

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Tiina Kuura

**Variantset luteiniseerivat hormooni määravate geneetiliste variantide seos
mehepoolse idiopaatilise viljatusega ja luteiniseeriva hormooni tasemega
seerumis**

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Marina Grigороva, PhD

Tartu 2015

1. Sisukord	
1. Sisukord.....	2
2. Kasutatud lühendid ja mõisted	4
3. Sissejuhatus	6
4. Kirjanduse ülevaade	7
4.1 Glükoproteiinsed hormoonid	7
4.1.1 Glükoproteiinsete hormoonide funktsioon.....	7
4.1.2 Glükoproteiinsete hormoonide struktuur	8
4.1.3 Glükoproteiinsete hormoonide tootmine.....	9
4.1.4 Glükoproteiinsete hormoonide seondumine retseptoriga.....	11
4.1.5 Luteiniseeriva hormooni alaühikuid kodeerivad geenid	12
4.1.6 Inimese luteiniseeriva hormooni beeta-alaühiku geneetilised variandid	15
4.5 Ühenukleotiidiliste variantide genotüpiseerimine	18
4.5.1 DNA mikrokiibid	18
4.5.2 <i>TaqMan</i> 'i meetod	18
4.5.3 PCR-RFLP	18
4.5.4 Alleelispetsiifiline PCR.....	19
5. Eksperimentaalosa.....	20
5.1 Töö eesmärgid.....	20
5.2 Materjal ja meetodika	21
5.2.1 Valim.....	21
5.2.2 SNPde rs1800447 ja rs34349826 tuvastamine PCR ja restriksiooni abil	21
5.2.3 Statistiline analüüs.....	25
5.4 Tulemused ja arutelu.....	27
5.4.1 V-LH alleeli sagedus ei erine Eesti noorte meeste kohorti ja Eesti viljatute patsientide vahel.....	27
5.4.2 V-LH kandjatel on keskmine luteiniseeriva hormooni kontsentratsioon veres kõrgem.....	28
5.4.3 Arutelu.....	30
6. Kokkuvõte	33
7. Summary	34
8. Tänuavaldused.....	36
9. Kasutatud kirjanduse loetelu	37
9.1 Kasutatud veebiaadressid.....	45
10. Lisad	46

10.1 Lisa 1: <i>LHB</i> geeni järjestus	46
10.2 Lisa 2: Primer-BLAST tulemused	47
10.3 Lisa 3: Valimi parameetrite seos LH tasemega veres	49
10.4 Lisa 4: Luteiniseeriva hormooni tase logaritmitud ja logaritmitamata väärtustena	51
10.5 Lisa 5: Artikkel ' <i>Carriers of V-LH among 1593 Baltic men have significantly higher serum LH</i> '	52
11. Lihtlitsents	60

2. Kasutatud lühendid ja mõisted

bp	aluspaar
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> ehk tsükliline adenosiin-monofosfaat
CG	kooriongonadotropiin
<i>CGB</i>	Kooriongonadotropiini hormooni beeta-alaühikut kodeerivad geenid
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon ehk follitropiin
FSHR	follitropiini retseptor
GnRH	<i>Gonadotropine releasing hormone</i> ehk gonadotropiine vabastav hormoon
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i> ehk inimese kooriongonadotropiini hormoon
IU	Rahvusvaheline ühik (<i>international unit</i>). Rahvusvaheline kokkuleppeline suurus, mille mõõtmisel lähtutakse hormooni või muu substantsi bioaktiivsusest. Luteiniseeriva hormooni puhul on see hormooni kogus, mis vastab 0.0668 mg hormooni aktiivsusele (World Health Organization, 1975).
HPG	<i>hypothalamus-pituitary-gonadal axis</i> ehk hüpotaalamus-hüpofüüsi-gonaadide telg
kb	kilo-aluspaari ehk tuhat aluspaari
LH	luteiniseeriv hormoon ehk lutropiin
LH-beeta	luteiniseeriva hormooni beeta-alaühik
<i>LHB</i>	Luteiniseeriva hormooni beeta-alaühikut kodeeriv geen
LHCGR	Luteiniseeriva hormooni ja kooriongonadotropiini retseptor
nmol	nanomool
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	Restriktsioonifragmentide pikkuse polümorfismi võrdlev PCR
P-väärtus	Statistiline väärtus, mis annab infot läbiviidud analüüsi või testi tulemuste tõlgendamiseks. P-väärtust võrreldakse valitud olulisusnivoo vastu, kui see on sellest suurem, võib oletada et testi null-hüpotees peab paika.
SNP	Ühenukleotiidiline asendus DNA nukleotiidide vahel (<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>), mis on populatsioonis levinud
SNV	<i>single nucleotide variation</i> ehk ühenukleotiidiline varieeruvus
TBE	0.5x Tris-boraat EDTA puhver

TSH	kilpnääret stimuleeriv hormoon ehk türotropiin
TSHR	türotropiini retseptor
V-LH	variantne luteiniseeriv hormoon, asendustega Trp8Arg ja Thr15Ile
μl	mikroliiter

3. Sissejuhatus

Inimese viljakus on reguleeritud erinevate hormoonide poolt, mis ühtse süsteemina vastutavad sugulise arengu, sugurakkude küpsemise ning raseduse kulu eest. Süsteemis mängivad olulist rolli gonadotroopsed hormoonid: luteiniseeriv hormoon, folliikuleid stimuleeriv hormoon ning kooriongonadotropiin. Need kolm hormooni moodustavad koos türeotropiiniga glükoproteiinsete hormoonide rühma, olles struktuurilt sarnased.

Luteiniseeriv hormoon (LH) mängib olulist rolli nii meeste kui naiste viljakuses. Hormoon põhjustab meestel testosterooni sünteesi ning naistel ovulatsiooni, samuti östrogeeni sünteesiks vajalike androgeenide tootmist (Moyle ja Campbell, 1996). Lisaks metsiktüüpi hormoonile on levinud ka variantne LH (V-LH), mille struktuur on kahe aminohappelise asenduse tõttu erinev (Trp8Arg SNV rs1800447, Ile15Thr SNV rs34349826). Erinevused struktuuris mõjutavad hormooni seondumist retseptoriga, ning seeläbi ka V-LH kandjate fenotüüpi. Senised uuringud on näidanud, et V-LH vähendab naiste viljakust ja suurendab LH taset veres (Furui jt., 1994; Takahashi jt., 1998; Takahashi jt., 1999; Du jt., 2012). Uuringuid mõjust meeste viljakusele on aga vähe ning avaldatud uuringutes on kasutusel väikesed valimid, mille puhul pole arvesse võetud teisi parameetreid, mis mõjutavad hormooni taset.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates antakse ülevaade glükoproteiinsete hormoonide toimimisest organismis ning vaadeldakse täpsemalt luteiniseeriva hormooni ning tema variantse vormi mõju viljakusele. Käsitletakse ka ühenukleotiidiliste variantide tuvastamise võimalusi. Eksperimentaalselt on genotüpiseeritud Eesti noorte meeste kohortvalim ning Eesti viljatute meeste valim ühenukleotiidilise variandi rs1800447 suhtes, mis määrab V-LH alleeli. Saadud andmete analüüsis on vaadeldud, kas leidub seoseid viljatuse ning luteiniseeriva hormooni tasemega.

Antud töö on osa projektist HAPPY PREGNANCY (<http://www.happypregnancy.ut.ee/>). Projekti eesmärgiks on välja töötada uued mitteinvasiivsed biomarkerid inimese viljakuse hindamiseks ning rasedustüsistuste ennustamiseks ja varaseks avastamiseks. Töö tulemusi on kasutatud avaldatud artiklis (Punab jt., 2015).

Märksõnad: V-LH, luteiniseeriv hormoon, lutropiin, glükoproteiinsete hormoonid, viljakus

4. Kirjanduse ülevaade

4.1 Glükoproteiinsed hormoonid

Luteiniseeriv hormoon (LH) ehk lutropiin kuulub koos folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ehk follitropiini ning türeoidstimuleeriva (kilpnääret stimuleeriva) hormooni (TSH) ehk türotropiiniga ajuripatsis sünteesitavate glükoproteiinsete hormoonide hulka. Glükoproteiinsete hormoonide hulka kuulub ka inimese platsentas sünteesitav kooriongonadotropiin (CG, inimese hormooni puhul hCG). Glükoproteiinsete hormoonide puhul kuulub valgu struktuuri lisaks aminohapetele ka suhkruahel. Kõik neli hormooni koosnevad kahest alaühikust, millest üks on vaadeldud hormoonidel ühine. FSH, LH ning hCG moodustavad gonadotropsete hormoonide perekonna (Pierce ja Parsons, 1981). Antud töös on vaadeldud täpsemalt inimese glükoproteiinseid hormoone.

4.1.1 Glükoproteiinsete hormoonide funktsioon

FSH ja LH on olulised meeste ja naiste sugurakkude ja suguhormoonide regulatsioonis. FSH on meestel looteas vajalik Sertoli rakkude paljunemiseks ja arenemiseks. Sertoli rakud on vajalikud spermatoosoidide arenguks, nad sünteesivad erinevaid parakriinseid ja endokriinseid produkte, mis mõjutavad Leydigi rakkude arengut. Täiskasvanueas on FSH vajalik normaalseks spermatogeneesiks. (Plant ja Marshall, 2001). Naistel põhjustab FSH folliikulite küpsemist, nagu ka hormooni nimi viitab (McGee ja Hsueh, 2000).

Luteiniseeriv hormoon on oluline paljunemiseks. LH märklaudrakkudeks on meestel munandite Leydigi rakud, kus ta stimuleerib testosterooni sünteesi ning on oluline esmase spermatogeneesi käivitamiseks. Testosterooni on vaja spermatogeneesiks ja sekundaarsete sugutunnuste arenemiseks ning püsimiseks. Naistel põhjustab LH järsk tõus munaraku küpsemise järel ovulatsiooni ehk munaraku vabanemist munasarjast, ning kollaskeha (*corpus luteum*) arenemist. Samuti põhjustab LH naistel teeka rakkudes androgeenide sünteesi, millest toodetakse hiljem granuloosa rakkudes östrogeeni. Östrogeen on vajalik naiste sekundaarsete sugutunnuste arenemiseks ning püsimiseks (Gharib jt., 1990; Moyle ja Campbell, 1996).

Kooriongonadotropiini (hCG) toodetakse inimese platsentas ning ta seondub sama retseptoriga mis LH (LHCGR). Kooriongonadotropiin säilitab raseduse esimesel trimestril kollaskeha, mis sekreteerib progesterooni. Progesteroon hoiab emaka limaskestast paksu ning veresoonte rikkana, võimaldades lootel platsenta kaudu sellega ainevahetust. Raseduse hilisemas järgus võtab progesterooni sünteesi üle platsenta (Moyle ja Campbell, 1996).

Arvatakse, et hCG võib omada rolli juba blastotsüsti implantatsioonis emaka limaskestale (Cole ja Butler, 2010).

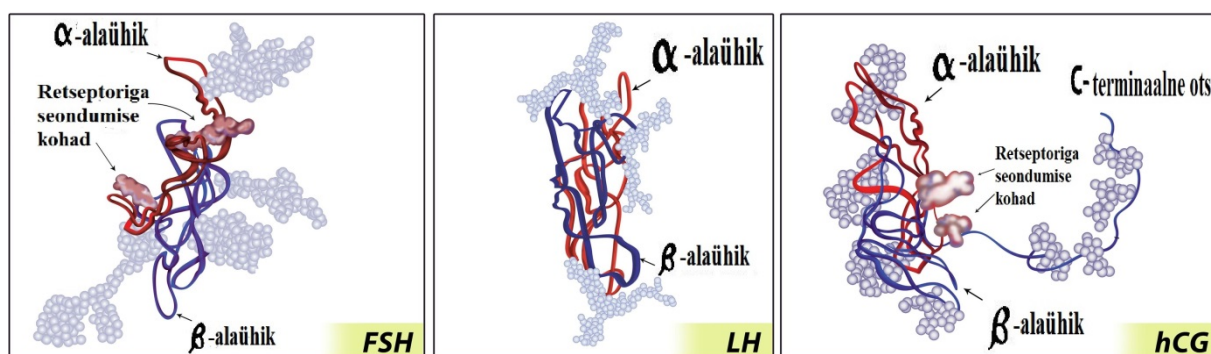
Türotropiin stimuleerib kilpnäärme epiteelrakkude kasvu ja türoksiini (T_4) tootmist. Türoksiinist toodetakse aktiivset trijodotüroniini (T_3), mis mõjutab väga paljusid inimkeha füsioloogilisi protsesse, sealhulgas metabolismi aktiivsust (Moyle ja Campbell, 1996).

4.1.2 Glükoproteiinsete hormoonide struktuur

FSH, LH, TSH ning hCG on suhteliselt suured (30-40 kDa) heterodimeersed valgud, ehk koosnevad kahest erinevast alaühikust. Alfa-alaühik on nendel hormoonidel ühine, beeta-alaühik on igal hormoonil unikaalne ning määrab hormooni toimet ja retseptoriga seondumist. Subühikud on seotud mittekovalentsete sidemete abil (Themmen ja Huhtaniemi, 2000).

Alfa-alaühiku valk koosneb 92 aminohappest. Valgul on kaks N-glükosüleerimiskohta, mille kaudu on seondunud suhkruahelad. Valgu struktuuris on 10 tsüsteiini, mis osalevad alaühiku-siseste disulfiidsildade moodustamises, mis on olulised beeta-alaühikuga seondumiseks (Sato jt., 1997; Hiro'oka jt., 2000).

Hormoonide beeta-alaühikud on omavahel sarnased (aminohappelises järjestuses 32% sarnasust LH-TSH paari puhul, 83% LH-hCG paari puhul). Nende struktuuris on 12 tsüsteiini, mis moodustavad kuus subühiku-sisest disulfiidsilda. FSH, TSH ning hCG beeta-subühikud sisaldavad kahte N-glükosüleerimiskohta, LH ühte. hCG C-terminaalses otsas on lisaks veel neli O-glükosüleerimiskohta (Joonis 1). Alaühiku pikkused varieeruvad 111-145 aminohappe vahel (Themmen ja Huhtaniemi, 2000; Morgan jt., 1975).



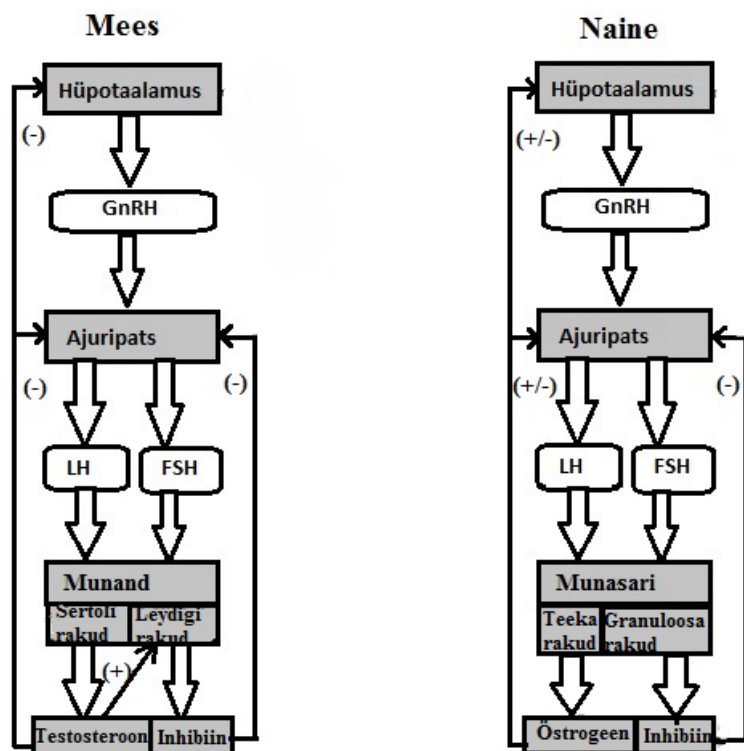
Joonis 1. Gonadotroopsete hormoonide struktuur. Alfa-alaühikud on toodud punase, beeta-alaühikud sinise joonega. Suhkruahelad on toodud helesiniste pallidena. Roosalt on märgitud retseptoriga seondumise kohad (Leao ja Esteves, 2014).

Glükoproteiinsete hormoonide puhul on lisaks aminohapetele oluline osa struktuurist suhkruahelad. Glükoproteiinseid hormoone glükosüleeritakse erinevate suhkruahelatega, sealhulgas siaalhape ning sulfoonhappe rühmadega. See põhjustab hormoonide erinevate isovormide teket, mis erinevad poolestusaja ja bioaktiivsuse poolest (Choi ja Smitz, 2014). Luteiniseeriva hormooni ja folliikuleid stimuleeriva hormooni puhul sõltub erinevate isovormide osakaal veres naistel menstruaaltsükli faasist (Anobile jt., 1998). On leitud, et sulfoneeritud gonadotropiinide poolestusaeg on lühem ning sialüeeritud gonadotropiinide poolestusaeg pikem (Wide jt., 2009). Sufoneeritud-sialüeeritud gonadotropiinide tasakaal muutub ka vanusega, sõltub soost ja naiste puhul menstruaaltsükli faasist ning polütsüstiliste munasarjade sündroomi puhul on seotud kehamassiindeksiga (Wide jt., 2007). Kooriongonadotropiini puhul eristatakse tavalist hCG hormooni (36 kDa) hüperglükosüleeritud hCG hormoonist (h-hCG, 40-41 kDa). h-hCG-d sünteesitakse rohkem raseduse alguses. Selle madalat osakaalu on seostatud raseduse katkemisega (Kovalevskaya jt., 2002; Sasaki jt., 2008). hCG seondumata beeta-subühiku leidumist verest seostatakse erinevate patoloogiatega, seejuures vähiga, ning arvatakse, et see takistab rakusurma (Choi ja Smitz, 2014). Kuigi LH ja hCG on aminohappeliselt järjestuselt sarnased, on LH poolestusaeg alla tunni ning hCG poolestusaeg ~24 tundi (Diebel ja Bogdanove, 1978; Wehmann ja Nisula, 1981). Arvatavasti on põhjus hCG suuremas glükosüleerituses (LH puhul 3 potentsiaalset glükosüleerimiskohta, hCG puhul 8, joonis 1).

4.1.3 Glükoproteiinsete hormoonide tootmine

Luteiniseerivat hormooni (LH), folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH) ning kilpnääret stimuleerivat hormooni (TSH) toodetakse hüpofüüsi ehk ajuripatsi eesgaras. TSH-d toodetakse türotropiinsetes rakkudes, LH-d ning FSH-d toodetakse gonadotroopsetes rakkudes. Gonadotroopsed rakud moodustavad ligikaudu 5-10% ajuripatsi näärmerakkudest. Nende põhiline ülesanne ongi vastavate hormoonide tootmine (Prendergast jt., 2008). Gonadotroopseid hormoone sünteesitakse ja pannakse subühikutest kokku endoplasmaatilises retiikulumis. Valgu töötlemine ehk posttranslatsiooniline modifikatsioon, sealhulgas suhkruahelate lisamine, toimub enne endoplasmaatilisest retiikulumist väljumist. Peale sünteesi ja töötlemist hoitakse hormoone rakus vesiikulites – LH ja FSH kumbki eraldi (Moyle ja Campbell, 1996). Mõlemat hormooni eritatakse ka sama vabastajahormooni – GnRH ehk gonadotropiinide vabastajahormooni (*gonadotropin releasing hormone*) mõjul, mida toodetakse hüpotaalamuses (Schally jt., 1971). LH ja FSH hormoonid on osa hüpotaalamus-hüpofüüs-gonadide (HPG ehk *hypothalamus-pituitary-gonadal axis*) teljest

(joonis 2). Selle abil kontrollitakse inimese sugurakkude ning suguhormoonide tootmist suguküpses eas.



Joonis 2. HPG ehk hüpotaalamus-hüpofüüs-gonaadide telg, hormonaalne signaalrada. Hormonaalne regulatsioon mehel (vasakul) ja naisel (paremal). Joonisel on näidatud negatiivne tagasiside miinusega, positiivne plussiga (Grigorova, 2011).

Follitropiini või lutropiini sünteesitakse sõltuvalt GnRH hulgast ning mõjuperioodi pikkusest, ning ka teiste hormoonide tagasisidest. Üldiselt põhjustavad madala sagedusega GnRH pulsid (intervalliga üle 2 h) FSH vabastamist, kõrge sagedusega GnRH pulsid aga LH vabastamist (60 minutiste intervallidega maksimaalset) (Lim jt., 2009). GnRH suur kogus põhjustab suure hulga LH vabastamise, mis toob naistel esile ovulatsiooni. Meeste puhul on GnRH pulsid ühtlased, naiste puhul aga muutuvad vastavalt menstruaaltsükli faasidele (Bliss jt., 2010). hCG-d toodetakse vähesel määral ka ajuripatsi gonadotroopsetes rakkudes. Ajuripatsis sünteesitud hCG mõju arvatakse olevat sama mis LH (Cole ja Butler, 2010). LH poolt indutseeritud suguhormoonide – testosterooni ja östrogeeni, toimel inhibeeritakse GnRH ning väiksemal määral ka LH sünteesi. Selline negatiivne tagasiside põhjustabki GnRH hormooni eritumist nn pulssidena. Kõrge östrogeeni tase aga toimib hoopis positiivse tagasisidena, suurendades LH sünteesi enne ovulatsiooni (Bliss jt., 2010). Peale GnRH osalevad FSH sünteesi regulatsioonis veel hormoonid inhibiin, aktiviin ja follistatiin. Nendest kolmest hormoonist inhibiini toodetakse gonaadides. Aktiviin suurendab FSH sünteesi ning GnRH

sekretsiooni ja selle retseptori sünteesi. Follistatiin ning inhibiin vähendavad aktiivse mõju – follistatiin otseses interaktsioonis aktiivsega, inhibiin konkureerides seondumisel retseptoriga (Gregory ja Kaiser, 2004).

Inimese varases embrüonaalses arengus osalevad kaks testikulaarset hormooni – anti-Mülleri hormoon ja testosteroon. Anti-Mülleri hormoon takistab naissuguorganite arenemist meesorganismis. Meessuguorganite areng sõltub testosteroonist, mida sünteesitakse hCG mõjul – munandites on juba embrüonaalses arengus gonadotropiinide retseptorid. Naissuguorganite areng on gonadotropiinidest sõltumatu ning looteas puuduvad munasarjadel gonadotropiinide retseptorid (Themmen ja Huhtaniemi, 2000). Peale sünni sekreteeritakse lühikese aja jooksul palju gonadotropiine. Selle perioodi järel on gonadotropiinide süntees väga madal kuni puberteedieani. Puberteedi ajal käivitub HPG telg, põhjustades suguhormoonide tootmist, seksuaalse arengu jätkumist ning suguküpsuse saabumist (Themmen ja Huhtaniemi, 2000).

4.1.4 Glükoproteiinsete hormoonide seondumine retseptoriga

Hormoonid avaldavad rakule mõju kinnitumisel oma retseptorile. Glükoproteiinsete hormoonide seondumisel nende retseptoritega on olulised nii alfa- kui beeta-alaiühik, kuid spetsiifilise retseptori seondumiseks määrab ära hormoonide unikaalne beeta-alaiühik. Monomeersed või beeta-alaiühiku homodimeersed hormoonide vormid ei suuda retseptoriga seonduda (Jiang jt., 2014). FSH ja TSH seonduvad vastavalt FSH retseptoriga (FSHR) ning TSH retseptoriga (TSHR). Luteiniseeriva hormooni ning kooriongonadotropiini retseptor (LHCGR) on üks ja sama – hormoonide suure sarnasuse tõttu suudavad retseptorile kinnituda mõlemad. (Themmen ja Huhtaniemi, 2000). Kuigi LH ja hCG retseptor on sama, ei mõju hormoonid retseptorile samamoodi. On leitud, et LH mõju rakule on kiirem (saabub 10 minuti jooksul vs 1 tund hCG puhul), samal ajal kui hCG põhjustab ligi 5 korda rohkema tsüklilise AMP tootmise. Samal ajal on lutropiiniga stimuleeritud rakkudes aktiivsemad ERK (*extracellular signal-regulated kinases* ehk rakuvälise signaali poolt reguleeritud kinaasid) ning AKT (ehk proteiinkinaas B) signaalrajad (Casarini jt., 2012). LH ja hCG seondumist retseptoriga mõjutavad ka retseptori erinevad variandid. Ka LHCGR valgus on erinevaid glükosülatsioonikohti, ning *LHCGR*-geeni transkript läbib alternatiivse splaissimise, mille tulemuseks on suur hulk isovorme. Erinevad isovormid seovad ning reageerivad LH ja hCG hormoonidele erinevalt (Choi ja Smits, 2014). Lisaks moodustavad glükoproteiinsete hormoonide retseptorid oligomeere, mis mõjutavad retseptori käitumist (Jiang jt., 2014).

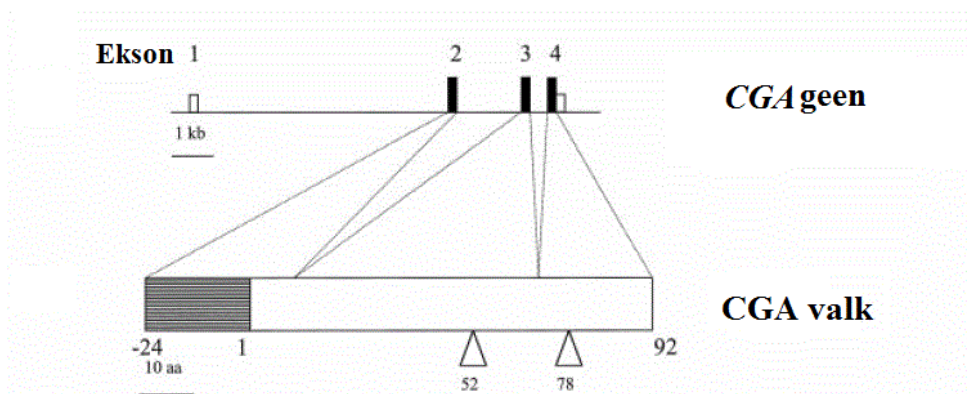
Glükoproteiinsete hormoonide retseptoriteks on G-valguga seotud retseptorid (*G protein coupled receptors*). G-valguga seotud retseptorid koosnevad seitsmest membraani läbivast alfa-heeliksist, mille struktuur on retseptoritel sarnane. Membraani välimisel küljel, retseptorivalgu N-terminaalses osas, on retseptori hormoonspetsiifiline osa, mis vastutab õige signaalmolekuliga seondumise eest. Membraani sisemisel küljel on retseptoriga seotud trimeerne G-valk ehk GTPaas. Retseptori ja seeläbi G-valgu konformatsiooni muutumisel eraldub kompleksist valgu alfa-subühik ning aktiveerib adenülaadi tsüklaasi, mis tekitab tsüklilise AMP. Tsükliline AMP aktiveerib proteiinkinaasi, mille läbi aktiveeritakse rakus vajalik valk või ensüüm (Jiang jt., 2014).

4.1.5 Luteiniseeriva hormooni alaühikuid kodeerivad geenid

Luteiniseerivat hormooni, follitropiini ja türotropiini leidub kõigis selgroogsetes, nende alaühikuid kodeerivad geenid on kõrgelt konserveerunud kuni luukaladeni välja. Kooriongonadotropiini leidub aga vaid primaatidel (selts *Primates*), hobuste perekonnas (perekond *Equus*) ja inimestel (*Homo Sapiens*) (Moyle ja Campbell, 1996). Hobuste perekonnas on LH-beeta ja kooriongonadotropiin-beeta aminohappelised järjestused samad ning transkribeeritud sama geeni poolt (Sherman jt., 1992). Uue maailma ahvidel (*new world monkeys* ehk primaatidel taksonist *Platyrrhini*) on LH beeta-alaühiku geen mittetranskribeeritav (pseudogeen) ning LH ja CG tootmine toimub ühe *CGB*-geenivariandi pealt. Vana maailma ahvidel (*old world monkeys* ehk primaatidel taksonist *Cercopithecidae*) toodetakse kooriongonadotropiini beeta-alaühikut aga eraldi geenide transkriptsioonist, sealjuures geenikoopiate arv on varieeruv (inimesel 4 *CGB* geeni millest 2 pseudogeenid, gorilladel ~50) (Nagirnaja jt., 2010).

4.1.5.1 Inimese glükoproteiinsete hormoonide alfa-alaühikut kodeeriv geen

Inimese luteiniseeriva hormooni alfa-alaühik on kodeeritud ühe geeniga, glükoproteiinsete hormoonide alfa-polüpeptiidi geeniga (*CGA*), mis asub 6. kromosoomi pikemas õlas (6q12-q21) ja on 9,4 kb (kilo-aluspaari) pikk. Geenil on kaks teadaolevat transkribeeritavat isovormi, millest üks sisaldab viite, teine nelja eksonit. Geeni ja valgu struktuur on näidatud joonisel 3. Geen on kõrgelt konserveerunud: teadaolevalt 150 organismil on inimese *CGA* geeni ortoloogid (NCBI Gene, 2015).



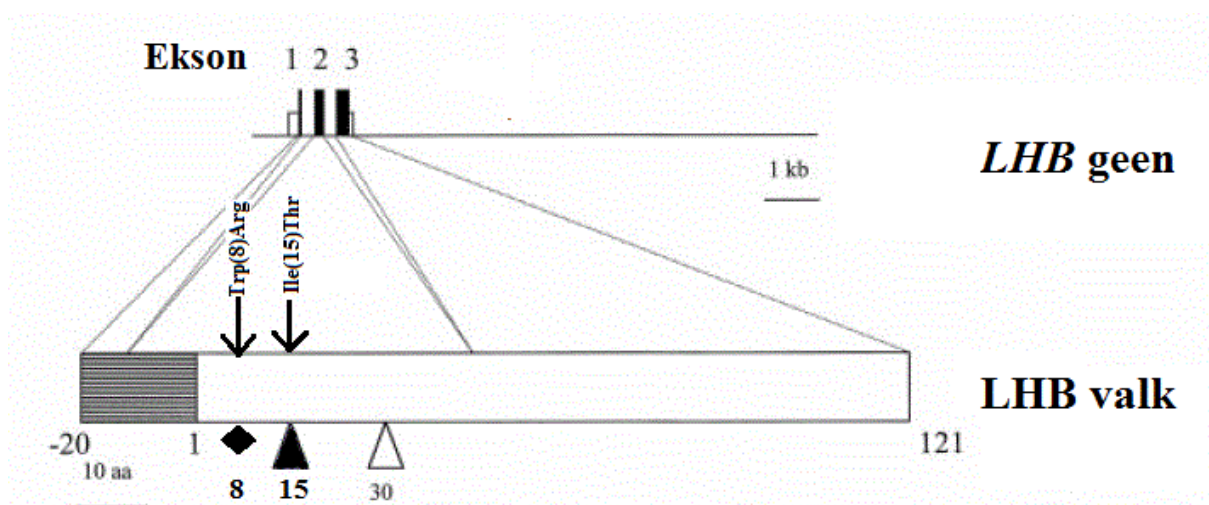
Joonis 3. Glükoproteiinsete hormoonide alfa-alaühiku geeni ja valgu struktuur. Eksonid on märgitud geeni joonisel kastikestena, valgulist järjestust kodeerivad eksonid on värvitud seest tumedaks. Valgu joonisel on toodud välja valmis hormooni esimene aminohape numbriga 1 ning kolmnurkadega ja aminohapete järgi nummerdatult on tähistatud N-glükosüleerimiskohad. Hall ala tähistab signaalpeptiidi, mis valgu töötlemisel eemaldatakse ning küpses valgus puudub. Geeni ja valgu joonise all on näidatud ka mõõtkava – tähistatud on 1 kb ehk kilo-aluspaar ning 10 aa ehk aminohapet (muudetud Themmen ja Huhtaniemi, 2000).

Inimesel on seni teadaolevalt vaid üks alfa-alaühiku valgulist järjestust mõjutav geenivariant. Tegemist on mutatsiooniga, mis leiti vähirakkudest ning põhjustab asenduse Glu->Ala valmis valgu 56 positsioonis. Sellise asendusega alfa-alaühik ei moodustunud beeta-alaühikuga dimeere ning valgu molekulmass oli metsiktüüpi valgu omast märgatavalt suurem (Nishimura jt., 1986). Lisaks valgulist järjestust mõjutavatele variantidele on leitud mitmeid sünonüümseid asendusi (asendusi geenijärjestuses, mis põhjustavad sama valgulise järjestuse kodeerimist), mis on patogeensed (NCBI ClinVar, 2015). Arvatavasti ei esine rohkem geenivariante, kuna alfa-alaühik osaleb ka hCG moodustamises, millel on oluline roll juba loote implantatsioonis. Mittefunktsionaalne alfa-alaühik viiks tõenäoliselt selleni, et rasedumist ei toimu või rasedus katkeb.

4.1.5.2 Inimese luteiniseeriva hormooni beeta-alaühikut kodeeriv geen

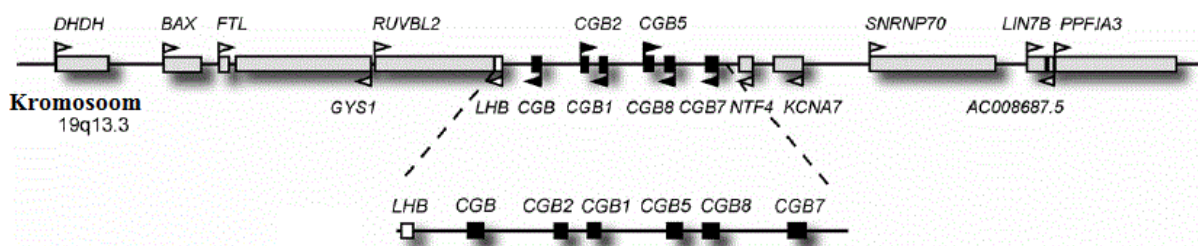
Inimese luteiniseeriva hormooni beeta-alaühikut kodeerib samuti üks geen (*LHB* geen), mis asub 19. kromosoomi pikemas õlas (19q13.32) ja on 1111 aluspaari pikk ning kodeerib 121 aminohappelist järjestust (joonis 4). Geen koosneb 3 eksonist ning alternatiivseid splaiss-orme pole (Nagirnaja jt., 2010). Arvatakse, et LH-beeta geen on tekkinud *FSHB*-st duplitseerumise teel. Sellele viitavad geenide samasse perekonda kuuluvad naaber geenid

KCNA4 ja *KCNA7*, geenide ja valkude suur sarnasus, ning valgu sama alfa-alaühikuga seondumine (Nagirnaja jt., 2010).



Joonis 4. LH beeta-alaühiku geeni ning kodeeritava valgu struktuur. Eksonid on märgitud geeni joonisel kastikestena, valgulist järjestust kodeerivad eksonid on värvitud seest tumedaks. Valgu joonisel on toodud välja valmis hormooni esimene aminohape numbriga 1 ning kolmnurkadega ja aminohapete järgi nummerdatult on tähistatud N-glükosüleerimiskohad. Valgu joonisel on toodud välja ka variantse vormi aminohappeliste asenduste kohad, mis on toodud värvitud rombiga ning kolmnurgaga (viieteistkümnendas positsioonis on vaid V-LH puhul suhkruahel). Hall ala tähistab signaalpeptiidi, mis valgu töötlemisel eemaldatakse ning küpses valgus puudub. Joonise vasakus servas on näidatud mõõtkava: tähistatud on 1 kb ehk kilo-aluspaar ning 10 aa ehk aminohapet (muudetud Themmen ja Huhtaniemi, 2000).

LHB asub klastris nelja hCG hormooni beeta-alaühikut kodeeriva geeniga (*CGB*, *CGB5*, *CGB8* ja *CGB7*) ning kahe sarnase koopiaga (*CGB1* ja *CGB2*), mille ülesannet seni ei teata (joonis 5) (Policastro jt., 1986; Nagirnaja jt., 2010). Klastril on kõrge G/C nukleotiidide osakaal – 57% võrreldes inimese genoomi keskmise, 41%-ga. Samuti on piirkonnal kõrge *Alu*-korduste hulk - 23,2% võrreldes keskmise 13,1%-ga (Nagirnaja jt., 2010).



Joonis 5. LH-hCG geeniklaster inimesel. Nooltega on näidatud iga geeni transkribeerimissuunda (muudetud Nagirnaja jt., 2010).

Alu-kordused on primaatidel „*copy-paste*“ meetodil levinud korduselemendid. Need elemendid võivad genoomis põhjustada ümberkorraldusi. Arvatavasti toimub *Alu*-rikastes piirkondades *Alu*-elementide vahel rekombinatsioon, mis suurendab piirkonna geneetilist varieeruvust ning aitab kaasa duplitseerumisele (Bailey ja Eichler, 2003). Kooskõlas *Alu*-korduste rikkusega on piirkonna geenide kõrge varieeruvus. *LHB* geeni puhul on see 12,6 SNP/kb, teiste klastrisse kuuluvate geenide puhul 6,7-15,6 SNP/kb (Hallast jt., 2005).

LHB sarnasus klastrisse kuuluvate hCG hormooni beeta-alaühikut kodeerivate geenidega on 92%-93%, hCG-beetat kodeerivate geenide omavaheline sarnasus 97%-99% ning sarnasus *CGB1* ja *CGB2*-ga on 85%. Suur sarnasus näitab, et geenidel on tõenäoliselt ühine päritolu – hCG-beeta geenid võisid tekkida *LHB*-st duplitseerumise tulemusel (Hallast jt., 2005). Hormoonide erineva ekspressiooni ja bioloogilise rolli erinevused tulenevad promootorpiirkonnast (Henke ja Gromoll, 2008). Väga sarnase järjestusega piirkondades toimub sage geenikonversioon. Geenikonversioon on protsess, mille käigus DNA-järjestus doonorsaidis asendab järjestuse aktseptorsaidis, mille tulemusena doonorsaidi järjestus jääb samaks, kuid aktseptorsaidi järjestus muutub. *LHB/CGB* piirkonnast on leitud polümorfisme võrreldes kokku 27 geenikonversiooni saiti, millest kahe puhul oli aktseptorsaidiks *LHB* geen (Hallast jt., 2005).

4.1.6 Inimese luteiniseeriva hormooni beeta-alaühiku geneetilised variandid

Kuigi *LHB* puhul on täheldatud palju SNV-sid (1499 seisuga 25.05.2015)(Ensemblr 2015), mõjutavad vähesed neist valgu aminohappelist järjestust. Muudatusi, mida esineb väga harva ning mille tõttu kaob valgu bioaktiivsus, ei vaadelda geneetiliste variantidena vaid mutatsioonidena ning need põhjustavad üldiselt viljatust. Selliseid mutatsioone on *LHB* geenist leitud 3 ning lisaks on leitud 3 ühenukleotiidilist muudatust, mis muudavad valgu aminohappelist järjestust, kuid mille mõju pole teada. Veel on leitud 2 geneetilist varianti lisaks metsiktüüpi hormoonile (Nagirnaja jt., 2010).

Asendus geeni kolmandas eksonis, 961 positsioonis, G nukleotiidi asemel A, põhjustab glütsiini asendumise seriiniga valmis valgu 102. positsioonis. Selline asendus põhjustab teadaolevalt menstruaaltsüklihäireid naistel ning viljatust meestel (Ramanujam jt., 1999; Ramanujam jt., 2000). Sellise muutusega LH puhul on näidatud väiksemat seondumisvõimet retseptoriga ning madalamat progesterooni sünteesi (Liao jt., 2002). See minoorne alleel on madala sagedusega, ülemaailmselt 0,1%. Alleel on populatsioonispetsiifiline, paljude rahvaste seas ei esine seda üldse. Seda on leitud Vietnamis (0,51%), Hiinas (0,48%-0,97% erinevate

rahvaste seas) ja Egiptuses (15,7%) (Hashad jt., 2012; The 1000 Genomes Project Consortium, 2012).

Asendused geeni teises eksonis, positsioonis 443 T nukleotiidi asemel C (rs1800447) ja positsioonis 465 samuti T nukleotiidi asemel C (rs34349826), ehk vastavalt trüptofaani asendumine arginiiniga 8. positsioonis ja isoleutsiini asendumine treoniiniga 15. positsioonis valmis valgusjärjestuses, esinevad seni teadaolevalt alati koos (Nilsson jt., 1998; Punab jt., 2015). Lisaks on selliste asendustega alleelselt aheldatud 8 ühenukleotiidilist muudatust geeni promootorpiirkonnas, mis põhjustab geeni kuni 40% suuremat ekspressiooni (Jiang jt., 1999). Selliste asenduste kombinatsioonile vaadatakse antud töös edaspidi kui V-LHd ehk variantset luteiniseerivat hormooni. Arvatavasti on nende koosinemine põhjustatud geenikonversiooni poolt mõne CGB kodeeriva geeniga, sest kõigil *CGB* geenidel on selles piirkonnas samad nukleotiidid (Hallast jt., 2005). V-LH alleeli sagedus erineb populatsiooniti suurelt. Euroopas on see keskmiselt 8%, kuid ülemaailmselt jääb vahemikku 0% (Kotas Lõuna-Indias) kuni 28,3% (Austraalia aborigeenidel, alleeli kandjaid 53,5%) (Huhtaniemi jt., 2010; Nilsson jt., 1998).

Asendus Trp8Arg tõttu on V-LH osade immunoloogilise määramise vahenditega tuvastamatu (Suganuma jt., 1996). Selline anomaalia andis aluse V-LH avastamiseks (Pettersson jt., 1992; Furui jt., 1994). Seda kasutatakse ühe levinuima meetodina V-LH tuvastamiseks, kus võrdluseks on V-LH-d tuvastav immunoloogilise määramise test (Nilsson jt., 1997; Nilsson jt., 1998). Teised kasutatud meetodi V-LH tuvastamiseks on sekveneerimine ning PCR-RFLP (Elter jt., 1999; Ramanujam jt., 2000; Lee jt., 2003; Berger jt., 2005; Du jt., 2012). Asendus Ile15Thr on analoogselt kooriongonadotropiini valgusamale paigale N-glükosüleerimiskoht, mille kaudu valguga seondub võrreldes metsiktüüpi hormooniga üks suhkruahel rohkem (Suganuma jt., 1996). Et suhkruahelatel on otsene mõju valguspoolestusajale (vt peatükk 3.1.2), on tõenäoliselt ka V-LH poolestusaeg erinev metsiktüüpi LH-st. Seni avaldatud andmed on selles osas aga vastuolulised – kolme uurimuse puhul on näidatud, et see on lühem (Haavisto jt., 1995; Suganuma jt., 1996; Manna jt., 2002), ühe puhul aga, et pikem kui metsiktüüpi variandil, kusjuures V-LH puhul leiti rohkem siaalhappe rühmi (Wide jt., 2010). Võimalik, et mõõtmistulemuste erinevused sõltuvad mõõtmismeetodist. Osade uurimuste puhul on täheldatud, et metsiktüüpi ning V-LH seondumine mõõtmiseks kasutatavate antikehadega on erinev, mistõttu võib V-LH kontsentratsiooni mõõtmisviga olla suurem (Elter jt., 1999).

4.1.6.2 V-LH mõju inimese fenotüübile

V-LH lisandunud suhkruahel omab tõenäoliselt mõju hormooni seondumisele retseptoriga. On näidatud, et V-LH põhjustab suuremat tsükklilise AMP ning progesterooni tootmist, mis on kooskõlas tema sarnasusega hCG'le. Samuti põhjustas V-LH 1,8 korda rohkemat inositol-trifosfaadi tootmist kui metsiktüüpi hormoon (Manna jt., 2002; Casarini jt., 2012). Tõenäoliselt mõjutab variantse hormooni toimimist ka selle suurem tootmine ning erinev poolestusaeg, mille tõttu võib hormooni kontsentratsioon veres erineda metsiktüüpi hormooni omast. Seni on erinevad uuringud näidanud, et V-LH puhul on naistel ja noortel meestel hormooni kontsentratsioon veres suurem, kesk- ja vanemaealistel meestel aga väiksem kui metsiktüüpi hormooni puhul (Du jt., 2012; Huhtaniemi jt., 2010; Punab jt., 2015).

Naiste puhul on leitud seoseid V-LH esinemise ning vähenenud viljakusega (subfertiilsusega), mis on tingitud erinevatest ovulatoorsetest häiretest (Furui jt., 1994; Takahashi jt., 1998; Takahashi jt., 1999; Du jt., 2012). V-LH puhul täheldati kõrgemat testosterooni, östradioli ja suguhormoone siduva globuliini taset (Rajkhowa jt., 1995). On leitud ka, et V-LH kandjate seas on kunstlikul viljastamisel väiksem tundlikkus välisele FSH hormooni annustamisele (Alviggi jt., 2013).

Meeste puhul on leitud, et V-LH on riskifaktoriks munandivähile ning munandite laskumatajäämisele ehk krüptorhismile (Elkins jt., 2003; Kaleva jt., 2005). On leitud ka, et V-LH kandjatel on puberteedi kulg suguküpsuseni aeglasem ning aeglasem kasv, nad olid lühemad ning neil oli väiksem munandimaht (Raivio jt., 1996).

Lisaks on uuritud V-LH seost polütsüstiliste munasarjade sündroomiga, menstruaalhäiretega, endometrioosiga, subfertiilsusega ning meeste puhul meeste eunuhhi sündroomiga ja viljatusega, kuid seost pole leitud (Rajkhowa jt., 1995; Elter jt., 1999; Tapanainen jt., 1999; Ramanujam jt., 2000; Ramanujam jt., 1999; Gazvani jt., 2002; Shiraishi ja Naito, 2003; Lee jt., 2003).

4.5 Ühenukleotiidiliste variantide genotüpiseerimine

Inimese genoomis esineb erinevaid geneetilisi variante, mida on seostatud fenotüübiga, aga oma töös keskendun teadaolevate ühenukleotiidsete geneetiliste variantide (SNV-de ehk *single nucleotide variant*) hüpoteesipõhiste genotüpiseerimise meetoditele. Käsitletud ei ole kõiki meetodeid, vaid levinumaid.

4.5.1 DNA mikrokiibid

DNA mikrokiibid (*microarrays*) põhinevad hübriidsatsioonil. DNA või RNA paardub kiibil olevate üheaahelaliste lõikudega, kui selle järjestus vastab kiibi järjestusele. Kiibil on enamasti nii metsiktüüpi kui variantne DNA, ning vaadeldes milliseiga seondumine toimus, saadakse teada kumba alleeli indiviid kandis. Ühe kiibi peal on tavaliselt tuhandeid kuni miljoneid DNA lõike, nii et korraga on võimalik vaadata suurt hulka erinevaid SNV-sid (Steemers ja Gunderson, 2005).

4.5.2 *TaqMan*'i meetod

TaqMan'i meetod SNV-de genotüpiseerimiseks on reaalaaja polümeraasahelreaktsioon (PCR ehk *polymerase chain reaction*). Meetod põhineb *Taq* polümeraasi ensüümi 5'-3' eksonukleaaassel aktiivsusel. Praimerid on 5' otsast seotud fluorestsentsvärviga ning 3' otsast fluorestsensi kustutajaga. Fluorestsensi kustutaja kaotab fluorestseerumise efekti seni, kuni ta asub fluorestsentsvärvi lähedal. *Taq* polümeraas lagundab praimerit, nii et fluorestsentsvärv eemaldub fluorestsensi kustutajast. Seeläbi on vastavalt fluorestseerumise heledusele võimalik tuvastada PCR-i DNA kogust. SNV-de esinemise korral seondub praimer DNA-ga halvemini kui metsiktüüpi DNA puhul, mille jaoks praimer disainitud on, ning fluorestsents on väiksem kuna *Taq* ensüüm ei lõika vaba praimerit (Shen jt., 2009).

4.5.3 PCR-RFLP

PCR-RFLP ehk polümeraasahelreaktsiooni restriksioonifragmentide pikkuse polümorfism (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*) põhineb PCR käigus amplifitseeritud DNA lõikude lõikamisel restriksiooniensüümidega, mis on spetsiifilised variantse koha suhtes. Ensüüm lõikab seetõttu metsiktüüpi ning variantset alleeli erinevalt, tekitades erineva pikkusega lõike. DNA kantakse agarosgeelile ning jooksutatakse seda elektroforeesvannis, kus lühemad DNA fragmendid liiguvad kiiremini. Geeli on tavaliselt lisatud fluorestsentsvärvi seonduvat ainet, näiteks etiidiumbromiidi, mis fluorestsentsvärvi segatud DNA-proovid helendama paneb. Võrdluseks kasutatakse teadaoleva pikkusega DNA lõike, ning nii saadakse teada, millise pikkusega fragmendid

antud DNA proovis tekkisid, ehk millis(t)e alleeli(de) kandja antud indiviid oli (Chang jt., 2010). Seda meetodit on kasutatud ka antud töös.

4.5.4 Alleelispetsiifiline PCR

Meetod põhineb praimerite kasutamisel, mille 3' otsas on sellised nukleotiidid, mis teise alleeliga ei paardu ning seetõttu amplifitseerivad vaid ühe alleeli DNA-d. Kokku kasutatakse kolme praimerit, millest kaks on alleelispetsiifilised ning üks ühine. Eristamiseks erinevate praimeritega amplifitseeritud DNA lõike, disainitakse praimerid nii, et ühe puhul oleks PCR produkt märgatavalt pikem. Produkti pikkust on võimalik tuvastada elektroforeesvannis geelil ülalkirjeldatud meetodil (Birdsell jt., 2012).

5. Eksperimentaalosa

5.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli uurida:

1. Kas V-LH kandjate seas on suurem risk viljatuse esinemiseks, võrreldes V-LH esinemissagedust kohortvalimis ning viljatute meeste valimis.
2. V-LH alleeli seost LH tasemega, võrreldes V-LH kandjate ning mittekanjate hormooni taset veres.

Eesmärkide saavutamiseks kasutati PCR-RFLP meetodit. Selleks amplifitseeriti PCR abil *LHB*-geenilõik, mis sisaldab kahte V-LHd määravat polümorfisimi, ning leiti restriksiooni abil uuritavate indiviidide genotüüp SNP rs1800447 ja rs34349826 suhtes.

Töö autor viis läbi PCR-RFLP reaktsioonid ning analüüsis leitud genotüüpide seoseid fenotüübiga. Antud töö on osa avaldatud artiklist (Punab jt., 2015).

5.2 Materjal ja metoodika

5.2.1 Valim

Uurimise läbiviimiseks kasutati:

- 1) Eesti Androloogiakeskuse poolt kogutud kohortvalimit Eesti noortest meestest (keskmine vanus 19,2 a), 502 indiviidi.
- 2) Valimit idiopaatilise (teadmata põhjusega) viljatuse, madala või madalapoolse normaalse testosterooni tasemega <15 nmol/L (normaalne testosterooni tase on vahemikus 12-40 nmol/L) ning oligozoospermiaga (spermide arv <20 miljonit/ml) meestest, 152 indiviidi (Nieschlag jt., 2010).

Idiopaatilise viljatusega mehi uuriti järgmiste diagnooside suhtes, mille avastamisel mehed valimist välja jäeti: obstruktiivne azoospermia, krüptorhism, kromosomaalsed ümberkorraldused, Y-kromosoomi deletsioonid, hüpogonadotroopne hüpogonadism, munandite haigused, seksuaalsed häired, anaboolsete steroidide kuritarvitamine, traumad ning operatsioonid genitaalpiirkonnas, kemo- ja radioteraapia (Punab, 2007).

Kohortvalimist jäeti välja mehed, kellel avastati azoospermia, krüptorhism, anaboolsete steroidide kuritarvitamine või munandite haigused.

Valimite kliiniliste andmete kogumine viidi läbi Eesti Androloogiakeskuse töötajate poolt. Käesoleva töö raames kasutati andmete analüüsiks kogutud andmeid ning genotüüpiseerimiseks verest eraldatud DNA proove. Töö autor viis eraldatud DNA proovidega läbi PCR-RFLP reaktsioonid ning analüüsis tulemuse seost valimi andmetega.

5.2.2 SNPde rs1800447 ja rs34349826 tuvastamine PCR ja restriksiooni abil

Genoomse DNA lahjendused amplifitseeriti touch-down PCR meetodil. Reaktsioonisegu koostis on toodud tabelis 1. Kasutati praimereid artiklist Elter *et al.*, 1999, mille spetsiifilisust kontrolliti programmi NCBI primer-BLAST abil (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Tulemuseks saadi, et alla tuhande aluspaari pikkustest amplifikatsioonilõikudest parim vaste oli *LHB* geenil (lisa 1 on toodud *LHB* geen, kus on markeeritud ka praimerite seondumiskohad, lisa 2 on toodud Primer-BLAST tulemused) (Ye jt., 2012). Praimerid olid järgmised:

vLH_F 5'-GAAGCAGTGTCCCTTGTCCTCA-3'

vLH_R 5'-GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT-3'

Tabel 1. PCR reaktsioonisegu

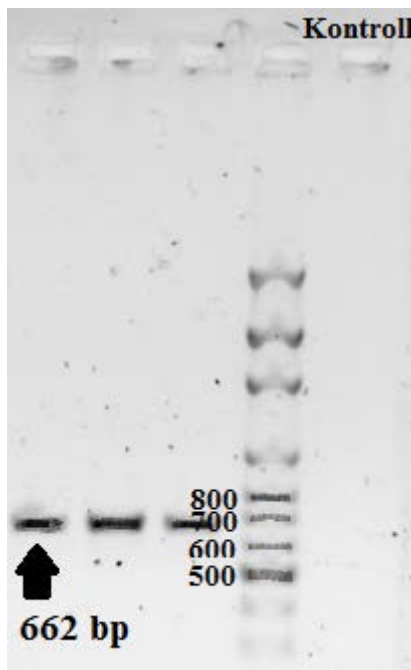
Reagent	Kogus (µl)	Lõppkontsentratsioon
10x Puhver B1	1.25	1x
MgCl ₂	1.25	2.5 mM
dNTP mix (Solis BioDyne Tartu, Eesti)	1.25	0.25 mM
Praimerid vLH-F ja vLH-R (Solis BioDyne Tartu, Eesti)	0.5 + 0.5	0.4 + 0.4 pmol/µl
Ensüüm Solis BioDyne hot start firepol (Tartu, Eesti)	0.05	0.02 U/µl
gDNA	3.5	2.8 ng/µl
ddH ₂ O	4.2	
Kokku:	12.5	

Tabelis 2 on toodud PCR programmi temperatuurid ning kestused. Kasutati *touch-down PCR*, mille puhul iga tsükliga temperatuuri alandati, et praimerite algne seondumine oleks spetsiifilisem ning saada puhtamat produkti.

Tabel 2. PCR programm

	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Algne denaturatsioon	95	15 min	1
	95	45 sek	10
Praimerite seondumine	64 (-1°C igal kordusel)	30 sek	
Ekstensioon	72	1 min	
Denaturatsioon	94	45 sek	25
Praimerite seondumine	54	30 sek	
Ekstensioon	72	1 min	
	72	10 min	1

PCR õnnestumist kontrolliti 1% agarosgeelil, mis oli valmistatud 0,5xTBE puhvri baasil ning millele oli lisatud 7 µl etiidumbromiidi (5mg/ml) 150 milliliitrit lahuse kohta. Võrdluseks kasutati O'GeneRuler 100 bp DNA markerit Thermo Fisher Scientific firmalt, Waltham, USA, 2012. Geeli jookutati elektrofooresvannis, samas puhvris mida geelis kasutati, 40 minutit 125 V juures. Joonisel 6 on toodud näidis PCR geeli pildist, kust võib näha, et saadi õige pikkusega produktid.



Joonis 6. PCR fragmendid geelil. Fragmentide pikkuseks on 662 aluspaari (bp). Parempoolne äärmine rada on kontroll – seal on ilma DNA proovita PCR segu. Paremalt teisel rajal on marker – välja on toodud fragmentidele lähedase pikkusega markerilõikude pikkused.

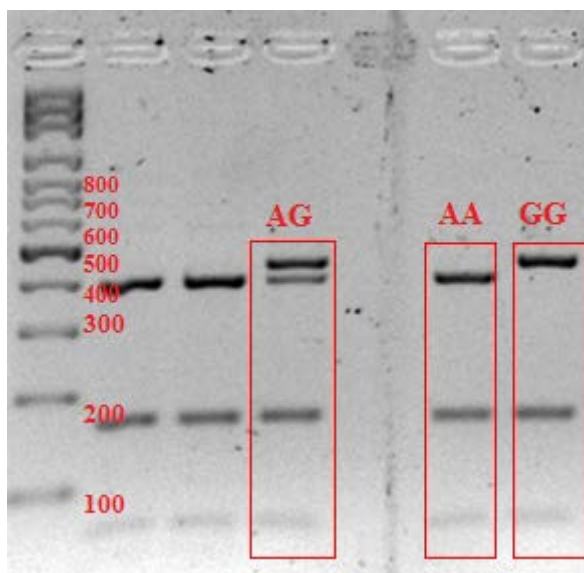
Saadud PCR produktidele viidi läbi restriksioon. Viljatute meeste valimi puhul viidi restriksioon läbi kahe ensüümiga: *NcoI* (tuvastab SNP rs1800447 A>G v-LH Trp28(8)Arg) ja *BseGI* (tuvastab SNP rs34349826 A>G v-LH Thr35(15)Ile) firmalt ThermoScientific, Tartu, Eesti, 2012. Kuna SNP'd on tugevas aheldatuses, kasutati noorte meeste valimis vLH tuvastamiseks vaid *NcoI*. Ensüümide äratundmis- ja lõikekohad on järgnevad:

- *NcoI*
 5'...C↓C A T G G...3'
 3'...G G T A C↑C...5'
- *BseGI* (tuntud ka kui *BtsCI* või *FokI*)
 5'...G G A T G N N↓...3'
 3'...C C T A C↑N N ...5'

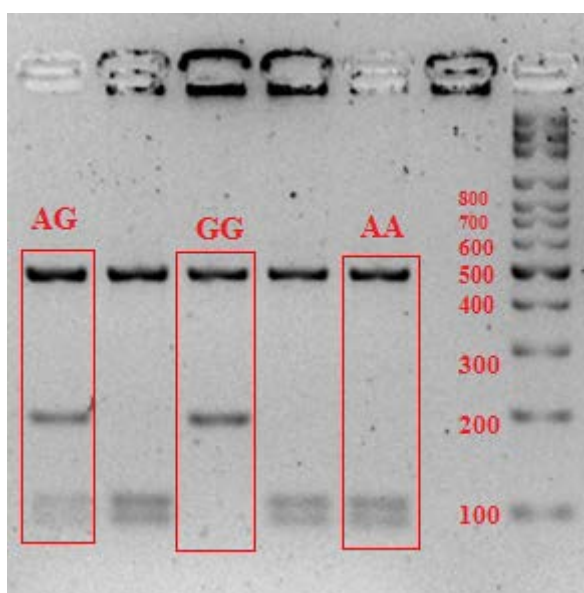
Restriksiooni läbiviimisel võeti 3 µl PCR produkti reaktsiooni kohta, ning 5,5 µl restriksioonisegu. Restriksioonisegu koosnes 4,5 µl ddH₂O, 0,5 µl puhver „Tango“ ning 0,5 µl ensüümi.

Seejärel hoiti ensüüme vastavalt 55°C juures *BseGI* puhul, ning 37°C juures *NcoI* puhul, keskmiselt 12 tundi.

Restriksiooni õnnestumist kontrolliti 3% agarosgeelil, mis oli valmistatud TBE puhvri baasil ning millele oli lisatud 7 µl etiidumbromiidi 150 ml lahuse kohta. Võrdluseks kasutati O'GeneRuler 100bp DNA markerit Thermo Fisher Scientific firmalt, Waltham, USA, 2012. Geeli jookutati elektroforeesvannis, samas puhvris mida geelis kasutati, 90 minutit 100 V juures. Joonistel 7 ja 8 on toodud näidised restriksiooni geelipiltidest.



Joonis 7. Restriksioon ensüümiga *BseGI* (rs34349826). Näha on erinevused restriksioonifragmentide pikkustes: AG genotüübi puhul 45 bp, 64 bp, 165 bp, 394 bp ja 437 bp, AA (metsiktüübi) puhul 45 bp, 64 bp, 165 bp ja 394 bp, GG puhul 64 bp, 165 bp ja 437 bp.



Joonis 8. Restriksioon ensüümiga *NcoI* (rs1800447). Näha on erinevused restriksioonifragmentide pikkustes: AG genotüübi puhul 85 bp, 96 bp, 185 bp ja 473 bp, AA (metsiktüübi) puhul 85 bp, 96 bp ja 473 bp, GG puhul 185 bp ja 473 bp.

5.2.3 Statistiline analüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati programmeerimiskeele „R“ versiooni 3.2.0 (R Core Team, 2012) ning geneetilise statistika programmi „Plink“ versiooni 1.07 (Purcell jt., 2007). Diagrammide joonistamiseks kasutati R paketti „ggplot2“ (Wickham, 2009). Analüüsi valimite genotüüpide jaotust ning genotüüpide seost LH seerumi tasemega. Valimite genotüüpide jaotust võrreldi *Pearsoni* χ^2 testi abil ning *Fisheri* testi abil. Leitud alleelide esinemissagedust testiti *Hardy-Weinbergi* tasakaalu suhtes, mille hälvet hinnati χ^2 testi abil.

Mõlema valimi indiviidide kohta on teada luteiniseeriva hormooni tase veres, kehamassiindeks ning vanus. Noorte meeste kohortivalimi kohta on teada ka vere võtmise kellaeg, sest hormooni kontsentratsioon veres sõltub kellaajast (Grigorova jt., 2011). Lisas 3 on toodud joonised vere võtmise kellaaja, vanuse ning kehamassiindeksi seosest luteiniseeriva hormooni tasemega. Andmed valimite parameetrite kohta on toodud tabelis 3. Alleelide esinemissagedust hinnati kohaldatuna loetletud parameetrite suhtes geneetilise assotsiatsiooni lineaarse regressiooni testiga, eeldades additiivset geneetilist mudelit. Luteiniseeriva hormooni tase veres arvestati testides logaritmitud väärtusena, et saavutada väärtuste normaaljaotus, mida on vaja lineaarse regressiooni testi tulemuse täpsuse jaoks. Tulemuste regressiooni koefitsiendi (β) ja standardvea väärtused on tagasi transformeeritud. Lisas 4 on toodud joonis logaritmitud ja logaritmitamata luteiniseeriva hormooni taseme kohta, kust võib näha, et logaritmitud väärtuste puhul saavutati normaaljaotusele lähedane jaotus. Normaaljaotuse hindamiseks kasutati ka Shapiro-Wilks normaaljaotuse testi, mis näitas et logaritmitamata LH väärtused ei ole normaaljaotuses ($p < 0.001$ mõlemas valimis) ning logaritmitud väärtused on normaaljaotuses ($p = 0.4454$ Eesti viljatute meeste valimis, $p = 0.5844$ Eesti noorte meeste valimis).

Vaatlemaks paremini luteiniseeriva hormooni kontsentratsiooni veres, jaotati indiviidid mõlemas valimis genotüüpide järgi rühmadesse (AA, AG, GG variantide kandjad) ning toodi välja iga rühma puhul hormooni kontsentratsiooni keskmine sisaldus veres, tabelis 4. V-LH kandjate ja mittekanjate vere LH kontsentratsiooni väärtuste jaotuste erinevust võrreldi ka *Kruskal-Wallise* testi abil, kus kasutati logaritmitamata väärtusi, ning mille abil saab hästi võrrelda erineva suurusega grupe. See test ei kasuta kofaktoreid, mistõttu jätab arvestamata muude parameetrite mõju LH tasemele.

Kuna Eesti viljatute meeste valimis oli vaid 2 indiviidi ning valim oli väike, mis mõjutab statistiliste testide tulemusi, rühmitati mõlema valimi individid V-LH kandjateks ja mittekandjateks. Rühmi võrreldi *Mann-Whitney U*-testi abil.

5.4 Tulemused ja arutelu

5.4.1 V-LH alleeli sagedus ei erine Eesti noorte meeste kohorti ja Eesti viljatute patsientide vahel

Genotüüpiseerimise tulemusena saadud genotüüpide ja alleelide sagedused olid mõlemas valimis sarnased (tabel 3). Tõestamaks, et sagedused ei erine märgatavalt vaadeldavates valimites, viidi läbi traditsiooniline *Pearsoni* χ^2 test kahe valimi genotüüpide võrdluseks, võttes null-hüpootesiks Eesti noorte meeste jaotuse ning võrreldes viljatute meeste jaotust selle vastu. χ^2 test andis kinnitust jaotuste sarnasusest ($\chi^2=2.55$ ja $p=0.28$). Viidi läbi ka *Fisher*i test (*Fisher's exact test*), mille nullhüpootesiks oli, et jaotused on samad. Testi tulemus näitab, et jaotused on samad (tabel 3).

Mõlema valimi kohta tehti *Hardy-Weinbergi* test (tabel 3). Kui tavaliseks olulisusnivooks võetakse 0.05, võib lugeda Eesti noorte meeste valimis väärtus piiripealseks. Viljatute meeste valimi puhul oli tulemus *Hardy-Weinbergi* järgi tasakaalus, kuid märgatavalt erinevat p-väärtust võib seletada valimite suuruse erinevusega.

Tabel 3. Valimite karakteristikud

	Eesti noored mehed, n=502		Viljatud mehed, n=152		<i>Fisher</i> i testi p-väärtus, võrreldes valimeid omavahel:
	Keskmine \pm standardhälve	Mediaan (5-95)	Keskmine \pm standardhälve	Mediaan (5-95)	
vanus (aastates)	19.2 \pm 1.8	18.6 (17.2–22.8)	32.8 \pm 5.9	32.7 (24.8–43.6)	
Kehamassi indeks (kg/m ²)	22.3 \pm 2.7	22.0 (18.7–27.5)	28.3 \pm 5.2	28.0 (21.0–36.0)	
vere võtmise kellaeg	10:40 \pm 1:29	10:30 (8:30–13:07)			
AA	0.80 (401)		0.82 (126)		0.86
AG	0.18 (91)		0.17 (26)		
GG	0.02 (10)		0.01 (2)		
A	0.89 (893)		0.90 (278)		0.60
G	0.11 (111)		0.10 (30)		
<i>Hardy-Weinbergi</i> p-väärtus	0.0795		0.6213		

5.4.2 V-LH kandjatel on keskmine luteiniseeriva hormooni kontsentratsioon veres kõrgem

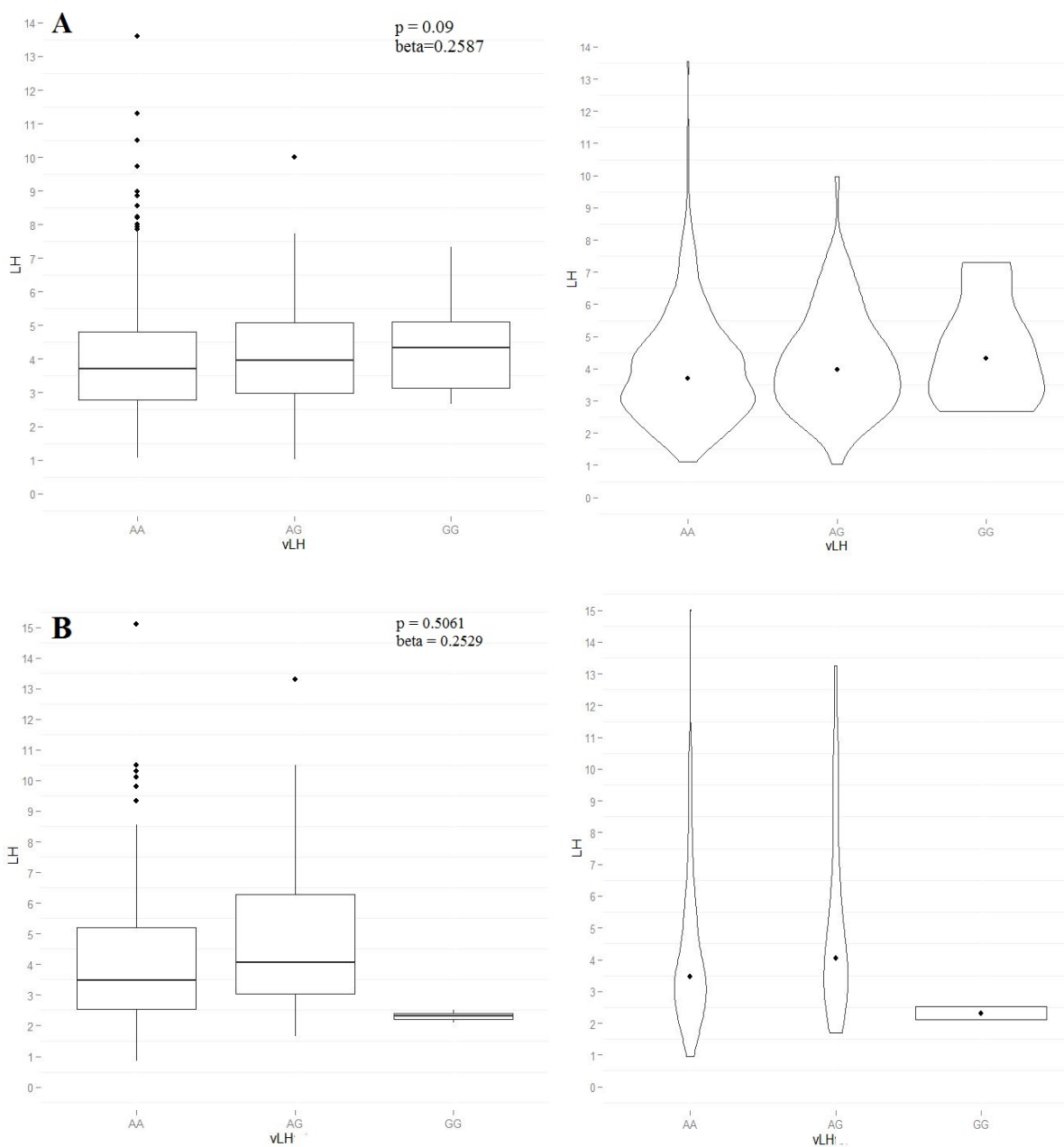
Vaadeldi ka seost V-LH ja seerumi LH taseme vahel (tabel 4). Ülejäänud tulemuste tendentsist erineb märgatavalt vaid Eesti viljatute meeste valimi GG genotüübiga indiviidide rühm, kuid selles rühmas oli ka vaid 2 indiviidi.

Tabel 4. Luteiniseeriva hormooni kontsentratsioonid veres noorte meeste valimi ning viljatute meeste valimi erinevate genotüüpide puhul.

Genotüüp rs1800447	Eesti noored mehed keskmine ± standardhälve Mediaan (5-95)(IU/l)	Viljatud mehed keskmine ± standardhälve Mediaan (5-95)(IU/l)
AA	4.00±1.71	4.14±2.34
	3.70 (1.80–7.21)	3.50 (1.56–9.15)
AG	4.21±1.59	5.10±3.00
	3.96 (2.20–7.07)	4.06 (2.06–10.45)
GG	4.53±1.63	2.31±0.30
	4.33 (2.83–7.15)	2.31 (2.12–2.50)

LH taseme ja genotüüpide võrdluses *Kruskal-Wallis* testis võeti null-hüpooteesiks, et AA, AG ja GG alleelide kandjate LH taseme jaotus on sama. *Kruskal-Wallis* testi puhul saadi Eesti noorte meeste valimis p-väärtuseks 0.1855 ja Eesti viljatute meeste valimis 0.08354. Antud testi tulemust Eesti viljatute meeste valimis võib lugeda piiripealseks.

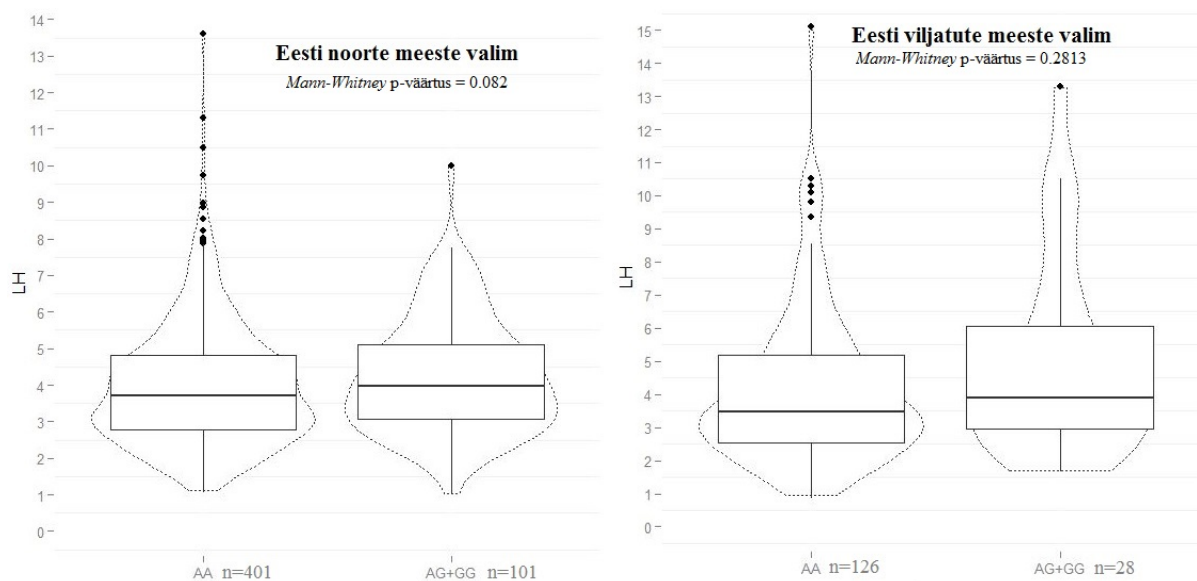
Mõlema valimi genotüüpide ning luteiniseeriva hormooni kontsentratsiooni sisalduse veres võrdluseks joonistati ka graafikud karpdiagramm (*boxplot*) ning viiuldiagramm (*violin plot*), mis on toodud joonisel 9. Karpdiagrammilt võib näha, et vLH alleelide arvu suurenedes kasvab rühma LH taseme mediaan (jättes välja viljatute meeste valimi GG kandjate rühma, kus oli vaid 2 indiviidi). Viiuldiagramm toob esile LH taseme jaotuse rühmades – on näha et viljatutel meestel on see oluliselt ebahühtlasem.



Joonis 9. Noorte meeste valimi (A) ning viljatute meeste valimi (B) LH väärtuste kohta (y-teljel). Kõigil graafikutel on valimid jaotatud kolme rühma vastavalt vLH genotüübile, rühm on toodud x-teljel. Joonisel on välja toodud ka lineaarse regressiooni testi P- ja beeta-koefitsiendi väärtused. Viiuldiagrammi joonisele on lisatud mediaanväärtus punktina.

Et saada teada V-LH alleeli efekt LH tasemele, viidi läbi programmi „*Plink*“ additiivse mudeliga lineaarse regressiooni test. Tulemused noorte meeste valimis olid $P=0.09$, tagasitransformeeritult β koefitsient (mõju suurus)=0.2587 IU/L ja standardviga= 0.1486. Viljatute meeste valimis olid väärtused $P=0.5061$ ning tagasitransformeeritult β koefitsient (mõju suurus)=0,2529 IU/L ja standardviga=0.3858.

Et vähendada minoorse alleeli heterosügootide rühma väiksuse mõju tulemuste analüüsile, jagati mõlemad valimid kahte rühma: a) vLH kandjad b) vLH mitte kandjad (joonis 10). Nende rühmade võrdluses tehti valimitele mitteparameetiline *Mann-Whitney U*-test, kus võrreldi valimi rühmade LH taset veres. Noorte meeste valimi puhul saadi p-väärtuseks 0.0802, viljatute meeste valimi puhul oli p-väärtus 0.2813. Noorte meeste puhul on tegu piiripealse tulemusega, millest võib järeldada, et vLH geenil võib olla mõju meeste LH tasemele.



Joonis 10. Luteiniseeriva hormooni tase grupeerides valimid kahte rühma V-LH kandjastaatuse järgi.

5.4.3 Arutelu

Antud töös võrreldi V-LH sagedust Eesti noorte meeste kohortivalimis ning Eesti idiopaatilise viljatusega meeste valimis, samuti uuriti seost seerumi LH tasemega. Valimite genotüpiseerimise meetodiks valiti *PCR-RFLP*, kuna see meetod tagab vajaliku täpsuse (praimerite ja restriksiooniensüümide valiku läbi), mis on oluline *LHB* geeni sarnasuse tõttu *CGB* geenidega. Alternatiivset immunoloogilise määramise vahenditega (*immunoassays*) tuvastamist ei kasutatud, kuna see meetod töötab halvemini madala seerumi LH tasemega indiviididel, ei pruugi hästi eristada heterosügootide ning tuvastab vaid ühe asenduse V-LH puhul. Viljatute meeste valimit genotüpiseeriti mõlema asenduse vastu V-LH geenis, et saada kindlust nende koosinemisest. Et hinnata paremini V-LH mõju seerumi LH tasemele, võeti arvesse ka seda mõjutavaid teisi faktoreid.

Leitud V-LH alleeli sagedused 11% Eesti noorte meeste valimis ja 10% Eesti viljatute meeste valimis ei erine oluliselt, millele andsid kinnitust ka erinevad statistilised testid: *Pearsoni* χ^2 test ning *Fisheri* test. Tulemus on kooskõlas varem avaldatud töödega (Ramanujam jt., 2000; Lee jt., 2003) ning jääb püsima ka suurema valimi puhul (Balti noorte meeste kohortvalim, n=986) (Punab jt., 2015), millest võib järeldada, et V-LH kandjatest meeste seas ei ole suurem risk viljatuseks. Varasemalt on näidatud, et seos leidub naiste viljakuse ja V-LH vahel (Furui jt., 1994; Takahashi jt., 1998; Takahashi jt., 1999; Du jt., 2012). Selle täpset põhjust ei ole välja toodud, kuid on näidatud, et V-LH puhul erineb hormooni tootmine, poolestusaeg ning retseptoriga seondumine, mis mõjutavad hormooni bioaktiivsust ning võib omada rolli ka meeste seas (Jiang jt., 1999; Casarini jt., 2012; Manna jt., 2002). Erinevus V-LH mõjust viljakusele meeste ja naiste seas tuleneb tõenäoliselt sellest, et meestel on LH tase üsna stabiilne, kuid naistel muutub menstruaaltsükli vältel, ning muutunud poolestusaja ning ekspressiooniga V-LH tase seerumis on kõrgem (Du jt., 2012), mis võib häirida menstruaaltsükli reguleerimist.

Valimite genotüüpide jaotuse analüüs *Hardy-Weinbergi* tasakaalu kohta ei andnud statistiliselt olulist erinevust ($p=0.62$ viljatute meeste valimis, $p=0.08$ Eesti noorte meeste valimis). Kui vaadata Balti noorte meeste kohortvalimit, millest üks osa analüüsitud Eesti noorte meeste kohortvalim oli, siis andis *Hardy-Weinbergi* test aga kindla tulemuse ($p=0.55$) ning jaotus vastas eeldatavale (Punab jt., 2015). Tõenäoliselt oli kõrvalekalle Eesti noorte meeste kohortvalimis tingitud juhuslikkusest ning seda võiks kinnitada edasiste uuringutega. V-LH homosügootsete indiviidide uurimisel võiks ka potentsiaalselt saada rohkem teada luteiniseeriva hormooni taseme regulatsioonist V-LH kandjatel.

Hindamaks V-LH alleeli mõju seerumi LH tasemega, kasutati erinevaid meetodeid ja statistilise analüüsi teste. Võrreldes rühmade LH taseme mediaani (tabel 4, joonised 9 ja 10), on näha tendentsi V-LH alleelide arvu kasvamisel LH taseme tõusuks. Statistilised testid ei andnud otsest kinnitust selle tendentsi mittejuhuslikkuse kohta, kuid iga testi puhul oli vähemalt ühe valimi tulemus piiripealne. Suurendades valimit ning võttes arvesse 1593 Balti mehe LH taseme ning V-LH kandjastaatuse, saadi aga tulemuseks kindel seos V-LH alleelide arvu ning LH kõrgema taseme vahel (Punab jt., 2015). Statistilised testid kasutavad seoste hindamisel ka valimite suurust. Väiksema valimi puhul on juhuslikult erinevad väärtused suurema mõjuga kogu tulemi hindamisel, nii et testide tulemust võis mõjutada viljatute meeste valimis minoorse alleeli kandjate vähesus (heterosügootte 2 ja homosügootte 26) ning Eesti noorte meeste valimis mažoorse alleeli homosügootide LH taseme suurem standardhälve (tabel 4).

Senised uuringud on näidanud, et naiste seas on V-LH kandjatel luteiniseeriva hormooni kontsentratsioon veres suurem, kuid uuringud kesk- ja vanemaealiste meeste seas on näidanud V-LH kandjate hormooni madalamat taset (Huhtaniemi jt., 2010; Du jt., 2012). Antud töös vaadeldi seost noorte meeste seas, mida seni uuritud pole, ning saadi tulemuseks V-LH kandjate kõrgem hormooni tase vaadeldud valimites. Laiendades valimit Balti meeste peale (n= 1593) ning uurides V-LH kandjastaatuse seost teiste reproduktiivsete parameetritega, leiti, et ka munandite kogumaht on V-LH kandjate seas väiksem (Punab jt., 2015). Sellest võib oletada, et kuigi pikema poolestusaja (Wide jt., 2010) ning kõrgema transkriptsiooniaktiivsuse (Jiang jt., 1999) mõjul on LH tase V-LH kandjatel kõrgem, on V-LH madalama bioaktiivsusega, mis on tõenäoliselt tingitud tema suuremast sarnasusest hCG hormooniga (Hallast jt., 2005), mille seondumine LHCGR retseptorvalguga erineb LH seondumisest (Casarini jt., 2012). V-LH madalam bioaktiivsus võiks mõjutada munandite suurust läbi madalama testosterooni taseme puberteedieas, sest luteiniseeriv hormoon mõjutab otseselt testosterooni taset (Moyle ja Campbell, 1996). Seos väiksema munandite mahuga LH kandjate seas on leitud ka varasemates uuringutes, milles vaadeldi väikese valimi poiste puberteedi kulgu ning leiti lisaks seosed lühema ja aeglasema kasvuga (Raivio jt., 1996). Edaspidistes uuringutes võiks vaadelda, milline on V-LH kandjate luteiniseeriva hormooni tase seerumis puberteedi ajal, et hinnata paremini variantse vormi bioaktiivsust ning mõju fenotüübile.

6. Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaate osa eesmärgiks oli põhjalikult vaadelda glükoproteiinseid hormone ning täpsemalt luteiniseerivat hormooni ning selle variantset vormi. Samuti käsitleti ühenukleotiidiliste variantide genotüpiseerimise meetodeid. Antud töö kirjanduse ülevaade peaks andma hea aluse mõistmaks eksperimentaalses valitud meetodeid, uuringuküsimusi ning saadud tulemuste tähendust.

Eksperimentaalse töö eesmärgiks oli uurida, kas V-LH kandjate seas on suurem risk viljatuse esinemiseks, võrreldes V-LH esinemissagedust kohortvalimis ning viljatute meeste valimis, ja uurida V-LH alleeli seost LH tasemega, võrreldes V-LH kandjate ning mittekanjate hormooni taset veres.

Töö eksperimentaalses leiti, et V-LH alleeli sagedus ei erine Eesti noorte meeste valimis ning Eesti viljatute meeste valimis, millest võib järeldada, et V-LH ei põhjusta meeste viljatust. Alleelide jaotused valimites olid ka *Hardy-Weinbergi* tasakaalus, millest võib järeldada, et geen ei ole loodusliku valiku all.

Antud töö andmete põhjal võib märgata tendentsi V-LH alleelide suurema arvu ja kõrgema LH seerumi taseme vahel. Statistilised testid ei kinnitanud tendentsi mittejuhuslikkust, kuid varieerusid oma tulemustes suuresti, andes mitmel juhul piiripealseid väärtusi. Arvatavasti on testide tulemused mõjutatud valimite väiksusest.

7. Summary

Association of the variant luteinizing hormone determining genetic variants with idiopathic male infertility and serum LH level

Tiina Kuura

The purpose of this bachelor's thesis was to give an overview of glycoprotein hormones and study the effect of variant luteinizing hormone on male fertility and levels of serum luteinizing hormone.

Human fertility is regulated by various hormones, which as a system are responsible for sexual development, gamete maturation and the course of pregnancy. In this system, the gonadotropine hormones: luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and chorionic gonadotropine (CG) play a central role of regulating both male and female fertility. The gonadotropine hormones together with thyroid stimulating hormone (TSH) form the group of glycoprotein hormones.

The glycoprotein hormones are similar in structure, consisting of a common alpha-subunit and specific beta-subunit. The subunits are united by non-covalent bonds and cystine-knot tertiary structures. Both of the subunits are glycosylated with different sulfonic- and sialic-acid residues, which raise the number of each hormone's known isoforms and cause different bioactivity of the hormone. The receptors of these hormones are similar as well and are also glycosylated. While FSH and TSH have each specific receptors, LH and CG share a common receptor, which binds to both hormones, but results in different inner-cellular reaction depending on the hormone.

Luteinizing hormone is responsible for synthesis of testosterone in males and ovulation and synthesis of estrogen precursors in females. In addition to wild-type LH, there is a common variant (V-LH), which has two amino-acid substitutions in the beta-subunit: Trp->Arg on the position 8 of the mature subunit, and Ile->Thr on the position 15 of the mature subunit. The change Ile15Thr creates an extra glycosylation site in V-LH compared to the wild-type hormone. This alters the hormone's half-life and binding to the receptor. In addition, 8 single-nucleotide changes have been found to be in linkage disequilibrium with the changes causing amino-acid substitutions. This causes the promoter of V-LH being up to 40% more active in transcription.

Studies on V-LH have shown that it has an effect on female fertility and the serum luteinizing hormone levels. Studies about male V-LH carriers have found that V-LH is a risk factor for

testicular cancer and cryptorchism, and causes a slower progression of puberty and lower testes volume.

The current study genotyped Estonian young men cohort (n=502) and Estonian idiopathic infertility patients (n=154) for V-LH carrier status with *PCR-RFLP* method. The results were analyzed to find answers to following questions:

- 1) Is there a higher risk for male infertility among V-LH carriers?
- 2) Is there an association between V-LH and serum LH levels in males?

The data was analyzed with statistical analysis program „Plink“ and the programming language „R“. Factors that affect the LH levels were included in the linear regression analysis with Plink. For both study groups, body mass index and age were included, for Estonian young men cohort, the time of LH measurement was included as well.

It was found that there is no difference of V-LH carrier status between cohort and infertile study groups. This was supported by Pearson's χ^2 test and Fisher's exact test. The study groups were in Hardy-Weinberg equilibrium for the V-LH and wild-type-LH alleles.

There was a tendency of higher V-LH allele number and higher serum LH level, but the statistical tests were inconsistent about this tendency. None of the tests gave p-value below 0.05 on either study group, but some of the values could be considered borderline significant. The results might be affected by the small size of study groups and low frequency of V-LH homozygotes.

This study is a part of project HAPPY PREGNANCY (<http://www.happypregnancy.ut.ee/>). The purpose of the project is to develop new non-invasive biomarkers for human fertility assessment and prediction of pregnancy complications and early detection. The results of the study was used in published article (Punab jt., 2015).

8. Tänuavaldused

Sooviksin tänada oma juhendajat Marina Grigorovat, ilma kelleleta poleks antud töö valmimine võimalik olnud. Samuti sooviksin tänada professor Maris Laant, tänu kellele sain tegeleda antud huvitava teemaga. Veel tänan inimgeneetika töörühma liikmeid, eriti Anna Maria Punabit, kellega koos antud uurimus valmis.

Tänan ka oma lähedasi ja kolleege, kes toetasid mind lõputöö valmimise käigus.

9. Kasutatud kirjanduse loetelu

Alviggi, C., Pettersson, K., Longobardi, S., Andersen, C.Y., Conforti, A., De Rosa, P., Clarizia, R., Strina, I., Mollo, A., De Placido, G. ja Humaidan, P. (2013) 'A common polymorphic allele of the LH beta-subunit gene is associated with higher exogenous FSH consumption during controlled ovarian stimulation for assisted reproductive technology', *Reproductive Biology and Endocrinology* 51(11).

Anobile, C., Talbot, J., McCann, S., Padmanabhan, V. ja Robertson, W. (1998) 'Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state', *Molecular Human Reproduction* 4(7), pp. 631-639.

Bailey, J.A. and Eichler, E.E. (2003) 'An Alu Transposition Model for the Origin and Expansion of Human Segmental Duplications', *The American Journal of Human Genetics* 73(4), pp. 823-834.

Berger, K., Billerbeck, A.E., Costa, E.M., Carvalho, L.S., Arnhold, I.J. ja Mendonca, B.B. (2005) 'Frequency of the allelic variant (Trp8Arg/Ile15Thr) of the luteinizing hormone gene in a Brazilian cohort of healthy subjects and in patients with hypogonadotropic hypogonadism', *Clinics (Sao Paulo)* 60(6), pp. 461-4.

Birdsell, D.N., Pearson, T., Price, E.P., Hornstra, H.M., Nera, R.D., Stone, N., Gruendike, J., Kaufman, E.L., Pettus, A.H., Hurbon, A.N., Buchhagen, J.L., Harms, N.J., Chanturia, G., Gyuranecz, M., Wagner, D.M. ja Keim, P.S. (2012) 'Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA): A Functional Study of a Cost-Effective SNP Genotyping Assay in Bacterial Models', *PLoS One* 7(3), p. e32866.

Bliss, S.P., Navratil, A.M., Xie, J. ja Roberson, M.S. (2010) 'GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility', *Front neuroendocrinology* 31(3), pp. 322-340.

Casarini, L., Lispi, M., Longobardi, S., Milosa, F., La Marca, A., Tagliasacchi, D., Pignatti, E. ja Simoni, M. (2012) 'LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different Intracellular Signalling', *PLoS ONE* 7(10), p. e46682.

Chang, H.W., Cheng, Y.H., Chuang, L.Y. ja Yang, C.H. (2010) 'SNP-RFLP 2: an updated and integrated PCR-RFLP tool for SNP genotyping', *BMC Bioinformatics* 11, p. 173.

Choi, J. and Smits, J. (2014) 'Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference', *Molecular and Cellular Endocrinology* 383, pp. 203-213.

Cole, L.A. and Butler, S.A. (2010) Human chorionic gonadotropin (hCG), 1st edition, London: Elsevier.

Diebel, N.D. and Bogdanove, E.M. (1978) 'Analysis of LHe and FSH release kinetics during a dynamic secretory event, the postpartum preovulatory surge in the rat, based on quantitative changes in stored and circulating LH and FSH and metabolic clearance data for these hormones', *Endocrinology* 103(3), pp. 665-673.

Du, J.-W., Xu, K.-Y. ja Qui, X.-L. (2012) 'Association between mutations of the luteinizing hormone beta subunit and female infertility', *Molecular Medicine Reports* 5(2), pp. 473-476.

Elkins, D.A., Yokomizo, A., Thibodeau, S.N., Schaid, D.J., Cunningham, J.M., Marks, A., Christensen, E., McDonnell, S.K., Slager, S., Peterson, B.J., Jacobsen, S.J., Cerhan, J.R., Blute, M.L., Tindall, D.J. ja Liu, W. (2003) 'Luteinizing Hormone beta Polymorphism and Risk of Familial and Sporadic Prostate Cancer', *The Prostate* 56(1), pp. 30-36.

Elter, K., Erel, T., Cine, N., Ozbek, U., Hacıhanefioğlu, B. ja Ertunçalp, E. (1999) 'Role of the mutations Trp8->Arg and Ile15->Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility* 71(3), pp. 425-430.

Furui, K., Suganuma, N., Tsukahara, S., Asada, Y., Kikkawa, F., Tanaka, M., Ozawa, T. ja Tomoda, Y. (1994) 'Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78(1), pp. 107-113.

Gazvani, R., Pakarinen, P., Fowler, P., Logan, S. ja Huhtaniemi, I. (2002) 'Lack of association of the common immunologically anomalous LH with endometriosis', *Human Reproduction* 17, pp. 1532-1534.

Gharib, S., Wierman, M., Shupnik, M. ja Chin, W. (1990) 'Molecular biology of the pituitary', *Endocr Rev.*, pp. 177-199.

Gregory, S. and Kaiser, U. (2004) 'Regulation of gonadotropins by inhibin and activin.', *Semin Reprod Med.* 22(3), pp. 253-67.

Grigorova, M. (2011) 'Fine-scale genetic variation of follicle-stimulating hormone beta-subunit coding gene (FSHB) and its association with reproductive health. PhD thesis', Tartu University Press, p. 18.

- Grigorova, M., Punab, M., Žilaitiene, B., Erenpreiss, J., Ausmees, K., Matulevicius, V., Tsarev, I., Jorgensen, N. ja Laan, M. (2011) 'Genetically determined dosage of follicle-stimulating hormone (FSH) affects male reproductive parameters', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(9), pp. E1534-E1541.
- Haavisto, A.-M., Pettersson, K., Bergendahl, M., Virkamäki, A. ja Huhtaniemi, I. (1995) 'Occurrence and Biological Properties of a Common Genetic Variant of Luteinizing Hormone', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(4), pp. 1257-1263.
- Hallast, P., Nagirnaja, L., Margus, T. ja Laan, M. (2005) 'Segmental duplications and gene conversion: Human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin β gene cluster', *Genome Research* 15(11), pp. 1535-1546.
- Hashad, D., Mohamed, N. ja Hashad, M.M. (2012) 'Luteinising hormone β -subunit gene Gly102Ser variant and oxidative stress biomarkers in Egyptian infertile males', *Andrologia* 44, pp. 484-489.
- Henke, A. and Gromoll, J. (2008) 'New insights into the evolution of chorionic gonadotrophin', *Molecular and Cellular Endocrinology* 291(1-2), pp. 11-19.
- Hiro'oka, T., Maassen, D., Berger, P. ja Boime, I. (2000) 'Disulfide bond mutations in follicle-stimulating hormone result in uncoupling of biological activity from intracellular behaviour', *Endocrinology* 141(12), pp. 4752-6.
- Huhtaniemi, I.T., Pye, S.R., Holliday, K.L., Thomson, W., O'Neill, T.W., Platt, H., Payne, D., John, S.L., Jiang, M., Bartfai, G., Boonen, S., Casanueva, F.F., Finn, J.D., Forti, G., Giwercman, A., Han, T.S., Kula, K., Lean, M.E.J., Pendleton, N., Punab, M. jt. (2010) 'Effect of Polymorphism in Selected Genes Involved in Pituitary-Testicular Function on Reproductive Hormones and Phenotype in Aging Men', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95(4), pp. 1898-1908.
- Jiang, X., Dias, J.A. ja He, X. (2014) 'Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: Insights to signaling', *Molecular and Cellular Endocrinology* 382, pp. 424-451.
- Jiang, M., Pakarinen, P., Zhang, F.-P., El-Hefnawy, T., Koskimies, P., Pettersson, K. ja Huhtaniemi, I. (1999) 'A common polymorphic allele of the human luteinizing hormone beta-subunit gene: additional mutations and differential function of the promoter sequence', *Human Molecular Genetics* 8(11), pp. 2037-2046.

Kaleva, M., Virtanen, H., Haavisto, A.-M., Main, K., Skakkebaek, N.E., Huhtaniemi, I., Irjala, K. ja Toppari, J. (2005) 'Does Variant Luteinizing Hormone (V-LH) Predispose to Improper Testicular Position in Late Pregnancy?', *Pediatric Research* 58(3), pp. 447-450.

Kovalevskaya, G., Birken, S., Kakuma, T., Ozaki, N., Sauer, M., Lindheim, S., Cohen, M., Kelly, A., Schlatterer, J. ja O'Connor, J. (2002) 'Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope', *Journal of Endocrinology* 172(3), pp. 497-506.

Leao, R.B.F. and Esteves, S.C. (2014) 'Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech', *Clinics* 69(4), pp. 279-293.

Lee, S., Kim, N.K., Kim, H.J., Lee, S.H., Jeong, H.J. ja Cha, K.Y. (2003) 'Genetic analysis of three polymorphic sites of the luteinizing hormone beta-subunit gene in infertile Korean men with nonobstructive azoospermia', *Fertility Sterility* 79, pp. 517-521.

Liao, W.X., Goh, H.H. ja Roy, A.C. (2002) 'Functional characterization of a natural variant of luteinizing hormone', *Human Genetics* 111, pp. 219-224.

Lim, S., Pnueli, L., Tan, J.H., Naor, Z., Rajagopal, G. ja Melamed, P. (2009) 'Negative Feedback Governs Gonadotrope Frequency - Decoding of Gonadotropin Releasing Hormone Pulse-Frequency', *PLoS ONE*, p. e7244.

Manna, P.R., Joshi, L., Reinhold, V.N., Aubert, M.L., Sugarnuma, N., Pettersson, K. ja Huhtaniemi, I.T. (2002) 'Synthesis, purification and structure and functional characterization of recombinant form of a common genetic variant of human luteinizing hormone', *Human Molecular Genetics* 11(3), pp. 301-315.

McGee, E. and Hsueh, A. (2000) 'Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles', *Endocr Rev.* 21(2), pp. 200-214.

Morgan, F.J., Birken, S. ja Canfield, R.E. (1975) 'The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit.', *The Journal of Biological Chemistry* 250, pp. 5247-5258.

Moyle, W.R., Bahl, O.P. ja März, L. (1975) 'Role of carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action', *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 9163-9169.

- Moyle, W.R. and Campbell, R.K. (1996) Reproductive endocrinology, surgery, and technology: Gonadotrophines, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Nagirnaja, L., Rull, K., Uusküla, L., Hallast, P., Grigorova, M. ja Laan, M. (2010) 'Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: Unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci', *Molecular and Cellular Endocrinology* 329, pp. 4-16.
- Nieschlag, E., Behre, H.M. ja Nieschlag, S. (ed.) (2010) *Andrology*, 3rd edition, Heidelberg: Springer.
- Nilsson, C., Jiang, M., Pettersson, K., Iitiä, A., Mäkelä, M., Simonsen, H., Easteal, S., Herrera, R.J. ja Huhtaniemi, I. (1998) 'Determination of a common genetic variant of luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassays', *Clinical Endocrinology* 49(3), pp. 369-376.
- Nilsson, C., Pettersson, K., Millar, R.P., Coerver, K.A., Matzuk, M.M. ja Huhtaniemi, I.T. (1997) 'Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research', *Fertility and Sterility* 67(6), pp. 998-1004.
- Nishimura, R., Shin, J., Middaugh, C.R., Kruggel, W., Lewis, R.V. ja Ji, T.H. (1986) 'A single amino acid substitution in an ectopic alpha-subunit of a human carcinoma choriogonadotrophin', *Journal of Biological Chemistry* 261(23), pp. 10475-10477.
- Pettersson, K., Ding, Y.Q. ja Huhtaniemi, I. (1992) 'An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 74, pp. 164-171.
- Pierce, J.G. and Parsons, T.F. (1981) 'Glycoprotein hormones: structure and function', *Annu. Rev. Biochem.*, pp. 465-495.
- Plant, T. and Marshall, G. (2001) 'The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates', *Endocr. Rev.* 22(6), pp. 764-786.
- Policastro, P.F., Daniels-McQueen, S., Carle, G. ja Boime, I. (1986) 'A Map of the hCGB-LHP Gene Cluster', *The Journal of Biological Chemistry* 261(13), pp. 5907-5916.
- Prendergast, K., Gueorguiev, M. ja Heras-Herzig, A, e.a. (2008) 'GNRH Gonadotropin Physiology and Pathology', Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279070/> in De Groot, L., Beck-Peccoz, P. ja Chrousos, G. (ed.) *Endotext* [Internet], South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.

Punab, M. (2007) Male fertility and its risk factors in Estonia. PhD thesis, Tartu: University of Tartu Press, Available: <http://hdl.handle.net/10062/2885>.

Punab, A.M., Grigorova, M., Punab, M., Adler, M., Kuura, T., Poolamets, O., Vihljajev, V., Žilaitienė, B., Erenpreiss, J., Matulevičius, V. ja Laan, M. (2015) 'Carriers of V-LH among 1593 Baltic men have significantly higher serum LH', *Andrology*.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J. ja Sham, P.C. (2007) 'PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis', *American Journal of Human Genetics* 81(3), pp. 559-575.

R Core Team (2012) 'R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing', Available: <http://www.R-project.org/> [2014].

Raivio, T., Huhtaniemi, I., Anttila, R., Siimes, M.A., Hagenäs, L., Nilsson, C., Pettersson, K. ja Dunkel, L. (1996) 'The Role of Luteinizing Hormone beta Gene Polymorphism in the Onset and Progression of Puberty in Healthy Boys', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(9), pp. 3278-3282.

Rajkhowa, M., Talbot, J., Jones, P., Pettersson, K., Haavisto, A., Huhtaniemi, I. ja Clayton, R. (1995) 'Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome', *Clinical Endocrinology* 43(3), pp. 297-303.

Ramanujam, L.N., Liao, W.X., Roy, A.C., Loganath, A., Goh, H.H. ja Ng, S.C. (1999) 'Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders', *Clinical Endocrinology* 51(2), pp. 243-246.

Ramanujam, L.N., Liao, W.-X., Roy, A.C. ja Ng, S.C. (2000) 'Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility', *Human Reproduction* 15(4), pp. 925-928.

Sasaky, Y., Ladner, D. ja Cole, L. (2008) 'Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures', *Fertility and Sterility* 89(6), pp. 1781-1786.

- Sato, A., Perlas, E., Ben-Menahem, D., Kudo, M., Pixley, M., Furuhashi, M., Hsueh, A. ja Boime, I. (1997) 'Cystine knot of the gonadotropin alpha subunit is critical for intracellular behavior but not for in vitro biological activity', *Biol Chem* 272(29), pp. 18098-103.
- Schally, A.V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H., Redding, T.W. ja Debeljuk, L. (1971) 'Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone', *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43(2), pp. 393-399.
- Shen, G.Q., Abdullah, K.G. ja Wang, Q.K. (2009) 'The TaqMan Method for SNP Genotyping', *Methods in Molecular Biology* 578(6), pp. 293-306.
- Sherman, G.B., Wolfe, M.W., Farmerie, T.A., Clay, C.M., Threadgill, D.S., Sharp, D.C. ja Nilson, J.H. (1992) 'A single gene encodes the beta-subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin', *Mol. Endocrinol.* 6(6), p. 951.9.
- Shiraishi, K. and Naito, K. (2003) 'Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the beta subunit of luteinizing hormone', *Endocrinology* 50, pp. 733-737.
- Stemers, F.J. and Gunderson, K.L. (2005) 'Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform', *Pharmacogenomics* 6(7), pp. 777-782.
- Suganuma, N., Furui, K., Kikkawa, F., Tomoda, Y. ja Furuhashi, M. (1996) 'Effects of the mutations (Trp8 --> Arg and Ile15 --> Thr) in human luteinizing hormone (LH) beta-subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo', *Endocrinology* 137(3), pp. 831-838.
- Takahashi, K., Kurioka, H., Ozaki, T., Kanasaki, H., Kohsaka, M., Miyazaki, K. ja Karino, K. (1998) 'Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients', *Human Reproduction* 13(12), pp. 3338-3344.
- Takahashi, K., Ozaki, T., Okada, M., Kurioka, H., Kanasaki, H. ja Miyazaki, K. (1999) 'Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure', *Fertility Sterility* 71(1), pp. 96-101.
- Tapanainen, J.S., Koivunen, R., Fauser, B.C., Taylor, A.E., Clayton, R.N., Rajkova, M., White, D., Franks, S., Anttila, L., Pettersson, K.S. ja Huhtaniemi, I.T. (1999) 'A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone', *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, pp. 1711-1715.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2012) 'An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes', *Nature* 491, pp. 56-65.

Themmen, A.P.N. and Huhtaniemi, I.T. (2000) 'Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function', *Endocrine Reviews* 21(5), pp. 551-583.

Wehmann, R.E. and Nisula, B.C. (1981) 'Metabolic and renal clearance rates of purified human chorionic gonadotropin', *The Journal of Clinical Investigation* 68(1), pp. 184-194.

Wickham, H. (2009) *GGplot2: elegant graphics for data analysis*, New York: Springer, Available: <http://had.co.nz/ggplot2/book>.

Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P.M. ja Hall, J.E. (2009) 'Serum Half-Life of Pituitary Gonadotropins Is Decreased by Sulfonation and Increased by Sialylation in Women', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94(3), pp. 958-964.

Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P.M. ja Hall, J.E. (2010) 'The Common Genetic Variant of Luteinizing Hormone Has a Longer Serum Half-Life than the Wild Type in Heterozygous Women', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95(1), pp. 383-389.

Wide, L., Naessén, T., Sundström-Poromaa, I. ja Eriksson, K. (2007) 'Sulfonation and Sialylation of Gonadotropins in Women during the Menstrual Cycle, after Menopause, and with Polycystic Ovarian Syndrome and in Men', *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(11), pp. 4410-4417.

World Health Organization (1975) 'WHO Expert Committee on Biological Standardization', *World Health Organization Technical Report Series* 565(26), p. 13.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. ja Maddel, T.L. (2012) 'Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction', *BMC Bioinformatics* 13(134).

9.1 Kasutatud veebiaadressid

NCBI ClinVar (2015) NCBI ClinVar, [Online], [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CGA\[gene\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CGA[gene]) [16 mai 2015].

NCBI Gene (2015) CGA glycoprotein hormones, alpha polypeptide [Homo sapiens (human)], [Online], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=1081> [1 mai 2015].

NCBI primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). [24 mai 2015]

1000 Genomes project <http://browser.1000genomes.org>

Ensemblr (2015)

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000104826;r=19:49015980-49017090

10. Lisad

10.1 Lisa 1: *LHB* geeni järjestus

>hg19_dna range=chr19:49519237-49520347 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

```
GCACCAAGGATGGAGATGCTCCAGGTAAGACTACAGGGCCCCTGGGCACC
TTCCACCTCCTTCCAGGCCATCACTGGCATGAGAAGGGGCAGACCCGTGT
GAGCTGTGGAAGGAGGCCTCTTTCTGGAGGGGCATGACCCCAGTAAGCT
TCAGGTGGGGCAGTTCCTGAGGGTGGGGATCTGAAATGTTGGGGCATCTC
AGGTCCTCTGGGCTGTGGGGTGGGCTCTGAAAGGCAGGTGTCCGGGTGGT
GGGTCTGAATAGGAGATGCCGGGAAGGGTCTCTGGGTCTTTGTGGGTGG
TGTACCACGCGGGATGGGAAGGCCAGGACTCGGGGCTGCGGTCTCAGACC
TGGGTGAAGCAGTGTCTTGTCCCAGGGGCTGCTGCTGTTGCTGCTGCTG
AGCATGGGCGGGGCATGGGCATCCAGGGAGCCGCTTCGGCCATGGTGCCA V-LH rs1800447
CCCCATCAATGCCATCCTGGCTGTCGAGAAGGAGGGCTGCCCAGTGTGCA V-LH rs34349826
TCACCGTCAACACCACCATCTGTGCCGGCTACTGCCCCACCATGGTGAGC
TGCCTGGGGCCAGGGGCAGATGCTGCCACCTCAGGGCCAGACCCACAGAG
GCAGCGGGGGAGGAAGGGTGGTCTGCCTCTCTGGCCTGCGGTTGGGGAAT
GGGGTGTGGGAAGGCAGGAACAGAGGGCTTCCTGGGCTCCTGAGTCCAGG
ACCTGTGGGGTCAGCTTGGGAGCTCAGCTGAGGCGCTGGCCTCAGGCACA
TGCTCATTCCCCACTCACACGGCCTCCAGATGCGCGTGCTGCAGGCGGT
CCTGCCGCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCACCTACCGTGATGTGCGCTTCG
AGTCCATCCGGCTCCCTGGCTGCCCGCGTGGTGTGGACCCCGTGGTCTCC
TTCCCTGTGGCTCTCAGCTGTCGCTGTGGACCCTGCCGCCGACACCTC
TGACTGTGGGGGTCCCAAAGACCACCCCTTGACCTGTGACCACCCCAAC
TCTCAGGCCTCCTCTTCTCTAAAGACCCTCCCCGCAGCCTTCCAAGTCC
ATCCCGACTCCTGGAGCCCTGACACCCCGATCCTCCACAATAAAGGCTT
CTCAATCCGCA
```

Joonis 11. *LHB* geeni järjestus. Paksus kirjas on toodud praimerite seondumisalad, allajoonitult ning halli taustaga on toodud V-LH asendused.

10.2 Lisa 2: Primer-BLAST tulemused

All on toodud praimerite analüüsi programmiga Primer-BLAST tulemused. *Product length* näitab PCR produkti pikkust. Praimeri ja järjestuse vastavuse korral on praimeriga kohakuti asuval real punktid, mittevastavuse korral on toodud välja antud kohal asuvad nukleotiidid.

	Sequence (5'->3')	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA	59.89	55.00	3.00	1.00
Reverse primer	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	58.43	55.00	6.00	0.00

Products on target templates

>[NC_000019.10](#) Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 662

Features associated with this product:

[lutropin subunit beta precursor](#)

[lutropin subunit beta isoform X1](#)

Forward primer	1	GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA	20
Template	49016735	49016716
Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	49016074	49016093

product length = 3838

Features associated with this product:

[chorionic gonadotropin, beta polypeptide 5 precursor](#)

[chorionic gonadotropin, beta polypeptide 8 precursor](#)

Forward primer	1	GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA	20
Template	49044556	49044575
Forward primer	1	GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA	20
Template	49048393	49048374

product length = 3842

Features associated with this product:

[choriogonadotropin subunit beta variant 2 precursor](#)

[choriogonadotropin subunit beta variant 2 isoform X1](#)

Forward primer	1	GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA	20
Template	49032483	49032502
Forward primer	1	GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA	20
Template	49036324C....	49036305

>[NC_000008.11](#) Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 2929

Features associated with this product:

[potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3 is...](#)

Forward primer	1	GAAGCAGTGCCTTGTCCCA	20
Template	132456333GG.....T...	132456314
Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	132453405	.G...T.....G.	132453424

product length = 3278

Features flanking this product:

[986251 bp at 5' side: sorting nexin-16 isoform X3](#)

[1355485 bp at 3' side: RNA-binding Raly-like protein isoform 1](#)

Forward primer	1	GAAGCAGTGCCTTGTCCCA	20
Template	82826236	TGT.....A.A.....	82826255
Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	82829513AA..G.....	82829494

product length = 3067

Features flanking this product:

[45363 bp at 5' side: protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-
contain...](#)

[202679 bp at 3' side: suppression of tumorigenicity 18 protein isoform
X2](#)

Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	51909579	C....A....G.....A	51909560
Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	51906513	AG.T....A.....A	51906532

>[NC_000005.10](#) Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 975

Features associated with this product:

[uncharacterized protein C5orf64](#)

Forward primer	1	GAAGCAGTGCCTTGTCCCA	20
Template	61655844	T.CA.T.....C	61655825
Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	61654870	...A..A..C.....C	61654889

>[NC_000014.9](#) Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p2 Primary Assembly

product length = 776

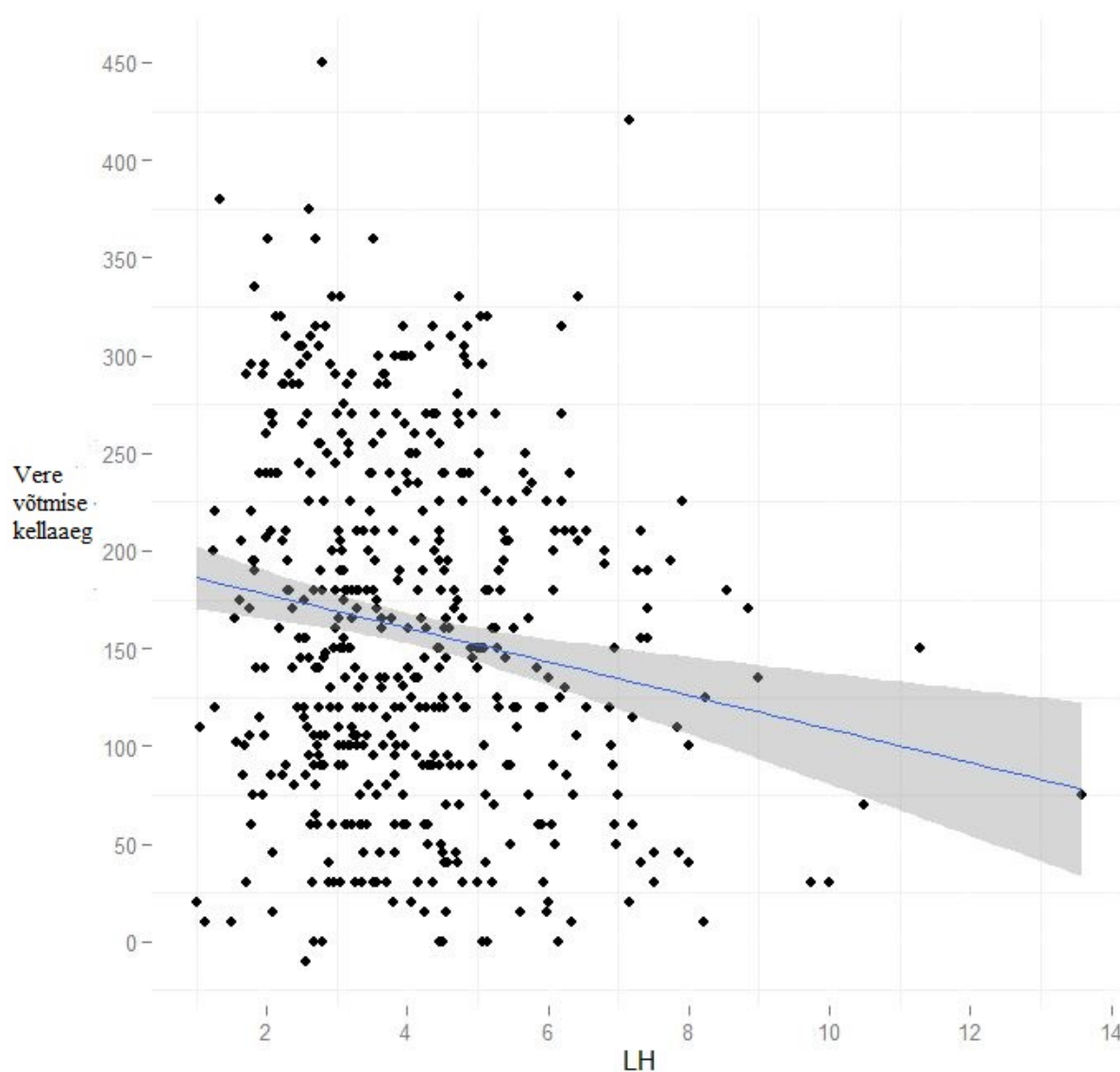
Features flanking this product:

[242163 bp at 5' side: rho GTPase-activating protein 5 isoform X1](#)

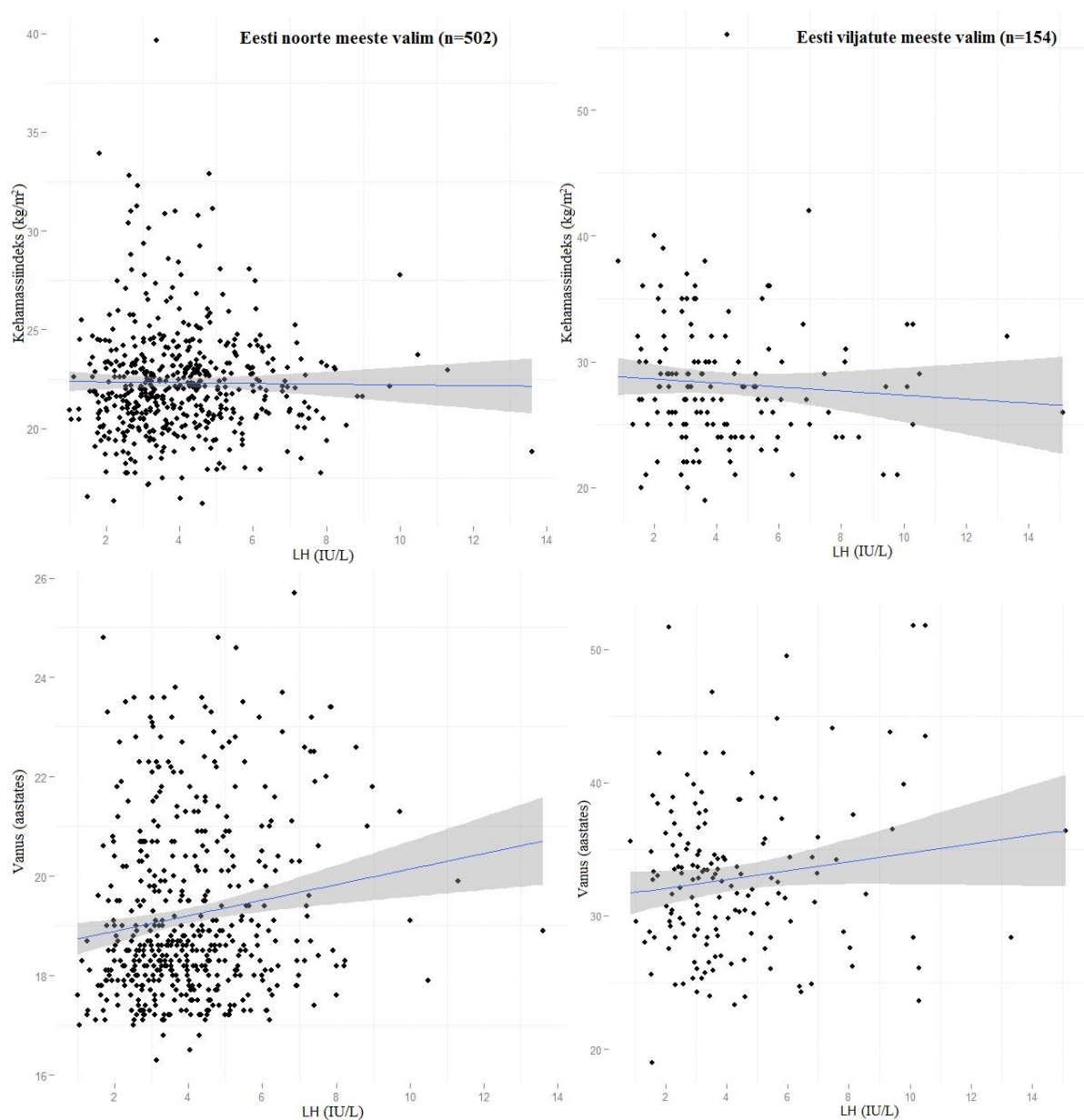
[35608 bp at 3' side: A-kinase anchor protein 6 isoform X1](#)

Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	32397885	A.....A...C..T...	32397866
Reverse primer	1	GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT	20
Template	32397110	CTG...A.....A..	32397129

10.3 Lisa 3: Valimi parameetrite seos LH tasemega veres

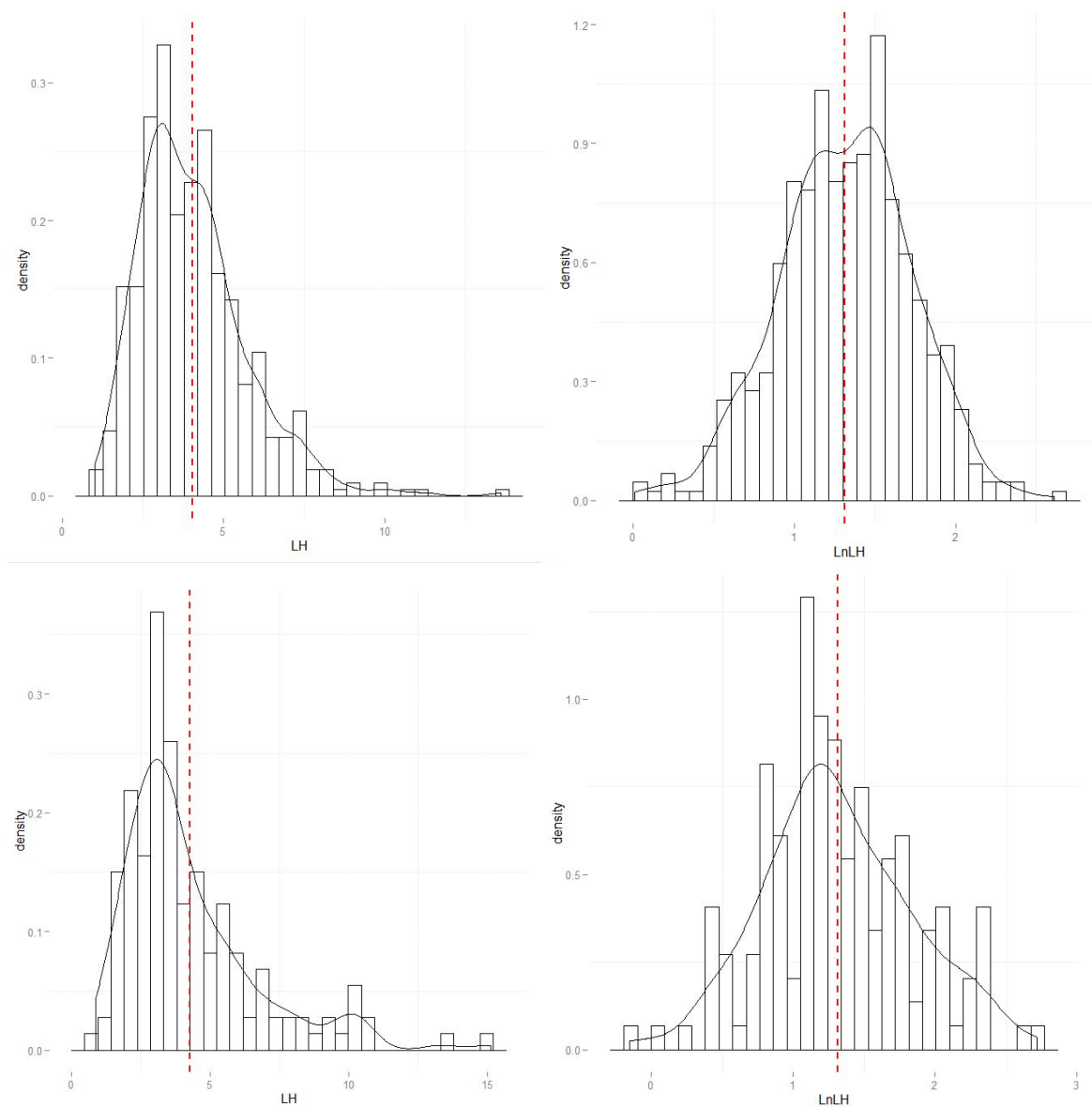


Joonis 12. Vere võtmise kellaaja seos LH tasemega veres. y teljel on toodud vere võtmise kellaeg minutites alates kella kaheksast hommikul, x teljel on toodud luteiniseeriva hormooni tase veres rahvusvahelistes ühikutes liitri kohta (IU/L). Andmepunktide põhjal on lisatud lineaarse regressiooni joon ($p=0.00027$, koefitsient $=-8.6$ IU/L). Joont ümbritsev hall ala näitab 95% tõenäosuse piirkonda.



Joonis 13. Kehamassiindeksi ja vanuse mõju vere LH tasemele Eesti noorte meeste valimis (vasakul) ning viljatute meeste valimis (paremal). Andmepunktide põhjal on lisatud lineaarse regressiooni joon (kehamassiindeks $p=0.8$ noortel meestel, $p=0.3$ viljatutel. Vanus $p=0.00078$, mõju suuruse koefitsient 0.1454 noortel meestel, $p=0.0876$, mõju suuruse koefitsient 0.05787 viljatutel meestel). Joont ümbritsev hall ala näitab 95% tõenäosuse piirkonda.

10.4 Lisa 4: Luteiniseeriva hormooni tase logaritmitud ja logaritmitamata väärtustena



Joonis 14. Eesti noorte meeste valimi (üleval) ning viljatute meeste valimi (all) luteiniseeriva hormooni (vasakul) ja logaritmitud luteiniseeriva hormooni (paremal) tasemete histogrammid. Histogrammile on lisatud väärtuste keskmine punase katkendjoonega, ning sagedusjoon.

10.5 Lisa 5: Artikkel 'Carriers of V-LH among 1593 Baltic men have significantly higher serum LH'

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Maris Laan, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia St. 23, 51010 Tartu, Estonia.
E-mail: maris.laan@ut.ee

Keywords:

LHB gene, luteinizing hormone, testes volume, V-LH

Received: 13-Aug-2014

Revised: 15-Dec-2014

Accepted: 2-Feb-2015

doi:10.1111/andr.12022

'Carriers of V-LH among 1593 Baltic men have significantly higher serum LH'

¹A. M. Punab, ¹M. Grigorova, ²M. Punab, ¹M. Adler, ¹T. Kuura, ²O. Poolamets, ²V. Vihljajev, ³B. Žilaitienė, ⁴J. Erenpreiss, ³V. Matulevičius and ¹M. Laan

¹Human Molecular Genetics Research Group, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Tartu, Estonia, ²Andrology Unit, Tartu University Clinics, Tartu, Estonia, ³Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Institute of Endocrinology, Kaunas, Lithuania, and ⁴Andrology Laboratory, Riga Stradins University, Riga, Latvia

SUMMARY

Luteinizing hormone (LH) is a pituitary heterodimeric glycoprotein essential in male and female reproduction. Its functional polymorphic variant (V-LH) is determined by two missense mutations (rs1800447, A/G, Trp8Arg; rs34349826, A/G, Ile15Thr) in the LH β -subunit encoding gene (*LHB*; 19q13.3; 1111 bp; 3 exons). Among women, V-LH has been associated with higher circulating LH and reduced fertility, but the knowledge of its effect on male reproductive parameters has been inconclusive. The objective of this study was to assess the effect of V-LH on hormonal, seminal and testicular parameters in the Baltic young men cohort ($n = 986$; age: 20.1 ± 2.1 years) and Estonian idiopathic infertility patients ($n = 607$; 35.1 ± 5.9 years). V-LH was detected by genotyping of the underlying DNA polymorphisms using PCR-RFLP combined with resequencing of a random subset of subjects. Genetic associations were tested using linear regression under additive model and results were combined in meta-analysis. No significant difference was detected between young men and infertility patients for the V-LH allele frequency (11.0 vs. 9.3%, respectively). V-LH was associated with higher serum LH in both, the young men cohort ($p = 0.022$, allelic effect = 0.26 IU/L) and the idiopathic infertility group ($p = 0.008$, effect = 0.59 IU/L). In meta-analysis, the statistical significance was enhanced ($p = 0.0007$, resistant to Bonferroni correction for multiple testing; effect = 0.33 IU/L). The detected significant association of V-LH with increased serum LH remained unchanged after additional adjustment for the SNPs previously demonstrated to affect LH levels (*FSHB* -211G/T, *FSHR* Asn680Ser, *FSHR* -29A/G). Additionally, a suggestive trend for association with reduced testicular volume was observed among young men, and with lower serum FSH among infertility patients. The V-LH carrier status did not affect sperm parameters and other circulating reproductive hormones. For the first time, we show a conclusive contribution of V-LH to the natural variance in male serum LH levels. Its downstream clinical consequences are still to be learned.

INTRODUCTION

Luteinizing hormone (LH) is a pituitary-derived heterodimeric glycoprotein that shares the common α -subunit with FSH, hCG and TSH, but possesses a unique β -subunit conferring the biological specificity of LH (Pierce & Parsons, 1981; Gharib *et al.*, 1990). In both genders, LH is essential for reproduction and its action is mediated through binding to its receptors in testes and ovaries. In men, LH stimulates the production of testosterone by testicular Leydig cells. In women, LH triggers ovulation and the development of the corpus luteum to prepare the endometrium for an implantation (Moyle & Campbell, 1996).

A functional variant of LH (V-LH), first detected in Finland (Pettersson *et al.*, 1992) and Japan (Furui *et al.*, 1994), is determined by two missense mutations (Trp8Arg, Ile15Thr) in the gene coding for the LH β -subunit (*LHB*; 1111 bp; 3 exons; chr.

19q13.3) (Pettersson *et al.*, 1994). The two SNPs coding for V-LH (A->G, rs1800447; A->G, rs34349826) are located in the *LHB* exon 2 and exhibit complete linkage disequilibrium (LD) (Nilsson *et al.*, 1998). V-LH seems to be a universally common variant with the average minor allele frequency among Europeans 8% (range 7.34–11.8%; Huhtaniemi *et al.*, 2010). The change from isoleucine to threonine (Ile15Thr) creates an extra glycosylation site Asn¹³-Ala-Thr in V-LH compared to the wild-type (WT) LH (four vs. three oligosaccharide chains) (Suganuma *et al.*, 1996). As the half-life of pituitary gonadotropins depends on the number and type of oligosaccharide side chains (Morell *et al.*, 1971; Strott, 2002), V-LH is predicted to have an altered half-life in circulation. However, it is not certain whether the circulating V-LH has increased or decreased stability compared to WT-LH and the published data are also inconsistent concerning the half-life of

these hormone variants (Haavisto *et al.*, 1995; Suganuma *et al.*, 1996; Manna *et al.*, 2002; Wide *et al.*, 2010). In addition, the V-LH determining polymorphisms were reported to be in LD with a certain *LHB* promoter haplotype characterized by significantly higher basal transcriptional activity (Jiang *et al.*, 1999).

Although the V-LH was reported to possess an increased *in vitro* bioactivity (Manna *et al.*, 2002), most clinical observations suggest that V-LH is functionally less potent than WT-LH (Nagirnaja *et al.*, 2010). Case-control association studies in male patients have suggested V-LH as a risk factor for cryptorchidism (Kaleva *et al.*, 2005) and testicular cancer (Elkins *et al.*, 2003). A small-scale study ($n = 49$) investigating the onset and progression of puberty in healthy boys reported slower progression of puberty and lower testes volume in V-LH carriers (Raivio *et al.*, 1996). In a European cohort of middle-aged and elderly men (EMAS study; $n = 2748$ men, eight European countries), V-LH was associated with reduced levels of serum LH (Huhtaniemi *et al.*, 2010). In female patients, several studies have associated V-LH with subfertility because of ovulatory disorders (Furui *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1998, 1999; Du *et al.*, 2012). Among women, Du *et al.* (2012) showed an association of V-LH with higher levels of serum LH and Rajkhowa *et al.* (1995) has reported increased levels of testosterone, oestrogen and SHBG.

Taken together, the published studies are inconsistent regarding the effect of V-LH on serum LH levels and its downstream physiological consequences. One of the reasons might be that the majority of association studies with V-LH have been carried out on relatively small patient groups and for limited sets of clinical parameters (Nagirnaja *et al.*, 2010). In addition, most of the studies have determined V-LH using a technically demanding immunoassay-based approach, which measures the two alternative isoforms of LH. Only a handful of studies have used direct and robust detection of the two DNA variants underlying V-LH (A->G, rs1800447, Trp8Arg; A->G, rs34349826, Ile15Thr) either by sequencing or genotyping (Ramanujam *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2012). To overcome the limitations of previous studies, we explored for the first time the effect of V-LH on a comprehensive set of hormonal, seminal and testicular parameters in a large and well-characterized sample set consisting of the population-based Baltic young men cohort ($n = 986$) and the study group of Estonian idiopathic infertility patients ($n = 607$).

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The study has been approved by the Ethics Committee of Human Research of the University Clinic of Tartu, Estonia (approval date 27.01.2003), the Ethics Committee of Riga Stradins University, Latvia (23.04.2003) and the Regional Ethics Committee of Kaunas, Lithuania (approval no. 13, 2003).

The Baltic young male cohort

The Baltic young male cohort was recruited between May 2003 and June 2004 among the participants in a prospective study Environment and Reproductive Health (EU 5th FP project QLRT-2001-02911) in parallel at three study centres (Tartu, Estonia; Riga, Latvia; Kaunas, Lithuania). The study group consist of military conscripts from Estonia, Latvia and Lithuania (age: 20.1 ± 2.1 years; marital and parenthood status not

documented). The recruitment and phenotyping protocols at the participating centres were identical. Study participation was voluntary and written informed consent was obtained from all subjects. Details of the study group formation were described previously (Punab *et al.*, 2002). Men were recruited to the study at the Centre of Andrology, University Clinic of Tartu, Estonia ($n = 578$; all born and living in Estonia), at the Riga Family and Sexual Problems Centre, Latvia ($n = 300$; all born and living in Latvia) and at the specialized laboratory of the Institute of Endocrinology, Kaunas University of Medicine ($n = 326$; all born and living in Lithuania). In genetic association studies, cohort participants with clinical factors leading to strongly deviated reproductive physiology (lack of spermatozoa in ejaculate, i.e. azoospermia, $n = 2$; cryptorchidism, $n = 13$; abuse of anabolic steroids, $n = 1$; orchitis with unilateral testis damage, $n = 1$) or incomplete clinical data ($n = 9$), have been excluded. For the current study, DNA samples of a subset ($n = 192$) of the full cohort were unavailable for genotyping. The final number of Baltic young men analysed for the V-LH variant was 986 (Table 1A).

Estonian idiopathic infertility patients

The study group of oligozoospermic Estonian men with idiopathic infertility ($n = 750$) was recruited at the Andrology Centre, Tartu University Clinics between June 2003 and August 2008 and consisted of male partners of couples failing to conceive a child for a period of ≥ 12 months. Oligozoospermia was diagnosed according to the World Health Organization (WHO) criteria valid at the time of recruitment (sperm concentration < 20 mln/mL; World Health Organization, 1999). Phenotyping protocol was identical with that in Baltic young male cohort (Punab *et al.*, 2002); the details of the formation of the study group are described elsewhere (Punab, 2007). In brief, all study participants were of white European ancestry, born and living in Estonia. All men with causal factors for male factor infertility (obstruction, cryptorchidism, chromosomal abnormalities, Y chromosome deletions, hypogonadotropic hypogonadism, testicular diseases, sexual dysfunctions, androgen abuse, severe traumas and operation in genital area, chemo- and radiotherapy) were excluded from the analyses resulting in a study group consisting of 688 participants. For the current project, also patients with azoospermia, that is lack of spermatozoa in ejaculate, ($n = 47$) were additionally excluded from the genetic analysis. For the current study, DNA samples of a subset ($n = 34$) of the full cohort were unavailable for genotyping. The final number of analysed subjects successfully genotyped for V-LH was 607 (age: 35.1 ± 5.9 years). Among the included infertility patients (sperm concentration, < 20 mln/mL), 376 subjects also fulfilled the latest World Health Organization, 2010 criteria for oligozoospermia (sperm count below 39×10^6 /ejaculate; World Health Organization, 2010).

Hormone assays

For all participants of the study, venous blood was obtained from the cubital vein in the morning and serum was separated immediately. Serum sampling period for the Baltic cohort was from 08.00 to 13.00, and for the Estonian infertility patients from 08.00 to 11.00.

For the Baltic young men cohort, serum levels of FSH, LH and total testosterone were determined using time-resolved immunofluorometric assays (Delfia, Wallac, Turku, Finland), estradiol

Table 1 Characteristics of the study groups

Parameter	Baltic male cohort study group (n = 986)		Estonian idiopathic infertility group (n = 607)	
	Mean ± SD	Median (25–75th percentile)	Mean ± SD	Median (25–75th percentile)
A. General characteristics				
Age (years)	20.1 ± 2.1	19.8 (18.5–21.5)	35.1 ± 5.9	30.7 (27.1–34.9)
BMI	22.4 ± 2.6	22.1 (20.7–23.6)	26.8 ± 4.5 ^a	26.0 (23.7–29.3)
Abstinence period (hours)	107.7 ± 63.1	86.0 (63.0–134.0)	75.3 ± 44.8	72.0 (48.0–96.0)
Total testes volume (mL)	49.1 ± 10.4	50.0 (41.0–55.0)	40.2 ± 10.2	40.0 (34.0–47.0)
Sperm concentration (10 ⁶ /mL)	80.7 ± 72.1	63.3 (34.7–105.8)	8.0 ± 5.9	7.0 (2.6–13.0)
B. Genotyping data of V-LH (Trp8Arg, rs1800447)				
Allele frequencies, % (number of chromosomes)				
A	89.0 (1756)		90.7 (1101)	
G	11.0 (216)		9.3 (113)	
Genotype frequencies, % (number of genotype carriers) ^b				
A/A	79.1 (780)		82.4 (500)	
A/G	19.9 (196)		16.6 (101)	
G/G	1.0 (10)		1.0 (6)	
χ ² test			p = 0.27 ^c	

^aData for BMI available for 318 patients of the Estonian idiopathic infertility group. ^bHardy–Weinberg Equilibrium test in Baltic male cohort and Estonian idiopathic infertility group, $p = 0.55$ and $p = 0.72$, respectively. ^c p -value from Chi-squared test for differences in V-LH genotype distribution between Estonian idiopathic infertility group and Baltic male cohort.

by radioimmunoassay (Pantex, Santa Monica, CA, USA) and Inhibin B by a specific two-sided enzyme immunometric assay (Serotec, Oxford, UK) at the Department of Growth and Reproduction in Copenhagen, Rigshospitalet, Denmark in the framework of the Environment and Reproductive Health (EU 5th FP project QLRT-2001-02911). The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) for measurement of both FSH and LH were 3 and 4.5%, for total testosterone < 8 and < 5%, for estradiol 7.5 and 13% and for Inhibin B 15 and 18%, respectively.

For the Estonian idiopathic infertility patients, the FSH, LH, total testosterone and estradiol levels of blood serum were measured using the Immulite automated chemiluminescence immunoassay analyser (Immulite; Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA) according to manufacturer's instructions, at the United Laboratories, University of Tartu Clinics. The intra- and inter-assay CV were 4.2 and 8% for FSH; 4.0 and 7.1% for LH; 6.3 and 9.4% for testosterone; 7.5 and 13% for estradiol.

Semen analysis and physical examination

Semen samples were obtained by masturbation and all semen values were determined in accordance with the World Health Organization (WHO) criteria valid at the time of recruitment (World Health Organization, 1999). In brief, after ejaculation, the semen was incubated at 37°C for 30–40 min for liquefaction. Semen volume was estimated by weighing the collection tube with the semen sample and subsequently subtracting the predetermined weight of the empty tube assuming 1 g = 1 mL. For assessment of the sperm concentration, the samples were diluted in a solution of 0.6 mol/L NaHCO₃ and 0.4% (v/v) formaldehyde in distilled water. The sperm concentration was assessed using the improved Neubauer haemocytometers.

Patients were examined by clinical investigators who had passed special clinical training. Physical examination for the assessment of genital pathology and testicular size was performed with the man in standing position. If necessary, pathologies were clarified further with the men in supine position. The orchidometer (made of birch wood, Pharmacia & Upjohn, Denmark) was used for the assessment of testicular size. The total testes volume is the sum of right and left testicles.

Genotyping procedure and data

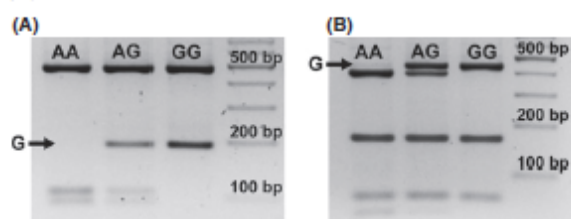
Genotyping by PCR – RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis was performed for screening *LHB* Trp8Arg (A->G, rs1800447; *Nco*I, WT-LH specific restriction-site) and Ile15Thr (A->G, rs34349826; *Bse*GI, V-LH specific restriction-site) polymorphisms according to the method described by Elter *et al.* (1999). All the 1593 study subjects were initially screened for the Trp8Arg polymorphism. The genotypes of the V-LH variant carriers (both heterozygotes and homozygotes) were confirmed by *Bse*GI, cutting specifically V-LH.

A 662 bp fragment in the *LHB* gene region containing the V-LH determining Trp8Arg and Ile15Thr polymorphisms was amplified using a published primer pair (forward: 5' GAAGC AGTGTCTTGTCCTCA C 3'; reverse: 5' GAAGAGGAGGCCTGAG AGTT 3'; Elter *et al.*, 1999). The PCR product was digested either by the *Nco*I (Trp8Arg; A->G) or by *Bse*GI (Ile15Thr; A->G) restriction enzymes (Thermo Scientific, US) and the restriction fragments were separated in 2.5% agarose gel and 0.5 X Tris-borate EDTA buffer. The *Nco*I digestion (Trp8Arg) of PCR products produced three DNA fragments (85 bp, 96 bp, 473 bp) corresponding to the A/A-genotype in WT-homozygotes, four fragments (85 bp, 96 bp, 185 bp, 473 bp) for the A/G-heterozygotes and two fragments referring to the G/G-genotype in V-LH homozygotes (185 bp and 473 bp; Fig. 1A). The *Bse*GI digestion (Ile15Thr) produced four DNA fragments (392 bp, 165 bp, 62 bp, 43 bp) in the A/A-homozygotes corresponding to WT-LH carriers, five fragments (436 bp, 392 bp, 165 bp, 62 bp, 43 bp) in the A/G-heterozygotes and three fragments (436 bp, 165 bp, 62 bp) for the G/G-genotype carriers referring to the V-LH homozygotes (Fig. 1B). As a further inner quality control, every tenth individual was subjected to direct sequencing to blindly verify the RFLP-based genotype detection. Sequencing analysis was performed as described by Hallast *et al.* (2005). There was no difference in the results of the three methods used for confirming V-LH status.

Data analysis

Mean, standard deviation, median and 25–75th percentiles were calculated for general characteristics (age, BMI, ejaculation abstinence period) and main outcome variables (hormonal and

Figure 1 Genotyping of the V-LH determining genetic variants Trp8Arg (A->G, rs1800447) and Ile15Thr (A->G, rs34349826) after amplification of the targeted LHB region (662 bp). (A) RFLP analysis with *NcoI* restriction enzyme detecting the alleles of rs1800447 (allele-specific RFLP bands are underlined): AA-homozygote, fragments 473, 96 and 85; GG-homozygote: fragments 473, and 185 bp. (B) RFLP analysis with *BseGI* restriction enzyme detecting the alleles of rs34349826 (allele-specific RFLP bands are underlined): AA-homozygote, fragments 392, 165, 62 and 43 bp; GG-homozygote: fragments 436, 165 and 62 bp. The black arrow points to the fragment characteristic to the LHB variant with the G-allele (V-LH), 'AG' lane indicated PCR-RFLP pattern from a heterozygote individual. Enzyme digested PCR products were separated on 2.5% agarose gel containing EtBr.



seminal variables, total testes volume) using PASW software Grad Pack 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Tests for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) of the genotyped SNPs and genetic association testing with male reproductive parameters were implemented in PLINK, version 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) (Purcell *et al.*, 2007). The natural log-transformation was used to obtain an approximate normal distribution of values for all studied quantitative parameters except free testosterone percentage. SNP-trait association tests were performed using linear regression, assuming an additive genetic model. In the Baltic cohort, regression testing was adjusted for age, BMI, smoking status, recruitment centre; hormone measurements were additionally corrected for blood sampling hour, and semen parameters were corrected for ejaculation abstinence period according to the analysis settings described previously (Table S1; Grigorova *et al.*, 2011). In the study group of Estonian idiopathic infertility patients, adjustment for age was applied for all parameters and abstinence period was used as an additional confounder in association tests with semen parameters. In an alternative test, we assessed the independent effect of V-LH in both study samples by incorporating additional genetic confounders to the applied regression models and adjusted the association test for the three SNPs (*FSHB* -211 G/T, rs10835638; *FSHR* -29 G/A, rs1394205; *FSHR* c.2039 A/G, rs6166) previously shown to modify reproductive parameters (Grigorova *et al.*, 2008, 2013, 2014). Results of association testing in the two study samples were combined in meta-analysis implemented in the meta package (Schwarzer, 2010, <http://CRAN.Rproject.org/package=meta>) developed for the statistical package R (<http://www.r-project.org>). Meta-analysis was based on inverse variance method under fixed effects model. The results of meta-analysis were subjected to Bonferroni correction for multiple testing with an estimated threshold $0.05/14 = 3.6 \times 10^{-3}$, taking into account the number of independent measurements (seven) and sample sets (two).

Statistical differences between the groups of V-LH carriers (G/G homozygotes and A/G-heterozygotes) and non-carriers (A/A-homozygotes) in hormonal, testicular and semen parameters

were assessed by the non-parametric Mann-Whitney *U*-test (PASW software Grad Pack 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

No enrichment of V-LH among male infertility patients

The Baltic young men cohort ($n = 986$, aged: 20.1 ± 2.1 years; Table 1A) and Estonian idiopathic infertility group ($n = 607$, aged: 35.1 ± 5.9 years; Table 1A) were genotyped for a common polymorphism (Trp8Arg; rs1800447, A->G) determining the V-LH isoform. All subjects carrying LH β Arg8 variant were confirmed to carry also Thr15 allele. The determined genotype frequencies were consistent with HWE in both study samples ($p > 0.5$). No significant difference was detected between young men and infertility patients for the V-LH allele frequency (1.1.0 vs. 9.3%, respectively; Table 1B).

Higher LH among the carriers of V-LH in both study samples

V-LH was associated with higher serum LH in both, the Baltic young men cohort (linear regression additive model: $p = 0.022$, allelic effect = 0.26 IU/L) and Estonian idiopathic infertility group ($p = 0.008$, effect = 0.59 IU/L) (Tables 2–3). In meta-analysis, the statistical significance was enhanced ($p = 0.0007$, resistant to Bonferroni correction for multiple testing; effect = 0.33 IU/L; Table 4). The increase in serum LH level among the V-LH carriers (AG+GG genotypes) compared to the WT-LH homozygotes (AA-genotype) in the infertility patient group (5.0 ± 2.3 vs. 4.2 ± 2.0 IU/L; Mann-Whitney *U*-test, $p = 0.00017$) was more pronounced compared to the young men cohort (4.2 ± 1.5 vs. 4.0 ± 1.7 IU/L; $p = 0.035$) (Fig. 2).

In the Baltic male cohort, a suggestive association was detected between V-LH and lower total testes volume (linear regression additive model: $p = 0.047$; allelic effect -1.47 mL; Table 2). Decreased serum FSH was observed among the V-LH carriers in the Estonian infertility patient group ($p = 0.018$; effect = -0.85 IU/L; Table 3). However, the meta-analysis across the two study samples did not provide conclusive support for these pilot observations. Serum total testosterone, estradiol, SHBG and sperm parameters were not associated with V-LH carrier status either in the separate analysis of the two study groups or in the combined meta-analysis.

Effect of V-LH on LH and total testes volume independent of other known genetic risk factors

To demonstrate the independent genetic effect of V-LH, linear regression analysis was performed with additional adjustment for the genotypes of the three SNPs (rs10835638, *FSHB* -211, G/T; rs6166, *FSHR*, Asn680Ser; rs1394205, *FSHR* -29, G/A) known to modify the levels of serum LH. The statistical significance (resistant to Bonferroni correction) and the effect of V-LH on serum LH level remained unchanged in the separate analysis of both study samples, as well as in the meta-analysis combining the obtained results (Tables 2–4).

DISCUSSION

In this study, a comprehensive set of hormonal, testicular and seminal parameters was analysed to elucidate the effect of V-LH in two large and well-characterized andrological samples – the Baltic cohort of young men and the Estonian male idiopathic infertility patient group. The carrier frequency of V-LH

Table 2 Male reproductive parameters in the Baltic young men cohort stratified by the V-LH (A->G) genotype

Parameter ^a	A/A (n = 780)	A/G (n = 196)	G/G (n = 10)	Standard cofactors ^b		Standard cofactors and genetic cofactors ^{b,c}	
				p-value	G-allele effect	p-value	G-allele effect
LH (IU/L)	4.0 ± 1.7	4.2 ± 1.5	4.5 ± 1.6	0.022	0.26 (0.11)	0.022	0.27 (0.11)
Total testosterone (nmol/L)	3.8 (2.8–4.9)	4.0 (3.1–5.0)	4.3 (3.1–5.6)	0.931	0.06 (0.65)	0.979	0.02 (0.65)
	27.5 ± 9.2	27.2 ± 9.0	30.3 ± 7.6				
Free testosterone (%)	26.6 (20.8–32.7)	26.1 (20.9–32.7)	28.3 (25.5–38.2)	0.287	−0.03 (0.03)	0.274	−0.03 (0.03)
	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.4				
Estradiol (pmol/L)	2.3 (2.0–2.6)	2.3 (2.0–2.6)	2.0 (1.9–2.5)	0.120	5.37 (3.42)	0.131	5.34 (3.49)
	92.9 ± 24.5	97.9 ± 28.0	92.0 ± 29.4				
SHBG (nmol/L)	89.0 (76.0–106.0)	94.0 (81.0–110.8)	90.0 (67.3–104.0)	0.314	0.91 (0.90)	0.298	0.95 (0.91)
	34.4 ± 14.3	34.6 ± 12.8	38.8 ± 10.4				
FSH (IU/L)	32.0 (25.0–41.0)	33.0 (25.3–43.0)	43.0 (29.5–46.0)	0.143	−0.14 (0.10)	0.258	−0.11 (0.10)
	3.1 ± 1.7	2.9 ± 1.5	3.6 ± 1.5				
Inhibin B (pg/mL)	2.8 (2.0–3.9)	2.6 (1.7–3.6)	3.7 (2.7–4.4)	0.218	−11.00 (9.36)	0.178	−12.24 (9.54)
	232.3 ± 78.3	215.4 ± 78.5	224.1 ± 63.7				
Total testes volume (mL)	223.0 (177.0–278.0)	208.5 (163.0–260.0)	214.5 (194.0–268.0)	0.047	−1.47 (0.76)	0.011	−1.88 (0.76)
	49.4 ± 10.6	48.0 ± 9.2	43.8 ± 8.2				
Total sperm count per ejaculate (× 10 ⁶)	50.0 (41.0–56.0)	49.5 (41.8–53.0)	43.0 (35.8–103.3)	0.223	−15.69 (14.01)	0.146	−18.84 (14.25)
	280.1 ± 275.2	236.6 ± 211.8	305.7 ± 231.6				
Sperm concentration (× 10 ⁶ /mL)	213.3 (105.2–362.8)	187.5 (86.9–321.1)	316.2 (215.1–423.7)	0.234	−4.46 (4.04)	0.155	−5.37 (4.11)
	82.9 ± 74.9	70.8 ± 59.8	103.6 ± 49.1				
Semen volume (mL)	65.9 (35.2–108.2)	58.3 (31.5–96.1)	115.8 (52.0–131.9)	0.784	−0.03 (0.12)	0.744	−0.04 (0.12)
	3.5 ± 1.6	3.4 ± 1.6	3.2 ± 0.9				
AB motile (%)	3.3 (2.3–4.5)	3.2 (2.3–4.5)	3.2 (2.5–4.0)	0.792	0.31 (1.19)	0.866	0.20 (1.20)
	57.0 ± 13.5	57.6 ± 13.5	56.0 ± 15.6				
	58.0 (50.0–66.0)	59.0 (49.0–67.3)	59.0 (47.0–68.0)				

^aData are presented as mean ± SD and median (25th to 75th percentile). ^bMarker trait association testing was performed using linear regression under additive model with the adjustment for age, BMI, smoking status and recruitment centre. Hormone measurements were additionally corrected for blood sampling hour and semen parameters were corrected for ejaculation abstinence period; nominal $p < 0.05$ has been highlighted in bold. ^cLinear regression model was additionally adjusted for *FSHR* rs10835638, *FSHR* rs6166 and rs1394205.

(heterozygotes and homozygotes) in the two study groups (20.9 and 17.6%, respectively. Table 1B) was concordant with the previous report on V-LH frequency among Estonians determined by the immunoassay-based isoform detection method (21.3%; Nilsson *et al.*, 1997). There was no difference in allele and genotype frequencies of V-LH between idiopathic infertility patients and a population-based cohort of young men, confirming previous studies (Ramanujam *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003). As the major result, we detected a convincing association between the V-LH carrier status and increased serum levels of LH in both study groups. Meta-analysis conclusively supported this evidence as the statistical significance was enhanced and reached a P -value resistant to Bonferroni correction for multiple testing (Tables 2–4; Fig. 2). We further demonstrated an independent effect of V-LH on circulating LH concentration by applying an additional adjustment of the analysis for the SNPs previously demonstrated to affect LH levels (Grigorova *et al.*, 2008, 2013, 2014).

There are several lines of published evidence supporting our study outcome. Considering that the profile of oligosaccharide side chains modulates the half-life of pituitary gonadotropins, there is a reason to believe that the Trp8Arg/Ile15Thr substitutions modify the effect of LH *in vivo* (Morell *et al.*, 1971; Strött, 2002). LH molecules with lower number of sulfonated and higher amount of sialic acid residues were reported to survive longer in the human circulation (Wide *et al.*, 2009). Compared to WT-LH, V-LH has higher number of sialic acid residues and indeed, its measured half-life is approximately 40% longer (half-life: WT-LH 108 min, V-LH 148 min; Wide *et al.*, 2010). The V-LH polymorphism was suggested to have originated through an ancient gene conversion event, where one of the hCGβ

encoding *CGB* genes has acted as a conversion donor and the *LHB* gene as an acceptor of the respective genomic fragment (Hallast *et al.*, 2005). The concerted substitutions in V-LH exon 2 leading to Trp8Arg/Ile15Thr correspond to the nucleotide sequence in the respective positions of all six *CGB* genes (Nag-irajaja *et al.*, 2010). Because of the Trp8Arg/Ile15Thr substitutions in the encoded LHβ subunit it resembles the more stable hCGβ and subsequently, the V-LH has a prolonged half-life compared to WT-LH. Additionally, V-LHβ has been associated with a promoter differing from WT-LHβ in eight nucleotide positions and exhibiting ~40% higher basal transcriptional activity (Jiang *et al.*, 1999). In concordance with these data, we report significantly higher serum level of LH in V-LH carriers among the young Baltic men and Estonian male infertility patients. Consistently, young female V-LH carriers were also measured increased LH ($n = 120$, age: 31.4 ± 3.6 years; Du *et al.*, 2012).

In contrast, in a cohort of middle-aged and elderly men ($n = 2748$; mean age: 60.2 ± 11.2 year) significantly lower serum LH levels among V-LH carriers compared to the WT-LH homozygotes were reported (Huhtaniemi *et al.*, 2010). During ageing, the changes in hormonal pattern gradually lead to primary testicular dysfunction with declining testosterone levels and an associated elevation of LH (Araujo & Wittert, 2011). We speculate that despite the higher basal activity, the V-LHβ promoter is unable to respond to the increased physiological requirement to the similar degree as the WT-LH promoter. In ageing men, the WT-LH homozygotes have increasing levels of serum LH, which is not the case for the V-LH carriers.

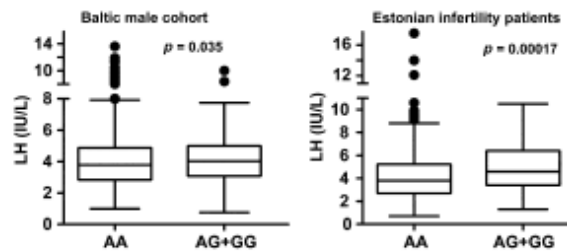
Our observation that V-LH shows a trend for association with lower testes volume among the young Baltic men is in

Table 3 Male reproductive parameters in the Estonian idiopathic infertility group stratified by the V-LH (A->G) genotype

Parameter ^a	A/A (n = 500)	A/G (n = 101)	G/G (n = 6)	Standard cofactors ^b		Standard cofactors and genetic cofactors ^{b,c}	
				p-value	G-allele effect	p-value	G-allele effect
LH (IU/L)	4.2 ± 2.0 3.8 (2.7–5.2)	5.1 ± 2.3 4.6 (3.6–6.4)	4.2 ± 3.0 3.2 (1.9–7.2)	0.008	0.59 (0.21)	0.009	0.60 (0.22)
Total testosterone (nmol/L)	18.6 ± 6.3 18.0 (14.0–22.0)	19.3 ± 6.3 18.7 (14.4–23.8)	16.5 ± 8.4 14.7 (9.1–24.3)	0.304	0.88 (0.85)	0.280	0.93 (0.86)
Estradiol (pmol/L)	101.1 ± 37.2 89.8 (73.4–116.0)	101.0 ± 41.5 84.5 (73.4–117.5)	106.8 ± 53.3 76.4 (73.0–156.0)	0.890	–0.33 (2.41)	0.915	–0.26 (2.43)
FSH (IU/L)	7.3 ± 6.0 5.6 (3.5–8.8)	6.2 ± 5.5 5.0 (3.4–7.0)	6.7 ± 5.8 4.2 (2.1–13.6)	0.018	–0.85 (0.41)	0.019	–0.84 (0.40)
Total testes volume (mL)	40.3 ± 10.2 40.0 (34.0–46.0)	39.7 ± 9.7 40.0 (33.5–47.0)	47.0 ± 9.9 47.0 (39.5–55.5)	0.635	–0.52 (1.11)	0.563	–0.64 (1.14)
Total sperm count per ejaculate (× 10 ⁶)	35.0 ± 31.2 27.0 (9.2–52.6)	34.3 ± 31.6 25.6 (9.5–53.4)	24.4 ± 21.9 14.6 (7.2–49.9)	0.331	–2.18 (2.56)	0.303	–2.33 (2.59)
Sperm concentration (10 ⁶ /mL)	8.1 ± 5.9 7.2 (2.6–13.0)	8.1 ± 5.9 7.0 (2.6–13.0)	5.1 ± 4.2 3.9 (1.5–9.2)	0.557	–0.29 (0.53)	0.503	–0.33 (0.54)
Semen volume (mL)	4.3 ± 1.8 3.9 (3.0–5.3)	4.1 ± 1.7 4.0 (3.0–5.3)	4.6 ± 1.3 4.2 (3.7–5.7)	0.531	–0.11 (0.19)	0.597	–0.10 (0.19)

^aData are presented as mean ± SD and median (25th to 75th percentile). ^bMarker trait association testing was performed using linear regression under additive model with the adjustment for age; semen parameters were additionally corrected for the ejaculation abstinence period; nominal $p < 0.05$ has been highlighted in bold. ^cLinear regression model was additionally adjusted for *FSHB* rs10835638, *FSHR* rs6166 and rs1394205.

Figure 2 Tukey boxplots for the distribution of serum LH values in the Baltic young men cohort (AA, n = 780, AG+GG, n = 206) and in the Estonian idiopathic infertility patient sample (AA, n = 500, AG+GG, n = 107) sub-grouped according to the carrier status of the V-LH variant (rs1800447, G-allele). p-value of Mann-Whitney U-test is shown.



concordance with the few conducted clinical studies showing lower in vivo potency of V-LH compared to WT-LH. The association between V-LH and reduced testes volume has been previously reported in a small study (49 boys) on pubertal onset and progression, where V-LH carriers additionally exhibited slower pubertal progression and growth rate (Raivio *et al.*, 1996).

Another study reported increased prevalence of V-LH among cryptorchid boys born with gestational age > 40 weeks and suggested that the lower hormonal efficacy of V-LH predisposes for improper testicular descent in late pregnancy (Kaleva *et al.*, 2005). However, as the effect in total testes volume was found only in the young male cohort, it needs to be confirmed in further studies. The same applies to the pilot observation of lower FSH among the V-LH carriers in the Estonian infertility patient group, which may also represent a chance finding as a result of a severely altered reproductive physiology in these patients.

In summary, this study demonstrates for the first time a conclusive contribution of V-LH to the natural variance in male serum LH levels. Its downstream clinical consequences are still to be learned.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML, MP, MG and AMP conceived and designed the experiments. AMP, MA and TK performed the experiments. AMP, MG and ML analysed the data. ML and MP contributed reagents/materials/analysis tools. AMP, ML and MP wrote the manuscript. MP, OP, VV, BŽ, JE and VM contributed to recruitment and clinical phenotyping of patients. MG, MA, OP, VV, BŽ, JE,

Table 4 Results of meta-analysis across the Baltic male cohort and Estonian infertility group

Parameter	Standard cofactors		Standard cofactors and genetic cofactors	
	p-value	G-allele effect	p-value	G-allele effect
LH (IU/L)	0.0007*	0.33 (0.10)	0.0006*	0.34 (0.10)
Total testosterone (nmol/L)	0.483	0.36 (0.52)	0.499	0.35 (0.52)
Estradiol (pmol/L)	0.428	1.56 (1.97)	0.432	1.57 (1.99)
FSH (IU/L)	0.064	–0.18 (0.10)	0.115	–0.15 (0.10)
Total testes volume (mL)	0.063	–1.17 (0.63)	0.018	–1.50 (0.63)
Total sperm count per ejaculate (× 10 ⁶)	0.299	–2.62 (2.52)	0.262	–2.86 (2.55)
Sperm concentration (10 ⁶ /mL)	0.493	–0.36 (0.53)	0.438	–0.42 (0.54)
Semen volume (mL)	0.603	–0.05 (0.10)	0.574	–0.06 (0.10)

Nominal $p < 0.05$ has been highlighted in bold. *Significant after Bonferroni correction for multiple testing; $\alpha = 0.05/14 = 3.6 \times 10^{-3}$ (7 independent measurements in two samples).

VM and TK were involved in critical commenting of the data and manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to the participants of the study. Niels Jørgensen is thanked for the assistance in the recruitment of study participants and Piret Kelgo for laboratory assistance in DNA extractions. The recruitment of the Baltic male cohort was financed by European Union 5th Framework project QLRT-2001-02911 (MP, BŽ, JE). The genetic research has been financed by Estonian Ministry of Education and Science Core Grant SF0180022s12, Wellcome Trust International Senior Research Fellowship (070191/Z/03/A) in Biomedical Science in Central Europe and Estonian Science Foundation Grant ETF9030 (to ML); by Estonian Research Council project PUT181 (to MP) and by the European Union through the European Regional Development Fund, project HAPPY PREGNANCY, no. 3.2.0701.12-0047 (to ML, MP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Araujo AB & Wittert GA. (2011) Endocrinology of the aging male. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(2), 303–319.
- Berger K, Billerbeck AEC, Costa EMF, Carvalho LS, Amhold IJP & Mendonca BB. (2005) Frequency of the allelic variant (Trp8Arg/Ile15Thr) of the luteinizing hormone gene in a Brazilian cohort of healthy subjects and in patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Clinics* 60(6), 461–464.
- Du JW, Xu KY, Fang LY & Qi XL. (2012) Association between mutations of the luteinizing hormone β subunit and female infertility. *Mol Med Rep* 5(2), 473–476.
- Elkins DA, Yokomizo A, Thibodeau SN, Schaid DJ, Cunningham JM, Marks A, Christensen E, McDonnell SK, Slager S, Peterson BJ, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Tindall DJ & Liu W. (2003) Luteinizing hormone β polymorphism and risk of familial and sporadic prostate cancer. *Prostate* 56(1), 30–36.
- Elter K, Erel CT, Cine N, Ozbek U, Hacıhanefioglu B & Ertunçalp E. (1999) Role of the mutations Trp8 \rightarrow Arg and Ile15 \rightarrow Thr of the human luteinizing hormone β -subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 71(3), 425–430.
- Furuji K, Suganuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T & Tomoda Y. (1994) Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 78(1), 107–111.
- Gharib SD, Wieman ME, Shupnik MA & Chin WW. (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11, 177–199.
- Grigorova M, Punab M, Ausmees K & Laan M. (2008) FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod* 23(9), 2160–2166.
- Grigorova M, Punab M, Žilaitienė B, Erenpreiss J, Ausmees K, Matulevičius V, Tsarev I, Jørgensen N & Laan M. (2011) Genetically determined dosage of follicle-stimulating hormone (FSH) affects male reproductive parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 96(9), E1534–E1541.
- Grigorova M, Punab M, Poolamets O, Sõber S, Vihljajev V, Žilaitienė B, Erenpreiss J, Matulevičius V, Tsarev I & Laan M. (2013) Study in 1790 Baltic men: FSHR Asn680Ser polymorphism affects total testes volume. *Andrology* 1(2), 293–300.
- Grigorova M, Punab M, Punab AM, Poolamets O, Vihljajev V, Žilaitienė B, Erenpreiss J, Matulevičius V & Laan M. (2014) Reproductive physiology in young men is cumulatively affected by FSH-action modulating genetic variants: FSHR -29G/A and c.2039 A/G, FSHB -211G/T. *PLoS ONE* 9(4), e94244.
- Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, Virkamäki A & Huhtaniemi I. (1995) Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 80(4), 1257–1263.
- Hallast P, Nagirnaja L, Margus T & Laan M. (2005) Segmental duplications and gene conversion: human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin β gene cluster. *Genome Res* 15(11), 1535–1546.
- Huhtaniemi IT, Pye SR, Holliday KL, Thomson W, O'Neill TW & Platt RW, Payne D, John SL, Jiang M, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Finn JD, Forti G, Giverrman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Labrie F & Wu FC. European Male Aging Study Group (2010) Effect of polymorphisms in selected genes involved in pituitary-testicular function on reproductive hormones and phenotype in aging men. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(4), 1898–1908.
- Jiang M, Pakarinen P, Zhang FP, El-Hefnawy T, Koskmiies P, Pettersson K & Huhtaniemi I. (1999) A common polymorphic allele of the human luteinizing hormone β -Subunit gene: additional mutations and differential function of the promoter sequence. *Hum Mol Genet* 8(11), 2037–2046.
- Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, Main K, Skakkebaek NE, Huhtaniemi I, Irjala K & Toppari J. (2005) Does variant luteinizing hormone (V-LH) predispose to improper testicular position in late pregnancy? *Pediatr Res* 58, 447–450.
- Lee S, Kim NK, Kim HJ, Lee SH, Jeong HJ & Cha KY. (2003) Genetic analysis of three polymorphic sites of the luteinizing hormone β -subunit gene in infertile Korean men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 79(3), 517–521.
- Manna PR, Joshi L, Reinhold VN, Aubert ML, Suganuma N, Pettersson K & Huhtaniemi I. (2002) Synthesis, purification and structural and functional characterization of recombinant form of a common genetic variant of human luteinizing hormone. *Hum Mol Genet* 11(3), 301–315.
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J & Ashwell G. (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246(5), 1461–1467.
- Moyle WR & Campbell RK. (1996) Gonadotropins. In: *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology* (eds EY Adashi, JA Rock & Z Rosenwaks), pp. 683–724. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Nagimaja L, Rull K, Uusküla L, Hallast P, Grigorova M & Laan M. (2010) Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci. *Mol Cell Endocrinol* 329(1), 4–16.
- Nilsson C, Pettersson K, Millar RP, Coerver KA, Matzuk MM & Huhtaniemi IT. (1997) Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. *Fertil Steril* 67(6), 998–1004.
- Nilsson C, Jiang M, Pettersson K, Iitää A, Mäkelä M, Simonsen H, Easteal S, Herrera RJ & Huhtaniemi I. (1998) Determination of a common genetic variant of luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassays. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49(3), 369–376.
- Pettersson K, Ding YQ & Huhtaniemi I. (1992) An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 74(1), 164–171.
- Pettersson K, Mäkelä MM, Dahlén P, Lamminen T, Huoponen K & Huhtaniemi I. (1994) Gene polymorphism found in the LH beta gene of an immunologically anomalous variant of human luteinizing hormone. *Eur J Endocrinol* 130(Suppl2), S17.

- Pierce JG & Parsons TF. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochem* 50, 465–495.
- Punab M (2007) Male fertility and its risk factors in Estonia. PhD thesis, University of Tartu Press, Tartu, pp. 25–28. (<http://hdl.handle.net/10062/2885>)
- Punab M, Žilaitienė B, Jørgensen N, Horte A, Matulevičius V, Peetsalu A & Skakkebaek NE. (2002) Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int J Androl* 25, 243–252.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ & Sham PC. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559–575.
- Raivio T, Huhtaniemi I, Anttila R, Siimes MA, Hagenäs L, Nilsson C, Pettersson K & Dunkel L. (1996) The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9), 3278–3282.
- Rajkhowa M, Talbot JA, Jones PW, Pettersson K, Haavisto AM, Huhtaniemi I & Clayton RN. (1995) Prevalence of an immunological LH β -subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43(3), 297–303.
- Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC & Ng SC. (2000) Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility. *Hum Reprod* 15(4), 925–928.
- Strott CA. (2002) Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* 23(5), 703–732.
- Suganuma M, Funai K, Kikkawa F, Tomoda Y & Furuhashi M. (1996) Effects of mutations (Trp 8 Arg and Ile15 Thr) in human luteinizing hormone (LH) β -subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo. *Endocrinology* 137(3), 831–838.
- Takahashi K, Kurioka H, Ozaki T, Kanasaki H, Kohsaka M, Miyazaki K & Karino K. (1998) Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients. *Hum Reprod* 13(12), 3338–3344.
- Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H & Miyazaki K. (1999) Increased prevalence of luteinizing hormone β -subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 71(1), 96–101.
- Wide L, Eriksson K, Sluss PM & Hall JE. (2009) Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. *J Clin Endocrinol Metab* 94(3), 958–964.
- Wide L, Eriksson K, Sluss PM & Hall JE. (2010) The common genetic variant of luteinizing hormone has a longer serum half-life than the wild type in heterozygous women. *The J Clin Endocrinol Metab* 95(1), 383–389.
- World Health Organization. (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge.
- World Health Organization. (2010) *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn. World Health Organization, Geneva.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Potential confounders incorporated in genetic tests: age, BMI, ejaculation, blood sampling hour.

11. Lihtlitsents

Mina, Tiina Kuura (sünnikuupäev: 23.04.1992),

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Variantse luteiniseeriva hormooni mõju meeste viljakusele ja luteiniseeriva hormooni tasemele“, mille juhendaja on Marina Grigorova, PhD.,
 - a. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - b. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu kuni 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.

Tartu, 24.05.2015