

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kati Hensen

**Enneaegse munasarjade puudulikkusega seotud DNA koopiaarvu variatsioonide
tuvastamine Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonoritel**

Magistritöö

Juhendaja prof Ants Kurg

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	7
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. ENNEAEGNE MUNASARJADE PUUDULIKKUS	8
1.2. POF-I TEKKIMISE PÕHJUSED	8
1.2.1. Turneri sündroom	9
1.2.2. X-kromosoomi trisoomia.....	10
1.2.3. X-kromosoomi ümberkorraldused.....	10
1.2.4. POF-iga seotud geenid X-kromosoomis	11
1.2.4.1. <i>FMR1</i>	11
1.2.4.2. <i>FMR2</i>	12
1.2.4.3. <i>BMP15</i>	12
1.2.4.4. <i>DACH2</i>	13
1.2.5. POF-iga seotud geenid autosoomides	13
1.2.5.1. <i>LH</i> ja <i>LHCGR</i>	13
1.2.5.2. <i>FSHR</i>	14
1.2.5.3. <i>ESR1</i> ja <i>ESR2</i>	14
1.2.5.4. <i>INHA</i>	15
1.2.5.5. <i>NR5A1</i>	15
1.2.5.6. <i>FOXL2</i>	16
1.2.5.7. <i>FOXO3</i>	16
1.2.5.8. <i>TGFBR3</i>	17
1.2.6. POF-iga seotud metaboolsed häired	17
1.2.6.1. Galaktoseemia	17
1.2.6.2. Glükosüülimise defekt 1a.....	18
1.2.6.3. 17-alfahüdroksülaasi defitsiit.....	18
1.2.6.4. Aromataasi defitsiit	19
1.2.7. POF-iga seotud autoimmuunhaigused.....	19
1.2.8. POF-iga seotud viirushaigused.....	21
1.2.9. Iatogeensed POF-i põhjused.....	21
1.2.10. Elustiiliga seotud POF-i põhjused	22
1.3. POF-I TAGAJÄRJED	23

1.3.1.	Munasarjade vananemise hindamine.....	23
1.3.2.	POF-i diagnoosimine.....	24
1.4.	POF-I RAVI.....	25
1.4.1.	Hormoonasendusravi.....	25
1.4.2.	Viljatuse ravi.....	25
1.4.3.	Psühholoogiline nõustamine.....	26
1.5.	DNA KOOPIAARVU VARIATSIOONID JA POF.....	27
1.5.1.	DNA Koopiaarvu variatsioonide uurimine.....	27
1.5.2.	POF-iga seostatud DNA koopiaarvu variatsioonid.....	28
2.	EKSPERIMENTAALNE OSA.....	30
2.1.	TÖÖ EESMÄRGID.....	30
2.2.	MATERJALID JA MEETODID.....	31
2.2.1.	Valim.....	31
2.2.2.	Mikrokiibianalüüs.....	31
2.2.3.	Genotüüpiseerimistulemuste analüüs.....	32
2.2.4.	CNV-de tõlgendamine.....	32
2.2.5.	CNV-de kinnitamine kvantitatiivse PCR-i abil.....	33
2.2.6.	Võrdlus kontrollpopulatsiooniga.....	34
2.3.	TULEMUSED.....	34
2.4.	ARUTELU.....	36
	KOKKUVÕTE.....	40
	SUMMARY.....	41
	TÄNUAVALDUSED.....	42
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	43
	KASUTATUD INTERNETIALLIKAD.....	62
	LISA 1. UURITUD DOONORITE FENOTÜÜBID.....	63
	LISA 2. PRAIMERITE JÄRJESTUSED.....	64
	LIHTLITSENTS.....	65

KASUTATUD LÜHENDID

17OHD	17-alfahüdroksülaasi defitsiit (<i>17-hydroxylase deficiency</i>)
AMH	anti-Mülleri hormoon (<i>antimüllerian hormone</i>)
AMOTL1	(<i>angiomin like 1</i>)
BAF	alleelide intensiivsuste suhe (<i>B allele frequency</i>)
BMP15	luu morfogeneesi valk 15 (<i>bone morphogenetic protein 15</i>)
BPES	blefarofimoos-ptosis-epikantus inversus sündroom (<i>blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome</i>)
CNV	DNA koopiaarvu variatsioon (<i>DNA copy-number variation</i>)
CYP17A1	tsütokroom P450 17A1 (<i>cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1</i>)
CYP19A1	aromataas ehk tsütokroom P450 19A1 (<i>cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>)
DACH2	(<i>dachshund family transcription factor 2</i>)
ESR1	östrogeeni retseptor 1 (<i>estrogen receptor 1</i>)
ESR2	östrogeeni retseptor 2 (<i>estrogen receptor 2</i>)
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon (<i>follicle stimulating hormone</i>)
FMR1	fragiilse X-i intellektipuude geen 1 (<i>Fragile X mental retardation 1</i>)
FMR2	fragiilse X-i intellektipuude geen 2 (<i>Fragile X mental retardation 2</i>)
FOXL2	(<i>forkhead box L2</i>)
FOXO3	(<i>forkhead box O3</i>)
GALT	galaktoos-1-fosfaat uridüültransferaas (<i>galactose-1-phosphate uridylyl-transferase</i>)
GnRH	gonadotropiini vabastav hormoon (<i>gonadotrophin-releasing hormone</i>)

GnRHa	gonadotropiini vabastava hormooni agonist (<i>gonadotrophin-releasing hormone agonist</i>)
GWAS	ülegenoomne assotsiatsiooni-uuring (<i>genome-wide association study</i>)
INHA	inhibiin A (<i>inhibin alpha</i>)
INHB	inhibiin B (<i>inhibin beta</i>)
IVF	<i>in vitro</i> viljastamine (<i>in vitro fertilization</i>)
KMI	kehamassiindeks (<i>body mass index</i>)
LH	luteiniseeriv hormoon (<i>luteinizing hormone</i>)
LHCGR	luteiniseeriva hormooni retseptor (<i>luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor</i>)
LRR	signaalide intensiivsuste logaritmline suhe (<i>log R ratio</i>)
NR5A1	tuuma retseptor 5A1 (<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i>)
PIWIL4	piwi-laadne RNA-vahendatud geeni vaigistamine 4 (<i>piwi-like RNA-mediated gene silencing 4</i>)
PMM2	fosfomannomutaas 2 (<i>phosphomannomutase 2</i>)
POF	enneaegne munasarjade puudulikkus (<i>premature ovarian failure</i>)
POI	primaarne munasarjade puudulikkus (<i>primary ovarian insufficiency</i>)
qPCR	kvantitatiivne PCR (<i>quantitative PCR</i>)
SLC26A4	(<i>solute carrier family 26, member 4</i>)
SNTG2	süntropiin gamma 2 (<i>syntrophin, gamma 2</i>)
TG	türoglobuliin (<i>thyroglobulin</i>)
TGFβ	transformeeriv kasvufaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TGFBR3	transformeeriv kasvufaktor β retseptor 3 (<i>transforming growth factor, beta receptor 3</i>)
TPO	kilpnäärme peroksidaas (<i>thyroid peroxidase</i>)

TS	Turneri sündroom (<i>Turner's syndrome</i>)
TSHR	kilpnääret stimuleeriva hormooni retseptor (<i>thyroid stimulating hormone receptor</i>)
TÜ EGV	Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (<i>Estonian Genome Center of the University of Tartu</i>)

SISSEJUHATUS

Enneaegne munasarjade puudulikkus (POF, *premature ovarian failure*) on üks olulisemaid naiste viljatuse põhjuseid. See on muutumas suureks probleemiks, sest naised lükkavad laste saamist aina kõrgemasse vanusesse. POF-i tekke põhjused on väga heterogeensed ja suures osas veel teadmata. Praeguseks on POF-iga seostatud kromosomaalseid ja geneetilisi muutusi, metaboolseid häireid, autoimmuun- ja viirushaiguseid ning ravimitest ja keskkonnast tingitud viljatuse põhjustajaid. Mõningaid POF-i sümptomeid on võimalik hormoonasendusraviga leevendada, kuid viljakust enamasti taastada ei suudeta. Seetõttu on oluline luua võimalusi POF-i väljakujunemise riski hindamiseks juba noortele naistele, et neil oleks võimalik teha informeeritud otsuseid oma pere planeerimise kohta.

Traditsiooniliselt on POF-i põhjuste otsimisel kasutatud kariotüüpiseerimist, et detekteerida X-kromosoomi aneuploidiaid ja suuremaid genoomseid ümberkorraldusi. Tänapäeval on kasutusse võetud DNA mikrokiibid, mis võimaldavad SNP markerite abil määrata ka submikroskoopilisi DNA koopiaarvu variatsioone (CNV, *copy number variation*). Nii saab analüüsida palju patsiente lühikese aja jooksul ja tuvastada POF-i kandidaatpiirkondi. DNA mikrokiipidega on leitud juba mitmeid CNV-sid ja nendes asuvaid gene, millel võib olla roll POF-i väljakujunemises.

Käeoleva magistritöö esimeses osas antakse ülevaade POF-i tekkimise põhjustest, tagajärgedest ja ravivõimalustest ning tutvustatakse DNA mikrokiipe kui POF-iga seotud CNV-de tuvastamise meetodit. Töö teise osa eesmärgiks on DNA mikrokiipide abil tuvastada enneaegse menopausiga naistel esinevaid genoomi ümberkorraldusi, mis võiksid põhjustada POF-i. Lisaks teadaolevatele põhjustele otsitakse ka uusi POF-i kandidaatpiirkondi ja –gene.

Käesolev töö on valminud ühe osana Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Biotehnoloogia õppetooli prof Ants Kure töörühma ning AS Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus koostööprojektist, mis keskendub POF-i geneetilistele põhjustele ning haigusseoseliste CNV-de ja geenide leidmisele Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonoritel.

Märksõnad: enneaegne munasarjade puudulikkus, POF, CNV

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. ENNEAEGNE MUNASARJADE PUUDULIKKUS

Loomulik menopaus algab naistel keskmiselt 51-aastaselt, kuid umbes 1%-l naistest juba enne 40. eluaastat (Coulam *et al.*, 1986). Enneaegne munasarjade puudulikkus (POF, *premature ovarian failure*) tähendab vähemalt neli kuud kestnud amenorröad ehk menstruatsiooni puudumist alla 40-aastastel naistel. Sellega kaasneb kõrgeenenud folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja madal östradiooli tase. POF-iga on paralleelselt kasutuses ka termin primaarne munasarjade puudulikkus (POI, *primary ovarian insufficiency*). Mitmed autorid vaidlevad nende terminite korrektsuse ja tähenduse üle, kuid kuna haiguse nimetuses ei ole konsensuseni jõutud, kasutatakse käesolevas töös enimlevinud nimetust POF (Shelling, 2010). Kui naisel ei ole menstruaaltsüklid kunagi alanudki, nimetatakse seda primaarseks amenorröaks, kui aga on alanud normaalses vanuses, kuid enne 40. eluaastat vähemalt neljaks kuuks katkenud, siis sekundaarseks amenorröaks (Timmreck ja Reindollar, 2003).

POF-i tagajärgedeks on hüpoöstrogeenism ja viljatus. Hüpoöstrogeenism põhjustab osteoporoosi, südame- ja veresoonkonna haiguseid ning neurodegeneratiivseid haiguseid, kuid neid on võimalik hormoonasendusraviga leevendada. Viljatust praegu ravida ei osata, mistõttu keskendutakse POF-i avastamisele võimalikult varajases eas, et riskigrupi naistel oleks soovi korral võimalik viljastuda noorena (Persani *et al.*, 2010). POF on naiste viljatuse põhjuseks umbes 10%-l juhtudel (Lindstrand *et al.*, 2008).

1.2. POF-I TEKKIMISE PÕHJUSED

Embrüogeneesi ajal on munasarjas umbes seitse miljonit primordiaalselt folliikulit, millest enamused läbi atreesia, ning sünni ajaks jääb neid alles üks kuni kaks miljonit (Markstrom *et al.*, 2002). Lapseeas atreesia aeglustub ja menarhe ehk menstruatsioonide algusajaks on alles 300-400 tuhat primordiaalselt folliikulit (te Velde ja Pearson, 2002). Viljaka ea jooksul ovuleerub vaid 400-500 munarakku. POF-i peamiseks põhjuseks on vähenenud embrüonaalsete primordiaalsete folliikulite hulk, kuid seda võivad tekitada ka kiirenenud atreesia või häired munarakkude küpsemisel. Primordiaalsete folliikulite hulk võib väheneda paljude faktorite tõttu: kromosomaalsed, geneetilised, autoimmuunsed, metaboolsed,

infektsioonilised ja ravimitekkelised (Goswami ja Conway, 2005). Umbes veerand POF-i juhtumeid saab seostada vähiraviga, kuid 50-65% juhtumite korral ei ole POF-i tekkimise põhjus teada (Persani *et al.*, 2010; Luisi *et al.*, 2015). Võib eeldada, et paljud POF-i juhtumid on geneetiliselt päritolu, kuna need esinevad tihti perekondades (Cordts *et al.*, 2011).

1.2.1. Turneri sündroom

Turneri sündroom (TS) on täielik või osaline X-kromosoomi monosoomia, mis esineb 1:2500 vastsündinud tüdrukul (Sybert ja McCauley, 2004). Umbes pooltel juhtumitel on tegemist täieliku monosoomiaga, ülejäänud juhtudel mosaiiksuse või X-kromosoomi ümberkorraldustega, mis põhjustavad patsiendil kergemat fenotüüpi (Bharath *et al.*, 2010). Haiguse fenotüübiks on lühike kasv, ülekaal, nahavolt kaelal, madalal paiknevad kõrvad ja juuksepiir, südame ja neerude anomaaliad ning gonaadide düsgenees (Persani *et al.*, 2009). 46,XX kariotüübiga naistel toimub ühe X-kromosoomi inaktivatsioon, kuid mitmed geenid pääsevad inaktiveerumisest, kuna need on vajalikud X-kromosoomi normaalseks funktsioneerimiseks (Zinn ja Ross, 1998).

TS-ga naistel toimub munarakkude atreesia kiiremini ja folliikulid võivad degenerereeruda juba sündimise ajaks. Seda võivad põhjustada doositundlikud X-kromosoomi geenid, mis on vajalikud normaalseks oogeneesiks, kuid tegemist võib olla ka meioosihäirega, mis on tingitud paardumata X-kromosoomist. Histoloogilised uuringud näitavad, et probleemseks kohaks on diploteeni ootsütide kaasamine folliikulitesse, mistõttu ei toimu täielike folliikulite valmimist (Loughlin *et al.*, 1991; Pouresmaeili ja Fazeli, 2014).

Täieliku TS korral on patsiendi FSH tase juba imikueas vastav postmenopausaalsele tasemele, kuid mosaiikse TS-ga patsientidel on FSH tase madalam kui täieliku TS-i korral (Hagen *et al.*, 2010). Seetõttu toimub umbes 10%-l täieliku TS-i ja 40%-l mosaiikse TS-i patsientidel spontaanselt menarhe ning on ka juhtumeid, kus nii täieliku kui osalise TS-ga naised loomulikult rasestuvad ja sünnitavad terveid lapsi (Livadas *et al.*, 2005; Bondy, 2014).

Tsütogeneetiliste analüüsidega on leitud 2,6 Mb suurune regioon, mis on statistiliselt seotud nii TS-i kui POF-iga. See regioon, Xp11.2-p22.1, on identne X- ja Y-kromosoomidel ning selles piirkonnas paiknevad geenid jäävad X-inaktivatsiooni järel aktiivseks, mistõttu võib arvata, et nende geenide mõlemad alleelid on organismi normaalse arengu jaoks vajalikud (Kosho *et al.*, 1999; Fortuno ja Labarta, 2014).

1.2.2. X-kromosoomi trisoomia

X-kromosoomi trisoomia (47,XXX) on levinud aneuploidia, mis esineb 1:1000 vastsündinud tüdrukust. Kõige enam on levinud 47,XXX kariotüüp, kuid 10% patsientidel esineb mosaiiksust 46,XX/47,XXX või 47,XXX/48XXXX või koos TS-ga 45,X/47XXX või 45,X/46,XX/47XXX (Nielsen ja Wohlert, 1990). Haiguse fenotüübiks on pikk kasv, õpiraskused, kõnehäired, käitumisprobleemid, krambihood, urogenitaaltrakti ebanormaalsused ja POF, kuid paljudel juhtudel haigusnähud ei avaldu ning trisoomia jääb diagnoosimata (Nielsen ja Wohlert, 1990; Tartaglia *et al.*, 2010).

Kuigi X-kromosoomi trisoomiaga naistel toimub seksuaalne areng normaalselt, on osadel neist diagnoositud POF. Enne POF-i avaldumist on enamus trisoomiaga naisi võimelised rasestuma, kuid raseduse jooksul esineb palju komplikatsioone ning umbes ainult pooled rasedused lõppevad terve lapse sünniga. Suuremaid uuringuid X-kromosoomi trisoomia ja POF-i seoste vahel ei ole tehtud, kuid POF-i patsiente uurides on leitud, et 3,8%-l neist on ka X-kromosoomi trisoomia. Arvatakse, et POF-i põhjustab inaktivatsioonist pääsevate geenide üleekspressioon ja 47,XXX-ga seotud autoimmuunhaigused, kuid sarnaselt TS-le võib paardumata X-kromosoom põhjustada meiosisihäireid (Goswami *et al.*, 2003; Tartaglia *et al.*, 2010).

1.2.3. X-kromosoomi ümberkorraldused

POF-iga seotud deletsioonid X-kromosoomis paiknevad nii lühikeses (Xp11.2-p22.1) kui pikas (Xq13-q27) õlas. Kõige sagedamini on deletsioone leitud regioonidest Xq21.3–Xq27 ja Xq13.3–Xq21.1, mida nimetatakse ka POF-i kriitilisteks regioonideks, vastavalt POF1 ja POF2 (Tachdjian *et al.*, 2008; Knauff *et al.*, 2011; Fortuno ja Labarta, 2014). Deletsiooni paiknemise kohta distaalses või proksimaalses osas on andmed vastukäivad, seetõttu ei saa asukoha järgi deletsiooni mõju usaldusväärselt hinnata (Simpson ja Rajkovic, 1999; Yachelevich *et al.*, 2011). Küll aga on lühikese õla deletsioone seostatud pigem primaarse amenorröaga ja pika õla deletsioone nii primaarse kui sekundaarse amenorröaga (Sybert ja McCauley, 2004). Deletsioonide mõju on tõenäoliselt sarnane TS-le, kus doositundlike geenide ühe alleeli kadumisel ei saa munasarjad normaalselt areneda või funktsioneerida (Pouresmaeili ja Fazeli, 2014).

Nii X-kromosoomi sisesed kui X:autosoom translokatsioonid võivad põhjustada POF-i. Sarnaselt deletsioonidele toimuvad ka translokatsioonid väga sageli X-kromosoomi pikas õlas, eriti regioonis Xq21 (Rizzolio *et al.*, 2006). Translokatsioonide roll POF-i tekkimisel ei ole täpselt teada, kuid on välja pakutud, et a) geeni sattumisel vale regulatoorse elemendi mõjuvälja ei ekspresseeru see õigel tasemel või b) meioosi käigus tekib valepaardumine, mis käivitab DNA kahjustuse kontrollpunkti mehhanismi (Hernando *et al.*, 2004; Ochalski *et al.*, 2011).

X-isokromosoom tekib siis, kui tsentromeer poolitub vales tasapinnas ja tulemuseks on kromosoomid, millel on identsed õlad. Enim on levinud kahe pika õlaga X-isokromosoom koos normaalse X-kromosoomiga (46,X,i(Xq)). Sellistel patsientidel on TS-i fenotüüp ja tavaliselt ka POF (Young, 2010; Akbas, 2012).

1.2.4. POF-iga seotud geenid X-kromosoomis

Molekulaarsete uuringute ja transgeensete loomudelite katsete tulemusena on leitud mitmeid gene, mis on tõenäoliselt olulised POF-i tekkimises. Siiski esineb nendes geenides mutatsioone vaid umbes 10% POF-i patsientidel ning kuna nende täpne funktsioon ei ole teada, ei kasutata neid ka POF-i geneetilise markeritena (Harris *et al.*, 2002; Goswami ja Conway, 2005).

1.2.4.1. FMRI

FMRI (*Fragile X mental retardation 1*) geen asub regioonis Xq27.3 ja on seotud fragiilse X-i sündroomiga. Tervetel indiviididel on *FMRI* geenis kuni 55, premutatsiooni korral 55-200 ja haigetel üle 200 CGG korduse. On näidatud, et 15-25%-l premutatsiooniga naistest esineb POF, kuid täismutatsiooniga naiste seas on POF-i sagedus sama, mis üldpopulatsioonis (Sullivan *et al.*, 2011; Gleicher *et al.*, 2012). Tosh *et al.* tegid hiljuti suure metaanalüüsi, kus uuriti *FMRI* premutatsiooni ja POF-i seost päritolust sõltuvalt, ning leidsid tugeva seose Euroopa päritolu naistel, mis näitab et *FMRI* premutatsiooni esinemine Euroopa populatsioonis tõstab POF-i riski (Tosh *et al.*, 2014). POF-i tekkemehhanism *FMRI* kaudu ei ole täpselt teada, kuid arvatakse, et folliikulite dünaamika kiireneb ja nad vananevad kiiremini (Sullivan *et al.*, 2005; Willemsen *et al.*, 2011).

1.2.4.2. FMR2

FMR2 (*Fragile X mental retardation 2*) geen asub regioonis Xq28, 600kb *FMR1*-st distaalsemalt. Sarnaselt *FMR1*-ga paikneb ka *FMR2*-s trinukleotiidsete korduste blokk, mis suurtes kordustes rikub antud geeni normaalse funktsiooni ning põhjustab vaimse arengu mahajäämust. Osadelt POF-iga naistelt on leitud deletsioon *FMR2* geeni oletatava transkriptsioonisaidi lähedal. On võimalik, et deletsioonid selles piirkonnas põhjustavad transkriptsiooni termineerimist või suunavad kasutusse alternatiivse start-saidi, tekitades seeläbi ebatüüpilisi *FMR2* transkripte. Arvatakse, et *FMR2* osaleb RNA alternatiivse splaissingu regulatsioonis, kuid POF-i väljakujunemise mehhanism *FMR2* mutatsioonide korral pole teada (Murray *et al.*, 1999; Cordts *et al.*, 2011).

1.2.4.3. BMP15

BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*) geen asub regioonis Xp11.2 ja kuulub TGF β (*transforming growth factor β*) superperekonda, mis vastutab embrüonaalse arengu jooksul mitmete protsesside eest (Hogan, 1996). *BMP15* ekspresseerub ainult ootsüütides ning stimuleerib granuloosarakkude proliferatsiooni ja follikulogeneesi, ennetab ootsüütide apoptoosi ja reguleerib ovulatsiooni (Persani *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013). POF-iga naiste *BMP15* geenist on leitud mitmeid SNP-e ja deletsioone. Need mutatsioonid takistavad *BMP15* valgu posttranslatsioonilist protsessimist, mistõttu on tema kontsentratsioon organismis madal. Sellest tulenevalt esineb lühike kõrgeenenud viljakusega periood, millele järgneb munarakkude reservi vähenemine ja võib välja kujuneda POF (Inagaki ja Shimasaki, 2010; Li *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015).

Lisaks on *BMP15* üks nendest geenidest, mis X-inaktivatsiooni järel jääb aktiivseks, mistõttu võib arvata, et mõlemad geenikoopiad on normaalseks arenguks vajalikud. Duplikatsioonid ja deletsioonid selles piirkonnas võivad mõjutada *BMP15* ekspressiooni taset, mis omakorda mõjutab viljakust (Goswami ja Conway, 2005). *BMP15* mutatsioone on seostatud nii primaarse kui sekundaarse amenorröaga ning on POF-i põhjuseks kuni 15%-l naistest (Persani *et al.*, 2011).

1.2.4.4. DACH2

DACH2 (*dachshund family transcription factor 2*) geen asub regioonis Xq21.3 (POF-i kriitilises regioonis POF1) ja on oluline raku saatuse määramisel. Bione *et al.* uurisid Itaalia POF-i patsiente ja leidsid *DACH2* kodeerivast osast viis aminohapet muutvat SNP-i. Neid SNP-i allelele leidus ka kontrollgrupil, kuid oluliselt vähem, mistõttu järeldati, et iga üksik geenivariant POF-i ei põhjusta, küll aga on mitme riskialleeliga indiviidi POF-i haigestumise tõenäosus suurem (Bione *et al.*, 2004). Lisaks on POF-iga naistel leitud translokatsioon, mis katkestab *DACH2* geeni. *DACH2* täpne roll POF-i kujunemisel ei ole teada (Prueitt *et al.*, 2002).

1.2.5. POF-iga seotud geenid autosoomides

1.2.5.1. LH ja LHCGR

Luteiniseeriv hormoon (LH, *luteinizing hormone*) on heterodimeerne glükoproteiin, millel on oluline roll progesterooni ja teiste steroidhormoonide tootmisel ning ootsütide küpsemisel. Lisaks on see vajalik ovulatsiooni toimumiseks ja folliikulite luteiniseerimiseks, mis omakorda põhjustab androgeenide tootmist, mis on substraadiks östradioli sünteesiks munasarjades. Ebanormaalne LH sekretsioon põhjustab enneaegset ootsütide küpsemist, menstruaalhäireid, polütsüstiliste munasarjade sündroomi, raseduse katkemist ja viljatust (Jeppesen *et al.*, 2012).

LH β -subühikut kodeeriv geen paikneb regioonis 19q13.32 ning selles on leitud mitmeid POF-iga seostatud mutatsioone. Laialdaselt on levinud mutatsioon valgu positsioonis 102, glütsiini asendus seriiniga, mille kõrvalahel on polaarne ja takistab hüdrofoobsete interaktsioonide teket. Tõenäoliselt takistab see LH korrektse konformatsiooni teket ja normaalset toimimist. See põhjustab viljatust nii meestel kui naistel (Ramanujam *et al.*, 1999; Ramanujam *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2012).

LH retseptori (*LHCGR*, *luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*) geen asub regioonis 2p21. Mutatsioonid selles geenis põhjustavad retseptori väiksemat aktiivsust ning selle tulemuseks on amenorröa ja viljatust (Knauff *et al.*, 2009; Jeppesen *et al.*, 2012).

1.2.5.2. *FSHR*

FSH koos LH-ga reguleerivad folliikulit ümbritsevate teekarakkude östradioli ja progesterooni tootmist. *FSHR* (*follicle stimulating hormone receptor*) geen asub regioonis 2p21. Mutatsioonid *FSHR*-is võivad mõjutada tema afiinsust FSH-le või takistada signaaliraja aktivatsiooni (Sundblad *et al.*, 2004; Piersma *et al.*, 2007).

Hiired, kellel on muteerunud *FSHR* geen, on steriilsed, sest nende follikulogenees on blokeeritud. Kui selliste hiirte munasarja süstida *FSHR*-i ekspresseerivat adenoviirusvektorit, taastub nende follikulogenees ja võime toota östrogeneeni (Ghadami *et al.*, 2010).

Inimestel on *FSHR* geenis leitud erinevaid mutatsioone, mis on seotud viljatusega. Mitmes Soome perekonnas leidub üks konkreetne retsessiivne mutatsioon (C566T → Ala189Val), mis vähendab oluliselt *FSHR* vastust FSH-le ning seetõttu primordiaalsete folliikulite areng peatub (Aittomaki *et al.*, 1995). Seda mutatsiooni on hetkel leitud vaid Soome populatsioonis, kuid ka mujal maailmas on avastatud *FSHR* geeni variante, mida on seostatud viljatusega (Pu *et al.*, 2014).

1.2.5.3. *ESR1 ja ESR2*

Inimese organismis leidub kahte tüüpi östrogeneeni retseptoreid: östrogeneeni retseptor alfa, mille geen *ESR1* (*estrogen receptor 1*) paikneb regioonis 6q25.1, ja östrogeneeni retseptor beeta, mille geen *ESR2* (*estrogen receptor 2*) paikneb regioonis 14q23.2 (Walter *et al.*, 1985; Mosselman *et al.*, 1996). Nendes geenides leiduvaid polümorfisme on seostatud ebanormaalse hormoonide tasemega, loomuliku menopausi algusega ja menarhe vanusega (Kolibianakis *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

ESR1 geen sisaldab kahte POF-iga seostatud SNP-i, A351G (rs9340799) ja T397C (rs2234693), ja promootoris paikneb varieeruva pikkusega (TA)-kordus (Syrrou *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2010; Cordts *et al.*, 2012). Syrrou *et al.* leidsid, et POF-i patsientidel on üldpopulatsiooniga võrreldes väga madal (TA)-korduste arv, kuid hiljem näitasid Bretherick *et al.* vastupidist korrelatsiooni, kus POF-iga seostati just kõrget (TA)-korduste arvu (Syrrou *et al.*, 1999; Bretherick *et al.*, 2008). *ESR1* promootor on väga keerulise organisatsiooniga, sisaldades mitut start-saiti ja alternatiivseid splaiss-saite. (TA)-korduse pikkus võib mõjutada alternatiivse promootori kasutamist, mille tulemuseks on sobimatu *ESR1* produktsioon osades kudedes (Bretherick *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2010).

1.2.5.4. *INHA*

Inhibiiniid on dimeersed glükoproteiinid, mida toodetakse peamiselt gonaadides. Inhibiin A (INHA) ja B (INHB) on aktiivsed menstruaaltsükli erinevates faasides. INHA (mille geen asub regioonis 2q35) tase tõuseb tsükli keskel, kui seda toodab preovulatoorne folliikul, ja uuesti luteaalses faasis, kui seda toodab kollaskeha. INHB (mille geen asub regioonis 2q13) tase on kõrge tsükli keskel. Nende ülesandeks on reguleerida FSH sekretsiooni, et tagada korrapärane küpse folliikuli ovulatsioon (Groome *et al.*, 1996; Messinis *et al.*, 2014).

Santoro *et al.* näitasid, et mutatsioonid *INHA* geenis põhjustavad inhibiini tasemele langust, mis koos kõrge aktiivse A tasemega põhjustavad kõrget FSH taset. See omakorda kiirendab munarakkude reservi vähenemist. Kui FSH tase tõuseb menopausieelsele tasemele, võib patsiendil välja kujuneda POF (Santoro *et al.*, 1999; Cordts *et al.*, 2011). On leitud mitmeid *INHA* geeni polümorfisme, mida on seostatud POF-iga, ja oleks võimalik kasutada POF-i geneetilise markerina (Dixit *et al.*, 2004; Rah *et al.*, 2014).

1.2.5.5. *NR5A1*

NR5A1 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*) geen asub regioonis 9q33 ja on vajalik gonaadide arenguks. Granuloosa-spetsiifilised *NR5A1 knock-out*-hiired on steriilsed, neil on vähem folliikuleid, puudub kollaskeha ja esinevad hemorraagilised tsüstid. See viitab, et *NR5A1* on munasarjas kindlasti vaja, tõenäoliselt östrogeeni tootmisel. Seetõttu võivad mutatsioonid *NR5A1* geenis tõsiselt häirida steroidhormoonide sünteesi ning tagajärjena põhjustada POF-i ja mitmeid teisi suguhormoonide häiretega seotud haigusi (Jeyasuria *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2010).

Mitmed uuringud on leidnud erinevaid *NR5A1* mutatsioone, mis põhjustavad naistel POF-i ja meestel azospermiat (spermide puudumine ejakulaadis) ja testiste arengu häireid (Camats *et al.*, 2012; Philibert *et al.*, 2013; Safari *et al.*, 2014). Harrison *et al.* uurisid perekondliku soo arengu häirete, hüpospaadia ja POF-iga patsiente ning leidsid ühes perekonnas mikrodeletsiooni, mis hõlmab *NR5A1* geeni, mis tõenäoliselt põhjustas haigusliku fenotüübi nii mehel kui naisel. Siiski nentisid autorid, et *NR5A1* deletsioonid on väga haruldased, kuid neid tasuks kindlasti uurida, kui fenotüüp ei ole tingitud klassikalistest põhjustest (Harrison *et al.*, 2013).

1.2.5.6. FOXL2

FOXL2 (*forkhead box L2*) geen asub regioonis 3q23. *FOXL2* on väga konserveerunud transkriptsioonifaktor ning seda ekspresseeritakse silmalaugudes ja munasarjades. Mutatsioonid selles geenis põhjustavad I tüüpi blefarofimoos-ptoos-epikantus inversus sündroomi (BPES) (OMIM 110100), mis lisaks silmahaigustele põhjustab ka POF-i (Pisarska *et al.*, 2004).

FOXL2 *knock-out*-hiirte munasarjades granuloosarakud ei diferentseeru. See viib nende primordiaalsete folliikulite enneaegsele aktiveerumisele ja põhjustab folliikulite atreesiat (Schmidt *et al.*, 2004). Kirjeldatud on üle 260 *FOXL2* mutatsiooni, millest umbes 100 asuvad kodeerivas regioonis. BPES kujuneb välja ka heterosügootse mutatsiooni korral, kuna selle ekspressioonitase on ebanormaalne ning see tekitab häireid granuloosarakkude diferentseerumises ja folliikulite küpsemises. Kuigi valdavalt kujuneb POF välja koos BPES-ga, on kirjeldatud ka patsiente, kellel on *FOXL2*-e mutatsioonist põhjustatud POF, kui BPES-i ei ole (Laissue *et al.*, 2009; Pisarska *et al.*, 2010; Caburet *et al.*, 2012).

1.2.5.7. FOXO3

FOXO3 (*forkhead box O3*) geen asub regioonis 6q21. *FOXO3* on transkriptsioonifaktor, mis ekspresseerub munasarjades ja on oluline selle arengus ja funktsioneerimises (Watkins *et al.*, 2006). *FOXO3* *knock-out*-hiired on steriilsed. Nende folliikulid, mis sisaldavad munarakku, aktiveeritakse tunduvalt varem ja laiemalt, kui normaalsetes hiirtes. Kui folliikul aktiveeritakse, hakkab see küpsema ning sellel on piiratud eluiga. Seetõttu sureb enamus munarakke juba väga varakult ära ja hiirtel tekib POF (Castrillon *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2008). Watkins *et al.* uurisid *FOXO3* geeni POF-iga naistel. Nad leidsid kaks statistiliselt olulist mutatsiooni (C1262T ja G1517A), mis põhjustavad aminohappe muutust (vastavalt Ser421Leu ja Arg506His) ja võivad seetõttu olla POF-i kujunemisel olulised (Watkins *et al.*, 2006).

1.2.5.8. TGFBR3

TGFBR3 (*transforming growth factor, beta receptor 3*) geen asub regioonis 1p33-32 (Hempel *et al.*, 2008). TGF β superperekonna valgud (näiteks INHA ja BMP15) osalevad embrüo gonaadide arengus ja follikulogeneesis ning nende funktsionaalset mitmekesisust aitavad suurendada koretseptorid, näiteks TGFBR3. Kuna missenssmutatsioonid *INHA* ja *BMP15* geenis põhjustavad POF-i, on tõenäoline, et ka mutatsioonid nende valkude retseptoris võivad seda teha (Dixit *et al.*, 2006; Persani *et al.*, 2011; Rah *et al.*, 2014).

INHA inhibeerib FSH tootmist ja sekretsiooni hüpofüüsis, mis on vajalik munasarjade normaalseks funktsioneerimiseks. Seetõttu, kui INHA aktiivsus on maha surutud, vananevad folliikulid kiiremini ning võib välja kujuneda POF (Welt *et al.*, 2005). INHA afiinsus TGFBR3-le on väga suur võrreldes alternatiivsete retseptoritega ja seetõttu on TGFBR3 aktiivni ja BMP signaalsiooni mahasurumisel väga oluline. *TGFBR3 knock-out*-hiired on väga madala elulemusega – ainult 0,3% embrüotest lõpeb elussünniga. Need, kes ellu jäid, olid madalama viljakusega, kuid muidu terved (Stenvers *et al.*, 2003). Ka POF-iga naistelt on mitmes uuringus leitud *TGFBR3* mutatsioone, mistõttu on see kindlasti üks POF-i kandidaatgeen (Dixit *et al.*, 2006; Chand *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012).

1.2.6. POF-iga seotud metaboolsed häired

1.2.6.1. Galaktoseemia

Galaktoos-1-fosfaat uridüültransferaasi puudulikkus ehk galaktoseemia (OMIM 230400) on põhjustatud regioonis 9p13 asuva *GALT* (*galactose-1-phosphate uridylyltransferase*) geeni defektist. Juba imikueas hakkab galaktoos toksilistes kogustes kuhjuma ja see põhjustab silma-, neeru- ja maksakahjustusi. Kui patsient juba noorena ravi ei saa, tekib tal lisaks ka intellektipuue (Kaufman *et al.*, 1981). 70-80%-l galaktoseemiaga naistest kujuneb välja POF (Guerrero *et al.*, 2000; Dixit *et al.*, 2010).

Galaktoseemia patsientidel on *GALT* geenis kirjeldatud üle 150 mutatsiooni. Kõige laialdasemalt on levinud mutatsioon, mis põhjustab *GALT* valgus Gln188Arg asendust. See põhjustab umbes 70% galaktoseemia juhtudest (Guerrero *et al.*, 2000). Elsas *et al.* uurisid erinevaid *GALT* valgu mutatsioone ja leidsid, et just Gln188Arg on homosügootses olekus korrelatsioonis nii POF-i esinemise kui ka üldiselt raskema haigusfenotüübiga (Elsas *et al.*,

1995). Sarnaseid uuringuid on ka hiljem tehtud ning leitud, et ka osadel heterosügootse Gln188Arg mutatsiooniga naistest esines POF. Teiste mutatsioonidega galaktoseemia patsientide seas ei leitud ühtegi POF-i juhtumit (Guerrero *et al.*, 2000; Gubbels *et al.*, 2008).

1.2.6.2. Glükosüülimise defekt 1a

Glükosüülimise defekt 1a-d (OMIM 212065) põhjustavad regioonis 16p13 asuva *PMM2* (*phosphomannomutase 2*) geeni mutatsioonid. Defektse fosfomannomutaasi tõttu ei saa mannoos-6-fosfaati konverteerida mannoos-1-fosfaadiks ning selle kuhjumisel tekivad neuroloogilised probleemid, näiteks tasakaaluhäired, hüperrefleksia, madal vererõhk ja epilepsia, intellektipuue, raskematel juhtudel suudavad patsiendid liikuda ainult ratastoolis või on voodihaiged. Tegemist on väga raske haigusega, mida on väliselt kerge ära tunda düsmorfse näo ja kõrvade, selgrookõveruse ja puudulike motoorsete oskuste järgi. Esimese eluaasta jooksul on suremus 20% ning haigust hetkel ravida ei osata (Bjursell *et al.*, 1997; Kjaergaard *et al.*, 2001).

Kuna haigus avaldub enamasti juba enne esimest eluaastat, tehakse enamus uuringuid laste kohta. Kuid siiski on mõned tehtud ka täiskasvanutega ning on leitud, et kõigil naistel, kellel on glükosüülimise defekt 1a, kujunes välja POF, välja arvatud ühel 28-aastaselt naisel, kellel uuringu hetkel oli veel normaalne menstruaaltsükkel. Haigusest mõjutatud meeste viljakus on normaalne. POF-i tekkimise molekulaarne mehhanism ei ole teada (Stibler *et al.*, 1994; Kjaergaard *et al.*, 2001; Perez-Duenas *et al.*, 2009; Monin *et al.*, 2014).

1.2.6.3. 17-alfahüdroksülaasi defitsiit

17-alfahüdroksülaasi defitsiit (17OHD, *17-hydroxylase deficiency*, OMIM 202110) on põhjustatud regioonis 10q24.3 asuva *CYP17A1* (*cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1*) geeni mutatsioonidest. Kui organismis on 17-alfahüdroksülaas puudulik, ei saa 17-alfahüdroksüprogesterooni konverteerida 11-desoksükortisooliks ega androsteendiooniks, mis on prekursoriteks kortisooli, androstenediooni, testosterooni ja östrogeenide sünteesile (Yanase, 1995). Haiguse sümptomiteks on kõrge vererõhk, kaaliumivaegus, primaarne amenorröa ja sekundaarsete sugutunnuste arengupeatetus (Marsh ja Auchus, 2014).

Kirjeldatud on üle 100 *CYP17A1* mutatsiooni geeni erinevates asukohtades. Kergemate mutatsioonide puhul säilib ensüümi aktiivsus kuni 40% ulatuses, kuid enamuse puhul ei suuda see enam üldse katalüüsi läbi viia. Selle tulemusena ei sünteesita organismis enam androgeene ega östrogeene ning sekundaarsed sugutunnused jäävad nii naistel kui meestel täiesti välja arenemata. Osalise 17OHD puhul toimub küll mõningane sugutunnuste areng, kuid naistel esineb siiski primaarne või sekundaarne amenorröa (Miura *et al.*, 1996; Taniyama *et al.*, 2005; Marsh ja Auchus, 2014). Kuigi 17OHD patsientide organism ise suguhormoone ei sünteesi, on nende gonaadid siiski tundlikud eksogeensetele hormoonidele. Siiani on olnud üks juhtum, kus osalise 17OHD-ga naisele tehti *in vitro* viljastamine (IVF, *in vitro fertilization*) koos hormoonraviga raseduse säilitamiseks ning ta sünnitas elusad kolmikud. Rohkem elussünde 17OHD patsientidel raporteeritud ei ole (Levrant *et al.*, 2003).

1.2.6.4. Aromataasi defitsiit

Aromataasi geen *CYP19A1* (*cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1*) paikneb regioonis 15q21.1. Aromataas asub samuti suguhormoonide sünteesi rajal, kuid tema funktsiooniks on androgeenide aromatiseerimine, mille tulemuseks on östrogeenid ja progesteroonid (Morishima *et al.*, 1995).

Aromataasi mutatsioonide korral östrogeene ei toodeta ning see häirib tugevalt naiste väliste sugutunnuste arengut. Sündides on nad tihti ebaselgete suguorganitega. Juba varajases lapsepõlves tekivad neil munasarjade tsüstid, mis takistavad tulevikus ovulatsiooni. Enamusel patsientidest ei arene puberteedieas välja sekundaarseid sugutunnuseid ega toimu ka menarhe. Liigsetest androgeenidest tingituna tekib tihti akne ja hirsutism. Eksogeensete östrogeenidega on võimalik sümptomeid leevendada ning osadel juhtudel tekib ka menstruaaltsükkel. Meespatsientidel esinevad kergemad sümptomid, näiteks vähenenud spemide produktsioon või väikesed ja laskumata testised (Morishima *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 2012; Cox ja Liu, 2014; Marino *et al.*, 2015).

1.2.7. POF-iga seotud autoimmuunhaigused

POF-i juhtumitest 10-55% saab erinevate uuringute andmetel seostada autoimmuunhaigustega, nendest tavalisemad on krooniline kilpnäärmepõletik, kilpnäärme alatalitus,

kõrvakilpnäärme alatalitus, Addisoni tõbi, tüüp I diabeet, kuiva silma sündroom, müasteenia (*myasthenia gravis*), reumatoidne artriit, süsteemne erütematoosne luupus ja kaasasündinud hüpotüreos (Hoek *et al.*, 1997; Goswami ja Conway, 2005; link 1).

Kilpnäärmehaiguseid on seostatud menstruaalhäirete ja raseduse katkemisega (Poppe ja Glinoe, 2003; Abalovich *et al.*, 2007). Kilpnäärme hormoonid mõjutavad otseselt LH ja FSH biosünteesi ja selle kaudu granuloosarakke, kollaskeha ja ootsüüte, mistõttu kilpnäärme ületalitus põhjustab ovulatoorseid häireid (Bals-Pratsch *et al.*, 1997; Cecconi *et al.*, 1999). Kilpnäärme alatalitus võib munasarju mõjutada kaudselt, kuna see vähendab suguhormoonide sidumisaktiivsust, suurendab prolaktiinide taset ja aeglustab LH vastust gonadotropiini vabastavale hormoonile (GnRH) (Cecconi *et al.*, 1999; Col *et al.*, 2004). Kilpnäärme hormoonide retseptoreid on leitud inimese ootsütides, kus nad koos LH ja FSH-ga stimuleerivad granuloosarakkude funktsioone (näiteks progesterooni tootmist) ja trofoblastide diferentseerumist (Wakim *et al.*, 1993).

15-20% kilpnäärmehaigustest on põhjustatud defektidest kilpnäärme hormoonide sünteesiradades (Knobel ja Medeiros-Neto, 2003). Kõige tihedamini põhjustavad neid mutatsioonid *TPO* (*thyroid peroxidase*) geenis, aga ka *SLC26A4* (*solute carrier family 26, member 4*), *TG* (*thyroglobulin*) ja *TSHR* (*thyroid stimulating hormone receptor*) geenides (Niu *et al.*, 2002; Dossena *et al.*, 2011). *TPO* geen paikneb regioonis 2p25 (Endo *et al.*, 1995). *TPO* katalüüsib türoglobuliini türosiini jäägi reaktsiooni joodiga, mille tagajärjel tekivad kilpnäärme hormoonid (Ruf ja Carayon, 2006). Mutatsioonid selles geenis põhjustavad täielikku joodi organifikatsiooni defekti, mille puhul üle 80% kilpnäärmes olevast joodist ei suudeta siduda kilpnäärme hormoonidega (Niu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2010). Kirjeldatud on üle 60 *TPO* mutatsiooni, millest enamus on retsessiivse loomuga (Ris-Stalpers ja Bikker, 2010).

Lisaks on kirjeldatud autoantikehade tekkimist teekarakkude vastu. Kui immuunsüsteem hakkab hävitama teekarakke, tekib munasarjapõletik, millega kaasneb inhibiinide kontsentratsiooni tõus. Inhibiinide ebanormaalne tase mõjutab ka FSH-d, mis omakorda reguleerib östradioli ja progesterooni tootmist. Seega võib teekarakkude ründamine oluliselt takistada folliikulite küpsemist ja menstruaaltsükli regulatsiooni (La Marca *et al.*, 2010).

1.2.8. POF-iga seotud viirushaigused

Viirushaigustest on POF-iga otseselt seostatud mumpsu ning AIDS-i. Mumpsiga kaasneb umbes 5%-l naistest munasarjapõletik, mille tagajärjeks on tihti viljatus (Senanayake, 2008). AIDS-i puhul ei ole kindlalt teada, kas POF-i põhjustab haigus ise või selle vastased ravimid. Ohl *et al.* uurisid 78 HIV-positiivset POF-iga naist ning leidsid, et 63%-l neist on vähenenud antraalsete folliikulite hulk ja ebanormaalselt kõrge INHB (57%), FSH (36%) ja anti-Mülleri hormooni (23%) tase. Hormonaalseid muutusi on võimalik detekteerida enne POF-i väljakujunemist, mistõttu tuleks neid naisi pidevalt jälgida, et nad saaksid vajadusel hormoonasendusravi (Ohl *et al.*, 2010).

1.2.9. Iatogeensed POF-i põhjused

Paljudel juhtudel võib POF-i põhjustada kasvajate ravi, eriti keemia- ja kiiritusravi. Kuna vähiravimid on suunatud peatama mitmeid rakuprotsesse ja rakkude proliferatsiooni, võivad nad lisaks põhjustada folliikulite apoptoosi. Kõige rohkem saavad kahjustada juba küpsed folliikulid (Clowse *et al.*, 2009). *Vinca* alkaloidid, antratsükliin ja antimetaboliidid on väikese toksilisusega, kuid alküleerivad ained tekitavad DNA-sse kaheaheelalisi katkeid ning on seetõttu väga ohtlikud. Need ained põhjustavad POF-i umbes 40%-l keemiaravi saanud naistest ning POF-i tekkimise risk tõuseb koos vanusega (Oktem ja Oktay, 2007; Fleischer *et al.*, 2011; Soleimani *et al.*, 2011; Bedoschi *et al.*, 2013). Kuna noorematel patsientidel on suur primordiaalsete folliikulite reserv, siis nende menstruaaltsükkel taastub tavaliselt 3-6 kuuga, kuid see ei garanteeri viljastumisvõimelisust (Letourneau *et al.*, 2012).

Otsene kiiritus vaagnapiirkonnale põhjustab samuti folliikulite atreesiat. Ka kaitsevahenditega on POF-i keeruline ennetada, sest munasarjad on kiiritusele äärmiselt tundlikud. Mõnikord liigutatakse munasarju kirurgiliselt vaagnapiirkonnast eemale, et neid kiirituse eest kaitsta, kuid viljakuse taastamiseks on vaja mitmeid abistavaid protseduure (Loren *et al.*, 2013; Cox ja Liu, 2014). Ka muud vaagnapiirkonna operatsioonid, mis ei ole vähiga seotud, võivad põhjustada põletikke ja häirida munasarjade verevarustust. Selle tagajärjel võib välja kujuneda ajutine amenorröa või POF (Amato ja Roberts, 2001; Ebrahimi ja Akbari Asbagh, 2011; Wang *et al.*, 2015).

1.2.10. Elustiiliga seotud POF-i põhjused

Lisaks geneetilistele ja haiguslikele põhjustele võib POF-i tekkida tingituna naise eluviisidest. On tehtud hulgaliselt uuringuid hindamaks kehakaalu, kehamassiindeksi (KMI), suitsetamise ja alkoholi tarbimise mõju naise viljakusele, kuid nende tulemused on omavahel vastuolulised.

Mitmed uuringud leidsid, et suitsetamine põhjustab munasarjade kiiremat vananemist ja varasemat menopausi (Harlow ja Signorello, 2000; Chang *et al.*, 2007). Lisaks on suitsetamist seotud ka kõrgeenenud FSH tasemega (Cramer *et al.*, 2002; Kinney *et al.*, 2007) ja madala östrogeeni tasemega (Westhoff *et al.*, 1996). Kolm teadlaste rühma uurisid seost suitsetamise ja INHB taseme vahel. Kaks neist ei leidnud seost (Freeman *et al.*, 2005; Kinney *et al.*, 2007), kuid kolmas näitas et suitsetajate INHB tase on madalam, mis viitab langenud viljakusele (Lambert-Messerlian ja Harlow, 2006).

Alkoholi tarbimist on seostatud kõrgeenenud östrogeeni tasemega (Muti *et al.*, 1998) ja hilisema menopausi vanusega (Kinney *et al.*, 2006). Osad uuringud aga ei leia seost alkoholi tarbimise ja munasarjade vananemise vahel (Kinney *et al.*, 2007).

Kofeiini tarbimise puhul on samuti leitud seos kõrgeenenud östrogeeni tasemega (Lucero *et al.*, 2001). Samas on teised uuringud kofeiini tarbimist seostanud just viljatusega (Hatch ja Bracken, 1993; Curtis *et al.*, 1997) ning mõned ei leia mingit seost (Kinney *et al.*, 2007).

Lisaks tarbimisharjumustele puutuvad naised igapäevaselt kokku ka selliste ohtlike kemikaalidega, mida on keeruline vältida. Hinnanguliselt on üldlevinud üle 50 keemilise ühendi, mis võivad kahjustada reproduktiivsust, näiteks lipiidides lahustuvad molekulid, mis pääsevad läbi rakuseina ja võivad seonduda steroidhormoonide retseptoritega ning aktiveerida või maha suruda mõne geeni ekspressiooni. Selline aine on näiteks diklorodifenüültrikloroetaan, mida kasutatakse laialdaselt kodudes putukatõrjeks ja osades riikides ka põllumajanduses. Organismi sattudes seondub see östrogeeni retseptorile ja kutsub esile bioloogilise vastuse, vaatamata sellele, et selle kuju on östrogeenist väga erinev. Sellised ühendeid leidub lisaks putukamürkidele ka plastikust, lahustites, tööstuslikes jääkproduktides ja ravimites. On näidatud, et östrogeensete ühendite mõjul võib naistel tekkida rinnavähk, varajane menarhe ja enneaegne menopaus (Sharara *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2015).

Peale selle on leitud veel POF-i seost haridusega. Pikema haridusteedega naistel esineb POF-i rohkem, kuid see seos võib olla põhjustatud sellest, et nad raporteerivad seda oma arstile tihemini. Samuti on leitud seos raseduste arvu ja POF-i vahel. Mida rohkem on naine

sünnitanud, seda väiksem on tal POF-i esinemise tõenäosus. Veel on täheldatud, et ebaregulaarse menstruaaltsükliga naistel on suurem POF-i risk (Testa *et al.*, 2001; Yasui *et al.*, 2012).

1.3. POF-I TAGAJÄRJED

1.3.1. Munasarjade vananemise hindamine

Kuigi munarakkude reservi saab täpsemini hinnata alles viljakuse lõpuperioodil, võimaldavad ultraheli ja endokriinsed markerid hinnata folliikulite arvu pikema perioodi jooksul. 25-40-aastastel naistel on pidevalt küpsemas 20-150 varajast folliikulit (diameeter 0,05-2,00 mm), kuid need on liiga väikesed, et neid tavaliste meetoditega loendada. Ainult väikene osa neist areneb terveteks antraalseteks folliikuliteks, mis reageerivad hästi FSH-le. Visuaalselt saab hinnata alles 2-10 mm diameetriga vedelikuga täidetud folliikulite hulka transvaginaalse sonograafia abil (Ruess *et al.*, 1996; Committee on Gynecologic Practice, 2015). Mitmed histoloogilised uuringud on näidanud, et antraalsete folliikulite arv korreleerub primordiaalsete folliikulite arvuga munasarjas (Scheffer *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2003; Bancsi *et al.*, 2004). Siiski tuleb arvestada, et üle poole transvaginaalse sonograafia abil detekteeritud antraalsetest folliikulitest hukuvad atreesia käigus ning nende kvaliteeti ei saa ultraheli käigus hinnata. Seetõttu on munasarjade stimuleerimine eksogeensete gonadotropiinidega ainuke meetod hindamiseks FSH-le tundlike folliikulite hulka (Hendriks *et al.*, 2005).

Endokriinsetest markeritest on munasarjade reservi hindamiseks kasutusel INHB ja anti-Mülleri hormoon (AMH). INHB-d sekreteeritakse granuloosarakkudes follikulaarse faasi ajal (Groome *et al.*, 1996). Arvati, et INHB tase võimaldab otseselt hinnata munarakkude reservi, kuna seda toodavad FSH-le tundlikud antraalsed folliikulid. Kõrgenenud FSH tase ja madalam ootsüütide kvaliteet põhjustavad INHB sekretsiooni langust (Hall *et al.*, 1999). Uuemad uuringud panevad selle kahtluse alla ja pakuvad välja, et INHB on küll hea marker munasarjade aktiivsuse määramiseks, kuid mitte munarakkude reservi hindamiseks. Siiski on näidatud, et viljaka perioodi lõpus toimub INHB taseme järsk langus, mis viitab menopausi lähenemisele (Scheffer *et al.*, 2003; van Rooij *et al.*, 2005; Committee on Gynecologic Practice, 2015).

AMH-d produtseerivad eksklusiivselt ainult preantraalsed granuloosarakud ja väikesed antraalsed folliikulid (Vigier *et al.*, 1984). AMH produktsioon algab primordiaalse folliikuli arenemisega primaarseks ning lõppeb keskantraalses etapis, kui folliikuli diameeter on 2-6mm (Weenen *et al.*, 2004). IVF andmed näitavad, et seerumi AMH on eelistatult sekreteeritud väikeste antraalsete folliikulite poolt ning nende arv on otseselt seotud primordiaalsete follikulite hulgaga (Catteau-Jonard *et al.*, 2007). Vananedes antraalsete folliikulite arv väheneb ja AMH tase langeb, muutudes menopausile lähenedes madalamaks (van Rooij *et al.*, 2005; Sowers *et al.*, 2008). POF-iga naistel aitab AMH taseme mõõtmine hinnata munarakkude reservi suurust ning seda sõltumata menstruaaltsükli faasist (La Marca *et al.*, 2007; Knauff *et al.*, 2009; Committee on Gynecologic Practice, 2015).

1.3.2. POF-i diagnoosimine

Käesolevaks ajaks ei ole tuvastatud kindlaid biomarkereid ega sümptomeid, mille abil määrata POF-i tekkimise vanust. Patsientidel võib menstruaaltsükli vaheline aeg nii pikeneda kui lüheneda, lisaks võivad esineda oligomenorröa ja düsfunktsionaalne emaka verejooks. Patsientidel võivad östrogeenide defitsiidist tingituna tekkida vasomotoorsed sümptomid, meeleolukõikumised, vaginaalne atroofia, osteoporoos, kardiovaskulaarsed ja neurokognitiivsed häired (McKinlay *et al.*, 1992; Goswami ja Conway, 2005).

POF-i diagnoosimiseks ei ole väga häid kriteeriumeid. Soovituslik on üle vaadata kogu patsiendi haiguslugu ning sooritada füüsiline ülevaatus, et välistada teisi amenorröa põhjuseid, näiteks rasedus, polütsüstiliste munasarjade sündroom, diabeet, gluteenitalumatus, väga madal või väga kõrge KMI, hüpotaalamuse ja ajuripatsi haigused, hüperprolaktineemia, kilpnäärme ala- või ületalitlus. Samuti tuleks uurida, kas perekonnas on eelnevalt esinenud enneaegset menopausi, kas patsiendile on tehtud vaagnapiirkonnas lõikusi või ta on saanud keemia- või kiiritusravi (Nelson, 2009; Rafique *et al.*, 2012). Füüsilise ülevaatus käigus võib teha transvaginaalse ultraheliuuringu. Kui munasarjad on normaalse suurusega ja antraalsete folliikulite hulk on suur, ei ole POF eriti tõenäoline (Parker *et al.*, 2009; Rebar, 2009; Committee on Gynecologic Practice, 2015).

Naistel, kellel on vähemalt neli kuud kestnud amenorröa, määratakse seerumi FSH ja östradioli tase. Kui FSH on kõrge (üle 40 IU/l), korratakse testi kuu aja pärast. Kui FSH on ikka kõrge ja östradioli tase on samuti kõrge (>50 pg/ml), on hormoonasendusravi abil võimalik ovulatsioon taastada. Kui aga östradioli tase on madal,

diagnoositakse POF ja sellega kaasnevat viljatust reeglina ravida ei saa (Nelson, 2009; Cox ja Liu, 2014).

1.4. POF-I RAVI

POF-i diagnoosiga naised peaksid saama mitmekülgset ravi. See hõlmab hormoonasendusravi, raseduse ennetamist, psühholoogilist tuge ja iga-aastast skriiningut, et hinnata kilpnäärme ja neerupealiste tegevust (Cox ja Liu, 2014).

1.4.1. Hormoonasendusravi

Hormoonasendusravi on soovituslik nendele POF-i patsientidele, kellel esineb menopausist tingitud sümptomeid. Patsiendid võtavad suukaudselt hormoonpreparaate, mis matkivad loomuliku menstruaaltsükli hormonaalseid tasemeid (Rebar, 2009; Rivera *et al.*, 2009; Seifer *et al.*, 2009). Kuigi ei ole tehtud kliinilisi katsetusi hindamaks optimaalset hormoonasendusravi kestust, soovitatakse üldiselt jätkata 51. eluaastani, mis on loomuliku menopausi keskmine vanus (Parker *et al.*, 2009). Ravi on üldiselt madala riskiga, kuid kui patsiendile on see vastunäidustatud, soovitatakse talle kehalist liikumist, D-vitamiini ja kaltsiumi tarbimist ja alkoholi ning tubaka vältimist, et vältida luude hõrenemist (Cox ja Liu, 2014).

1.4.2. Viljatuse ravi

Kuigi naisele on pandud POF-i diagnoos, võib ovulatsioon siiski aeg-ajalt toimuda ning 3-10% POF-iga naistest suudavad rasestuda (Bidet *et al.*, 2008; Bidet *et al.*, 2011). Naised, kes seda ei soovi, peavad sellest teadlikud olema ja kasutama rasestumisvastaseid vahendeid. Kui patsiendile on määratud hormoonasendusravi, tuleks kasutada mittehormonaalseid vahendeid (Cox ja Liu, 2014).

POF-tekkelist viljatust reeglina ravida ei saa ning POF-i välja kujunemist ette ennustada ei osata. Seetõttu on naistel, kelle perekonnas on esinenud POF-i, soovituslik käia perekonnanõustaja juures ja võimalusel koguda ja säilitada ootsüüte hilisemaks kasutamiseks (Shelling, 2010). Iatogeense POF-i puhul on osadel juhtudel patsiendil enne keemia- või

kiiritusravi saamist võimalik munarakke, embrüoid või munasarjakude külmutada või viljakust säilitada munasarja aktiivsuse allasurumisega ravi ajaks. Tuleb arvestada, et munasarjade stimulatsioon ja ootsüütide korjamine võtavad aega vähemalt kaks nädalat, mistõttu tuleb enne kindlasti konsulteerida patsiendi onkoloogiga (Pfeifer *et al.*, 2013). Praegu on kõige efektiivsemaks meetodiks viia läbi IVF doonori ootsüütidega, millel on 30-40% elussünni tõenäosus. Võib koguda ka patsiendi ootsüüte ning neid või embrüoid hiljemaks kasutamiseks külmutada, kuid sel juhul on elussünni tõenäosus väiksem. Põhjuseks võib olla nii külmakahjustus kui ka POF-i patsiendi munarakkude halvem kvaliteet (Shelling, 2010; Cox ja Liu, 2014).

Patsientidel, kellel ei ole võimalik vähiraviga viivitada, ja lastel, kellel ei ole menstruatsioonid veel alanud, on praegu ainsaks võimaluseks munasarjakoe külmutamine. See meetod on eksperimentaaljärgus, sest praeguste tehnoloogiatega on ootsüütide ellujäämus väike ning on oht, et koos munasarjakoega satuvad kehasse tagasi ka vähirakud (Dunn ja Fox, 2009; Loren *et al.*, 2013).

Munasarjade aktiivsust võib alla suruda gonadotropiini vabastava hormooni agonistidega (GnRHa). Huvi selle meetodi vastu tekkis siis, kui pandi tähele, et puhkeolekus folliikulite ootsüüdid on keemiaravile vastupidavamad kui kasvavate folliikulite ootsüüdid. Hiirte puhul on see teooria paika pidanud (Glode *et al.*, 1981), kuid inimeste puhul on arvamused vastuolulised. Esiteks ei ekspresseeri primordiaalsed folliikulid FSH ega LH retseptoreid, mistõttu on nende aktivatsioon GnRH-st sõltumatu (Oktay *et al.*, 2007). Teiseks ei suuda GnRHa tekitada piisavalt madala östrogeeni tasemega olukorda, et munasarju ravimite eest piisavalt kaitsta (Waxman *et al.*, 1987). Kolmandaks ei ole teada, kas inimese primordiaalsed folliikulid ekspresseerivad GnRH retseptorit, küll aga on neid leitud paljudelt kasvajarakkudelt. See võib inhibeerida kasvajarakkude apoptoosi ja seega vähendada keemiaravi efektiivsust (Leung *et al.*, 2003; Cheng ja Leung, 2005). Hetkel ei ole GnRHa ravi viljakuse säilitamiseks soovituslik, kuid ei saa välistada, et uute avastustega ei saaks seda modifitseerida ja siiski kasutusele võtta (Bedoschi *et al.*, 2013; Loren *et al.*, 2013).

1.4.3. Psühholoogiline nõustamine

Lisaks füsioloogilistele haigustele kogevad POF-i patsiendid psühholoogilisi probleeme. POF-i diagnoos võib naistes tekitada viha, depressiooni, ärevust ja kurbust, eriti kui paaril ei ole veel lapsi. Neile tuleks pakkuda nõustamist viljatuse, enesepildi ja seksuaalsuse osas.

Patsient võib kasu saada nii eraviisilisest psühholoogi nõustamisest kui ka tugirühmadest (van der Stege *et al.*, 2008; Shelling, 2010).

1.5. DNA KOOPIAARVU VARIATSIOONID JA POF

1.5.1. DNA Koopiaarvu variatsioonide uurimine

DNA koopiaarvu variatsiooniks (CNV, *copy-number variation*) nimetatakse deletsiooni või duplikatsiooni, mis on suurem kui 1 kb (Feuk *et al.*, 2006). CNV-de peamised tekkemehhanismid on mittealleelne homoloogiline rekombinatsioon, mittehomoogiline DNA otste liitmine, tandemkorduste arvu varieerumine, transponeeruvate elementide ja pseudogeenide transpositsioon, matriitsi ümberlülitamise vead ning replikatsioonikompleksi libisemine (Connolly *et al.*, 2014). Olenevalt CNV-de asukohast ja suuruselt võivad nad põhjustada mitmeid haiguseid. Eriti suure tõenäosusega põhjustavad haigust deletsioonid ja duplikatsioonid, milles asuvad doositundlikud geenid. Selliste geenide ekspressioonitase sõltub nende koopiaarvust genoomis ning liiga kõrge või madal ekspressioon võib põhjustada kliinilist fenotüüpi. Probleeme võib tekitada ka see, kui CNV katkestab mõnda geeni ja selle tulemusena geeni produkti funktsioon muutub või kaob. Lisaks võib CNV katkestada või modifitseerida geenide regulaatorseid alasid, mis samuti geeniekspressiooni taset mõjutavad. Submikroskoopilisel tasandil on CNV-sid võimalik leida DNA mikrokiipidega (Cooper *et al.*, 2011). Mikrokiibid on laialt kasutatust leidnud ka ülegenoomsetes assotsiatsiooni-uuringutes (GWAS, *genome-wide association studies*), mille abil on leitud mitmeid POF-i kandidaatpiirkondi (Stolk *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2013). Neid meetodeid kasutatakse tihti just komplekshaigustele (näiteks intellektipuu ja kaasasündinud anomaaliad) kandidaatgeenide leidmiseks (Miller *et al.*, 2010; Cooper *et al.*, 2011).

Leitud CNV-de kliinilise tähenduse tõlgendamisel ei tohi olla liiga rutakas. Patsiendilt leitud CNV-sid tuleb võrrelda üldpopulatsiooniga – kui konkreetne CNV esineb laialdaselt üldpopulatsioonis, siis tõenäoliselt ei ole see patoloogiline (Pinto *et al.*, 2007; Shaikh *et al.*, 2009). Lisaks võiks analüüsida patsiendi vanemaid, et teada saada, millised CNV-d on päritud ja millised *de novo* tekkinud. Tervetelt vanematelt päritud CNV-d on tõenäoliselt kahjutud ja *de novo* tekkinud CNV-d põhjustavad haigust sagemini kui päritud CNV-d (Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013). Tuleks uurida, kas sarnaste fenotüüpidega patsientidel on samades piirkondades CNV-sid ning kui suures osas need kattuvad. Usaldusväärsed andmebaasid

patsientide kromosomaalsete ja fenotüübi andmetega on näiteks DECIPHER (Firth *et al.*, 2009; link 2) ja ECARUCA (Feenstra *et al.*, 2006; link 3). Kõige informatiivsem on tõenäoliselt CNV geenisisalduse uurimine – kui palju on antud piirkonnas gene, kas nad on doositundlikud, kas nad on mõne haigusega seotud, mis on nende funktsioon ning millistes kudedes on nad ekspresseeritud (Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013).

Vulto-van Silfhout *et al.* tegid suuremahulise uuringu, kus SNP-kiibiga analüüsiti üle 5500 indiviidi. Haruldasi CNV-sid leiti umbes neljandikult ning 17%-l neist oli rohkem kui üks CNV. Deletsioone ja duplikatsioone leiti peaaegu võrdselt. CNV-de suurused varieerusid 5 kb-st kuni 150 Mb-ni, mediaan 1,0 Mb. *De novo* tekkinud CNV-d moodustasid kõikidest CNV-dest umbes 40% ja olid tunduvalt suuremad kui päritud CNV-d (mediaanid vastavalt 2,6 Mb ja 0,5 Mb). *De novo* tekkinud CNV-dest klassifitseeriti kahjututeks 18% ning päritud CNV-dest 43%. Kõige tihedamalt leiti CNV-sid telomeeride lähedusest ja piirkondadest, kus toimub sagedasti mittehomoogiline rekombinatsioon (Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013).

Üks CNV sisaldas keskmiselt seitset ENSEMBL geeni, kusjuures *de novo* tekkinud CNV-des oli rohkem gene kui päritud CNV-des (mediaanid vastavalt 24 ja 3), mida võis eeldada ka nende suuruste erinevustest. Lisaks oli *de novo* CNV-des ka geenide tihedus natuke suurem (8,0 geeni/Mb vs 6,6 geeni/Mb, $p < 0,001$) (Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013).

1.5.2. POF-iga seostatud DNA koopiaarvu variatsioonid

POF-i patsientide CNV-sid on eelnevalt uuritud, kui enamus neist on teostatud madala resolutsiooniga platvormidel (võimalik tuvastada CNV-sid suurusega vähemalt 0,7 Mb) või vaadeldud ainult X-kromosoomi (Aboura *et al.*, 2009; Ledig *et al.*, 2010; Knauff *et al.*, 2011). Kõrge resolutsiooniga (võimalik tuvastada CNV-sid suurusega vähemalt 50 kb) on siiani tehtud kolm uuringut. McGuire *et al.* analüüsisid 88 POF-iga naise CNV-sid Illumina HumanCNV370-Duo DNA Analysis BeadChip-ga (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) ja leidsid 50 duplikatsiooni ja 148 deletsiooni suurusega 0,1 Mb kuni 3,4 Mb, millest 24 olid eelnevalt kirjeldamata (McGuire *et al.*, 2011). Norling *et al.* uurisid 26 POF-iga naise CNV-sid kohandatud Oxford Gene Technology aCGH-kiipidega (OGT, UK) ning leidsid kümme uut POF-i kandidaatpiirkonda (Norling *et al.*, 2014).

Tsuiko *et al.* analüüsisid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonoreid, kes olid raporteerinud menopausi enne 40. eluaastat. Kuna nendel naistel ei ole mõõdetud FSH

tasemeid ning arst ei ole neile POF-i diagnoosi pannud, siis jäeti uuringust välja naised, kes vastasid järgnevatele tingimustele: ebanormaalne kariotüüp (Turneri sündroom, 46,XY, 47,XXX), KMI üle 30kg/m², günekoloogilised operatsioonid või ravimite tarbimine, mis võivad põhjustada amenorröad. Kokku analüüsiti 301 naise CNV-sid HumanOmniExpress BeadChip ja HumanCoreExome BeadChip-ga (Illumina Inc.) ning leiti 15 POF-i kandidaatpiirkonda, millest 12 olid eelnevalt kirjeldamata (Tšuiiko *et al.*, avaldamata materjalid).

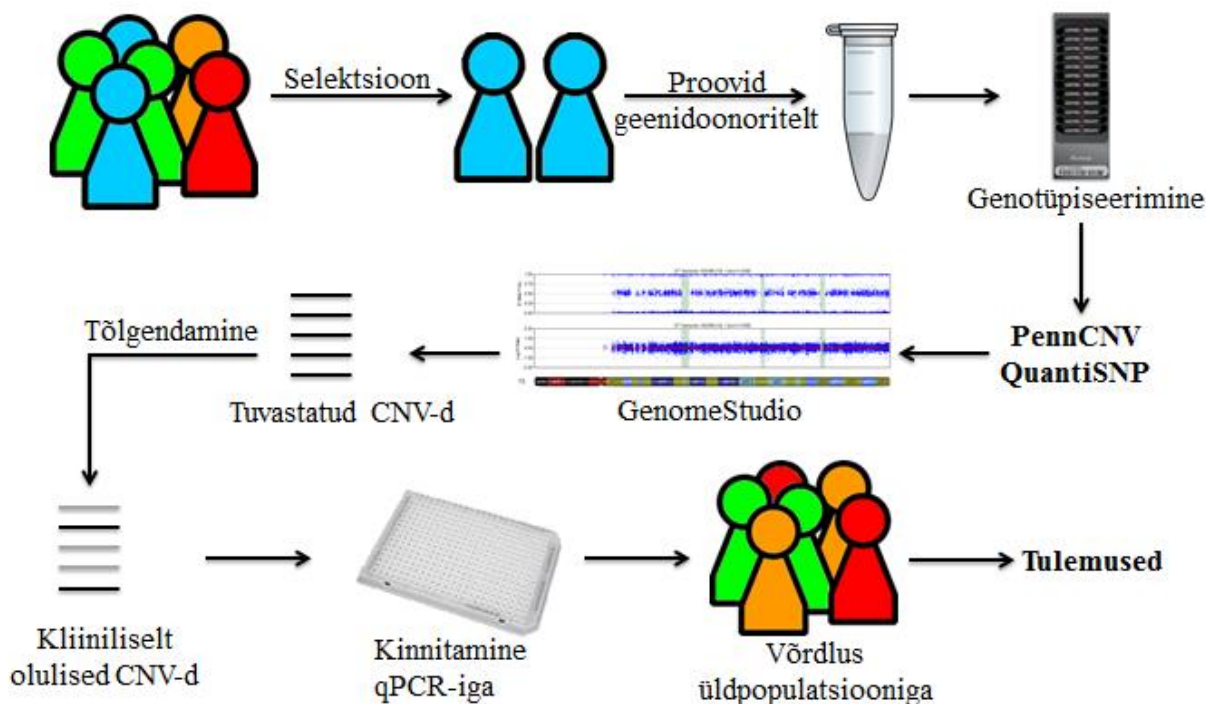
2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks on kromosomaalse mikroibiianalüüsi abil tuvastada Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) naisdoonoritel POF-iga seotud koopiaarvu variatsioone ning nendes piirkondades asuvaid POF-i kandidaatgeene.

Üldine tööskeem (joonis 1):

- Geenidoonorite seleksioon menopausi vanuse järgi
- Mikroibiianalüüs doonorite DNA-ga
- CNV-de tuvastamine
- CNV-de kliinilise olulisuse hindamine ja kandidaatgeenide tuvastamine
- Kliiniliselt oluliste CNV-de kinnitamine



Joonis 1. Üldine tööskeem. Valitud geenidoonorite DNA genotüüpiseeritakse, leitakse ja tõlgendatakse CNV-d. Kliiniliselt olulised CNV-d kinnitatakse ning võrreldakse üldpopulatsiooniga.

2.2. MATERJALID JA MEETODID

2.2.1. Valim

Käesoleva töö valimiks on 34 TÜ EGV naissoost doonorit, kes on ise endal raporteerinud enneaegse sekundaarse amenorröa enne 40. eluaastat (kaasa arvatud). Uuritavate keskmine (\pm standardhälve) vanus oli $55,8 \pm 14,0$ aastat ning neil algas menopaus keskmiselt $36,1 \pm 5,3$ aasta vanuselt. Menarhe ehk esimese menstruatsiooni vanus oli valimis keskmiselt $13,7 \pm 1,7$ aastat, mis teeb viljaka ea pikkuseks $22,4 \pm 5,5$ aastat.

Vähemalt üks rasedus on olnud 28 uuritaval 34-st, neist esimene $21,4 \pm 3,1$ aasta vanuselt ja keskmiselt $3,2 \pm 2,4$ rasedust on raporteeritud valimis ühe naise kohta. KMI oli uuritavatel keskmiselt $39,5 \pm 6,7$ kg/m² ja kõik uuritavad olid ülekaalulised (KMI >25). Samuti oli uuritavate keskmine vöö- ja puusaümbermõõtude suhe $0,90 \pm 0,08$, mis viitab suurele ülekaaluliste naiste osakaalule valimis (ülekaalule viitab >0,85). Uuringu hetkeks oli amenorröa kestnud keskmiselt $19,7 \pm 13,4$ aastat. Uuritavate fenotüübid on kokkuvõtlikult toodud lisas 1.

Antud valim oli osa suuremast projektist, mille eesmärgiks oli uurida POF-iga seotud piirkondi ja geene TÜ EGV geenidoonoritel. Käesolevas töös uuritavad 34 indiviidi jäeti esialgselt uuringust välja nende ülekaalu tõttu, mis on oluline POF-i riskitegur, kuid samas pole siiski välistatud, et nende viljatuse taga on geneetiline põhjus. Samuti tuleb meeles pidada, et TÜ EGV geenidoonorite kohta on kasutada informatsioon, mida nad on andmekogumisel toimunud arstivisiidi käigus geenivaramu küsimustikus enda kohta retrospektiivselt raporteerinud. Seetõttu ei ole teada nende hormonaalseid tasemeid ega muid näitajaid menopausi tekke ajal, mis võiksid antud uuringu seisukohalt olulised olla. Teisalt on geenivaramu doonoreid hea kasutada, sest sealt on kiiresti kättesaadav väga suur hulk indiviide, kelle kliiniline kogumine võtaks aega kuid või isegi aastaid (Haller-Kikkatalo *et al.*, 2015).

2.2.2. Mikrokiibianalüüs

CNV-de detekteerimiseks teostati valimi naistel ülegenoomne mikrokiibianalüüs HumanOmniExpress BeadChip (7 doonorit) ja HumanCoreExome BeadChip-ga (27 doonorit)

(Illumina Inc.). Mikrokiibianalüüsi eksperimentaalne osa viidi läbi TÜ EGV tuumiklabori spetsialistide poolt vastavalt tootja poolt välja töötatud protokollile.

HumanOmniExpress BeadChip võimaldab paralleelselt analüüsida üle 715 000 SNP markeri, mille mediaanekeskmine vahe on 2,1 kb. See võimaldab usaldusväärselt määrata CNV-sid, mille suurus on vähemalt 50 kb. HumanCoreExome BeadChip-il on üle 547 000 SNP markeri, millest umbes 266 000 asuvad eksoomi regioonides ja markerite mediaanekeskmine vahe on 1,9 kb. Sellega saab usaldusväärselt määrata CNV-sid, mille suurus on vähemalt 100 kb.

2.2.3. Genotüpiseerimistulemuste analüüs

Genotüpiseerimistulemusi analüüsiti GenomeStudio Genotyping Module v.3.1 tarkvara abil (Illumina Inc.). Esmaseks kvaliteedikontrolliks rakendati genotüpiseerimise edukus (*call rate*) üle 98%, millest madalama edukusega proovid jäeti edasisest analüüsist välja. Kasutades GenomeStudio poolt arvatud signaalide intensiivsuste logaritmilist suhet (LRR, *log R ratio*) ja alleelide intensiivsuste suhet (BAF, *B allele frequency*), rakendati veel kahte peidetud Markovi mudelil põhinevat programmi: QuantiSNP (*confidence score* ≥ 30) (Colella *et al.*, 2007) ja PennCNV (*confidence score* ≥ 10) (Wang *et al.*, 2007). QuantiSNP ja PennCNV analüüsid viidi läbi vastavalt Olga Žilina ja Margit Nõukase poolt. Kõigi programmide puhul kasutati autorite poolt soovitatud parameetreid ning valepositiivsete tulemuste vähendamiseks pidi CNV sisaldama vähemalt 10 järjestikust SNP markerit. Saadud tulemused ühendati ning edasiseks analüüsiks jäeti alles vaid need, mida suutsid tuvastada kõik programmid ning olid visuaalselt GenomeStudio Genome Viewer tarkvaras tuvastatavad.

2.2.4. CNV-de tõlgendamine

Leitud CNV-de bioloogilise tähenduse leidmiseks kasutati UCSC Genome Browser andmebaasi (link 4), OMIM andmebaasi (link 5) ja NCBI Gene andmebaasi (link 6). CNV-d peeti kliiniliselt oluliseks siis, kui see kattus mõne piirkonnaga, mis on eelnevalt teadaolevalt seostatud mõne sündroomi või haigusega. CNV loeti neutraalseks, kui neid leidis ka tervetel indiviididel DGV andmebaasis (link 7) või kui nad asusid geenivaeses piirkonnas ega sisaldanud ühtegi haigustega seotud geeni.

2.2.5. CNV-de kinnitamine kvantitatiivse PCR-i abil

Olulisemad CNV-d kinnitati reaalaaja kvantitatiivse PCR-i abil (qPCR, *quantitative PCR*). qPCR-i jaoks valiti välja piirkonnad, mida ei esinenud üldpopulatsioonis, või mis sisaldasid geene, mille funktsioon võis mõjutada menopausi vanust. Praimerid disainiti veebipõhise programmiga Primer3web (link 8; Untergasser *et al.*, 2012), võttes aluseks Thornton ja Basu poolt soovitatud parameetrid qPCR-i praimerite disainiks (Thornton ja Basu, 2011). Lisaks kasutati internetilehekülgi NCBI Reverse Search (link 9), Beacon Designer (link 10) ja IDT UNAFold (link 11), et kontrollida praimerite spetsiifilisust ja sekundaarstruktuuride moodustumist. Iga CNV jaoks disainiti kaheksa paari praimeereid, millest neli paiknesid CNV sees ja neli CNV-ga külgnevatel aladel. Praimerite järjestused on toodud lisas 2.

Praimerite efektiivsuste määramiseks kasutati standardkõvera meetodit. Selle jaoks kasutati lahjenduste rida (64, 16, 4, 1, 0,25, 0,0625 ng DNA-d reaktsiooni kohta), millega teostati qPCR. Reaktsioonisegus lõppmahuga 7,5 µl oli 1,5 µl qPCR segu (Solis BioDyne 5x HOT FirePol EvaGreen) (Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 0,75 µl praimeereid kontsentratsiooniga 10 pmol/µl, 2 µl genoomset DNA-d (Roche Holding AG, Šveits) ja 3,25 µl MQ H₂O. Igat reaktsiooni tehti kolmes korduses. Andmeid analüüsiti SDS 2.2.2. programmiga (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Praimeereid kasutati qPCR-i jaoks, kui nende efektiivsus jäi vahemikku 1,8-2,2.

Iga praimeripaariga teostati qPCR reaktsioon vastava patsiendi DNA-ga. Kontrolliks kasutati viie tsütogeneetiliseltselt normaalse naise ja mehe DNA segu. Reaktsioonisegu lõppmahuga 10µl sisaldas 2 µl qPCR segu (Solis BioDyne 5x HOT FirePol EvaGreen), 1 µl praimeereid kontsentratsiooniga 10 pmol/µl, 2,5 µl genoomse DNA lahust kontsentratsiooniga 1 ng/µl ja 4,5 µl MQ H₂O. Lisaks kasutati ka kahte referentspraimeerit Ref17 ja RefZNF80 (järjestused lisas 2). Kõiki reaktsioone tehti kolmes korduses.

qPCR analüüs teostati 7900HT Real-Time PCR süsteemiga (Applied Biosystems) ning kasutati järgnevat programmi:

- 1) DNA polümeraasi aktiveerimine 95°C juures 10 minutit;
- 2) denaturatsioon 95°C juures 15 sekundit;
- 3) praimerite seondumine ja DNA süntees 60°C juures 1 minut;
- 4) 95°C 15 sekundit;
- 5) 60°C 15 sekundit;
- 6) 95°C 15 sekundit.

Etappe 2 ja 3 korrati 40 tsükli. qPCR-i tulemusi analüüsiti SDS 2.2.2. ja qBase+ (Biogazelle, Gent, Belgia) programmidega. Analüüsil kasutati Pfaffl-i meetodit, kus arvutamisel võetakse arvesse iga praimeripaari efektiivsust (Pfaffl, 2001).

2.2.6. Võrdlus kontrollpopulatsiooniga

Kontrollpopulatsiooni moodustasid TÜ EGV naissoost geenidoonorid, kes olid proovi andmise hetkel üle 40-aastased ning neil ei olnud selleks ajaks veel menopaus esinenud. Doonorite genoom genotüpeeriti HumanOmniExpress BeadChip-i ja HumanCNV370-Quad DNA Analysis BeadChip-iga (Illumina Inc.). HumanOmniExpress BeadChip-iga CNV-de tuvastamiseks pidi nende pikkus olema vähemalt 20 kb ja sisaldama vähemalt 10 järjestikust SNP markerit. HumanCNV370-Quad DNA Analysis BeadChip-iga pidi CNV pikkus olema vähemalt 50 kb ning samuti sisaldama vähemalt 10 järjestikust SNP markerit. CNV-d määrati programmiga PennCNV (*confidence score* ≥ 10). Peale kvaliteedikontrolli jäi kontrollgruppi kokku 3189 naist. Seejärel võrreldi eelnevalt leitud kliiniliselt olulisi CNV-sid kontrollpopulatsiooni CNV-dega ning otsiti alade vahelisi kattuvusi, kusjuures CNV-d määrati omavahel kattuvaks ka siis, kui esines üks või enam kattuv SNP marker. Võrdlus viidi läbi Margit Nõukase poolt.

2.3. TULEMUSED

Mikrokiibianalüüsi tulemusena leiti 22 indiviidil 34-st kokku 53 CNV-d, nendest 23 deletsiooni ja 30 duplikatsiooni. Keskmiselt leiti ühelt doonorilt $1,6 \pm 1,7$ CNV-d. CNV pikkused varieerusid 50,8 kb-st 630,2 kb-ni, keskmine pikkus oli $166,7 \pm 114,2$ kb. POF-i seisukohalt peeti kliiniliselt oluliseks kolme CNV-d, mis olid kõik heterosügootsed deletsioonid (tabel 1). Olulistele CNV-de regioonidele disainiti praimerid ja teostati qPCR, mis kinnitas nende CNV-de olemasolu. Lisaks leiti ühel doonoril Turneri sündroom ning ühel X-kromosoomi trisoomia, mis olid eelnevalt diagnoosimata.

Doonoril 10 leiti 165,9 kb suurune deletsioon regioonis 2p25.3, milles asuvad *SNTG2* (*syntrophin, gamma 2*) ja *TPO* geenid. Doonoril 16 leiti 217,7 kb suurune deletsioon regioonis 11q21, milles asuvad geenid *PIWILA* (*piwi-like RNA-mediated gene silencing 4*) ja *AMOTL1* (*angiomotin like 1*). Doonoril 29 leiti 152,3 kb suurune deletsioon regioonis 1p22.1,

mis asub *TGFBR3* geeni sees. Doonoril 20 leiti eelnevalt diagnoosimata Turneri sündroom ning doonoril 15 leiti eelnevalt diagnoosimata X-kromosoomi trisoomia.

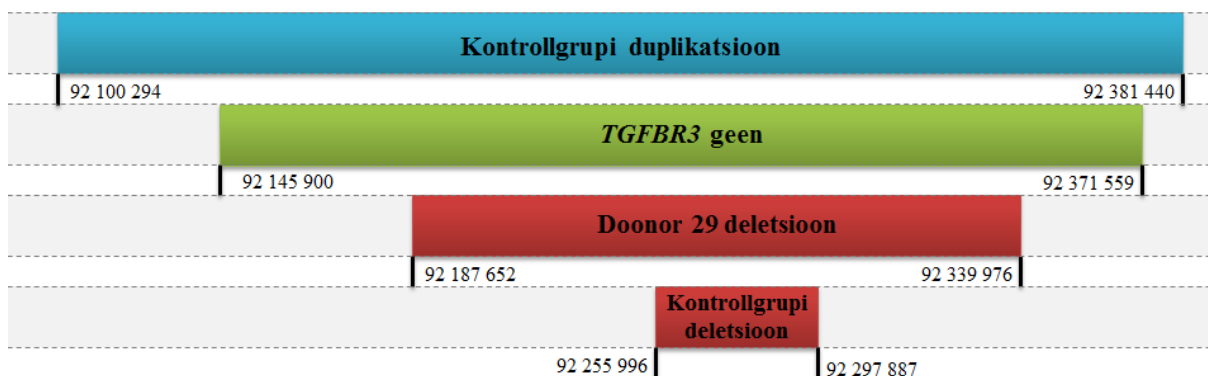
Tabel 1. Geenidoonoritelt leitud olulisemad CNV-d.

Doonori kood	10	16	29
Asukoht	2p25.3	11q21	1p22.1
Algpositsioon	1 359 621	94 310 641	92 187 652
Lõpp-positsioon	1 525 529	94 528 291	92 339 976
Pikkus (bp)	165 909	217 651	152 325
Geenide arv (RefSeq)	2	2	1
Olulised geenid	<i>TPO</i>	<i>PIWIL4, AMOTL1</i>	<i>TGFBR3</i>

Alg- ja lõpp-positsioonid vastavad inimese genoomi versioonile hg19.

Võrdluses kontrollpopulatsiooniga leiti doonor 29 1p22.1 deletsiooniga üks osaliselt kattuv deletsioon ning üks duplikatsioon. Kontrollgrupi deletsiooni suurus oli 41,9 kb ning see paiknes terves ulatuses doonor 29 deletsiooni sees. Kontrollgrupi duplikatsiooni suurus oli 281,1 kb ning see kattis doonor 29 deletsiooni täielikult. Kontrollgrupi deletsiooni ja duplikatsiooni, doonor 29 deletsiooni ja *TGFBR3* geeni paiknemine üksteise suhtes on kujutatud joonisel 2. Ülejäänud kaks huvipakkuvat deletsiooni ei kattunud ühegi kontrollpopulatsiooni CNV-ga.

TÜ EGV doonoritelt leitud CNV-sid võrreldi ka eelnevalt teadaolevate POF-i või menopausi vanusega seotud genoomi piirkondadega, mis on leitud GWAS meetodit kasutades (Stolk *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2013), kuid nende vahel kattuvusi ei esinenud.



Joonis 2. Doonor 29 deletsiooni paiknemine kontrollgrupi CNV-de ja *TGFBR3* geeni suhtes. Doonoril 29 leiti deletsioon regioonis 1p22.1 ning joonisel on kujutatud selle paiknemine kontrollgrupist leitud CNV-de suhtes. Alg- ja lõpp-positsioonid vastavad inimese genoomi versioonile hg19.

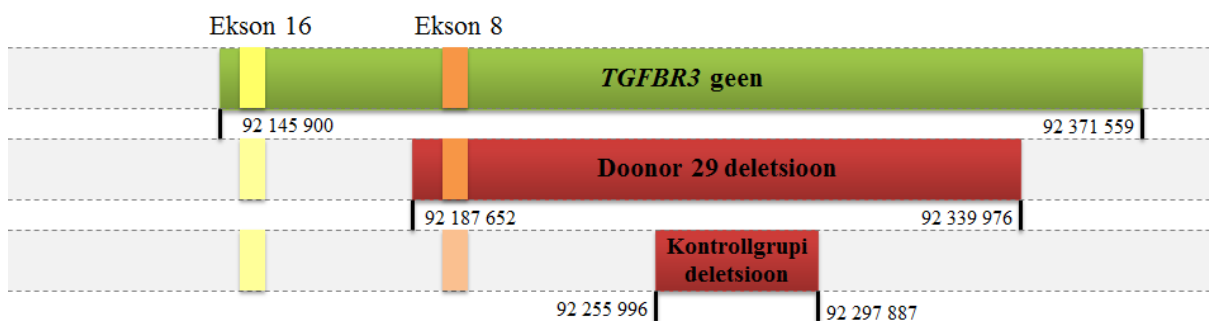
2.4. ARUTELU

Ühel uuritavatest (doonor 10) esines 165,9 kb suurune deletsioon regioonis 2p25.3, milles asuvad *SNTG2* ja *TPO* geenid. *TPO* katalüüsib türosiini jodeerimist türeoglobuliinis kilpnäärmehormoonide T3 ja T4 sünteesil. Kilpnäärme autoimmuunsete haiguste korral tekivad veres autoantikehad *TPO* vastu, mis blokeerides jodiidide oksüdeerimist, pärsivad kilpnäärme hormoonide T3 ja T4 sünteesi. Kui see protsess on häiritud, siis on organismis kilpnäärme hormoonide T3 ja T4 puudulikkus (Miot *et al.*, 2000). Antud isikul on eelnevalt diagnoositud suurenenud kilpnääre ehk struuma. Struuma võib kliiniliselt väljenduda nii kilpnäärme üle- kui alatalitlusena, mille väljenduseks on T3 ja T4 defitsiit. Paraku ei ole teada, mis tüüpi kilpnäärme haigusega antud isikul tegemist on, kuid kaasuvana tugevalt väljendunud ülekaalulisus (KMI 40,0 kg/m²) lubab arvata, et tegemist on kliiniliselt väljendunud kilpnäärme alatalitlusega. Seega on tõenäoline, et antud uuritava kilpnäärmehaigus on tingitud deletsioonist 2p25.3 regioonis. Samas mõjutab kilpnäärme hormoonide langus otseselt LH ja FSH biosünteesi (Bals-Pratsch *et al.*, 1997; Cecconi *et al.*, 1999). Ebapiisav LH ja FSH produktsioon põhjustab aga omakorda munasarjade talitluse langust ja seega võib välja kujuneda POF. *SNTG2* POF-i seisukohalt oluline ei ole.

Lisaks leiti ühel uuritaval (doonor 16) 217,7 kb suurune deletsioon regioonis 11q21, milles asuvad geenid *PIWIL4* ja *AMOTL1*. Eelnevalt on näidatud, et *PIWIL4* on oluline

spermatogeneesis ning mutatsioonid selle geenis põhjustavad meeste viljatust. Täpsemalt osaleb PIWIL4 piRNA-de sekundaarses protsessimises, mida on vaja sugurakkude DNA kaitsmiseks transponeeruvate elementide eest (Unhavaithaya *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010; Siomi *et al.*, 2011). Hiljem on leitud, et see ekspresseerub ka inimese munasarjades ja võib arvata, et see mõjutab ka naiste viljakust läbi piRNA-de protsessimise (Lim *et al.*, 2013). Kuigi siiani ei ole veel ühtegi uuringut, mis seostaks *PIWIL4* mutatsioone POF-i patogeneesiga, võiks see kindlasti olla üheks kandidaatgeeniks vastavatele uuringutele. Lisaks varajasele menopausile on antud doonoril olnud kolm raseduse katkemist. Üks võimalik põhjus sellele on *AMOTL1* geeni deletsioon, mis on oluline veresoonte moodustumisel, rakkudevaheliste ühenduste tekkel (Zheng *et al.*, 2009). Kuna varajases raseduses toimub platsentas väga intensiivne angiogenees, võivad mutatsioonid selles geenis põhjustada platsentatsiooni häireid põhjustades omakorda raseduse katkemist.

Järgmise leiuna esines valimis ühel isikul (doonor 29) 152,3 kb suurune deletsioon regioonis 1p22.1, mis asub *TGFBR3* geeni sees. *TGFBR3* on koretseptoriks TGF β superperekonna valkude (näiteks INHA), mis on äärmiselt vajalikud embrüo gonaadide arenguks ja follikulogeneesiks (Dixit *et al.*, 2006; Persani *et al.*, 2011; Rah *et al.*, 2014). INHA inhibeerib FSH tootmist, kuid kui INHA ekspressioon on häiritud mutatsiooni või deletsiooni tõttu, on häiritud ka FSH produktsiooni regulatsioon (Groome *et al.*, 1996; Messinis *et al.*, 2014). FSH tootmine menstruaaltsükli vältel ei ole stabiilne, olles tsükli algusfaasis madalam ja suurenedes preovulatoorselt ning taas langedes tsükli lõpupoole (Direito *et al.*, 2013). Seega võib arvata, et häired FSH ekspressiooni ja/või sekretsiooni regulatsioonis võivad olla põhjuseks, miks antud isikul kujunes välja amenorröa. Paraku ei ole teada missugustes väärtustes esines antud isikul vereseerumi FSH, kuid deletsioon *TGFBR3* geeni piirkonnas võib olla POF-i põhjuseks antud isikul. Ka eelnevalt on mitmelt POF-iga naiselt leitud *TGFBR3* geenis mutatsioone, millest enamus paiknevad 16. eksonis, mis jääb antud deletsioonist väljapoole (joonis 3). Lisaks on mõnelt POF-iga naiselt leitud mutatsioon kaheksandas eksonis (A1370G \rightarrow Glu459Gly), mis asub uuritava deletsiooni sees, kuid mitte kontrollgrupist leitud deletsioonis (Dixit *et al.*, 2006; Chand *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012). Pole kindel, kas see konkreetne piirkond on kliinilise tähtsusega, kuid seda võiks kindlasti tulevastes uuringutes POF-i seisukohalt uurida. Samuti võib rolli mängida see, et uuritav deletsioon on peaaegu neli korda suurem kui kontrollgrupi deletsioon. Kontrollgrupist leitud duplikatsioon hõlmab tervet *TGFBR3* geeni, mistõttu kõik transkriptid on normaalsed. Hetkel ei ole teada, et tegemist oleks doositundliku geeniga.



Joonis 3. Eksonite 16 ja 8 paiknemine *TGFBR3* geenis ja uuritavates deletsioonides.

Doonoril 29 leiti deletsioon piirkonnas 1p22.1. Joonisel on märgitud uuritava deletsiooni paiknemine *TGFBR3* geeni ja kontrollgrupist esineva deletsiooni suhtes ning POF-iga seotud piirkonnad – eksonid 16 ja 8. Kollasega on kujutatud ekson 16 asukoht ning oranžiga ekson 8 asukoht. Alg- ja lõpp-positsioonid vastavad inimese genoomi versioonile hg19.

Valimis avastati üks uuritav (doonor 20), kellel leiti Turneri sündroom (TS), mis ei olnud eelnevalt diagnoositud. Vastavalt uuritava fenotüübi andmetele, mis olid kasutada antud töös, viitavad TS-le uuritava lühike kasv (148 cm), kerge ülekaalulisus (KMI 25,6 kg/m²) ning kehatüve rasvumus (vöö- ja puusaümbermõõdu suhe oli 0,91). Uuritaval esines menarhe 14-aastaselt ja amenorröa kujunes välja 27-aastaselt. Kirjandusandmetel algab menstruatsioon kuni 40%-l TS-iga tütarlastest, kuid rasestuda õnnestub väga vähestel (Livadas *et al.*, 2005; Bondy, 2014). Antud uuritaval ei olnud esinenud ühtegi rasedust ning paraku ei ole teada, kas see oli tema isiklik valik või oli tegemist viljakusprobleemidega.

Sarnaselt eelmisele tuvastati valimis eelnevalt diagnoosimata X-kromosoomi trisoomia (doonor 15). Uuritava haigusloos puudusid olulised haigused, kuid kuna X-trisoomia sümptomid ei avaldugi sageli, võib see olla ka diagnoosi puudumise põhjuseks (Nielsen ja Wohlert, 1990; Tartaglia *et al.*, 2010). Uuritav raporteeris menopausi vanuseks 40 eluaastat ning tal oli esinenud viis rasedust, millest oli sündinud neli last.

Lisaks tuvastatud geneetilistele muutustele esines 13 uuritaval emaka- ja munasarjadega seotud haigusi, mis võisid neil puhkudel olla POF-i põhjuseks. Samuti võis amenorröad põhjustada muude kaasuvate haiguste ravimeetodid, näiteks astmaravimid (võis oletada kolmel juhul), vanemad antidepressandid (viis juhtu) ja vererõhualandajad (20 juhtu). Lisaks tuleb arvestada ka sellega, et kõik uuritavad olid ülekaalulised. Tugevast rasvumisest põhjustatud östrogeeni liig tingib hüpogonadotroopset amenorröad, mis võib kliiniliselt

väljenduda menstruatsioonitsükli häirena (Malhotra *et al.*, 2013; Mustaqeem *et al.*, 2015). Paraku ei ole meil andmeid uuritavate vereseerumi suguhormoonide ja gonadotropiinide väärtustest tagasiulatuvalt amenorröa kujunemise ajast, et eristada siin rasvumisest tulenevat ja reeglina madala FSH väärtusega kulgevad amenorröad primaarselt ovariaalsetest põhjustest tingitud ja kõrgete FSH väärtustega kulgevast POF-ist. Naistel, kelle KMI on $>35 \text{ kg/m}^2$, on 26% madalam tõenäosus loomulikult rasestuda ning naistel, kelle KMI on $>40 \text{ kg/m}^2$, lausa 43% madalam tõenäosus loomulikult rasestuda võrreldes normaalkaaluliste naistega (van der Steeg *et al.*, 2008).

POF muutub aina olulisemaks probleemiks, kuna nii esma- kui korduvsünnitajate keskmine vanus on pidevas tõusutrendis. Naised lükkavad pereplaneerimist aina kõrgemasse vanusesse ning lastetus võib samuti omakorda POF-i tekkimisele kaasa aidata. Kuna POF-il on palju erinevaid põhjuseid, on selle diagnoosimine ja ennustamine keerulised. Varajane diagnoos on oluline, sest POF-iga kaasneb hüpoöstrogeenism, mis põhjustab tõsiseid terviseprobleeme, näiteks luude hõrenemist, südame- ja veresoonkonnahaiguseid ja neurodegeneratiivseid haiguseid, aga ka kergemaid, kuid siiski ebameeldivad sümptomeid, näiteks unehäireid, kuumahoogusid ja vaginaalset atroofiat. Kõik need probleemid on hormoonasendusraviga leevendatavad.

POF-i teine tagajärg, viljatus, on tõsine sotsiaalne probleem. Viljatuse diagnoos tekitab naistes viha ja kurbust, langetab enesehinnangut ning põhjustab depressiooni. Eriti tugevalt mõjub see peredele, kus pole veel ühtegi last. Seetõttu on oluline, et lisaks hormoonasendusravile tutvustatakse POF-iga naisele ka teisi laste saamise võimalusi ning pakutakse psühholoogilist nõustamist. Mõningatel juhtudel on võimalik doonormunarakke kasutades IVF-iga rasedus saavutada ning see ka lõpuni kanda, kuid kindlasti tuleks rääkida ka adopteerimise võimalustest.

Praegu ei ole kahjuks võimalusi POF-i väljakujunemise pikalt ette ennustamiseks. Seetõttu tuleks uurida võimalikult palju POF-i patsiente ja kirjeldada võimalikke POF-i põhjustavaid geene. Selle jaoks kasutatakse tihti ülegenoomseid meetodeid, mis võimaldavad analüüsida palju patsiente lühikese ajaga ja annavad informatsiooni POF-i kandidaatpiirkondade kohta. See annaks võimaluse välja töötada teste, mida noored naised saaksid soovi korral kasutada, kui nende peres on eelnevalt enneaegne menopaus probleemiks olnud. Kui naine satub olema riskigrupis, saab ta teha informeeritumaid valikuid oma tuleviku ja pereplaneerimise kohta. Lisaks saab arst silma peal hoida tema hormonaalsetel näitajatel ja õigeaegselt hormoonasendusraviga alustada, et vältida tõsiseid terviseprobleeme.

KOKKUVÕTE

Enneaegne munasarjade puudulikkus (POF) on kompleksne haigus, mille põhjuseid ja tekkemehhanisme on uuritud juba mitmeid aastaid, kuid paljud neist on siiski veel teadmata. Nende tuvastamiseks on tänapäeval kasutuses kõrge lahutusvõimega DNA mikrokiibid, mis võimaldavad detekteerida ka submikroskoopilisi DNA koopiaarvu variatsioone (CNV).

Käesolevas töös uuriti 34 Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonorit, kellel esines sekundaarne amenorröa enne 40. eluaastat (kaasa arvatud) ning kelle KMI oli suurem kui 25 kg/m². DNA mikrokiipide abil tuvastati antud valimi indiviididel CNV-d, mille kliinilisel tõlgendamisel leiti nii eelnevalt teadaolevaid POF-iga seotud genee kui ka üks uus kandidaatpiirkond.

Töös tuvastati kolm kliiniliselt olulist CNV-d. Esiteks, 165,9 kb suurune deletsioon regioonis 2p25.3, milles asuvad lihasdüstroofiaga seotud *SNTG2* ja kilpnäärmehaigustega seotud *TPO* geenid. *SNTG2* ei ole tõenäoliselt POF-iga seotud, kuid *TPO* deletsioon võis antud indiviidil põhjustada kilpnäärme alatalitlust, millest tingitud kilpnäärme hormoonide taseme langus mõjutab FSH ja LH biosünteesi, mis häirib menstruaaltsükli regulatsiooni ning võib tekkida amenorröa. Sellele võis kaasa aidata ka struumast tingitud tugev ülekaal, mis põhjustab östrogenide liiga. Teiseks, 217,7 kb suurune deletsioon regioonis 11q21, milles asuvad angiogeneesi geen *AMOTL1* ja uus POF-i kandidaatgeen *PIWIL4*. *PIWIL4* valku on eelnevalt seostatud spermatogeneesi häiretega, kuid hiljuti on näidatud, et see ekspresseerub ka munasarjades ning võib mõjutada ka naiste viljakust. Kolmandaks, 152,3 kb suurune deletsioon regioonis 1p22.1, mis katkestab TGFβ superperekonna valkude (näiteks INHA) retseptori geeni *TGFBR3*. INHA ebanormaalne tase häirib ka FSH produktsiooni, mis on oluline folliikulite normaalseks küpsemiseks. Need CNV-d kinnitati kvantitatiivse reaal-aja PCR-iga. Lisaks leiti veel eelnevalt tuvastamata X-kromosoomi monosoomia ja trisoomia, mis võivad samuti POF-i põhjusteks olla.

Uute POF-i kandidaatpiirkondade leidmine on oluline, et mõista veel täpsemalt haiguse põhjuseid ja mehhanisme. Nii on võimalik koostada teste, millega saaks noortel naistel POF-i haigestumise riski ette ennustada, ning välja töötada ravimeetodeid, millega oleks võimalik viljakat iga pikendada.

Identifying DNA copy number variations associated with premature ovarian failure from the gene donors of the Estonian Genome Center of the University of Tartu

Kati Hensen

SUMMARY

Premature ovarian failure (POF) is one of the major causes for infertility in women. It is becoming an important problem, as women have children at increasingly higher ages. The causes of POF are very heterogeneous and still mostly unknown. Currently, chromosomal aberrations, genetic mutations, metabolic disorders, autoimmune and viral diseases, iatrogenic and environmental conditions have been shown to cause infertility.

In this thesis 34 gene donors from the Estonian Genome Center of the University of Tartu with secondary amenorrhea (before the age of 40) were studied. DNA copy number variations (CNVs) of these women were identified with DNA microarrays. Two previously known regions and one new candidate region for POF were found after clinical interpretation.

Three clinically important CNVs were identified. Firstly, a 165.9 kb deletion in 2p25.3, which includes the *SNTG2* gene (associated with muscular dystrophy) and the *TPO* gene (associated with thyroid disorders). Secondly, a 217.7 kb deletion in 11q21, which includes the *AMOTL1* gene (associated with angiogenesis) and a new candidate gene for POF – *PIWILA*. Thirdly, a 152.3 kb deletion in 1p22.1, which disrupts the *TGFBR3* gene that encodes a receptor for TGF β superfamily proteins. These deletions were confirmed with real-time quantitative PCR. Additionally, a previously unidentified X-chromosome monosomy and trisomy were found. These also could have been the causes for POF.

Discovering new POF candidate regions is important for understanding the causes and mechanisms of POF more accurately. With good enough understanding of POF, it would be possible to develop tests to predict the risk of POF in young women and also improve treatment methods that could elongate the fertile period of these women.

TÄNUAVALDUSED

Autor soovib eelkõige tänada oma juhendajat, prof Ants Kurge, toetuse ja abistavate nõuannete eest käesoleva töö valmimisel. Samuti lähevad suured tänusõnad Olga Žilinale, Olga Tšaikole, Kadri Haller-Kikkatalole, Merle Külaotsale, Margit Nõukasele ja Reedik Mägile abi ja õpetussõnade eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abalovich, M., Mitelberg, L., Allami, C., Gutierrez, S., Alcaraz, G., et al.** (2007). "Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility." *Gynecol Endocrinol* 23(5): 279-283.
- Aboura, A., Dupas, C., Tachdjian, G., Portnoi, M. F., Bourcigaux, N., et al.** (2009). "Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure." *J Clin Endocrinol Metab* 94(11): 4540-4546.
- Aittomaki, K., Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., et al.** (1995). "Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure." *Cell* 82(6): 959-968.
- Akbas, E., Altintas, Z. M., Karakas-Celik, S., Dilek, U. K., Delibas, A., Ozen, S., Mamur, B. A., Uyaniker, G. A.** (2012). "Rare Types of Turner Syndrome: Clinical Presentation and Cytogenetics in Five Cases. ." *LabMedicine* 43(5): 197-204.
- Amato, P. ja Roberts, A. C.** (2001). "Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization." *Fertil Steril* 75(2): 438-439.
- Bals-Pratsch, M., De Geyter, C., Muller, T., Frieling, U., Lerchl, A., et al.** (1997). "Episodic variations of prolactin, thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, melatonin and cortisol in infertile women with subclinical hypothyroidism." *Hum Reprod* 12(5): 896-904.
- Bancsi, L. F., Broekmans, F. J., Looman, C. W., Habbema, J. D. ja te Velde, E. R.** (2004). "Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization." *Fertil Steril* 81(1): 35-41.
- Bedoschi, G., Turan, V. ja Oktay, K.** (2013). "Utility of GnRH-agonists for Fertility Preservation in Women With Operable Breast Cancer: Is It Protective?" *Curr Breast Cancer Rep* 5(4): 302-308.
- Bharath, R., Unnikrishnan, A. G., Thampy, M. V., Anilkumar, A., Nisha, B., et al.** (2010). "Turner syndrome and its variants." *Indian J Pediatr* 77(2): 193-195.
- Bidet, M., Bachelot, A., Bissauge, E., Golmard, J. L., Gricourt, S., et al.** (2011). "Resumption of ovarian function and pregnancies in 358 patients with premature ovarian failure." *J Clin Endocrinol Metab* 96(12): 3864-3872.
- Bidet, M., Bachelot, A. ja Touraine, P.** (2008). "Premature ovarian failure: predictability of intermittent ovarian function and response to ovulation induction agents." *Curr Opin Obstet Gynecol* 20(4): 416-420.

- Bione, S., Rizzolio, F., Sala, C., Ricotti, R., Goegan, M., et al.** (2004). "Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B." *Hum Reprod* 19(12): 2759-2766.
- Bjursell, C., Stibler, H., Wahlstrom, J., Kristiansson, B., Skovby, F., et al.** (1997). "Fine mapping of the gene for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, type I (CDG1): linkage disequilibrium and founder effect in Scandinavian families." *Genomics* 39(3): 247-253.
- Bondy, C.** (2014). "Pregnancy and cardiovascular risk for women with Turner syndrome." *Womens Health (Lond Engl)* 10(4): 469-476.
- Bretherick, K. L., Hanna, C. W., Currie, L. M., Fluker, M. R., Hammond, G. L., et al.** (2008). "Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure." *Fertil Steril* 89(2): 318-324.
- Caburet, S., Georges, A., L'Hote, D., Todeschini, A. L., Benayoun, B. A., et al.** (2012). "The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology." *Mol Cell Endocrinol* 356(1-2): 55-64.
- Camats, N., Pandey, A. V., Fernandez-Cancio, M., Andaluz, P., Janner, M., et al.** (2012). "Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals." *J Clin Endocrinol Metab* 97(7): E1294-1306.
- Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W. ja DePinho, R. A.** (2003). "Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a." *Science* 301(5630): 215-218.
- Catteau-Jonard, S., Pigny, P., Reyss, A. C., Decanter, C., Poncelet, E., et al.** (2007). "Changes in serum anti-mullerian hormone level during low-dose recombinant follicular-stimulating hormone therapy for anovulation in polycystic ovary syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 92(11): 4138-4143.
- Cecconi, S., Rucci, N., Scaldaferrri, M. L., Masciulli, M. P., Rossi, G., et al.** (1999). "Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity." *Endocrinology* 140(4): 1783-1788.
- Chand, A. L., Robertson, D. M., Shelling, A. N. ja Harrison, C. A.** (2007). "Mutational analysis of betaglycan/TGF-betaRIII in premature ovarian failure." *Fertil Steril* 87(1): 210-212.
- Chang, H. M., Cheng, J. C., Klausen, C. ja Leung, P. C.** (2013). "BMP15 suppresses progesterone production by down-regulating StAR via ALK3 in human granulosa cells." *Mol Endocrinol* 27(12): 2093-2104.

- Chang, S. H., Kim, C. S., Lee, K. S., Kim, H., Yim, S. V., et al.** (2007). "Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause." *Maturitas* 58(1): 19-30.
- Cheng, C. K. ja Leung, P. C.** (2005). "Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans." *Endocr Rev* 26(2): 283-306.
- Clowse, M. E., Behera, M. A., Anders, C. K., Copland, S., Coffman, C. J., et al.** (2009). "Ovarian preservation by GnRH agonists during chemotherapy: a meta-analysis." *J Womens Health (Larchmt)* 18(3): 311-319.
- Col, N. F., Surks, M. I. ja Daniels, G. H.** (2004). "Subclinical thyroid disease: clinical applications." *JAMA* 291(2): 239-243.
- Colella, S., Yau, C., Taylor, J. M., Mirza, G., Butler, H., et al.** (2007). "QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data." *Nucleic Acids Res* 35(6): 2013-2025.
- Connolly, J. J., Glessner, J. T., Almoguera, B., Crosslin, D. R., Jarvik, G. P., et al.** (2014). "Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts." *Front Genet* 5: 51.
- Cooper, G. M., Coe, B. P., Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Vu, T. H., et al.** (2011). "A copy number variation morbidity map of developmental delay." *Nat Genet* 43(9): 838-846.
- Cordts, E. B., Christofolini, D. M., Dos Santos, A. A., Bianco, B. ja Barbosa, C. P.** (2011). "Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review." *Arch Gynecol Obstet* 283(3): 635-643.
- Cordts, E. B., Santos, A. A., Peluso, C., Bianco, B., Barbosa, C. P., et al.** (2012). "Risk of premature ovarian failure is associated to the PvuII polymorphism at estrogen receptor gene ESR1." *J Assist Reprod Genet* 29(12): 1421-1425.
- Coulam, C. B., Adamson, S. C. ja Annegers, J. F.** (1986). "Incidence of premature ovarian failure." *Obstet Gynecol* 67(4): 604-606.
- Cox, L. ja Liu, J. H.** (2014). "Primary ovarian insufficiency: an update." *Int J Womens Health* 6: 235-243.
- Cramer, D. W., Barbieri, R. L., Fraer, A. R. ja Harlow, B. L.** (2002). "Determinants of early follicular phase gonadotrophin and estradiol concentrations in women of late reproductive age." *Hum Reprod* 17(1): 221-227.
- Curtis, K. M., Savitz, D. A. ja Arbuckle, T. E.** (1997). "Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability." *Am J Epidemiol* 146(1): 32-41.

- Direito, A., Bailly, S., Mariani, A. ja Ecochard, R.** (2013). "Relationships between the luteinizing hormone surge and other characteristics of the menstrual cycle in normally ovulating women." *Fertil Steril* 99(1): 279-285.
- Dixit, H., Deendayal, M. ja Singh, L.** (2004). "Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure." *Hum Reprod* 19(8): 1760-1764.
- Dixit, H., Rao, K. L., Padmalatha, V. V., Kanakavalli, M., Deenadayal, M., et al.** (2006). "Mutational analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure." *Hum Reprod* 21(8): 2041-2046.
- Dixit, H., Rao, L., Padmalatha, V., Raseswari, T., Kapu, A. K., et al.** (2010). "Genes governing premature ovarian failure." *Reprod Biomed Online* 20(6): 724-740.
- Dossena, S., Nofziger, C., Tamma, G., Bernardinelli, E., Vanoni, S., et al.** (2011). "Molecular and functional characterization of human pendrin and its allelic variants." *Cell Physiol Biochem* 28(3): 451-466.
- Du, J. W., Xu, K. Y., Fang, L. Y. ja Qi, X. L.** (2012). "Association between mutations of the luteinizing hormone beta subunit and female infertility." *Mol Med Rep* 5(2): 473-476.
- Dunn, L. ja Fox, K. R.** (2009). "Techniques for fertility preservation in patients with breast cancer." *Curr Opin Obstet Gynecol* 21(1): 68-73.
- Ebrahimi, M. ja Akbari Asbagh, F.** (2011). "Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: an update." *Int J Fertil Steril* 5(2): 54-65.
- Elsas, L. J., 2nd, Langley, S., Paulk, E. M., Hjelm, L. N. ja Dembure, P. P.** (1995). "A molecular approach to galactosemia." *Eur J Pediatr* 154(7 Suppl 2): S21-27.
- Endo, Y., Onogi, S., Umeki, K., Yamamoto, I., Kotani, T., et al.** (1995). "Regional localization of the gene for thyroid peroxidase to human chromosome 2p25 and mouse chromosome 12C." *Genomics* 25(3): 760-761.
- Feenstra, I., Fang, J., Koolen, D. A., Siezen, A., Evans, C., et al.** (2006). "European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities." *Eur J Med Genet* 49(4): 279-291.
- Feuk, L., Carson, A. R. ja Scherer, S. W.** (2006). "Structural variation in the human genome." *Nat Rev Genet* 7(2): 85-97.
- Firth, H. V., Richards, S. M., Bevan, A. P., Clayton, S., Corpas, M., et al.** (2009). "DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources." *Am J Hum Genet* 84(4): 524-533.

- Fleischer, R. T., Vollenhoven, B. J. ja Weston, G. C.** (2011). "The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women." *Obstet Gynecol Surv* 66(4): 248-254.
- Fortuno, C. ja Labarta, E.** (2014). "Genetics of primary ovarian insufficiency: a review." *J Assist Reprod Genet* 31(12): 1573-1585.
- Freeman, E. W., Sammel, M. D., Gracia, C. R., Kapoor, S., Lin, H., et al.** (2005). "Follicular phase hormone levels and menstrual bleeding status in the approach to menopause." *Fertil Steril* 83(2): 383-392.
- Gallardo, T. D., John, G. B., Bradshaw, K., Welt, C., Reijo-Pera, R., et al.** (2008). "Sequence variation at the human FOXO3 locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea." *Hum Reprod* 23(1): 216-221.
- Ghadami, M., El-Demerdash, E., Salama, S. A., Binhazim, A. A., Archibong, A. E., et al.** (2010). "Toward gene therapy of premature ovarian failure: intraovarian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores folliculogenesis in FSHR(-/-) FORKO mice." *Mol Hum Reprod* 16(4): 241-250.
- Gleicher, N., Kim, A., Weghofer, A. ja Barad, D. H.** (2012). "Differences in ovarian aging patterns between races are associated with ovarian genotypes and sub-genotypes of the FMR1 gene." *Reprod Biol Endocrinol* 10: 77.
- Glode, L. M., Robinson, J. ja Gould, S. F.** (1981). "Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone." *Lancet* 1(8230): 1132-1134.
- Goswami, D. ja Conway, G. S.** (2005). "Premature ovarian failure." *Hum Reprod Update* 11(4): 391-410.
- Goswami, R., Goswami, D., Kabra, M., Gupta, N., Dubey, S., et al.** (2003). "Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders." *Fertil Steril* 80(4): 1052-1054.
- Groome, N. P., Illingworth, P. J., O'Brien, M., Pai, R., Rodger, F. E., et al.** (1996). "Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* 81(4): 1401-1405.
- Gu, A., Ji, G., Shi, X., Long, Y., Xia, Y., et al.** (2010). "Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population." *Hum Reprod* 25(12): 2955-2961.
- Gubbels, C. S., Land, J. A. ja Rubio-Gozalbo, M. E.** (2008). "Fertility and impact of pregnancies on the mother and child in classic galactosemia." *Obstet Gynecol Surv* 63(5): 334-343.

- Guerrero, N. V., Singh, R. H., Manatunga, A., Berry, G. T., Steiner, R. D., et al.** (2000). "Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia." *J Pediatr* 137(6): 833-841.
- Hagen, C. P., Main, K. M., Kjaergaard, S. ja Juul, A.** (2010). "FSH, LH, inhibin B and estradiol levels in Turner syndrome depend on age and karyotype: longitudinal study of 70 Turner girls with or without spontaneous puberty." *Hum Reprod* 25(12): 3134-3141.
- Hall, J. E., Welt, C. K. ja Cramer, D. W.** (1999). "Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome." *Hum Reprod* 14(2): 409-415.
- Haller-Kikkatalo, K., Uibo, R., Kurg, A., Salumets, A.** (2015). "The prevalence and phenotypic characteristics of spontaneous premature ovarian failure: a general population registry-based study." *Hum Reprod*. 30(5): 1229-1238.
- Hansen, K. R., Morris, J. L., Thyer, A. C. ja Soules, M. R.** (2003). "Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting." *Fertil Steril* 80(3): 577-583.
- Harlow, B. L. ja Signorello, L. B.** (2000). "Factors associated with early menopause." *Maturitas* 35(1): 3-9.
- Harris, S. E., Chand, A. L., Winship, I. M., Gersak, K., Aittomaki, K., et al.** (2002). "Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure." *Mol Hum Reprod* 8(8): 729-733.
- Harrison, S. M., Campbell, I. M., Keays, M., Granberg, C. F., Villanueva, C., et al.** (2013). "Screening and familial characterization of copy-number variations in NR5A1 in 46,XY disorders of sex development and premature ovarian failure." *Am J Med Genet A* 161A(10): 2487-2494.
- Hatch, E. E. ja Bracken, M. B.** (1993). "Association of delayed conception with caffeine consumption." *Am J Epidemiol* 138(12): 1082-1092.
- Hempel, N., How, T., Cooper, S. J., Green, T. R., Dong, M., et al.** (2008). "Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta." *Carcinogenesis* 29(5): 905-912.
- Hendriks, D. J., Mol, B. W., Bancsi, L. F., Te Velde, E. R. ja Broekmans, F. J.** (2005). "Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level." *Fertil Steril* 83(2): 291-301.

- Hernando, C., Plaja, A., Catala, V., Sarret, E., Egozcue, J., et al.** (2004). "Primary amenorrhea in a woman with a cryptic complex chromosome rearrangement involving the critical regions Xp11.2 and Xq24." *Fertil Steril* 82(6): 1666-1671.
- Hoek, A., Schoemaker, J. ja Drexhage, H. A.** (1997). "Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity." *Endocr Rev* 18(1): 107-134.
- Hogan, B. L.** (1996). "Bmps: multifunctional regulators of mammalian embryonic development." *Harvey Lect* 92: 83-98.
- Inagaki, K. ja Shimasaki, S.** (2010). "Impaired production of BMP-15 and GDF-9 mature proteins derived from proproteins WITH mutations in the proregion." *Mol Cell Endocrinol* 328(1-2): 1-7.
- Jeppesen, J. V., Kristensen, S. G., Nielsen, M. E., Humaidan, P., Dal Canto, M., et al.** (2012). "LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles." *J Clin Endocrinol Metab* 97(8): E1524-1531.
- Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S. P., Zhao, L., De Rooij, D. G., et al.** (2004). "Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function." *Mol Endocrinol* 18(7): 1610-1619.
- Kaufman, F. R., Kogut, M. D., Donnell, G. N., Goebelsmann, U., March, C., et al.** (1981). "Hypergonadotropic hypogonadism in female patients with galactosemia." *N Engl J Med* 304(17): 994-998.
- Kinney, A., Kline, J., Kelly, A., Reuss, M. L. ja Levin, B.** (2007). "Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years." *Hum Reprod* 22(4): 1175-1185.
- Kinney, A., Kline, J. ja Levin, B.** (2006). "Alcohol, caffeine and smoking in relation to age at menopause." *Maturitas* 54(1): 27-38.
- Kjaergaard, S., Schwartz, M. ja Skovby, F.** (2001). "Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype." *Arch Dis Child* 85(3): 236-239.
- Knauff, E. A., Blauw, H. M., Pearson, P. L., Kok, K., Wijmenga, C., et al.** (2011). "Copy number variants on the X chromosome in women with primary ovarian insufficiency." *Fertil Steril* 95(5): 1584-1588 e1581.
- Knauff, E. A., Eijkemans, M. J., Lambalk, C. B., ten Kate-Booij, M. J., Hoek, A., et al.** (2009). "Anti-Mullerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure." *J Clin Endocrinol Metab* 94(3): 786-792.

- Knauff, E. A., Franke, L., van Es, M. A., van den Berg, L. H., van der Schouw, Y. T., et al.** (2009). "Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene." *Hum Reprod* 24(9): 2372-2378.
- Knobel, M. ja Medeiros-Neto, G.** (2003). "An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system." *Thyroid* 13(8): 771-801.
- Kolibianakis, E. M., Papanikolaou, E. G., Fatemi, H. M. ja Devroey, P.** (2005). "Estrogen and folliculogenesis: is one necessary for the other?" *Curr Opin Obstet Gynecol* 17(3): 249-253.
- Kosho, T., Muroya, K., Nagai, T., Fujimoto, M., Yokoya, S., et al.** (1999). "Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: implications for the development of Turner syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 84(12): 4613-4621.
- La Marca, A., Brozzetti, A., Sighinolfi, G., Marzotti, S., Volpe, A., et al.** (2010). "Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes." *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(4): 277-282.
- La Marca, A., Giulini, S., Tirelli, A., Bertucci, E., Marsella, T., et al.** (2007). "Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology." *Hum Reprod* 22(3): 766-771.
- Laissue, P., Lakhali, B., Benayoun, B. A., Dipietromaria, A., Braham, R., et al.** (2009). "Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2." *J Med Genet* 46(7): 455-457.
- Lambert-Messerlian, G. M. ja Harlow, B. L.** (2006). "The influence of depression, body mass index, and smoking on serum inhibin B levels in late reproductive-aged women." *J Clin Endocrinol Metab* 91(4): 1496-1500.
- Ledig, S., Ropke, A. ja Wieacker, P.** (2010). "Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis." *Sex Dev* 4(4-5): 225-232.
- Letourneau, J. M., Ebbel, E. E., Katz, P. P., Oktay, K. H., McCulloch, C. E., et al.** (2012). "Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer." *Cancer* 118(7): 1933-1939.
- Leung, P. C., Cheng, C. K. ja Zhu, X. M.** (2003). "Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary." *Mol Cell Endocrinol* 202(1-2): 145-153.
- Levrán, D., Ben-Shlomo, I., Pariente, C., Dor, J., Mashiach, S., et al.** (2003). "Familial partial 17,20-desmolase and 17alpha-hydroxylase deficiency presenting as infertility." *J Assist Reprod Genet* 20(1): 21-28.

- Li, Y., Li, R. Q., Ou, S. B., Zhang, N. F., Ren, L., et al.** (2014). "Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans." *Reprod Biol Endocrinol* 12: 81.
- Lim, S. L., Tsend-Ayush, E., Kortschak, R. D., Jacob, R., Ricciardelli, C., et al.** (2013). "Conservation and expression of PIWI-interacting RNA pathway genes in male and female adult gonad of amniotes." *Biol Reprod* 89(6): 136.
- Lindstrand, A., Malmgren, H., Sahlen, S., Xin, H., Schoumans, J., et al.** (2008). "Molecular cytogenetic characterization of a constitutional, highly complex intrachromosomal rearrangement of chromosome 1, with 14 breakpoints and a 0.5 Mb submicroscopic deletion." *Am J Med Genet A* 146A(24): 3217-3222.
- Liu, L., Tan, R., Cui, Y., Liu, J. ja Wu, J.** (2013). "Estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women." *Gynecol Endocrinol* 29(2): 182-185.
- Livadas, S., Xekouki, P., Kafiri, G., Voutetakis, A., Maniati-Christidi, M., et al.** (2005). "Spontaneous pregnancy and birth of a normal female from a woman with Turner syndrome and elevated gonadotropins." *Fertil Steril* 83(3): 769-772.
- Loren, A. W., Mangu, P. B., Beck, L. N., Brennan, L., Magdalinski, A. J., et al.** (2013). "Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update." *J Clin Oncol* 31(19): 2500-2510.
- Loughlin, S. A., Redha, A., McIver, J., Boyd, E., Carothers, A., et al.** (1991). "Analysis of the origin of Turner's syndrome using polymorphic DNA probes." *J Med Genet* 28(3): 156-158.
- Lucero, J., Harlow, B. L., Barbieri, R. L., Sluss, P. ja Cramer, D. W.** (2001). "Early follicular phase hormone levels in relation to patterns of alcohol, tobacco, and coffee use." *Fertil Steril* 76(4): 723-729.
- Luisi, S., Orlandini, C., Regini, C., Pizzo, A., Vellucci, F., et al.** (2015). "Premature ovarian insufficiency: from pathogenesis to clinical management." *J Endocrinol Invest*.
- Ma, L., Chen, Y., Mei, S., Liu, C., Ma, X., et al.** (2015). "Single nucleotide polymorphisms in premature ovarian failure associated genes in a Chinese Hui population." *Mol Med Rep*.
- Malhotra, N., Bahadur, A., Singh, N., Kalaivani, M. ja Mittal, S.** (2013). "Does obesity compromise ovarian reserve markers? A clinician's perspective." *Arch Gynecol Obstet* 287(1): 161-166.

- Marino, R., Perez Garrido, N., Costanzo, M., Guercio, G., Juanes, M., et al.** (2015). "Five new cases of 46,XX aromatase deficiency: clinical follow-up from birth to puberty, a novel mutation, and a founder effect." *J Clin Endocrinol Metab* 100(2): E301-307.
- Markstrom, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B. ja Billig, H.** (2002). "Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation." *Reproduction* 123(1): 23-30.
- Marsh, C. A. ja Auchus, R. J.** (2014). "Fertility in patients with genetic deficiencies of cytochrome P450c17 (CYP17A1): combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency and isolated 17,20-lyase deficiency." *Fertil Steril* 101(2): 317-322.
- McGuire, M. M., Bowden, W., Engel, N. J., Ahn, H. W., Kovanci, E., et al.** (2011). "Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure." *Fertil Steril* 95(5): 1595-1600.
- McKinlay, S. M., Brambilla, D. J. ja Posner, J. G.** (1992). "The normal menopause transition." *Maturitas* 14(2): 103-115.
- Messinis, I. E., Messini, C. I. ja Dafopoulos, K.** (2014). "Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle." *Reprod Biomed Online* 28(6): 714-722.
- Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., et al.** (2010). "Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies." *Am J Hum Genet* 86(5): 749-764.
- Miot, F., Dupuy, C., Dumont, J. ja Rousset, B.** (2000). "Thyroid Hormone Synthesis and Secretion."
- Miura, K., Yasuda, K., Yanase, T., Yamakita, N., Sasano, H., et al.** (1996). "Mutation of cytochrome P-45017 alpha gene (CYP17) in a Japanese patient previously reported as having glucocorticoid-responsive hyperaldosteronism: with a review of Japanese patients with mutations of CYP17." *J Clin Endocrinol Metab* 81(10): 3797-3801.
- Monin, M. L., Mignot, C., De Lonlay, P., Heron, B., Masurel, A., et al.** (2014). "29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype." *Orphanet J Rare Dis* 9: 207.
- Morishima, A., Grumbach, M. M., Simpson, E. R., Fisher, C. ja Qin, K.** (1995). "Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens." *J Clin Endocrinol Metab* 80(12): 3689-3698.

- Mosselman, S., Polman, J. ja Dijkema, R.** (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." *FEBS Lett* 392(1): 49-53.
- Murray, A., Webb, J., Dennis, N., Conway, G. ja Morton, N.** (1999). "Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure." *J Med Genet* 36(10): 767-770.
- Mustaqeem, M., Sadullah, S., Waqar, W., Farooq, M. Z., Khan, A., et al.** (2015). "Obesity with irregular menstrual cycle in young girls." *Mymensingh Med J* 24(1): 161-167.
- Muti, P., Trevisan, M., Micheli, A., Krogh, V., Bolelli, G., et al.** (1998). "Alcohol consumption and total estradiol in premenopausal women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(3): 189-193.
- Nelson, L. M.** (2009). "Clinical practice. Primary ovarian insufficiency." *N Engl J Med* 360(6): 606-614.
- Neves, S. C., Mezalira, P. R., Dias, V. M., Chagas, A. J., Viana, M., et al.** (2010). "Monoallelic thyroid peroxidase gene mutation in a patient with congenital hypothyroidism with total iodide organification defect." *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(8): 732-737.
- Nielsen, J. ja Wohler, M.** (1990). "Sex chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark." *Birth Defects Orig Artic Ser* 26(4): 209-223.
- Niu, D. M., Hwang, B., Chu, Y. K., Liao, C. J., Wang, P. L., et al.** (2002). "High prevalence of a novel mutation (2268 insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, and evidence for a founder effect." *J Clin Endocrinol Metab* 87(9): 4208-4212.
- Norling, A., Hirschberg, A. L., Rodriguez-Wallberg, K. A., Iwarsson, E., Wedell, A., et al.** (2014). "Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high-resolution array comparative genomic hybridization platform." *Hum Reprod* 29(8): 1818-1827.
- Ochalski, M. E., Engle, N., Wakim, A., Ravnan, B. J., Hoffner, L., et al.** (2011). "Complex X chromosome rearrangement delineated by array comparative genome hybridization in a woman with premature ovarian insufficiency." *Fertil Steril* 95(7): 2433 e2439-2415.
- Ohl, J., Partisani, M., Demangeat, C., Binder-Foucard, F., Nisand, I., et al.** (2010). "[Alterations of ovarian reserve tests in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected women]." *Gynecol Obstet Fertil* 38(5): 313-317.

- Oktaý, K., Sonmezer, M., Oktem, O., Fox, K., Emons, G., et al.** (2007). "Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury." *Oncologist* 12(9): 1055-1066.
- Oktem, O. ja Oktaý, K.** (2007). "Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function." *Cancer* 110(10): 2222-2229.
- Park, M., Shin, E., Won, M., Kim, J. H., Go, H., et al.** (2010). "FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells." *Mol Endocrinol* 24(5): 1024-1036.
- Parker, W. H., Broder, M. S., Chang, E., Feskanich, D., Farquhar, C., et al.** (2009). "Ovarian conservation at the time of hysterectomy and long-term health outcomes in the nurses' health study." *Obstet Gynecol* 113(5): 1027-1037.
- Perez-Duenas, B., Garcia-Cazorla, A., Pineda, M., Poo, P., Campistol, J., et al.** (2009). "Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations." *Eur J Paediatr Neurol* 13(5): 444-451.
- Perry, J. R., Corre, T., Esko, T., Chasman, D. I., Fischer, K., et al.** (2013). "A genome-wide association study of early menopause and the combined impact of identified variants." *Hum Mol Genet* 22(7): 1465-1472.
- Persani, L., Rossetti, R. ja Cacciatore, C.** (2010). "Genes involved in human premature ovarian failure." *J Mol Endocrinol* 45(5): 257-279.
- Persani, L., Rossetti, R., Cacciatore, C. ja Bonomi, M.** (2009). "Primary Ovarian Insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity." *J Autoimmun* 33(1): 35-41.
- Persani, L., Rossetti, R., Cacciatore, C. ja Fabre, S.** (2011). "Genetic defects of ovarian TGF-beta-like factors and premature ovarian failure." *J Endocrinol Invest* 34(3): 244-251.
- Pfaffl, M. W.** (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pfeifer, S., Goldberg, J., McClure, R., Lobo, R., Thomas, M., et al.** (2013). "Mature oocyte cryopreservation: a guideline." *Fertil Steril* 99(1): 37-43.
- Philibert, P., Paris, F., Lakhali, B., Audran, F., Gaspari, L., et al.** (2013). "NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency." *Fertil Steril* 99(2): 484-489.
- Piersma, D., Verhoef-Post, M., Berns, E. M. ja Themmen, A. P.** (2007). "LH receptor gene mutations and polymorphisms: an overview." *Mol Cell Endocrinol* 260-262: 282-286.

- Pinto, D., Marshall, C., Feuk, L. ja Scherer, S. W.** (2007). "Copy-number variation in control population cohorts." *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2: R168-173.
- Pisarska, M. D., Bae, J., Klein, C. ja Hsueh, A. J.** (2004). "Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene." *Endocrinology* 145(7): 3424-3433.
- Pisarska, M. D., Kuo, F. T., Bentsi-Barnes, I. K., Khan, S. ja Barlow, G. M.** (2010). "LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(1): E101-109.
- Poppe, K. ja Glinoeer, D.** (2003). "Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy." *Hum Reprod Update* 9(2): 149-161.
- Pouresmaeili, F. ja Fazeli, Z.** (2014). "Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes." *Int J Fertil Steril* 8(1): 1-12.
- Practice, C. o. G.** (2015). "Committee opinion no. 618: Ovarian reserve testing." *Obstet Gynecol* 125(1): 268-273.
- Prueitt, R. L., Chen, H., Barnes, R. I. ja Zinn, A. R.** (2002). "Most X;autosome translocations associated with premature ovarian failure do not interrupt X-linked genes." *Cytogenet Genome Res* 97(1-2): 32-38.
- Pu, D., Xing, Y., Gao, Y., Gu, L. ja Wu, J.** (2014). "Gene variation and premature ovarian failure: a meta-analysis." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 182: 226-237.
- Qin, C. R., Chen, S. L., Yao, J. L., Li, T. ja Wu, W. Q.** (2012). "Haplotype and mutation analysis of the TGFBR3 gene in Chinese women with idiopathic premature ovarian failure." *Gynecol Endocrinol* 28(1): 63-67.
- Qin, C. R., Chen, S. L., Yao, J. L., Wu, W. Q. ja Xie, J. S.** (2011). "Identification of novel missense mutations of the TGFBR3 gene in Chinese women with premature ovarian failure." *Reprod Biomed Online* 23(6): 697-703.
- Qin, Y., Sun, M., You, L., Wei, D., Sun, J., et al.** (2012). "ESR1, HK3 and BRSK1 gene variants are associated with both age at natural menopause and premature ovarian failure." *Orphanet J Rare Dis* 7: 5.
- Rafique, S., Sterling, E. W. ja Nelson, L. M.** (2012). "A new approach to primary ovarian insufficiency." *Obstet Gynecol Clin North Am* 39(4): 567-586.
- Rah, H., Jeon, Y. J., Ko, J. J., Kim, J. H., Kim, Y. R., et al.** (2014). "Association of inhibin alpha gene promoter polymorphisms with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women." *Maturitas* 77(2): 163-167.

- Ramanujam, L. N., Liao, W. X., Roy, A. C., Loganath, A., Goh, H. H., et al.** (1999). "Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders." *Clin Endocrinol (Oxf)* 51(2): 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." *Hum Reprod* 15(4): 925-928.
- Rebar, R. W.** (2009). "Premature ovarian failure." *Obstet Gynecol* 113(6): 1355-1363.
- Ris-Stalpers, C. ja Bikker, H.** (2010). "Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations." *Mol Cell Endocrinol* 322(1-2): 38-43.
- Rizzolio, F., Bione, S., Sala, C., Goegan, M., Gentile, M., et al.** (2006). "Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature." *Hum Reprod* 21(6): 1477-1483.
- Rivera, C. M., Grossardt, B. R., Rhodes, D. J., Brown, R. D., Jr., Roger, V. L., et al.** (2009). "Increased cardiovascular mortality after early bilateral oophorectomy." *Menopause* 16(1): 15-23.
- Ruess, M. L., Kline, J., Santos, R., Levin, B. ja Timor-Tritsch, I.** (1996). "Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography." *Am J Obstet Gynecol* 174(2): 624-627.
- Ruf, J. ja Carayon, P.** (2006). "Structural and functional aspects of thyroid peroxidase." *Arch Biochem Biophys* 445(2): 269-277.
- Safari, S., Zare-Abdollahi, D., Mirfakhraie, R., Ghafouri-Fard, S., Pouresmaeli, F., et al.** (2014). "An Iranian family with azoospermia and premature ovarian insufficiency segregating NR5A1 mutation." *Climacteric* 17(3): 301-303.
- Santoro, N., Adel, T. ja Skurnick, J. H.** (1999). "Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women." *Fertil Steril* 71(4): 658-662.
- Scheffer, G. J., Broekmans, F. J., Bancsi, L. F., Habbema, J. D., Looman, C. W., et al.** (2002). "Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts." *Ultrasound Obstet Gynecol* 20(3): 270-275.
- Scheffer, G. J., Broekmans, F. J., Looman, C. W., Blankenstein, M., Fauser, B. C., et al.** (2003). "The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age." *Hum Reprod* 18(4): 700-706.
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., et al.** (2004). "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." *Development* 131(4): 933-942.

- Seifer, D. B., Golub, E. T., Lambert-Messerlian, G., Benning, L., Anastos, K., et al.** (2009). "Variations in serum mullerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women." *Fertil Steril* 92(5): 1674-1678.
- Senanayake, S. N.** (2008). "Mumps: a resurgent disease with protean manifestations." *Med J Aust* 189(8): 456-459.
- Shaikh, T. H., Gai, X., Perin, J. C., Glessner, J. T., Xie, H., et al.** (2009). "High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications." *Genome Res* 19(9): 1682-1690.
- Sharara, F. I., Seifer, D. B. ja Flaws, J. A.** (1998). "Environmental toxicants and female reproduction." *Fertil Steril* 70(4): 613-622.
- Shelling, A. N.** (2010). "Premature ovarian failure." *Reproduction* 140(5): 633-641.
- Simpson, J. L. ja Rajkovic, A.** (1999). "Ovarian differentiation and gonadal failure." *Am J Med Genet* 89(4): 186-200.
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. ja Aravin, A. A.** (2011). "PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(4): 246-258.
- Soleimani, R., Heytens, E., Darzynkiewicz, Z. ja Oktay, K.** (2011). "Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise." *Aging (Albany NY)* 3(8): 782-793.
- Sowers, M. R., Eyvazzadeh, A. D., McConnell, D., Yosef, M., Jannausch, M. L., et al.** (2008). "Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition." *J Clin Endocrinol Metab* 93(9): 3478-3483.
- Stenvers, K. L., Tursky, M. L., Harder, K. W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., et al.** (2003). "Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos." *Mol Cell Biol* 23(12): 4371-4385.
- Stibler, H., Blennow, G., Kristiansson, B., Lindehammer, H. ja Hagberg, B.** (1994). "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: clinical expression in adults with a new metabolic disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57(5): 552-556.
- Stolk, L., Perry, J. R., Chasman, D. I., He, C., Mangino, M., et al.** (2012). "Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways." *Nat Genet* 44(3): 260-268.
- Sullivan, A. K., Marcus, M., Epstein, M. P., Allen, E. G., Anido, A. E., et al.** (2005). "Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction." *Hum Reprod* 20(2): 402-412.

- Sullivan, S. D., Welt, C. ja Sherman, S.** (2011). "FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency." *Semin Reprod Med* 29(4): 299-307.
- Sundblad, V., Chiauzzi, V. A., Escobar, M. E., Dain, L. ja Charreau, E. H.** (2004). "Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF)." *Mol Cell Endocrinol* 222(1-2): 53-59.
- Sybert, V. P. ja McCauley, E.** (2004). "Turner's syndrome." *N Engl J Med* 351(12): 1227-1238.
- Syrrou, M., Georgiou, I., Patsalis, P. C., Bouba, I., Adonakis, G., et al.** (1999). "Fragile X premutations and (TA)_n estrogen receptor polymorphism in women with ovarian dysfunction." *Am J Med Genet* 84(3): 306-308.
- Zheng, Y., Vertuani, S., Nystrom, S., Audebert, S., Meijer, I., et al.** (2009). "Angiogenin-like protein 1 controls endothelial polarity and junction stability during sprouting angiogenesis." *Circ Res* 105(3): 260-270.
- Zinn, A. R. ja Ross, J. L.** (1998). "Turner syndrome and haploinsufficiency." *Curr Opin Genet Dev* 8(3): 322-327.
- Tachdjian, G., Aboura, A., Portnoi, M. F., Pasquier, M., Bourcigaux, N., et al.** (2008). "Cryptic Xp duplication including the SHOX gene in a woman with 46,X,del(X)(q21.31) and premature ovarian failure." *Hum Reprod* 23(1): 222-226.
- Taniyama, M., Tanabe, M., Saito, H., Ban, Y., Nawata, H., et al.** (2005). "Subtle 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency with homozygous Y201N mutation in an infertile woman." *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2508-2511.
- Tartaglia, N. R., Howell, S., Sutherland, A., Wilson, R. ja Wilson, L.** (2010). "A review of trisomy X (47,XXX)." *Orphanet J Rare Dis* 5: 8.
- te Velde, E. R. ja Pearson, P. L.** (2002). "The variability of female reproductive ageing." *Hum Reprod Update* 8(2): 141-154.
- Testa, G., Chiaffarino, F., Vegetti, W., Nicolosi, A., Caliari, I., et al.** (2001). "Case-control study on risk factors for premature ovarian failure." *Gynecol Obstet Invest* 51(1): 40-43.
- Thornton, B. ja Basu, C.** (2011). "Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software." *Biochem Mol Biol Educ* 39(2): 145-154.
- Timmreck, L. S. ja Reindollar, R. H.** (2003). "Contemporary issues in primary amenorrhea." *Obstet Gynecol Clin North Am* 30(2): 287-302.
- Tosh, D., Rao, K. L., Rani, H. S., Deenadayal, D. A., Murty, U. S., et al.** (2014). "Association between fragile X premutation and premature ovarian failure: a case-control study and meta-analysis." *Arch Gynecol Obstet* 289(6): 1255-1262.

- Unhavaithaya, Y., Hao, Y., Beyret, E., Yin, H., Kuramochi-Miyagawa, S., et al.** (2009). "MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation." *J Biol Chem* 284(10): 6507-6519.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., et al.** (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* 40(15): e115.
- Wakim, A. N., Polizotto, S. L., Buffo, M. J., Marrero, M. A. ja Burholt, D. R.** (1993). "Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells." *Fertil Steril* 59(6): 1187-1190.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., et al.** (1985). "Cloning of the human estrogen receptor cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23): 7889-7893.
- van der Steeg, J. W., Steures, P., Eijkemans, M. J., Habbema, J. D., Hompes, P. G., et al.** (2008). "Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women." *Hum Reprod* 23(2): 324-328.
- van der Stege, J. G., Groen, H., van Zadelhoff, S. J., Lambalk, C. B., Braat, D. D., et al.** (2008). "Decreased androgen concentrations and diminished general and sexual well-being in women with premature ovarian failure." *Menopause* 15(1): 23-31.
- van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., Scheffer, G. J., Looman, C. W., Habbema, J. D., et al.** (2005). "Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study." *Fertil Steril* 83(4): 979-987.
- Wang, H., Chen, H., Qin, Y., Shi, Z., Zhao, X., et al.** (2015). "Risks associated with premature ovarian failure in Han Chinese women." *Reprod Biomed Online* 30(4): 401-407.
- Wang, K., Li, M., Hadley, D., Liu, R., Glessner, J., et al.** (2007). "PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data." *Genome Res* 17(11): 1665-1674.
- Watkins, W. J., Umbers, A. J., Woad, K. J., Harris, S. E., Winship, I. M., et al.** (2006). "Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure." *Fertil Steril* 86(5): 1518-1521.
- Waxman, J. H., Ahmed, R., Smith, D., Wrigley, P. F., Gregory, W., et al.** (1987). "Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease." *Cancer Chemother Pharmacol* 19(2): 159-162.

- Weenen, C., Laven, J. S., Von Bergh, A. R., Cranfield, M., Groome, N. P., et al.** (2004). "Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment." *Mol Hum Reprod* 10(2): 77-83.
- Welt, C. K., Taylor, A. E., Fox, J., Messerlian, G. M., Adams, J. M., et al.** (2005). "Follicular arrest in polycystic ovary syndrome is associated with deficient inhibin A and B biosynthesis." *J Clin Endocrinol Metab* 90(10): 5582-5587.
- Verma, N., Jain, V., Birla, S., Jain, R. ja Sharma, A.** (2012). "Growth and hormonal profile from birth to adolescence of a girl with aromatase deficiency." *J Pediatr Endocrinol Metab* 25(11-12): 1185-1190.
- Westhoff, C., Gentile, G., Lee, J., Zacur, H. ja Helbig, D.** (1996). "Predictors of ovarian steroid secretion in reproductive-age women." *Am J Epidemiol* 144(4): 381-388.
- Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bezard, J. ja Josso, N.** (1984). "Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses." *J Reprod Fertil* 70(2): 473-479.
- Willemsen, R., Levenga, J. ja Oostra, B. A.** (2011). "CGG repeat in the FMR1 gene: size matters." *Clin Genet* 80(3): 214-225.
- Wu, J. Y., Shu, S. G., Yang, C. F., Lee, C. C. ja Tsai, F. J.** (2002). "Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations." *J Endocrinol* 172(3): 627-635.
- Vulto-van Silfhout, A. T., Hehir-Kwa, J. Y., van Bon, B. W., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., Meader, S., et al.** (2013). "Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation." *Hum Mutat* 34(12): 1679-1687.
- Yachelevich, N., Gittler, J. K., Klugman, S., Feldman, B., Martin, J., et al.** (2011). "Terminal deletions of the long arm of chromosome X that include the FMR1 gene in female patients: a case series." *Am J Med Genet A* 155A(4): 870-874.
- Yanase, T.** (1995). "17 alpha-Hydroxylase/17,20-lyase defects." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 153-157.
- Yang, J. J., Cho, L. Y., Lim, Y. J., Ko, K. P., Lee, K. S., et al.** (2010). "Estrogen receptor-1 genetic polymorphisms for the risk of premature ovarian failure and early menopause." *J Womens Health (Larchmt)* 19(2): 297-304.
- Yasui, T., Hayashi, K., Mizunuma, H., Kubota, T., Aso, T., et al.** (2012). "Factors associated with premature ovarian failure, early menopause and earlier onset of menopause in Japanese women." *Maturitas* 72(3): 249-255.
- Yoon, S. H., Choi, Y. M., Hong, M. A., Lee, G. H., Kim, J. J., et al.** (2010). "Estrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in patients with idiopathic premature ovarian failure." *Hum Reprod* 25(1): 283-287.

Young, I. D. (2010). *Medical Genetics*. New York, Oxford University Press Inc.

KASUTATUD INTERNETIALLIKAD

- 1) <http://www.endotext.org/chapter/evaluation-of-amenorrhea-anovulation-and-abnormal-bleeding/?singlepage=true> (kõlastatud 23.01.2015)
- 2) <http://decipher.sanger.ac.uk>
- 3) <http://www.ecaruca.net>
- 4) <http://genome.ucsc.edu/>
- 5) <http://www.omim.org>
- 6) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
- 7) <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- 8) <http://primer3.ut.ee/>
- 9) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/reverse.cgi>
- 10) <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>
- 11) <http://eu.idtdna.com/Unafold/>

LISA 1. UURITUD DOONORITE FENOTÜÜBID

Doonori kood	Menopausi vanus (aastates)	Fertiilse ea pikkus (aastates)	KMI (kg/m ²)	Raseduste arv
1	38	22	54,6	3
2	39	24	48,3	4
3	33	18	38,3	4
4	40	27	53,5	5
5	26	11	46,6	0
6	32	19	41,5	2
7	40	21	40,0	7
8	35	22	34,2	0
9	32	17	36,2	0
10	38	24	40,0	3
11	39	27	36,1	5
12	37	26	38,1	4
13	40	26	34,1	2
14	40	25	38,6	11
15	40	26	29,9	5
16	34	21	36,4	4
17	40	27	42,3	2
18	40	25	44,3	5
19	38	27	35,4	3
20	27	13	25,6	0
21	36	23	38,5	3
22	35	21	42,0	2
23	40	23	31,2	8
24	35	21	39,4	3
25	38	25	47,5	3
26	18	5	54,0	0
27	25	12	30,0	3
28	40	27	36,1	1
29	40	27	34,9	3
30	40	26	39,9	1
31	40	30	42,6	4
32	40	27	37,6	2
33	39	26	35,7	5
34	34	22	41,1	0

LISA 2. PRAIMERITE JÄRJESTUSED

Praimer	Region	Forward praimer	Reverse praimer
10_2_1	2p25.3	TGTGAGGGCTGATTATTTCTCT	TGTGGGTTAGGCAGTTATGG
10_2_3	2p25.3	ATCCCGCCTTCTTCAATCTAC	CAACACAGCAGCATTTC
10_2_4	2p25.3	TGGTTAGGCAGACGATAGGA	CCAAGGTGAGTTTCCCAGTT
10_2_5	2p25.3	TCTCTCTCTGTCCGTCATT	CTTATTCATCTCCGCCCTCC
10_2_6	2p25.3	CCCTCCATCCCTCCCAAT	GCTGTTCCTGACCTCCAC
10_2_7	2p25.3	TCAAGCCTCAATCTCTCCATAG	GGGTGGTGTGGGTGTAG
10_2_8	2p25.3	TGAATCTCTCCTCCCTTCTTTG	TCAACCCGCTTTCCTTTGT
29_1_1	1p22.1	AGTAGGGTGGGCTTATTTGTG	TTGTGGTGTGTTTGTGGAGT
29_1_2	1p22.1	CCCTCCCTCTGCTCTGG	ATCGTCTGCTCCGTGTTG
29_1_3	1p22.1	AAGCAGCAAACAGAAAGACAG	TGGGTAGAGGAGCAAATAGGA
29_1_4	1p22.1	GTGGACAAGAGGTCAGGAAG	GGATGGGCTAATGGCAGAG
29_1_5	1p22.1	CAGTCCACCTCCATCCT	CCTCCCTCGTTCCTTCGT
29_1_6	1p22.1	GTATGGTAGGCTGTTGTGAGG	GGGACTGTTCTAAGCATTGTGT
29_1_7	1p22.1	CCCACACTTCTTCATCCACA	GTCACTGGTCTTGCCACA
29_1_8	1p22.1	TCAGGCAGCATTGGGTATTT	CGTCAAGTCGGCATCTCC
16_11_1	11q21	CCTCCTCCAACACCACAC	GCCAATCCTGCTCCTATCTT
16_11_2	11q21	TACTGCCTCCCTACTGATGG	GCCTGTGCTTTGCTGA
16_11_4	11q21	TGCCCTGCTTTCATCTATTTCA	TCTGGTTGCTTTGTTTGCTTG
16_11_5	11q21	GGGCAAAGAGGCAACCAAA	CACCATCAGGCAGGACATTAC
16_11_6	11q21	GGGAAGGAAGACAAAGTGGA	TTAGGAGGGCGACAGCA
16_11_8	11q21	GGCAAGGTAAAGAAGTGGAGA	GTGGGTGTGTAGCGAGAG

Referents-

praimer	Region	Forward praimer	Reverse praimer
Ref17	1p35.3	TGCGAAACTGCGTGGACATT	ATGCGGAAGCCCATTTCAT
RefZNF80	3q13.3	CTGTGACCTGCAGCTCATCCT	TAAGTTCTCTGACGTTGACTGATGTG

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kati Hensen (sünnikuupäev: 10.08.1991),

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

Enneaegse munasarjade puudulikkusega seotud DNA koopiaarvu variatsioonide tuvastamine

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonoritel,

mille juhendaja on prof Ants Kurg,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015