protein kinase</i>)	spermatogenees	duplikatsioone seostatud azoospermiaga	Matsushime <i>et al.</i> , 1990
6p21.32	<i>HLA-DRB1</i> (<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 1</i>)	spermatogenees ja sugurakkude normaalne funktsioon	duplikatsioonid põhjustavad autoimmuunseid põletikulisi reaktsioone; azoospermiat	van der Ven <i>et al.</i> , 2000; Kurpisz <i>et al.</i> , 2011
6p21.32	<i>HLA-DQA1</i> (<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1</i>)	spermatogenees ja sugurakkude normaalne funktsioon	duplikatsioonid põhjustavad autoimmuunseid põletikulisi reaktsioone; azoospermiat	van der Ven <i>et al.</i> , 2000; Kurpisz <i>et al.</i> , 2011
8p12	<i>NRG1</i> (<i>pro-neuregulin-1</i>)	kontrollib testise rakkude jagunemist, proliferatsiooni ja diferentseerumist osaleb meioosi initsieerimisel	duplikatsioonid häirivad spermatogeneesi normaalset kulgu	Dong <i>et al.</i> , 2015

9p24.3	<i>DMRT1</i> (doublesex- and mab-3-related transcription factor 1)	geeni poolt kodeeritud transkriptsioonifaktorite funktsiooniks on aktiveerida ja represseerida Sertoli rakkude ja premeiootiliste sugurakkude geene	deletsioonid põhjustavad testikulaarset hüpoplaasiat ja soo muutmist	Agbor <i>et al.</i> , 2013; Lopes <i>et al.</i> , 2013
12q12	<i>ADAMTS20</i> (disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 20)	spermatogenees	deletsioonid mõjutavad geeniekspressiooni testistes ja tekitavad vigu spermatogeneesis	Ghorbel <i>et al.</i> , 2013
12q12	<i>TWF1</i> (Twintilin-1)	spermatogenees	deletsioonid mõjutavad geeniekspressiooni testistes ja tekitavad vigu spermatogeneesis	Ghorbel <i>et al.</i> , 2013
12q12	<i>ARID2</i> (AT-rich interactive domain-containing protein 2)	spermatogenees	deletsioonid mõjutavad geeniekspressiooni testistes ja tekitavad vigu spermatogeneesis	Ghorbel <i>et al.</i> , 2013
14q11.2	<i>EDDM3A</i> (epididymal secretory protein E3-alpha)	spermatogenees	duplikatsioonid ja deletsioonid häirivad munandimanuse epiteelrakkude valkude produktsiooni ning võivad põhjustada azoospermia	Damyanova <i>et al.</i> , 2013
14q11.2	<i>EDDM3B</i> (epididymal secretory protein E3-beta)	spermatogenees	duplikatsioonid ja deletsioonid häirivad munandimanuse epiteelrakkude valkude produktsiooni ning võivad põhjustada azoospermia	Damyanova <i>et al.</i> , 2013

15q11.2	<i>POTE B</i> (<i>POTE ankyrin domain family member B</i>)	reguleerib spermide küpsemist ja signalisatsiooni reproduktiivsüsteemi rakkude vahel	duplikatsioonid tekitavad vigu spermatogeneesis	Ise <i>et al.</i> , 2008
15q11.2	<i>GOLGA8C</i> (<i>golgin subfamily A member 8C</i>)	spermatogenees	duplikatsioonid põhjustavad azoospermiat	Tu <i>et al.</i> , 2013
17p12	<i>COX10</i> (<i>protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial</i>)	spermatogenees	duplikatsioone seostatud azoospermiaga	Yang <i>et al.</i> , 2009
17p12	<i>DNEL1</i> (<i>dynein heavy chain 9, axonemal</i>)	spermatogenees	duplikatsioone seostatud azoospermiaga	Milisav <i>et al.</i> , 1996
19q13.31	<i>PSG5</i> (<i>pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 5</i>)	spermatogenees	deletsioonid võivad olla seotud azoospermiaga	Ho <i>et al.</i> 2015
21q22.3	<i>DNMT3L</i> (<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like</i>)	spermatogenees	duplikatsioonid ja deletsioonid põhjustavad spermatogeneesi vigu, azoo- ja oligospermiat	Huang <i>et al.</i> , 2012

2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

2.1 Töö eesmärgid

Käesolevale bakalaureusetööle eelnevalt teostati Anna Maria Punabi poolt ülegenoomne koopiaarvu varieeruvuste uuring: viljatud ning viljakad mehed (rasedate naiste mehed).

CNV-de detekteerimiseks kasutati ülegenoomseid genotüpiseerimise kiipide andmeid. Töö eesmärk oli tuvastada ja kirjeldada CNV piirkondi, mis võiksid olla seotud meeste viljatusega.

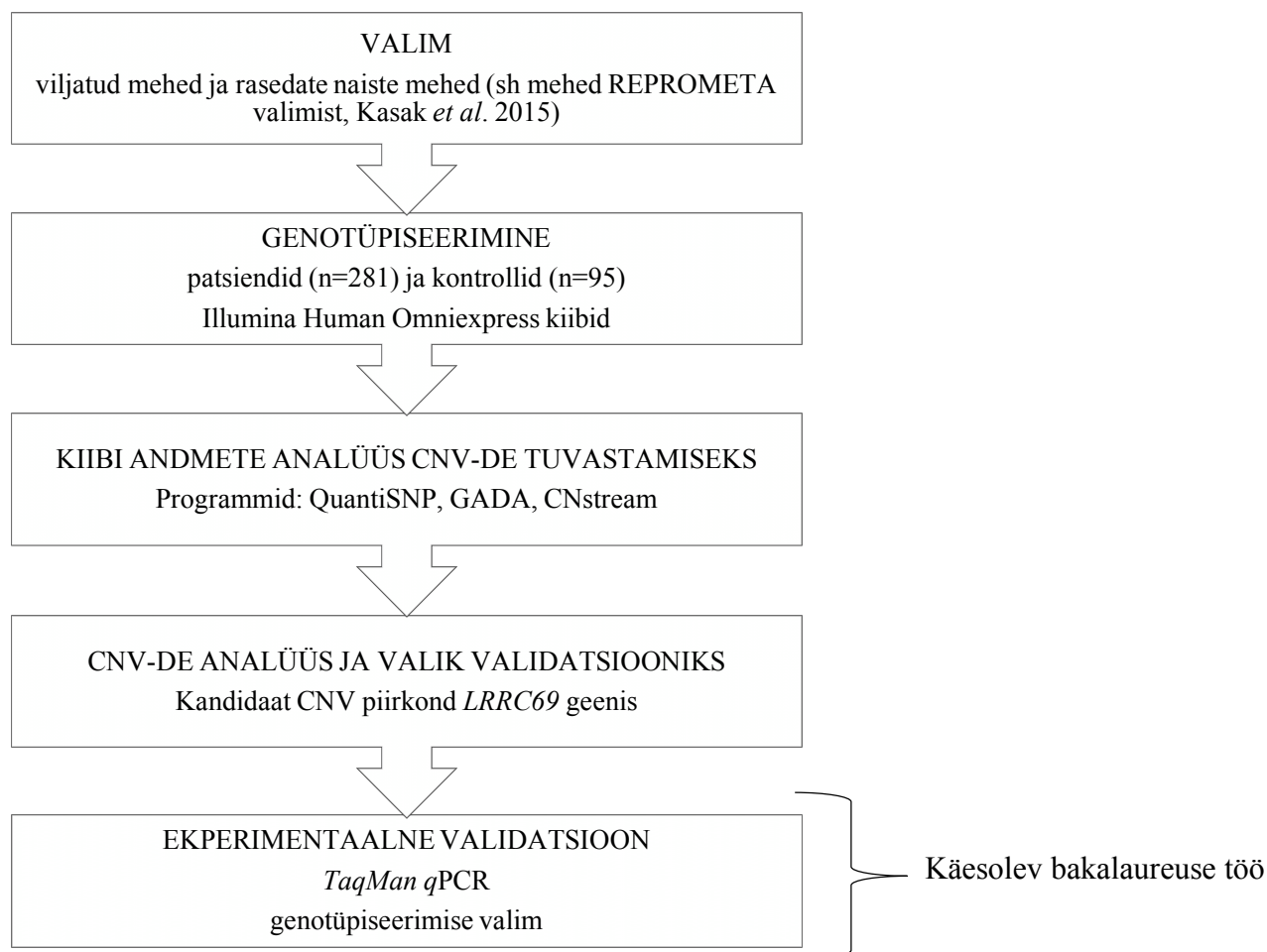
Antud bakalaureusetöö eksperimentaalse osa kitsamaks eesmärgiks oli ülal nimetatud ülegenoomse uuringu andmete põhjal ennustatud ühe CNV lookuse kinnitamine *qPCR*-i meetodiga.

Teise praktilise ülesandena oli selles piirkonna paikneva geeni *LRRC69* detailsem iseloomustus kasutades erinevaid genoomika andmebaase, et hinnata geenis paikneva deletsiooni võimalikku rolli meeste viljatuse põhjusena või riskifaktorina.

2.2 MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1 Töö ülesehitus

Joonis 6 kirjeldab antud bakalaureusetöös teostatud katseid ja sellele eelnenud tööd.



Joonis 6. Ülevaade käesoleva bakalaureusetöö raames tehtud ja sellele eelnenud tööst.

Valimi kogusid Margus Punab, Kristiina Rull, Pille Teesalu ja Pille Vaas. SNP mikrokiibi andmete analüüsi viisid läbi Anna Maria Punab ja Laura Kasak, piirkondade analüüsi ja valiku edasiseks uurimiseks tegid Anna Maria Punab ja prof. Maris Laan. Genotüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklaboris. Kiibi andmete analüüs oli läbi viidud kolme programmiga: QuantiSNP (Colella *et al.*, 2007), GADA (Pique-Regi *et al.*, 2010) ja CNstream (Alonso *et al.*, 2010). Edasiseks uuringuks valiti välja piirkonnad, mis olid ennustatud vähemalt kahe programmi poolt.

2.2.2 Valimi kirjeldus

Valimisse olid kaasatud idiopaatilise ehk seletamatu viljatusega mehed, kellel oli diagnoositud azoospermia või oligoospermia, s.t kelle spermide koguhulk ejakulaadis oli 0-39 milj/ml (tabel 3). Kõik teadaolevate viljatust põhjustavate kliiniliste probleemidega (joonis 1) mehed olid välistatud.

Tabel 3. Kiibikatses kasutatud viljatute meeste valimi iseloomustus

	Mediaanväärtus	Vahemik (min-max)
Vanus ^a	33,7	17,0-68,0
Bitestikulaarne maht (ml)	27,0	0,0-56,0
Spermatooside kontsentratsioon (milj/mL)	0,4	0,0-19,0
Spermide koguarv (milj/ml)	1,1	0,0-37,8
FSH (IU/L) ^b	18,9	2,7-138,1
LH (IU/L) ^c	6,4	1,8-97,1
Pikkus (cm)	180,0	156,0-210
Kaal (kg)	85,6	45,4-127,7
Kehamassi indeks (KMI)	26,1	18,0-37,8

^aVanus kajastab patsiendi vanust aastates hetkel, mil analüüs oli võetud

^bFSH, folliikuleid stimuleeriv hormoon (referentsväärtus 1.5-12.4 IU/L)

^cLH, luteiniseeriv hormoon (referentsväärtus 1.7-8.6 IU/L).

Antud uuringu kontrollgrupi moodustasid tõestatud viljakusega ehk rasedate naiste mehed, kelle sperma kvaliteet oli normi piires, s.t. spermide koguhulk ejakulaadis üle 39 milj/ml (tabel 4) (Ehala-Aleksejev ja Punab, 2015). Lisakontrollidena kasutati REPROMETA (*REPROgrammed fetal and/or maternal METAbolism*) valimi rasedate naiste ehk tõestatud viljakusega meeste CNV andmeid, kelle kohta spermaanalüüs puudus (Kasak *et al.*, 2015). REPROMETA pered kaasati uuringusse SA TÜK Naistekliinikus sünnitustoas vahetult enne või peale lapse sündi.

Tabel 4. Kiibikatses kasutatud kontrollgruppide iseloomustus

	Rasedate naiste mehed		REPROMETA mehed	
	Mediaan	Vahemik (min-max)	Mediaan	Vahemik (min-max)
Vanus	31	22-53	33	21-50
Pikkus (cm)	180,0	171,0-195,0	183,0	172,0-197,5
Kaal (kg)	80,2	62,0-107,4	87,0	63,0-140,0
KMI	24,8	19,7-34,2	26,0	19,0-38,0

2.2.3 DNA eraldamine verest

Verest DNA saamiseks lisati 1 ml vere kohta 4 ml puhvrit A (0.32 M sahharoos, 1 mM Tris-HCl pH-ga 7.5, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, ddH₂O) ning tsentrifuugiti 30 min 3000 rpm +4 kraadi juures. Eemaldati supernatant ja korrati sama etappi. Pärast seda korrati veelkord sama etappi, kuid 2 ml puhver A-ga. Seejärel eemaldati supernatant ning lisati 0.9 ml puhvrit B (400mM NaCl, 2mM EDTA pH 8-ga, 10 mM Tris-HCl pH-ga 7.5, ddH₂O), toksiti sade lahusesse. Järgnevalt lisati tilkhaaval 100 µl puhver C-d (20% SDS, 2mg/ml proteinaas K, ddH₂O) ning inkubeeriti üleöö 37 kraadi juures.

Järgmisel päeval lisati lahusele 270 µl küllastunud NaCl lahust, raputati ning tsentrifuugiti 30 min 4000 rpm 23 kraadi juures. Supernatant tõsteti teise tuubi, lisati kahekordne kogus 100% etanooli, loksutati õrnalt ning Pasteuri pipeti otsaga eemaldati DNA. DNA lahustamine oli segus kus oli 400-500 µl TE-d (10 mM Tris-HCl pH-ga 7.5, 1 mM EDTA). Proovi hoiti 7 päeva +4 kraadi juures loksutil.

2.2.4 Eksperimentaalne validatsioon *TaqMan* meetodil uuele kandidaat CNV piirkonnale

Eksperimentaalne validatsioon viidi läbi sama valimiga, kellel oli tehtud kiibikatse CNV-de tuvastamiseks kogu genoomist. Selleks kasutati *TaqMan* qPCR-i meetodikat. Enne validatsiooni teostati optimeerimine, milleks kasutati juhuslikku test-DNA-d. Lahjendusrida koosnes lahustest lõppkonsentratsioonidega: 80 ng/µl, 40 ng/µl, 20 ng/µl, 10 ng/µl, 5 ng/µl ja 2,5 ng/µl. Lahjendusreaga määrati nii *assay*-le (Hs03272098_cn) kui ka referentsile (*RNaseP*) sobiv kogus ja analüüsi tingimused edasisteks katseteks.

TaqMan qPCR viidi läbi bipleksreaktsioonidena (paralleelselt uuritav piirkond ja referentsgeen *RNaseP*) suhtelise kvantifitseerimise meetodil. 10 µl reaktsioonisegu sisaldas 2 µl 5 x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus'i (ROX, Solis BioDyne), mis sisaldas HOT FIREPol DNA polümeraasi, 5 x Probe qPCR puhvrit, 15 mM MgCl₂, dNTP-sid, ROX värvainet), 0.5 µl TaqMan® Copy Number Assay'd (Hs03272098_cn), 1 µl TaqMan® Copy Number Reference Assay RNaseP'd (20x), 5.5 µl ddH₂O-d ja 1 µl genoomset DNA-d (10 ng/µl). Iga plaat sisaldas kontrolliks ddH₂O-d, vähemalt 1 referentsindiviidi REPROMETA valimist ning 50-st juhuslikult valitud kontrollindiviidist koosnevat POOLi (10ng/µl)

plaadisiseseks normaliseerimiseks. Kõik reaktsioonid viidi läbi kolmes korduses. Ebaõnnestunud proove ja CNV kandjaid korrati.

Amplifikatsioonid viidi läbi ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem, USA) masinaga järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95 ⁰ C – 15 min	} 40 ts
Denaturatsioon	95 ⁰ C – 15 s	
Praimerite seondumine ja ekstensioon	60 ⁰ C – 60 s	

2.2.5 Andmete analüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati programme SDS 2.4 ja RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems, USA). Koopiaarvu määramiseks normaliseeriti proovid referentsgeeni ehk *RNaseP* ja kõik plaadid juhuslike kontrollindiviidide DNA segu ehk POOL suhtes.

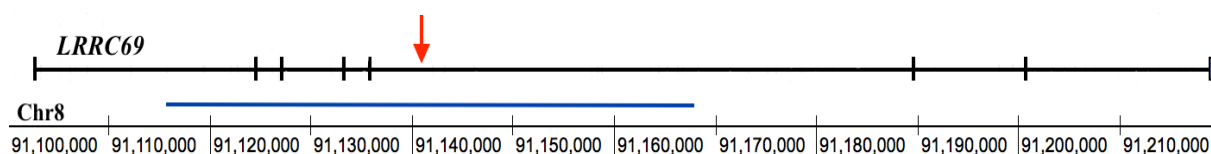
Tulemuste edasiseks töötlemiseks kasutati programmi Microsoft Excel 2016, kust oli oluline lugeda välja RQ väärtus, mis näitas koopiaarvu.

2.3 TULEMUSED

2.3.1 Eksperimentaalseks kinnitamiseks välja valitud deletsioon

Varasemalt olid Illumina HumanOmniExpress kiipidel genotüpiseeritud idiopaatilise viljatusega mehed (n=281) ja kontrollindiviididena rasedate naiste mehed (n=95) ning läbi viidud CNV piirkondade ennustamine kogu genoomist. Saadud kiibiuuringu tulemustest valiti käesoleva töö eksperimentaalseks validatsiooniks välja üks deletsioon, mis hõlmas *LRRC69* geeni piirkonda vahemikus Chr8:91,116,612-91,168,986 (hg38) (joonis 7). Kriteeriumite kohaselt pidi CNV olema ennustatud vähemalt kahel indiviidil patsientide grupist ning mitte esinema kontrollgrupis. Lisaks arvestati kõrget ekspressioonitaset meeste reproduktiivorganites.

Vastavalt ExAC andmebaasile on geeni piirkonnas leitud vähe *Loss of Function* mutatsioone. On leitud seitse harva varianti, mille tõttu võib oletada, et *LRRC69* mängib spermatogeneesis olulist rolli. Töös käsitletud CNV piirkonda ei ole varasemalt kirjanduses kajastatud.

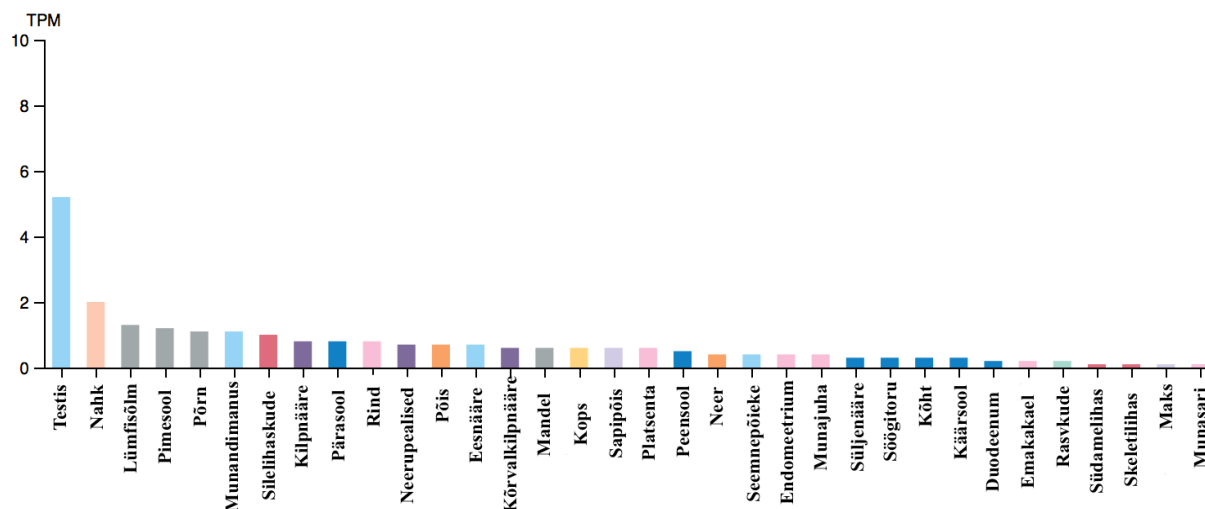


Joonis 7. Validatsioonis *TaqMan* qPCR meetodil analüüsitud CNV piirkonna genoomne kontekst (ThermoFisher). Must joon tähistab *LRRC69* geeni; lühikesed vertikaalsed mustad kriipsud geenis olevaid eksoneid; punane nool *Taqman assay*'d (Hs03272098_cn), mille asukohaks on GRCh38 järgi Chr8:91,141,929 *LRRC69* 5. intronis. Sinine joon tähistab geenis asuvat välja valitud deletsiooni, pikkusega 52,374 bp.

2.3.2 *LRRC69* geeni iseloomustus

LRRC69 (*leucine rich repeat containing 69*) on 8. kromosoomi pika öla + ahelal paiknev valku kodeeriv geen. Täpsem asukoht on GRCh38.p7 järgi Chr8:91,102,619-91,219,236. Geeni pikkus on 116,618 bp ning valk koosneb 347 aminohappest. *LRRC69*-l on 7 transkripti, millest 3 on valku kodeerivad. *LRRC69* geeni funktsioon ei ole täpselt teada väheste uuringute tõttu, kuid kõrge ekspressiooni poolest testises võib eeldada, et ümberkorraldused antud geenis võivad mõjutada spermatogeneesi. Üks transkriptidest (*LRRC69-001*) on testises väga kõrge ekspressioonitasemega. Geen on tugevalt ekspresseeritud ka naha-, immuunsüsteemi,

seedesüsteemi, lihas-, kopsu-, neeru- ning kuseteede rakkudes, kuid kõige kõrgem ekspressioonitase on just testise rakkudes (joonis 8).

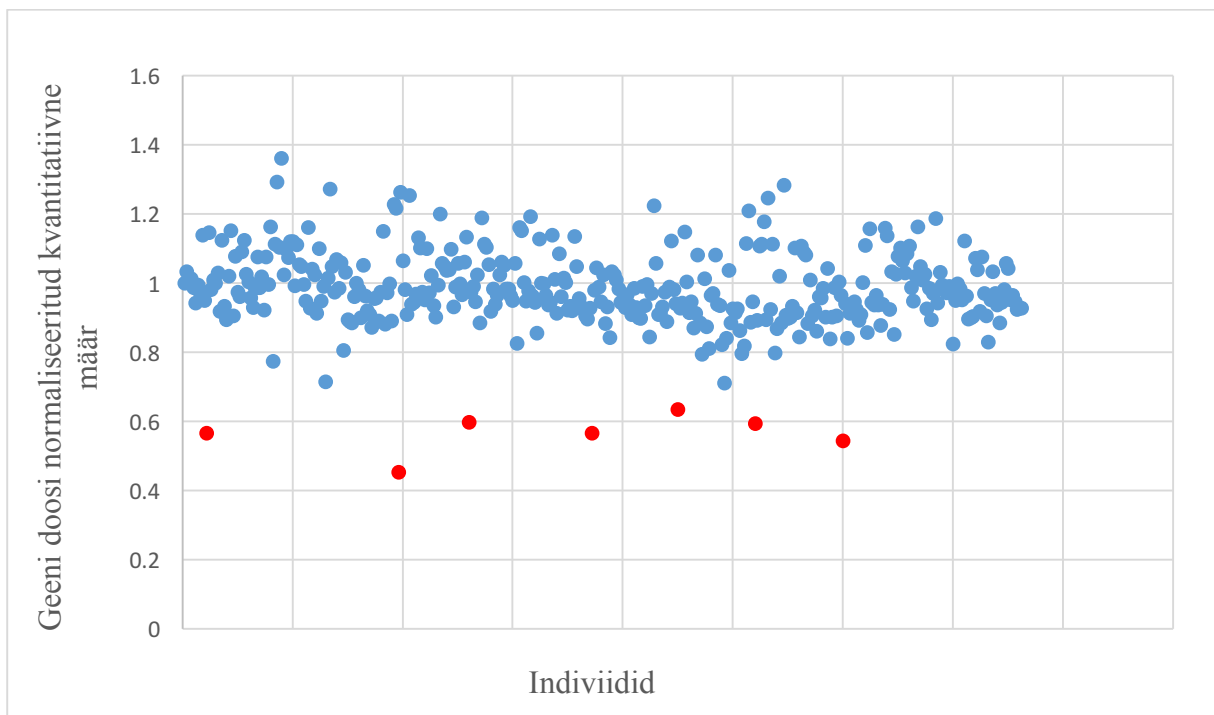


Joonis 8. RNA ekspressioonitase erinevates kudedes *LRRC69* geenis (ProteinAtlas). Kõige kõrgem ekspressioonitase on testises. TPM: transkriptide arv miljoni kohta.

2.3.3 Eksperimentaalne validatsioon *TaqMan* meetodil uuele kandidaat CNV piirkonnale

TaqMan qPCR validatsioon viidi läbi 281 patsiendil ning 95 kontrollil, et kinnitada kiibikatses ennustatud ümberkorraldust eksperimentaalselt teise meetodiga. Vastavalt ülegenoomsele Illumina HumanOmniExpress CNV kiibiuuringute tulemustele oli patsientide grupis *LRRC69* geenis asuva deletsiooni kandjaid 7.

Validatsioon *TaqMan* meetodil kinnitas kiibikatsega ennustatud 7-st kandjast 7. Piiripealsete koopiaarvu väärtustega indiviide korrati teisel katsel ning võeti tulemuste keskmine (joonis 9). Ühtegi valepositiivset ega valenegatiivset kandjat ei tuvastatud. Kandjate sageduseks saadi viljatute meeste grupis 2.5%, mis ei ole kontrollgrupiga võrreldes statistiliselt oluline suurus usaldusväärsuse nivool $\alpha=0.05$ ($p=0.1989$, Fisheri täpne test) (tabel 5). Praegustel andmetel ei saa tõestada ega lükata ümber väidet, et geenis olev deletsioon oleks meestel viljatuse põhjustaja. Siiski, antud deletsioon on huvipakkuv, sest ei esinenud ühelgi kontrollindiviidil. Edaspidiselt oleks vaja laiendada valimit eelkõige kontrollgrupis, et kinnitada antud deletsiooni seost meeste viljatusega.



Joonis 9. *LRRC69* geeni hõlmava deletsiooni eksperimentaalse validatsiooni tulemused. Punasega on märgitud indiviidid, kes kannavad *LRRC69* deletsiooni. Andmed on normaliseeritud nii, et 1=2 geenikoopiat (s.t mõlemas kromosoomis on geen olemas), <1 viitab deletsioonile ja >1 duplikatsioonile.

Tabel 5. *LRRC69* geenis asuva CNV piirkonna eksperimentaalse validatsiooni tulemused

Uuritud grupp	Arv	Deletsiooni kandjate arv	Kandjate sagedus (%)	Statistiline olulisus (p-väärtus)
Kontrollid	95	0	0.0	
Viljatud mehed	281	7	2.5	0.1989*

*Fisher'i täpne test (*Fisher's exact test*), olulisuse piiriks peeti p-väärtust < 0.05

2.4 ARUTELU

2.4.1 Koopiaarvu varieeruvuste roll mehepoolses viljatuses

Mehepoolne viljatus on kompleksne haigus, mis mõjutab igat 20-ndat reproduktiivses eas meest (Eggers *et al.*, 2015). Kuigi tänapäeval on selles vallas tehtud palju uuringuid, siis on pooled põhjused jätkuvalt seletamatud. Pole kahtlust, et lisaks keskkonnafaktoritele on suur osa idiopaatilistest mehepoolsetest viljatusjuhtumitest seotud geneetikaga, sest spermatogeneesis on mitmeetapiline protsess, mida kontrollivad tuhanded geenid. Neist 300-600 geeni on ekspresseeritud sugurakkudes ja ümberkorraldused neis geenides mõjutavad suure tõenäosusega meeste viljakust (Schultz *et al.*, 2003).

Praeguseks teadaolevad meeste viljatuse geneetilised põhjused, mis ühtlasi moodustavad osa rutiinsetest kliinilistest analüüsides on *AZF* deletsioonid, Klinefelteri sündroom, *CFTR* geeni mutatsioonid ja paljud teised teadaolevad suured kromosoomi aneüploidiad ja translokatsioonid, selgitavad umbes 20% meeste azoospermia juhtudest (Punab *et al.*, 2016; Skakkebaek *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2011). Kliiniliste analüüsides ei suudeta tuvastada kõigi viljatute haiguse põhjuseid, mistõttu võib arvata, et viljatus võib olla põhjustatud veel tuvastamata geenides olevate struktuursete varieeruvuste, deletsioonide ja duplikatsioonide poolt, mis võtavad osa sugurakkude arengust ja funktsioonist.

CNV-d, mis moodustavad umbkaudu 15% inimese genoomist, on potentsiaalsed riskifaktorid tervisele, sest hõlmavad genoomist suurema osa kui SNP-id ning on ka kõrge mutatsioonisagedusega (Zhang *et al.*, 2009). Koopiaarvu varieeruvused võivad viia defektse rekombinatsiooni, meioosi ja mitoosi vigadeni, muutes geenide ekspressioonitaset ja funktsiooni. Suur osa CNV-sid on seostatud komplekssete haigustega nagu närvisüsteemi, autoimmuunsete, kardiovaskulaarsete haiguste, tüüp II diabeedi, rinna- ja eesnäärme vähi, skisofreenia ja Alzheimer'iga. Ligi kümmekond tööd on tuvastanud ka CNV-sid, mis võiksid mõjutada suguorganite arengut ja funktsiooni (Lopes *et al.*, 2013). Kogu genoomi hõlmavates CNV uuringutes on leitud seoseid testikulaarse hüpospaadia, Sertoli rakkude sündroomi, sugurakkude aresti, Kallmann sündroomi ja muude spermatogeneesi häiretega. Taolisi andmeid ei saa aga kaasata kliinilistesse uuringutesse küllaltki kesise informatsiooni tõttu, sest neid pole siiani sõltumatutes uuringutes replitseeritud ega mudelorganismidel testitud.

Antud töös kasutati ülegenoomseks koopiaarvu varieeruvuste analüüsiks hüpoteesivaba meetodina SNP mikrokiipe. Hüpoteesivabad meetodid võimaldavad avastada uusi geene,

milles olevaid aberratsioone saaks seostada meestel viljatusega. Käsitletud metoodika eeliseks on kõrge resolutsioon, suur tihedus ja läbilaskevõime üle kogu genoomi, kuid proovide katvus võib olla ebaühtlane segmentaalsete duplikatsioonide korral (Ho *et al.*, 2013). Võrreldes teiste meetoditega on see ideaalne haigustega seotud ümberkorralduste uurimiseks, sest võimaldab leida potentsiaalseid viljakusega seotud kandidaatgeenide siseseid geneetilisi variatsioone, mida hiljem mõne muu hüpoteesipõhise meetodiga valideerida. Varasemalt avaldatud sarnastes geeniuuringute töödes, mis keskenduvad spermatogeneesi vigadega seotud genoomsetele ümberkorraldustele, on peamise tehnoloogiana olnud kasutusel nii SNP kui ka aCGH kiibid (Frühmesser *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2013; Damyanova *et al.*, 2013). Siiski tundub SNP kiipide kasutamine olevat kõige efektiivsem meetod, võttes arvesse kulu, aega ja informatsiooni kättesaadavust. Võrreldes aCGH tehnoloogiaga suudab SNP kiip tuvastada ka uniparentaalset disoomiat ning tunduvalt väiksemaid ümberkorraldusi kui aCGH. Antud meetodi puuduseks on inversioonide ja translokatsioonide tuvastamatus. Neid kahte võimaldavad tuvastada teise põlvkonna sekveneerimismeetodid, kuid arvestama peab tehnoloogia kalliduse ja ajamahuka andmeanalüüsiga.

Käesolevas bakalaureusetöös osutus ülegenoomse kiibikatse tulemuste põhjal eksperimentaalseks validatsiooniks valituks geeni *LRRC69* deletsioon. Kriteeriumite kohaselt pidi deletsioon ennustatud olema vähemalt kahel algoritmil kolmest ning vähemalt kahel patsiendil. Lisaks oli äärmiselt oluline, et deletsioon ei esineks kontrollgrupis ning et geen oleks ekspresseeritud meeste reproduktiivorganites. Ka varasemalt ilmunud meeste viljakusprobleemidega seotud CNV-sid uurivates töödes on keskendutud enamasti geenidele, millel on kõrge ekspressioon testises.

Validatsiooniks kasutati hüpoteesipõhist *TaqMan* qPCR meetodit, sest seda on lihtne käsitleda ja see on kiirelt optimeeritav. Lisaks võimaldab see läbi töötada palju proove bipleks reaktsioonidena. Puuduseks peetakse endogeensete kontrollide olemasolu ning võimetust analüüsida paljusid geene korraga. Viljatusega seotud geeniuuringute valideerimiseks on kasutatud ka teisi meetodeid nagu MAPH ja MLPA, kuid FISH tehnoloogiat tunduvalt vähem. Käesolevas töös valideerus antud meetodiga CNV kõigil ennustatud patsientidest. Ühtegi valepositiivset ega ka valenegatiivset tulemust ei saadud, ning seetõttu olid valitud meetodid katsete läbiviimiseks usaldusväärsed. Antud eksperimentaalse osa põhjal ei ole võimalik väita kindlalt, et uuritud deletsioon meestel viljatust põhjustaks, sest usaldusväärsuse nivool $\alpha=0.05$ ei ole deletsiooni esinemise suurus statistiliselt oluline. Järgnevalt oleks vaja teostada replikatsiooniuring suuremas valimis, eelkõige kontrollgrupis, et saada adekvaatsemat pilti deletsiooni esinemissagedusest üldpopulatsioonis.

2.4.2 *LRRC69* geeni tähtsus meeste viljakuses

Käesolevas töös leiti 8. kromosoomis *LRRC69* geeni sisene 52,374 bp pikkune deletsioon, mille levikuprotsent viljatutel meestel antud valimis on 2.5. Vastavalt DGV andmetele on GOLD standard variants (GssvL125896) leidnud usaldusväärsete andmete põhjal *LRRC69* geenis olevate struktuursete variatsioonide sageduseks üldpopulatsioonis 0.16%, kuid antud valimis oli levimus 2.5%. Deletsiooni esinemine on seega üle 15 korda kõrgem. On võimalus, et tuvastatud kõrge sagedus on juhuslik, sest analüüsitud valim oli väike. Leitud tulemused on aga huvipakkuvad, sest deletsiooni ei tuvastatud ühelgi kontrollindiviidil.

LRRC69 funktsioon on väheste uuringute tõttu teadmata, kuid kõrge ekspressioonitaseme tõttu testises, võib antud piirkond mängida olulist rolli spermatogeneesi edukal kulgemisel. Vaja oleks teostada geeniga seotud põhjalikumaid uuringuid laiemas valimis replikatsiooni ning mudelorganismidel testimise näol, et selgitada välja tema täpsemad funktsioonid ning ka mõju reproduktiivtervisele.

Käesolevas bakalaureusetöös toetuti hüpoteesivaba lähenemisega ülegenoomsele koopiaarvu varieeruvuste alguuringule, millest lähtuvalt valideeriti *LRRC69* geenis ennustatud CNV piirkonda viljatutel ja viljakatel meestel. Antud töö on esimene, kus kajastatakse *LRRC69* geenis olevat deletsiooni kui meestepoolse viljatuse võimalikku riskifaktorit.

KOKKUVÕTE

Viimastel aastatel on järjest enam hakatud pöörama tähelepanu meeste viljatusega seotud koopiaarvu varieeruvustele ning käesolevaks hetkeks on selles vallas avaldatud mitmeid teadustöid. Sellest hoolimata, suur osa viljatust põhjustavatest faktoritest jääb selgusetuks. Viljatuse põhjuste etioloogia uurimine on küllaltki keeruline, sest tegemist on väga kompleksse haigusega, mida mõjutavad tuhanded geenid ja faktorid. Suurema osa haigusjuhtumitest põhjustavad spermatogeneesi vead, mille taga on genoomi struktuursed varieeruvused. Mehepoolse viljatuse paremaks mõistmiseks oleks vaja teostada rohkem uurimusi, leidmaks nendega seotud genoomseid ümberkorraldusi ning seeläbi viise haigusega toimetulemiseks või ennetamiseks.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli varasemalt teostatud ülegenoomse Illumina HumanOmniExpress CNV kiibiuringute tulemuste põhjal ennustatud ühe CNV lookuse kinnitamine teise meetodiga, tõestamaks või ümberlukkamaks *LRRC69* geenis asuva deletsiooni olemasolu ja seost mehepoolse viljatusega. Validatsioonikatsed viidi läbi kasutades TaqMan *qPCR*-i ja analüüsiti SDS 2.4 ja RQ Manager 1.2.1 programmidega.

Valideerimisega kinnitus deletsioon uuritud seitsmel indiviidil kandidaatgeeni *LRRC69* 8:91,116,612-91,168,986 (hg38) piirkonnas. Ühtegi deletsioonikandjat kontrollgrupis ei leitud, kuid niivõrd väikeses valimis ei olnud deletsiooni leviku suurus statistiliselt oluline. Antud töö põhjal ei saa väita, et *LRRC69* geenis olev deletsioon on kindlasti seotud mehepoolse viljatusega. Metoodika koha pealt olid kasutatud meetodid töökindlad ja usaldusväärsed, kuid kinnitamaks deletsiooni seost meeste viljatusega oleks vaja edasises täiendavas replikatsiooniuuringus suurendada valimit nii patsientide grupis kui ka kontrollgrupis. Kuna käsitletav geen ei ole varasemalt kirjanduses palju kajastust leidnud, siis annaks mudelorganismide peal katsete tegemine rohkemat informatsiooni geeni olulisuse kohta meeste reproduktiivtervises.

Käesoleva bakalaureusetöö olulisus seisneb uue kandidaatgeeni tuvastamises, mis võimaldab paremat arusaama mehepoolsest viljatusest. Sarnaseid uuringuid on kirjanduses varasemalt kajastatud, kuid ükski pole käsitlenud *LRRC69* geenisiseseid CNV-sid. Kuna koopiaarvu varieeruvused mõjutavad otseselt spermatogeneesis osalevate geenide ekspressiooni, siis aitaks iga uue kandidaatgeenis oleva CNV tuvastamine jõuda lähemale meeste reproduktiivtervise parandamisele.

Copy number variations in male infertility

Anett Michelle Valdner

SUMMARY

Infertility is a worldwide problem affecting an estimated 15% of couples globally and males contribute about 50% of cases. The phenomenon is mostly caused by defects in spermatogenesis which are reflected in lower or absent production of spermatozoa (Massart *et al.*, 2012). Spermatogenesis is a complex process, involving thousands of genes, which have ubiquitous expression pattern or a specific function in reproductive tissues or spermatogenesis. The aetiology remains unknown in about 50% of the cases. The cases which have no known underlying cause are called “idiopathic” infertile males and therefore there is a need for further investigations. It has been proposed that CNVs in genes that are highly expressed in testis could theoretically cause male infertility (Stouffs *et al.*, 2016).

Copy number variation is a source of genetic diversity in humans. They are an important component of genomic structural variation, which is due to changes in the number of DNA segments that range from 50 bp to several megabase pairs (Mills *et al.*, 2011). CNVs can be deletions, duplications, insertions, translocations and they are formed by five different major mechanisms: NAHR (Nonallelic Homologous Recombination), NHEJ (Nonhomologous End-Joining), FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching), MEI (Mobile Element Insertion) and MMBIR (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication). Formation of CNVs can occur during meiosis and mitosis or replication. Previous studies have show that some copy number variations can cause Mendelian diseases or can be associated with complex diseases (Zhang *et al.*, 2009). Male infertility is indeed a complex disease and there have been found a handful of candidate genes that could be a causal factor in this particular disease (Nuti ja Krausz, 2008; Krausz *et al.* 2012; Krausz, 2011; Fröhmeser *et al.*, 2013; Stouffs *et al.*, 2012; Tüttelmann *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013).

Whole genome Illumina HumanOmniExpress arrays have been used previously to perform a whole-genome screening of CNVs in patients with male infertility (n=281) and fertile controls (partners of pregnant women, n=95). The results of the microarray experiment, a deletion in *LRRC69*, was validated in the frame of this bachelor thesis using *TaqMan qPCR*.

According to this study, all the predicted deletion carriers were confirmed. No false positives or false negatives or new carriers were found during the validation process. The deletion in 8q21.3 (*LRRC69*) was found in infertile males with a frequency of 2.5%. None of the controls carried this CNV, suggesting a role for *LRRC69* in male infertility. However it remains challenging to determine the functional importance with such a small sample set. A replication study with a larger sample set should be carried out and further functional studies are needed with this copy number variable region in order to elucidate its role in male infertility.

Overall, this is the first study showing a deletion in *LRRC69* gene as a potential causal factor in male infertility. As a large proportion of men have no underlying cause and they remain idiopathic, there is a greater need for further research into underlying etiology and treatment. With accurate data it is possible to predict and diagnose male infertility.

KIRJANDUSE LOETELU

Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13: 37

Agbor, V. A., Tao, S., Lei, N., Heckert, L. L. (2013). A *Wt1-Dmrt1* transgene restores *DMRT1* to Sertoli cells of *Dmrt1*(-/-) testes: a novel model of DMRT1-deficient germ cells. *Biol. Reprod.* 88(2): 51.

Alkan, C., Coe, B. P., Eichler, E. E. (2011). Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* 12: 363-376.

Alonso, A., Julia, A., Tortosa, R., Canaleta, C., Canete, J. D., Ballina, J., Balsa, A., Tornero, J., Marsal, S. (2010). CNstream: a method for the identification and genotyping of copy number polymorphisms using Illumina microarrays. *BMC. Bioinformatics.* 11: 264.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 5(2): 209-19.

Aston, K. I. (2014). Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology.* 2(3): 315-321.

Bernardini, L., Alesi, V., Loddo, S., Novelli, A., Bottillo, I. et al. (2010). High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? (2010). *Eur. J. Hum. Genet.* 18(2): 178-85.

Carrell, D. T., De Jonge, C., Lamb, D. J. (2006). The genetics of male infertility: a field of study whose time is now. *Arch. Androl.* 52(4): 269-74.

Chung, E., Brock, G. B. (2011). Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Can. Urol. Assoc. J.* 5(3): 210-214.

Colella, S., Yau, C., Taylor, J. M., Mirza, G., Butler, H., Clouston, P., Bassett, A. S., Seller, A., Holmes, C. C., Ragoussis, J. (2007). QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov

Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic. Acids. Res.* 35(6): 2013-1025.

Damyanova, V., Dimitrova-Dikanarova, D., Hadjidekova, S., Savov, A., Nesheva, D., Rukova, B., Vatev, I., Toncheva, D. (2013). Genomic study in patients with idiopathic azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Akush. Ginekol.* 52(5): 27-34.

Dong, Y., Pan, Y., Wang, R., Zhang, Z., Xi, Q., Liu, R. Z. (2015). Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. *Genet. Mol. Res.* 14(4): 16041-9.

Eggers, S., DeBoer, K. D., van den Bergen, J., Gordon, L., White, S. J., Jamsai, D., McLachlan, R. I., Sinclair, A. H., O'Bryan, M. K. (2015). Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility. *Fertil. Steril.* 103(1): 214-219.

Ehala-Aleksejev, K., Punab, M. (2015). The different surrogate measures of adiposity in relation to semen quality and serum reproductive hormone levels among Estonian fertile men. *Andrology.* 3: 225-234.

Elliott, D. J. (2004). The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNP-G-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 27: 328–34.

Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., Foresta, C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reprod. Biomed. Online.* 14(6): 734–45.

Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Nicolay, H. J., Sigalotti, L., Maio, M. (2011). The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol. Oncol.* 5(2): 164–182

Frühmesser, A., Vogt, P. H., Zimmer, J., Witsch-Baumgartner, M., Fauth, C., Zschocke, J., Pinggera, G. M., Kotzot, D. (2013). Single nucleotide polymorphism array analysis in men with idiopathic azoospermia or oligoasthenozoospermia syndrome. *Fertil. Steril.* 100(1): 81-7.

Ghorbel, M., Baklouti-Gargouri, S., El Ghazel, H., Zribi, N., Ben Abdallah, F., Cherif, M., Fakhfakh, F., Saad, A., Ammar-Keskes, L. (2013). Pericentric inversion of chromosome 12

[Inv (12) (p12q12)] associated with idiopathic azoospermia in one infertile Tunisian man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432: 472-474.

Greshock, J., Feng, B., Noguiera, C., Ivanova, E., Perna, I., Nathason, K., Protopopov, A., Weber, B. L., Chin, L. (2007). A comparison of DNA copy number profiling platforms. *Cancer. Res.* 67(21): 10173-80.

Halder, A., Kumar, P., Jain, M., Iyer, V. K. (2017). Copy number variation in testicular maturation arrest. *Andrology.* 5(3): 460-472.

Ho, H. C., Suarez, S. S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* 68(5): 1590-6.

Ho, C. C., Mun, K., Naidu, R. (2013). SNP array technology: an array of hope in breast cancer research. *Malaysian. J. Pathol.* 35(1): 33-43.

Ho, N. R., Huang, N., Conrad, D. F. (2015). Improved detection of disease-associated variation by sex-specific characterization and prediction of genes required for fertility. *Andrology.* 3(6): 1140-9.

Hochstenbach, R., Hackstein, J. H. (2000). The comparative genetics of human spermatogenesis: clues from flies and other model organisms. *Results. Probl. Cell. Differ.* 28: 271-298.

Hollox, E., Atia, T., Cross, G., Parkin, T., Armour, J. (2002). High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J. Med. Genet.* 39(11): 790-795.

Huang, J. X., Scott, M. B., Pu, X. Y., Zhou-Cun, A. (2012). Association between single-nucleotide polymorphisms of DNMT3L and infertility with azoospermia in Chinese men. *Reprod. Biomed. Online.* 24(1): 66-71.

Huang, M., Wang, H., Li, J., Zhou, Z., Du, Y., Lin, M., Sha, J. (2006). Involvement of ALF in human spermatogenesis and male infertility. *Int. J. Mol. Med.* 17(4): 599-604.

Iacobucci, I., Lonetti, A., Papayannidis, C., Martinelli, G. (2013). Use of Single Nucleotide Polymorphism Array Technology to Improve the Identification of Chromosomal Lesions in Leukemia. p. 791-810. Zhang, R. (ed.), Curr. Cancer. Drug. Targets, vol.13. Amarillo, USA.

Ionita-Laza, I., Rogers, A. J., Lange, C., Raby, B. A., Lee, C. (2008). Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. Genomics. 93(1): 22-6.

Ise, T., Das, S., Nagata, S., Maeda, H., Lee, Y., Onda, M., Anver, M. R., Bera, T. K., Pastan, I. (2008). Expression of POTE protein in human testis detected by novel monoclonal antibodies. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365: 603-608.

Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur. Urol. 62(2): 324-32.

Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., Pinkel, D. (1993). Comparative genomic hybridization: A rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. Semin. Cancer. Biol. 4(1): 41-46.

Kasak, L., Rull, K., Vaas, P., Teesalu, P., Laan, M. (2015). Extensive load of somatic CNVs in the human placenta. Sci. Rep. 5: 8342.

Kayser, O., Osmonov, D., Harde, J., Girolami, G., Wedel, T., Schäfer, P. (2012). Less invasive causal treatment of ejaculatory duct obstruction by balloon dilation: a case report, literature review and suggestion of a CT- or MRI-guided intervention. Ger. Med. Sci. 10: Doc06.

Kidd, J. M., Cooper, G. M., Donahue, W. F., ... Eichler, E. E. (2008). Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. Nature. 453(7191): 56–64.

Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 25: 271–285.

Krausz, C., Chianese, C., Giachini, C., Guarducci, E., Laface, I., Forti, G. (2011). The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility. *J. Endocrinol. Invest.* 34: 376-382

Krausz, C., Forti, G., McElreavery, K. (2003). The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int. J. Androl.* 26: 70–5.

Krausz, C., Giachini, C., Lo Giacco, D., Daguin, F., Chianese, C., Ars, E., Ruiz-Castane, E., Forti, G., Rossi, E. (2012). High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. *PLoS One.* 7(19): e44887

Krumm, N., Sudmant, P. H., Ko, A., O’Roak, B. J., Malig, M., Coe, B. P. (2012). Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome. Res.* 22(8): 1525-32.

Kumar, N., Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J. Hum. Reprod. Sci.* 8(4): 191-196.

Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., ... Page, D. C. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.* 29(3): 279-86.

Kurpisz, M., Nakonechnyy, A., Niepieklo-Miniewska, W., Havrylyuk, A., Kamieniczna, M., Nowakowska, B., Chopyak, V., Kusnierczyk, P. (2011). Weak association of anti-sperm antibodies and strong association of familial cryptorchidism/infertility with HLA-DRB1 polymorphisms in prepubertal Ukrainian boys. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 129.

Lee, J. Y., Dada, R., Sabanegh, E., Carpi, A., Agarwal, A. (2011). Role of genetics in azoospermia. *77(3):* 598-601.

Li, W., Olivier, M. (2013). Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. *Physiol. Genomics.* 45(1): 1-16.

Lopes, A. M., Aston, K. I., Thompson, E., ... Conrad, D. F. (2013). Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene *DMRT1*. *PLoS. Genet.* 9(3): e1003349.

Lucito, R., Healy, J., Alexander, J., ... Wigler, M. (2003). Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome. Res.* 13(10): 2291-305.

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum. Genet.* 9: 387-402.

Massaia, A., Xue, Y. (2017). Human Y chromosome copy number variation in the next generation sequencing era and beyond. *Hum. Genet.* 136(5): 591-603.

Massart, A., Lissens, W., Tornaye, H., Stouffs, K. (2012). Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian. J. Androl.* 14(1): 40-48.

Matsushime, H., Jinno, A., Takagi, N., Shibuya, M. (1990). A novel mammalian protein kinase gene (mak) is highly expressed in testicular germ cells at and after meiosis. *Mol. Cell Biol.* 10(5): 2261-2268.

Matzuk, M. M., Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* 14: 1197–1213.

McLachlan, R. I. (2013). Approach to the patient with oligozoospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98(3): 873-80.

Meschede, D., Lemcke, B., Behre, H. M., De Geyter, Ch., Nieschlag, E., Horst, J. (2000). Clustering of male infertility in the families of couples treated with intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Rep.* 15(7): 1604-1608.

Milisav, I., Jones, M. H., Affara, N. A. (1996). Characterization of a novel human dynein-related gene that is specifically expressed in testis. *Mamm. Genome* 7(9): 667-672.

Mills, R. E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R. E. et al. (2011). Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*. 470: 59-65.

Mills, R. E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R. E. et al. (2011). Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*. 470: 59-65.

Nuti, F., Krausz, C. (2008). Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*. 16: 504–13.

O’Flynn O’Brien, K. L., Varghese, A. C., Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil. Steril*. 93(1): 1-12.

Olesen, I. A., Andersson, A., Aksglaede, L., Skakkebaek, N. E., Rajpert-de Meyts, E., Joergenses, N., Juul, A. (2017). Clinical, genetic, biochemical, and testicular biopsy findings among 1,213 men evaluated for infertility. *Fertil. Steril*. 107(1): 74-82.e7.

Patsalis, P. C., Kousoulidou, L., Männik, K., ... Kurg, A. (2007) Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization. *European Journal of Human Genetics*. *Eur. J. Hum. Genet.* 15(2): 162-72.

Pique-Regi, R., Caceres, A., Gonzales, J. R. (2010). R-Gada: a fast and flexible pipeline for copy number analysis in association studies. *BMC. Bioinformatics*. 11: 380.

Poznik, G. D., Xue, Y., Mendez, F. L., ... Tyler-Smith, C. (2016). Punctuated bursts in human male demography inferred from 1244 worldwide Y-chromosome sequences. *Nat. Genet.* 48: 593–599.

Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihlajev, V., Pomm, K., Ladv, K., Korrovits, P., Laan, M. (2016). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum. Reprod.* 32(1): 18-31.

Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., ... Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 444: 444–454.

Sanocka, D., Kurpisz, M. (2003). Infertility in Poland--present status, reasons and prognosis as a reflection of Central and Eastern Europe problems with reproduction. *Med. Sci. Monit.* 9(3): SR16-20.

Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic. Acids. Res.* 30(12): e57.

Schultz, N., Hamra, F. K., Garbers, D. L. (2003). A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(21): 12201-12206.

Sellner, L. N., Taylor, G. R. (2004). MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum. Mutat.* 23(5): 413-9.

Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16(5): 972-8.

Skakkebaek, N., Rajpert-De Meyts, E., Louis, G., ... Juul, J. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* 96(1): 55-97

Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., ... Page, D. C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 423: 825-37.

Snijders, A. M., Pinkel, D., Albertson, D. G. (2003). Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2(1): 37-45.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., Lichter, P. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes. Chromosomes. Cancer.* 20(4): 399-407.

- Sun, Z., Liu, P., Jia, X., Withers, M. A., Jin, L., Lupski, J. R., Zhang, F. (2013). Replicative mechanisms of CNV formation preferentially occur as intrachromosomal events: evidence from Potocki–Lupski duplication syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 22(4): 749-756.
- Stouffs, K., Vandermaelen, D., Massart, A., Menten, B., Vergult, S., Tournaye, H., Lissens, W. (2012). Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Hum. Reprod.* 27(3): 921-929.
- Stouffs, K., Gheldof, A., Tournaye, H., Vandermaelen, D., Bonduelle, M., Lissens, W., Seneca, S. (2016). Sertoli Cell-Only Syndrome: Behind the Genetic Scenes. *Biomed. Res. Int.* 6191307.
- Strassberg, M., Fruhman, G., Van den Veyver, I. B. (2011). Copy-number changes in prenatal diagnosis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11(6): 579-92.
- Tournaye, H., Krausz, C., Oates, R. D. (2016). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet. Diabetes. Endocrinol.*
- Tu, X. D., Cong, X. W., Zeng, J., Zheng, D. Z., Yan, A. Z., Lin, Y. H., Qiu, L. P., Zhang, M., Zhong, F., Lan, F. (2013). Analysis of small supernumerary marker chromosome 15q11 in four infertile males. *Zhonghua. Yi. Xue. Yi. Chuan. Xue. Za. Zhi.* 30(5): 539-543.
- Tüttelmann, F., Simoni, M., Kliesch, S., Ledig, S., Dworniczak, B., Wieacker, P., Röpke, A. (2011). Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS. One.* 6(4): e19426.
- van der Ven, K., Fimmers, R., Engels, G., van der Ven, H., Krebs, D. (2000). Evidence for major histocompatibility complex-mediated effects on spermatogenesis in humans. *Hum. Reprod.* 15(1): 189-196.
- Vandeweyer, G., Kooy, R. F. (2013). Detection and interpretation of genomic structural variation in health and disease. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 13(1): 61-82.

Vogt, P. H. (2005). Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*. 10: 81–93.

Weischenfeldt, J., Symmons, O., Spitz, F., Korbel, J. O. (2013). Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat. Rev. Genet.* 14(2): 125-138.

Yan, Y., Yang, X., Liu, Y., Shen, Y., Tu, W., Dong, Q., Yang, D., Ma, Y., Yang, Y. (2017). Copy number variation of functional RBMY1 is associated with sperm motility: an azoospermia factor-linked candidate for asthenozoospermia. *Hum. Reprod.* 12: 1-11.

Yang, B., Yuan, J. L., Gao, X. K., Wang, H., Shao, C., Liu, H. L., Chen, B. Q., Qin, R. L., Shao, G. X., Kang, F. X. (2009). Expression of COX10 in human non-obstructive azoospermia testes. *Zhonghua. Nan. Ke. Xue.* 15(7): 599-603.

Zarrei, M., MacDonald, J. R., Merico, D., Scherer, S. W. (2015). A copy number variation map of the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 16(3): 172-183.

Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E., Lupski, J. R. (2009). Copy number variation in human health, disease and evolution. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 10: 451-481.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://omim.org/> (aprill, 2017)

<https://gtexportal.org/> (aprill, 2017)

<https://www.thermofisher.com/> (mai, 2017)

<http://www.ensembl.org/index.html/> (mai, 2017)

<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home/> (aprill, 2017)

<http://www.proteinatlas.org/> (mai, 2017)

<http://exac.broadinstitute.org/> (mai, 2017)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (2016/2017)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anett Michelle Valdner (sünnikuupäev 23.06.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
“Meeste viljakusega seotud geenide koopiaarvu varieeruvused”,
mille juhendajad on Laura Kasak, Anna-Maria Punab ja prof. Maris Laan

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu 31.12.2020 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
- 2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
- 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2017**