

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

Triin Kitsemets

Kariloomade sooselektsiooni meetodid

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Ott Scheler, Ph.D

prof. Ants Kurg, Ph.D

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1. Spermi morfoloogia.....	5
1.1 Spermi pea	5
1.2 Spermi kael	7
1.3 Spermi saba.....	8
2. Spermi DNA organiseerimine.....	9
2.1 Histooidid	11
2.2 Ülemineku tuumavalgud (TP-d).....	11
2.3 Protamiinid	12
2.4 DNA pakkimine	13
3. Kodustatud veise (<i>Bos taurus</i>) kromosoomistik	14
4. Sorteerimise tehnoloogia	15
4.1 DNA-ga seonduvad värvid	15
4.2 Lävivoolu tsütomeetriline protsess –Beltsville spermi sorteerimise meetod	16
4.3 Teised meetodid järglaste soomääramiseks.....	18
4.3.1 Füüsikalised meetodid soomääramiseks	18
4.3.2 Immunoloogilised meetodid.....	20
4.4 Spermi sorteerimise kvaliteedi hindamine	21
ARUTELU	23
KOKKUVÕTE	26
Summary.....	27
KASUTATUD KIRJANDUS.....	28
Tänuavaldused	37
Lihtlitsents lõputöö elektrooniliseks avaldamiseks	38

KASUTATUD LÜHENDID

FISH	fluorestsents <i>in situ</i> hübridisatsioon
CCP	rakku penetreeruv peptiid
H33342	Hoechst 33342
H333258	Hoechst 333258
IVF	<i>in vitro</i> viljastamine
PT	perinukleaarne teeka
P1/P2	protamiin1 ja 2
TP	ülemineku tuumavalk
TP1/TP2	üleminekuvalk 1 ja 2

SISSEJUHATUS

Loomapidajatele on sooselektsioon oluline sest, et see võimaldab neil saada soovitud soost kariloomi (veised, kitsed, pühvel jt) ning vähendada majanduslikult mitte nii väärtuslike loomade arvukust. Selline aretusstrateegia annab piimakarja pidajatele võimaluse suurendada emasloomade hulka, vähendada veiste osakaalu karjas ning suurendada selle kaudu majanduslikku sissetulekut. Kariloomade puhul kasutatakse soo järgi selekteeritud spermat ka loomade geneetiliste omaduste parandamiseks ning soovitud tunnuste levitamiseks üle kogu karilooma populatsiooni. Kõrge väärtusega emasloomade viljastamine soo järgi selekteeritud spermaga aitab suurendada järglaste hulka ning vähendab vajadust uute kariloomade ostmiseks. Lisaks sellele on kõrge geneetilise väärtusega isasloomad vajalikud esivanemana kunstliku seemenduse programmides.

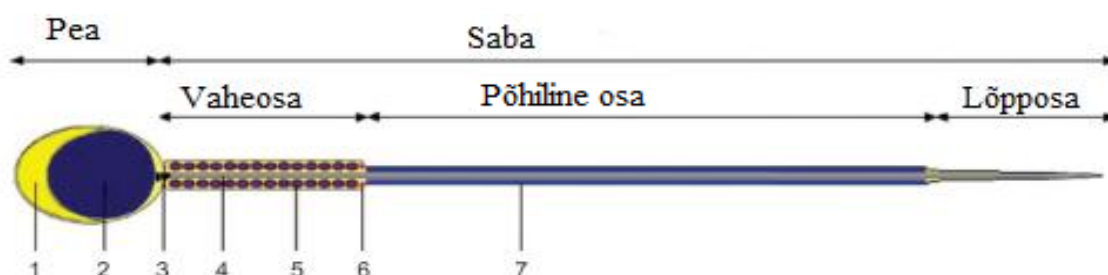
Aastaid on uuritud erinevaid võimalusi, kuidas määrata järglaste sugu enne kunstlikku viljastamist. Tänapäeval ainus kasutuses olev spermide soomääramise tehnoloogia on läbivoolu tsütomeetria. Läbivoolu tsütomeetri abil on võimalik sperme sorteerida suure puhtusega, kuid siiski ei ole see täiuslik meetod. Protsess toimub aeglaselt ja kõrge rõhu all, mis omab omakorda negatiivset mõju spermide elu- ja viljastamisvõimekusele. Seetõttu on vajadus uute alternatiivsete tehnoloogiate järele, mis võimaldaksid kiiremat selektsiooni, sperme võimalikult vähe kahjustades.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on anda kirjandusel põhinev ülevaade tehnoloogiatest, mida on kasutatud imetaja spermide soomääramiseks ning mis võiksid asendada hetkel kasutuses olevat läbivoolu tsütomeetrit. Antud referatiivne töö on jaotatud kaheks osaks. Esimeses osas antakse lühike ülevaade imetaja spermi ehitusest ja DNA pakkimisest. Teises osas on välja toodud valik meetoditest, mille abil oleks võimalik sperme soo järgi selekteerida.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Spermil morfoloogia

Küpsel spermil (60 μm) saab eristada kolme kindla ülesandega piirkonda: spermil pea, mis on seotud spermil ja munaraku ühinemisega; vaheosa koos mitokondritega, mis on vajalikud energia tootmiseks ja saba, mille ülesandeks on spermil liikumisvõime andmine (Flesch ja Gadella, 2000; Strachan ja Read, 2011). Siin ning edaspidi on tekstis räägitud imetaja spermilist, kui ei ole öeldud teisiti.



Joonis 1. Spermil ehitus (Toure *et al.*, 2011 järgi).

(1) Akrosoom, (2) tuum, (3) kael, (4) aksoneem, (5) mitokondrid, (6) *annulus*, (7) fibroosne ümbris.

1.1 Spermil pea

Spermilid võivad olla erineva peakujuga: spaatlikujulise (veis jänes, metssiga), ovaalse (inimene ja teised primaadid) ja sirpja kujuga (närilised) (Dvoráková *et al.*, 2005). Spermil peakujust sõltumata on võimalik selles eristada kolme põhilist osa: tuum, akrosoom, ja tsütoplasmaatilised kihid (Ferrara *et al.*, 2013). Samuti on selles neli erinevat membraanide tüüpi: plasmamembraan, välimine akrosomaalne membraan, sisemine akrosomaalne membraan ja tuuma membraan (Flesch ja Gadella, 2000). Plasmamembraani saab omakorda jagada kaheks suureks domääniks: akrosomaalseks ja postakrosomaalseks domääniks (Downing *et al.*, 2005).

Tuum

Spermil peale annab kuju spermil paiknev tuum, mis moodustab peast ligikaudu 60% ning on ümbritsetud õhukese kahekihilise membraaniga (Kärner 1997; Ho ja Suarez, 2003). Tuum sisaldab haploidset kromosoomistikku, mis viljastumisel munarakku sisenedes määrab ära järglase soo¹ (Ferrara *et al.*, 2013).

Akrosoom

Tuuma ees paiknev piirkond on kaetud mütsitaolise struktuuriga, mida nimetatakse akrosoomiks. See on spermile omane organell, mis sisaldab hüdrolüütilisi ensüüme, et viljastumisel munarakukestasid lõhkuda (Kärner, 1997). Akrosoomi moodustumine algab varajases spermiogeneesis proakrosomaalse vesiikuli tekkimisega, mis on süsivesikuterikas graanul ning pärineb spermatiidi Golgi kompleksist (Kallajoki, 1986).

Tsütoplasmaatilised kihid

Perinukleaarne teeka (PT) on tihe tsütoplasmaatiline struktuur, mis moodustub spermatogeneesi ajal plasmamembraani ja tuumamembraani vahele ning täidab suure osa spermi peas paiknevast vabast tsütoplasmaatilisest ruumist (Aul ja Oko, 2001; Sutovsky *et al.*, 2003). PT tsütoskelett-struktuur ümbritseb tuuma ja koosneb kolmest osast: subakrosomaalsest, ekvatoriaalsest ja postakrosomaalsest piirkonnast, millest igaühel on oma kindel funktsioon (Kitamura *et al.*, 2004). PT ei ole püsiv struktuur, vaid eemaldatakse spermi peast viljastumise käigus (Sutovsky *et al.*, 2003).

Subakrosomaalne piirkond

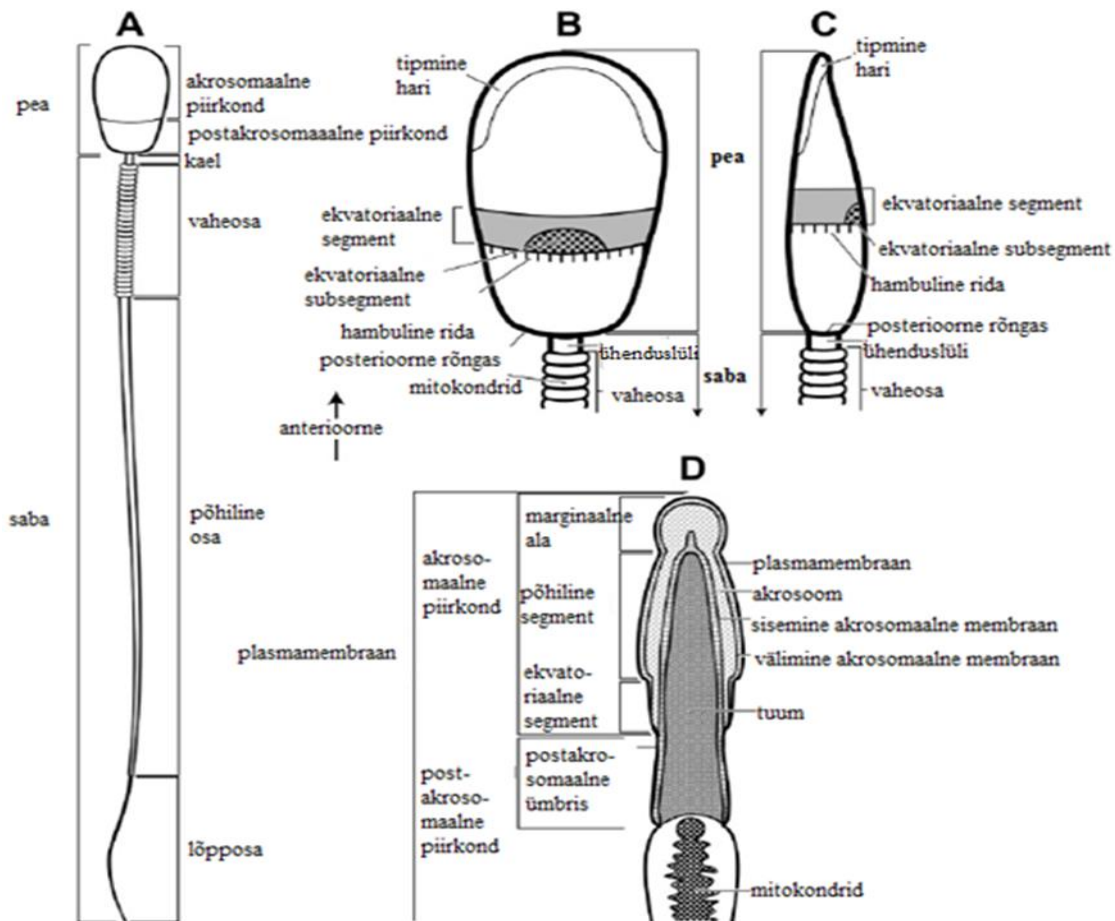
PT anterioorse osa k.a perforatooriumit kutsutakse subakrosomaalseks kihiks (Toshimori, 2003), mis paikneb akrosomaalse segmendi all ning mille ülesandeks on akrosoomi seondamine (Barratt ja Jonge, 2010).

Ekvatoriaalne piirkond

Ekvatoriaalne segment on piirkond plasmamembraanil, mis paikneb akrosoomi ja postakrosoomi vahel ning selles piirkonnas saab alguse spermi ja ootsüüdi ühinemine (Sutovsky *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2008).

Postakrosomaalne piirkond

Perinukleaarse teeka postakrosomaalne segment moodustab jäiga ning tiheda lehtrikujulise kompleksi, mida nimetatakse ka karikaks (lad k *calyx*) (Longo *et al.*, 1987). PT postakrosomaalne segment arvatakse olevat seotud viljastumisel toimuva munaraku aktiveerimisega (Kitamura *et al.*, 2004).



Joonis 2. Imetaja spermi pea koos plasmamembraaniga (Meisner *et al.* 2005 järgi). **A:** kogu sperm; **B:** lame külg; **C:** lateraalne külg; **D:** piklik läbilõige.

1.2 Spermi kael

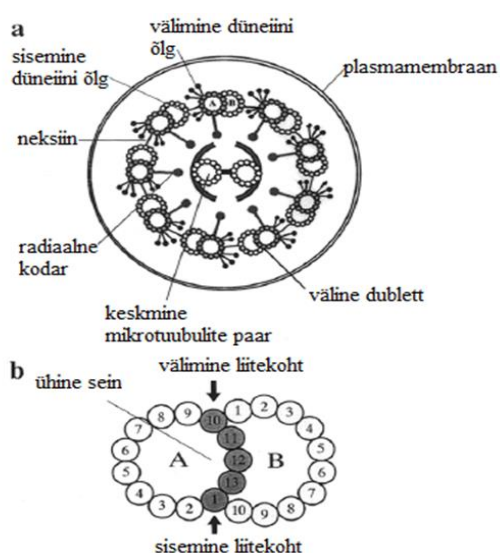
Spermi kael on ühenduslüli, mis liidab omavahel spermi pea ja saba. Selle põhilisteks osadeks on basaalplaat, *capitulum* ehk väike pea, tuuma distaalne osa koos tuumamembraaniga, proksimaalne ja distaalne tsentriool ning segmentidest moodustunud kolonnid (Toshimori, 2003). Proksimaalne tsentriool koosneb üheksast mikrotoubuli tripletist ja tühjast kambrist, mis jääb järele peale spermatogeneesis toimuvat distaalse tsentriooli degradatsiooni (Barratt ja Jonge, 2010). Distaalsest tsentrioolist kasvab spermatogeneesi jooksul välja viburi toes ehk aksoneem (Kärner, 1997).

1.3 Spermi saba

Saba annab spermile liikumisvõime ning aitab tal munarakku viljastada (Barratt ja Jonge, 2010). Saba on esimene struktuur, mis areneb spermatogeneesis ning mille moodustumine toimub samal ajal kui transporditakse tsütoplastmast mitokondreid, et nende abil moodustada spiraalselt keerdunud kest ümber saba vaheosa (Flesch ja Gadella, 2000). Imetajate spermi saba ehk *flagellum* koosneb aksoneemist, mida ümbritsevad üksteisest selgesti eristuvad struktuurid, nagu fibroosne ümbris, välimised tihedad fiibrid ja mitokondriaalne ümbris. Morfoloogiliselt jaotub spermi saba kolmeks üksteisest eristuvaks osaks: vaheosa, põhiline osa ja lõpposa. Nendel kolmel segmendil on ühine aksoneem ehk saba mootor, mis kulgeb läbi kogu saba ja koosneb tüüpiliselt 9+2 mikrotuubulite komplektist (Cao *et al.*, 2006).

Aksoneem

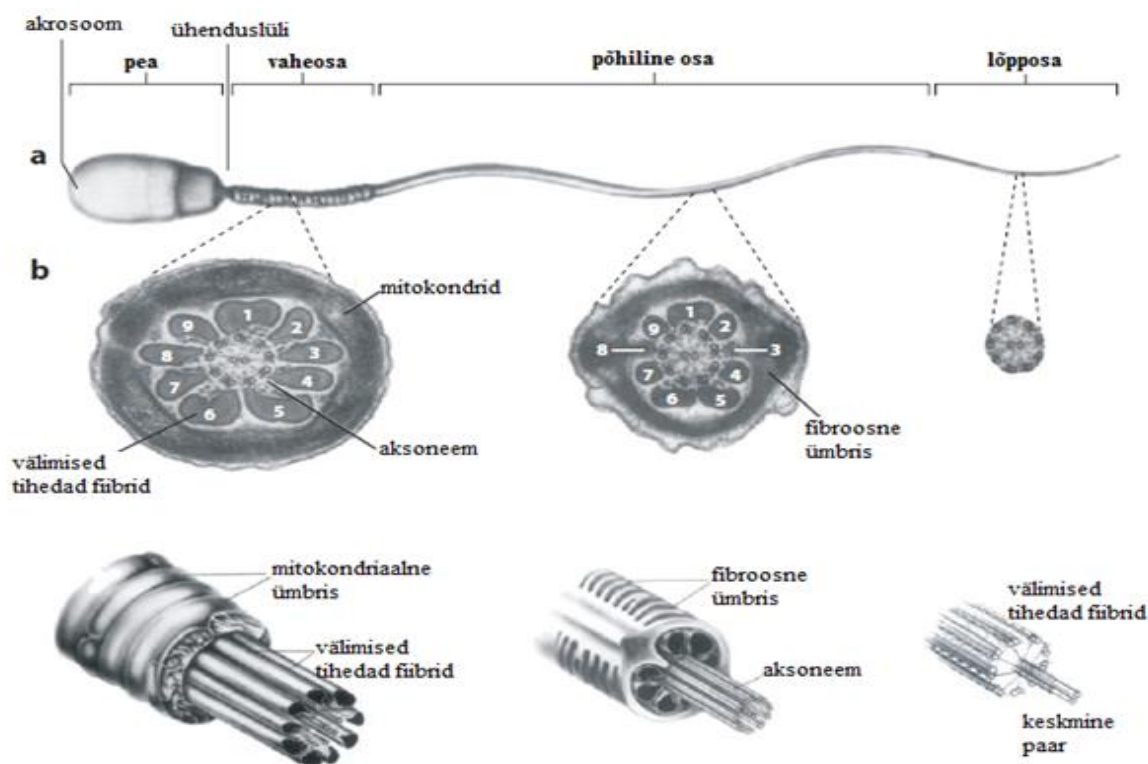
Aksoneem on viburi toes, mis läbib kogu saba ning annab spermile liikumisvõime. Ta koosneb kahest tsentraalselt asetsevast mikrotuubulist, mille ümber paikneb üheksa mikrotuubuli dubletti (joonis 3) (Kärner, 1997). Mikrotuubulid pärinevad tuuma taga paiknevast tsentrioolist ning koosnevad peamiselt α ja β tubuliinist, mis on olulised viburile struktuuri ja liikuvuse andmisel. Spermi liikumiseks vajaliku tõukejõu annab valk düneiin, mis on seotud mikrotuubulitega. Düneiin on ATPaas – ensüüm, mis hüdrolüüsib ATP-d ning muudab hüdrolüüsil vabaneva keemilise energia mehaaniliseks liikumisenergiaks (Barratt ja Jonge, 2010; Gilbert, 2010).



Joonis 3. a) Ristlõige spermi sabast, milles on näidatud 9 välimist mikrotuubuli dubletti (A ja B), kaks keskmist mikrotuubuli paari koos nendega seotud komponentidega (düneiin, neksiin ja radiaalsed kodarad). **b)** Suurendatud kujutis välimise dubleti ristlõikest, kus protofilamendid on nummerdatud. (Song ja Mandelkow, 1995 järgi).

Vaheosa, põhiosa ja lõpposa

Vaheosa seondub saba põhilise osaga *annulus*'e ehk rõnga abil, mida kutsutakse ka Jenseni rõngaks. *Annulus*'e ülesandeks on kontrollida vaheosa korrektset ülesehitust (Touré *et al.*, 2007). Vaheosa koosneb ümber aksoneemi ja välimiste tihedate fiibritest ja mitokondritest, milles toimub ATP süntees (Mukai ja Travis, 2012).



Joonis 4. Spermi ehitus (Gaffney *et al.*, 2011 järgi). **a)** Spermi saba piirkonnad; **b)** saba vaheosa ristlõige.

Saba põhiline osa moodustub: aksoneemist, välimistest tihedatest fiibritest ning fibroossest ümbrisest, mis kapseldab aksoneemi ja välimisi tihedaid fiibreid (Toshimori, 2003). Saba lõpposa koosneb ainult aksoneemi jääkidest, mis on ümbritsetud plasmamembraaniga. Saba põhiosast distaalselt lõpposa poole liikudes toimub välimiste tihedate fiibrite ja fibroosse ümbrise pidev kitsenemine kuni saba lõpuni (Cao *et al.*, 2006).

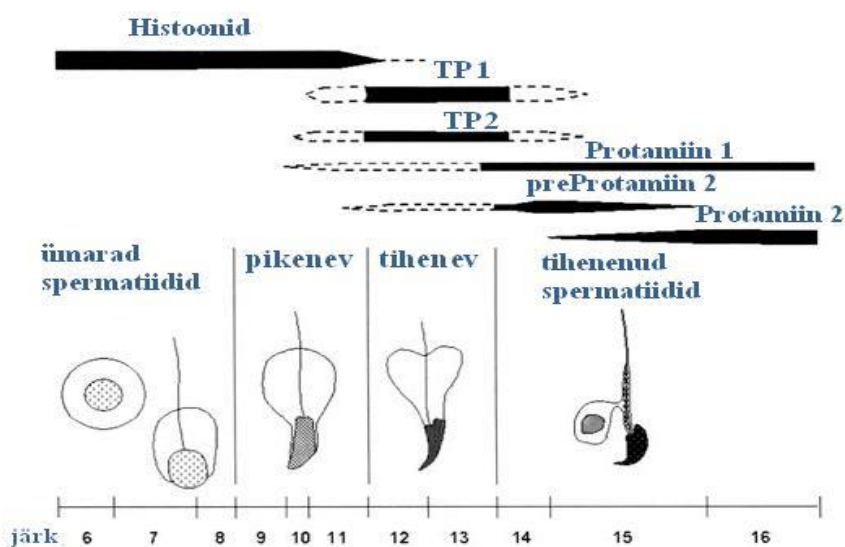
2. Spermi DNA organiseerimine

1980-datel arvati, et spermi kromatiin on organiseeritud nukleosoomidesse või nukleosoomi taolistes kompleksidesse. Kuid sellisel kujul DNA pakkimine üksikuisse, tihedalt pakitud nukleosoomi vajaks spermi peas $\sim 9,9 \mu\text{m}^3$ suurust ruumala, mis on ligikaudu kaks korda rohkem kui spermi tuum on võimeline mahutama. Järelikult on spermi kromatiin

organiseeritud erinevalt võrreldes somaatilises rakus oleva nukleosoomi struktuuriga (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000).

Isassugurakkudes toimub spermatogeneesi jooksul nukleosoomse struktuuri asendamine spermi spetsiifilise DNA-valk kompleksiga (Pirhonen, 1994). Kromatiini ümber organiseerimine toob kaasa mitmeid muutusi: tuuma kuju muutumise; negatiivselt superspiraliseerunud nukleosoomse DNA mittespiraliseerunuks muutumise, mille tõttu tekivad lühiajalised katked DNA ahelasse; kromatiini tihenemise (Zhao *et al.*, 2004).

Kromatiini ümber organiseerimiseks on vaja spetsiifilisi DNA-ga seonduvaid valke. Spermatiidi diferentseerumise käigus asendatakse histoonid nn. ülemineku valkudega (transition proteins TP) ehk testise-spetsiifiliste tuuma valkudega. Spermatiidi arengu viimases staadiumis, kui kromatiini tihenemine spermis lõppeb, asendatakse üleminekuvalgud omakorda protamiinidega (joonis 5). Tekkinud DNA-protamiin kompleks moodustab väga tiheda ja geneetiliselt inaktiivse spermi genoomi, mis on hästi kaitstud mutageensete ühendite ning füüsiliste ja keemiliste stressifaktorite eest ajal, kui sperm liigub suguteedes (Pirhonen, 1994).



Joonis 5. Histoone, üleminekuvalkude (TP) ja protamiinide (P1 ja P2) vahetumine hiire spermatogeneesis ja spermatiidi arengustaadiumid (Meistrich *et al.*, 2003 järgi).

2.1 Histoonid

Histoonid on aluselised valgud, mis jaotuvad spermi tuumas korrapäraselt ning sisaldavad palju lüsiini ja arginiini jääke (Godde ja Ura, 2009). Imetaja spermatogeneesis toimub enamuse somaatiliste histoonide asendumine testise spetsiifiliste variantidega, kuigi osa somaatilistest histoonidest säilib ka sugurakkudes (Dadoune, 2003). Histoonide variandid asendavad spermatotsüütides üle poole üksikutest somaatilistest histoonidest ning neid ekspresseeritakse vaid ajutiselt. Histoonide variandid roti spermatogeensetes rakkudes võib jagada kolme kategooriasse (Tabel 1) (Pirhonen, 1994).

Tabel 1. Histoonide variandid roti spermatogeensetes rakkudes (Pirhonen, 1994 järgi).

Histoonid	Somaatiline tüüp	Sugurakus suurel hulgal*	Sugurakuspetsiifilised
H1	H1b, H1c, H1d, H1e, H1 ⁰	H1a	H1t
H2A	H2A.1, H2A.2, H2A.Z	H2A.X	TH2.A
H2B	H2B.1	-	TH2.B
H3	H3.1, H3.2, H3.3	-	TH3
H4	H4	-	-

*Leitud ka somaatilisest rakust

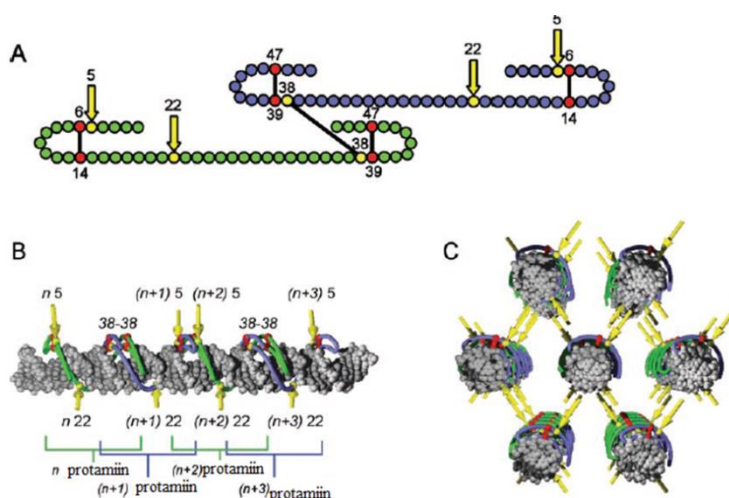
2.2 Ülemineku tuumavalgud (TP-d)

Imetajates leiduvaid üleminekuvalke (transition proteins TPs) kutsutakse ka ülemineku tuuma valkudeks, sest nad on vahepealsed valgud üleminekul histoonidest protamiinideks (Meistrich *et al.*, 2003). Ülemineku tuumavalgud on aluselised kui histoonid, kuid mitte nii aluselised kui protamiinid (Wouters-Tyrou *et al.*, 1998). Imetajate rakkudest on leitud neli erinevat üleminekuvalku (TP1-TP4), kuid kõige paremini on neist iseloomustatud kahte: ülemineku tuumavalku 1 (TP1) ja 2 (TP2) (Meistrich *et al.*, 2003; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998). Histoonide asendus TP1 ja TP2 valkudega toimub üheaegselt transkriptsiooni lakkamisega (Baskaran ja Rao, 1990). Arvatakse, et TP1 soodustab DNA üheaahelaliste katkete parandamist. Histoonide eelmaldamisele ning üheaahelaliste katkete parandamisele või ligeerimisele järgnevalt sünteesitakse protamiinid, mis säilitatakse kromatiinis, et viia lõpule kromatiini tihenemine ning kindlustada spermi genoomi inaktiivsus hetkeni kuni see jõuab munarakku ja reaktiveeritakse. TP2 on valk, mille funktsiooniks on pakutud CG saartele seondumise kaudu transkriptsiooni mahasurumist (Brewer *et al.*, 2002).

2.3 Protamiinid

Protamiinidel on mitu olulist ülesannet: esiteks, muudavad nad genoomi kompaktsemaks, et moodustuks tihedam ja hüdrodünaamilisem tuum, mis võimaldaks spermil liikuda kiiremini ning suurendaks spermi tõenäosust esimesena ootsüüti viljastada, teiseks, kaitsevad protamiinid geneetilist infot nukleaaside, mutageenide ja aktiivsete hapniku radikaalide eest ning kolmandaks, viivad nad läbi epigeneetilise modifitseerimise spermatogeneesi ajal, eemaldades transkriptsiooni faktoreid ja valke, et aidata taastada viljastumise järgset imprinting'ut otsüüdis (Carrell *et al.*, 2007; Andrabi, 2007).

Protamiinid on aluselised valgud, mis kuuluvad arginiinirikaste valkude perekonda (Balhorn, 2007; Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000). Imetajate spermid sisaldavad kahte tüüpi protamiine: protamiin I (P1) ja protamiin II (P2). Protamiin I esineb erinevalt protamiin II-st kõigi imetajate spermides ning tema aminohappeline järjestus on kõrgelt konserveerunud (Vilfan *et al.*, 2004). Imetajate spermidest näiteks veise sperm kasutab ainult protamiin I-te, millele on iseloomulik kõrge tsüsteiini jääkide sisaldus. Küpses veise spermis osaleb kahe intramolekulaarse disulfiidsideme moodustumises neli tsüsteiini molekuli seitsmest (Cys-6-Cys-14 ja Cys-39-Cys-47) (Vilfan *et al.*, 2004).



Joonis 8. Mudel protamiin-DNA kompleksi jaoks veise spermi kromatiinis (Vilfan *et al.*, 2004 järgi). **A**, veise kaks volditud protamiini monomeeri on omavahel kovalentselt seondunud Cys-38-Cys-38 disulfiidse sideme abil. Tsüsteiinijäägid, mis on seotud molekulisest disulfiidsidemete moodustumisega on märgitud punasega; tsüsteiinijäägid, mis on seotud molekulidevaheliste disulfiidsidemete moodustumisega on märgitud kollasega. Cys-5 ja Cys-22 positsioonid on rõhutatud kõigil kujutistel kollase noolega. **B**, DNA B-vormi neli keerdu liidetakse protamiini kahe dimeeri abil. Iga dimeer seondub DNA B-vormi suure vao ümber kaks korda. Keskmise DNA-ga seonduv domään paikneb sügaval suure vao sees ja volditud terminaalne ots ulatub välja väikesest vaost. **C**, seitse veise protamiin-DNA kompleksi jooniselt 8B on jaotunud heksagonaalselt tihedalt pakitud võresse.

2.4 DNA pakkimine

Imetaja spermi DNA on väga tihedalt kokku pakitud ning on vähemalt kuus korda tihedam kui DNA mitootilistes kromosoomides. Sellise tiheda kokkupakkimise saavutamiseks seondub DNA protamiinidega, et moodustada lineaarseid külj-külje kõrval asetsevaid kromatiinide ridu. Selline pakkimine erineb märkimisväärselt DNA pakkimisest somaatilise raku tuumas ja mitootilistes kromosoomides, mille puhul on DNA keerdunud ümber histoonide oktameeri, et moodustada nukleosoomi. Imetaja spermi DNA organiseeritus sarnaneb mõnevõrra ka somaatilise raku struktuurile, sest mõlemad nii spermis olevad lineaarsed kromatiini read kui ka somaatilises rakus olevad 30-nm solenoidi filamendid on organiseeritud tuuma maatriksi abil lingu taolistesse domäänidesse (Ward ja Coffey, 1991). Kaksikahel spermi DNA-s on peaaegu identne somaatilise raku DNA-ga (joonis 6. A ja F lisa). Erinevused on ainult DNA hüpermetülatsiooni ulatuses ning telomeeride pikkuses (De Lange et al., 1990; Groudine ja Conkin, 1985; Ward, 1993).

Protamiin-DNA kompleks

Spermi protamiin-DNA kompleks erineb oma ülesehituse poolest somaatilise raku nukleosoomi struktuurist. Imetaja spermi DNA-ga seonduvad väga aluselised protamiinid (Ward, 1993). Protamiinid seonduvad DNA-ga nii, et positiivse laenguga arginiini jäägid neutraliseerivad negatiivselt laetud fosfodiesterjäägid (Hennig, 2005; Ward, 1993). Selline seondumine muudab DNA neutraalseks polümeeriks. Protamiin-DNA kompleksi funktsionaalne tähtsus arvatakse olevat seotud spermi DNA inertsuse tagamisega. Spermi DNA-l puudub vajadus olla superspiraliseerunud, sest ta ei replitseeri ega transkribeeri DNA-d (Ward, 1993; Balhorn, 1982; Hennig, 2005).

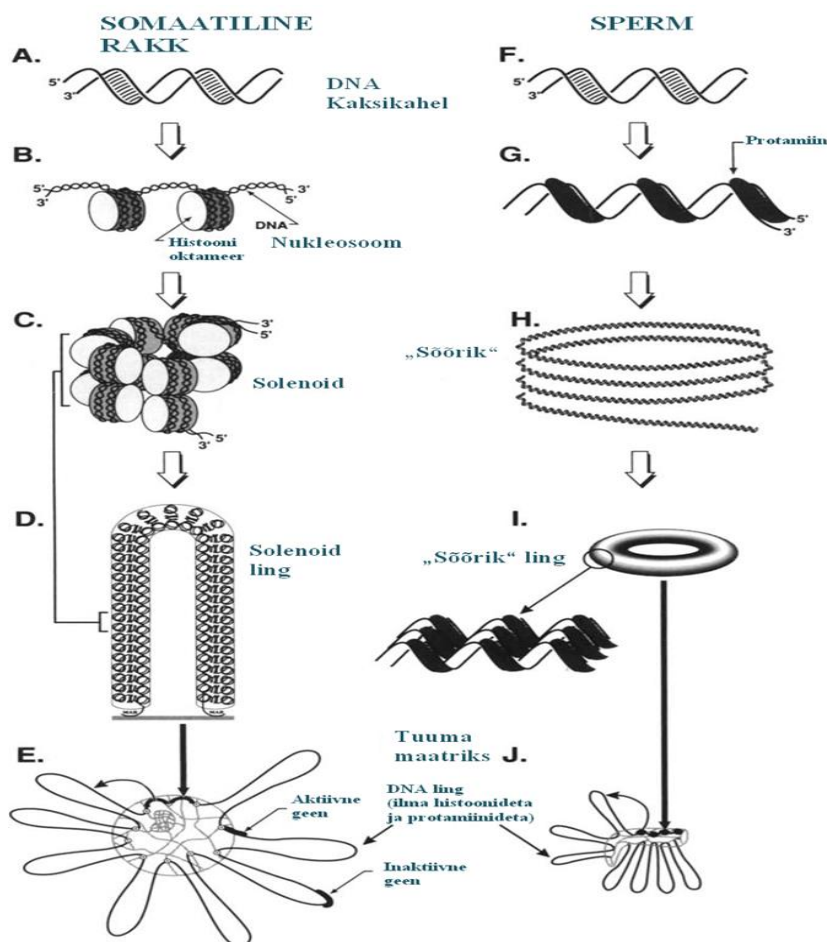
„Sõõrik“ struktuur

Välja on pakitud mudel, mis sarnaneb imetaja spermis oleva solenoid-struktuuriga. Selle mudeli kohaselt oleks võimalik DNA keerata kaheks spiraalseks ringiks iga solenoidi keeru kohta kromatiinis. Kaheteistkümnest nukleosoomsest superspiraalist tuleb eemaldada üksteist superspiraali, mille järel saab DNA keerduda kaheks spiraalseks ringiks. Hiljem saavad need kaks spiraalset DNA ringi koos protamiinidega seonduda teineteisega van der Waalsi jõudude abil (joonis 6. H lisa)(Ward, 1993; Balhorn, 1982).

„Sõõrik“ ling struktuur

Nii somaatilise raku kui spermi tuumas on kromatiin organiseeritud lingu domäänidesse, mis on seotud tuuma maatriksiga (Ward, 2010). Lingu domäänid seonduvad tuuma maatriksi külge spetsiifilise järjestuse abil (Ward, 1993). Spermi tuumas olevad DNA lingu domäänid

on väiksemad kui somaatilises rakus ning nende ligikaudne suurus ulatub kuni 50 kb-ni (Boissonneault, 2002). Spermi DNA ligu domäänidel ei esine superspiraliseerumist tänu protamiinide seondumisele spermi DNAGA (Ward ja Coffey, 1991; Balhorn, 1982).



Joonis 6. Võrdväärset DNA pakkimise tasemed somaatilises ja spermi kromatiinis põhinedes „sõõrik-ling“ mudelil (Ward, 1993 järgi). Somaatilises rakus on DNA (A) keerdunud kaks korda ümber histooni oktameeride nukleosoomiks (B), mis seejärel keerdub solenoidideks (C), milles on kuus nukleosoomi ühe keeru kohta. DNA on solenoid-struktuuris seotud ligikaudu 60 kb vahede kaudu oma alustega tuuma maatriksi külge, et moodustada DNA ligu domääne (D). Need solenoid-lingu domäänid paiknevad somaatilise raku tuumas, kuid peale histoonide eemaldamist on nad nähtavad ka tuumast väljaspool (E). Aktiivsed geenid on tugevamalt seotud somaatilise tuuma maatriksiga kui inaktiivsed geenid. Spermi tuumas seonduvad tugevalt aluselised protamiinid piki kaksikheeliksit, neutraliseerides DNA negatiivset laengut (G). Protamiinidega seondunud DNA keeratakse väga väikeste keerdudegaga protamiin-DNA kompleksis kontsentrilisteks ringideks (H). Need ühe liguuga ringid ühinevad seejärel „sõõriku“ kujuliseks struktuuriks (I), milles neutraalne DNA-protamiini kompleks on pakitud tugevalt kokku van der Waalsi jõudude abil. Iga „sõõriku“ struktuur esindab ühte DNA ligu domääni, mis on seondunud spermi tuuma maatriksiga (J). Spermi DNA ligu domäänid on väiksemad kui somaatilise raku omad.

3. Kodustatud veise (*Bos taurus*) kromosoomistik

Koduveis kuulub sõraliste seltsi (*Artiodactyla*), veislaste sugukonda (*Bovidae*) ja veise perekonda (*Bos*) (Kantanen, 1999). Veislaste sugukond on kõige mitmekesisem sõraliste perekond, kuhu kuulub 137 liiki (Gallagher *et al.*, 1999). Koduveis põlvneb ürgveisest *Bos*

primigenius'est ning koosneb rohkem kui 800 erinevast tõust, mis on grupeeritud kaheks liigiks: *Bos taurus* ja *Bos indicus* (Canavez *et al.*, 2012; Kikkawa *et al.*, 2003). Mõlemad lahknesid ühisest esivanemast 250 000 aastat tagasi (Burt, 2009). *Bos taurus* jaguneb omakorda kaheks alaliigiks: *Bos taurus taurus* (koduveis) ja *Bos taurus indicus* ehk seebu (Hassanin ja Ropiquet, 2004). *Bos taurus* on levinud peamiselt Euroopa riikides ja Argentiinas. *Bos indicus* on aga tüüpiline kariloom Indias, Brasiilias, Lõuna-Ameerikas, Põhja-Austraalias ning Lõuna-Hiinas (Canavez *et al.*, 2012).

Sugukromosoomid

Koduveise somaatilistes rakkudes on 60 kromosoomi, millest 29. paari on autosoomid ja 30. paari moodustavad sugukromosoomid X ja Y (Garner ja Seidel, 2008; Moruzzi, 1979) X-kromosoom on suurem kui Y-kromosoom, mis on väiksem kogu kromosoomide komplektist (Womack, 2012). Seetõttu sisaldab X-kromosoom rohkem DNA-d kui väiksem Y-kromosoom. Veise X ja Y spermides sisalduv DNA hulga erinevus jääb vahemikku 3% kuni 4%. (Garner, 1983; Hamano 2007). Samuti sõltub X ja Y spermides olev erinev DNA kogus loomatõugude päritolust. See on põhjustatud Y-kromosoomi varieeruvusest näiteks *Bos taurus*'e ja *Bos indicus*'e vahel (Garner 1983; Hamano 2007; Garner, 2006).

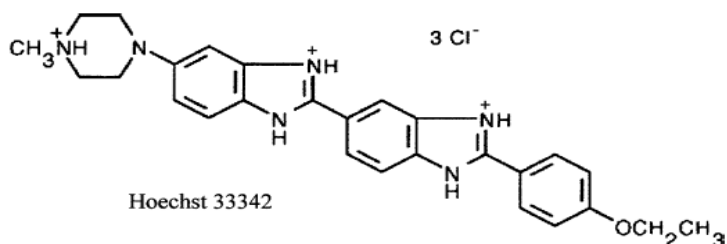
4. Sorteerimise tehnoloogia

Sorteeritud sperma kasutamine on suureks abiks põllumajanduses, kus soo järgi selekteeritud sperma abil on võimalik saada soovitud soost kariloomi (Hohenboken 1999). Sorteeritud sperme on hakatud kasutama ka looduskaitse eesmärkidel, näiteks loomaaias peetavate loomade peal ning ka looduses väljasuremisohus olevate loomade jaoks (O'Brien *et al.*, 2009). Soo järgi selekteeritud spermat on võimalik kasutada ka haruldaste ja hävimisohus olevate karilooma (veised, pühvel, kitsed) ning kodulooma (hobused, sead, lambad) tõugude säilitamiseks (Gordon, 2005). Lisaks karjakasvatusele saab sorteeritud sperme kasutada ka teistes kunstliku viljastamise valdkondades, nagu võistlusloomade aretamiseks, lemmikloomade peal ja muudes valdkondades, millest on pikemalt kirjutanud Seidel (2003).

4.1 DNA-ga seonduvad värvid

DNA-ga seonduvaid värve saab kasutada spermis oleva DNA koguse määramiseks, mida omakorda on võimalik kasutada sorteerimiseks. Mõned fluorestseeruvad värvid on võimelised tugevalt nukleiinhapetega seonduva, mistõttu on võimalik täpselt määrata spermis tuumas olevat DNA kogust (Lawrence *et al.*, 2005; Sklar, 2005).

Hoechst 33342 (H33342) (joonis 8) on kollane tahke aine ($C_{27}H_{28}N_6O \cdot 3HCl$), mis on mõõdukalt veeslahustuv ja suhteliselt mittetoksiline ning ergastub 350 nm lainepikkuse juures (Seidel ja Garner, 2002). Hoechst 33342 on elusrakke värviv värv, mis tungib läbi rakumembraani ja seondub tugevalt neljale AATT aluspaarile, mistõttu on ta kasutamisel ka palju ohutum, kui värvid, mis seonduvad DNA aluspaaride vahele (Garner, 2009; Watkins et al., 1996).



Joonis 8. Hoechst 33342 struktuur (Garner, 2007 järgi).

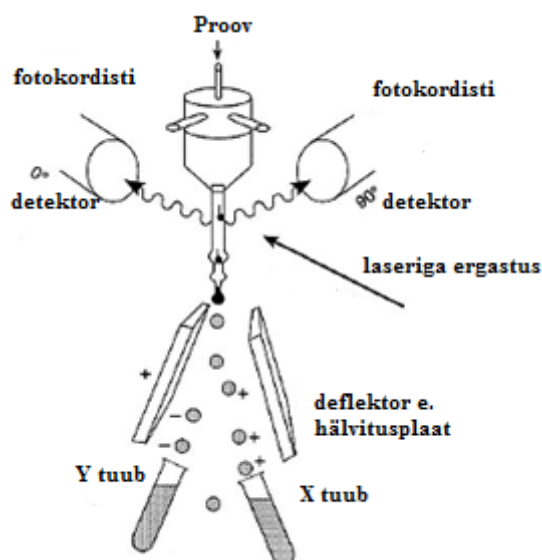
Spermide populatsioonis kasutatakse H33342-ga värvitud hukkunud rakkude määramiseks nii propiidium jodiidi kui ka punast toiduvärvi, mis aitab ära hoida võimalike mutageensete mõjude teket. (Welch ja Johnson, 1999). Toiduvärviga värvimise meetod toimib selliselt, et spermid, millel on kahjustatud rakumembraan, muutuvad värviliseks, samal ajal aga need rakud, millel on membraan terve, ei värvu toiduvärviga. Kahjustatud ja surnud rakkudes kustutab toiduvärv Hoechst 33342 fluorestsentsi, mistõttu fluorestseeruvad need spermid halvasti ning eemaldatakse sorteerimise protsessi käigus (Seidel, 2007). Teiseks võimaluseks värvida hukkunud rakke on kasutada Hoechst 333258, mis erineb Hoechst 33342-st sellepoolest, et tema benseeniringis etüülgrupi asemel hüdroksüülgrupp. Selline asendus muudab Hoechst 333258 rakumembraani mitte läbivaks ning kasulikuks hukkunud ja kahjustatud rakkude määramisel (Garner, 2009).

4.2 Lävivoolu tsütomeetiline protsess –Beltsville spermi sorteerimise meetod

Lävivoolu tsütomeetiline analüüs spermide sorteerimiseks põhineb X ja Y kromosoomi DNA koguse erinevusel ning DNA-ga seondunud fluorestsentsvärvi koguse mõõtmisel. Spermi DNA hulk määratakse kasutades fluorestseeruvat värvi Hoechst 33342, mis tungib läbi spermi membraani ja seondub DNA-ga. X-kromosoomiga sperm sisaldab rohkem DNA-d kui Y-kromosoomiga sperm (veiste puhul ligikaudu 4%), mistõttu on X-spermiga lõpuks seondunud ligikaudu 4% rohkem värvi kui Y-spermiga ning seetõttu fluorestseeruvad nad eredamalt (Seidel, 2007).

Spermid sisenevad ükshaaval voolukambrisse ning iga sperm hinnatakse individuaalselt. Fluorestseeruvad märgised ergastatakse argoonlaserist pärineva ultraviolett valgusega lainepikkusel 350 nm, mis paneb rakud kiirgama heledat sinist fluorestsentsi emissioonmaksimumiga lainepikkusel 461 nm (Garner ja Seidel, 2008; Garner, 2009). Tekkinud fluorestsents registreeritakse kasutades detektoreid, mis paiknevad üksteise suhtes 90° nurga all. X-ja Y-spermide lahutamine toimub eralduva fluorestsentsintensiivsuse erinevuse põhjal (joonis 7) (Seidel ja Garner, 2002; Garner ja Seidel, 2008).

Rakkude sorteerimise protsess töötab järgmise põhimõtte järgi: kui vedeliku vool väljub läbivoolu tsütomeetrist, siis see katkestatakse vibreeriva mehhanismi abil väikesteks tilkadeks. Umbes 1/3 tilkadest sisaldab sperme ja ligikaudu 2/3 on tühjad; mõned üksikud tilgad sisaldavad kahte või rohkemaid sperme. Kui tilgake sisaldab X-kromosoomi kandvat sperm, siis antakse sellele positiivne laeng; kui tilk sisaldab Y-kromosoomi kandvat sperm, siis antakse negatiivne laeng; kui aga tilk ei sisalda üldse sperm, sisaldab mitut sperm, kahjustatud sperm või neid, mida ei ole võimalik eristada suhtelise DNA koguse järgi, siis ei anta tilgale üldse laengut. Tilgad väljuvad läbivoolu tsütomeetri otsikust (kiirusega umbes 80 km/h) ning läbivad elektrivälja, mis on ühel pool positiivne ja teisel negatiivne. Kuna vastasmärgilised elektrilaengud tõmbuvad, siis tilgad, mis on positiivse laenguga (sisaldavad X-sperm) liiguvad negatiivse elektivälja suunas ja need, millel on negatiivne laeng liiguvad positiivse elektivälja suunas ning need, mis on ilma laenguta, liiguvad otse alla. Seega tekitatakse kolm tilkade voolu, mis kogutakse kolme erinevasse testtuubi (Seidel, 2007).



Joonis 7. Läbivoolu tsütomeeter (Cran ja Johnson, 1996 järgi).

Ühes tunnis on võimalik sorteerida ligikaudu 5 kuni 6 miljonit spermi, sorteerimispuhtusega 85% kuni 95%. Läbivoolu tsütomeetri abil spermide soomääramise tehnoloogia üheks peamiseks puuduseks on sorteerimisprotsessi aeglus, mis on põhjustatud rakkude ühekaupa sorteerimisest (Johnson et al., 1999). Tavaline sorteeritud veise seemendusdoos koosneb ligikaudu 8 miljonist spermist ühe ml-i kohta ehk 2,1 miljonist spermist ühe 0,25 cm³ spermakõrre kohta. Seemendusdoos, milles on 2,1 miljonit spermi on aga väga madal kogus kunstliku viljastamise jaoks, sest tavaliselt sisaldab veiste kunstlikuks seemendamiseks kasutatav seemendusdoos ligikaudu 20 miljonit spermi (Garner ja Seidel, 2008; Gosálvez et al., 2011).

4.3 Teised meetodid järglaste soomääramiseks

Mitmed uurijad on üritanud eraldada X- ja Y-kromosoomi kandvaid sperme kasutades tehnoloogiaid, mis põhinevad spermide massi ja liikuvuse erinevusel, erineval ujumismustril, pinnalaengul, ruumala erinevusel ning immunoloogilistel omadustel (Ericsson et al., 1973; Prasad et al., 2010; Jain et al., 2011). X- ja Y- sperme on üritatud sorteerida ka erinevaid tiheduse gradiendi meetodeid kasutades, nagu albumiini gradiendi (Ericsson et al., 1973; Quinlivan et al., 1982), Sephadex kolonni (Quinlivan et al., 1982; Steenoet al., 1975), Percoll'i gradiendi (Kaneko et al., 1983; Ericsson et al., 1973; Kobayashi et al., 2004) ja „swim-up“ (Check ja Katsoff, 1993) meetodi abil. Siiani aga ei ole ükski neist meetoditest olnud sobiv, et saavutada piisav X-i ja Y-it kandvate spermide eraldamine teineteisest. Mõned teised meetodid, mida on proovitud põhinevad pH ja elektiliste laengute erinevustel, tsentrifuugimisel, settimisel, geeli abil filtreerimisel, immunoloogiliste meetodite kasutamisel ja ensüümtestidel (Ericsson et al., 1973; Yan et al., 2006).

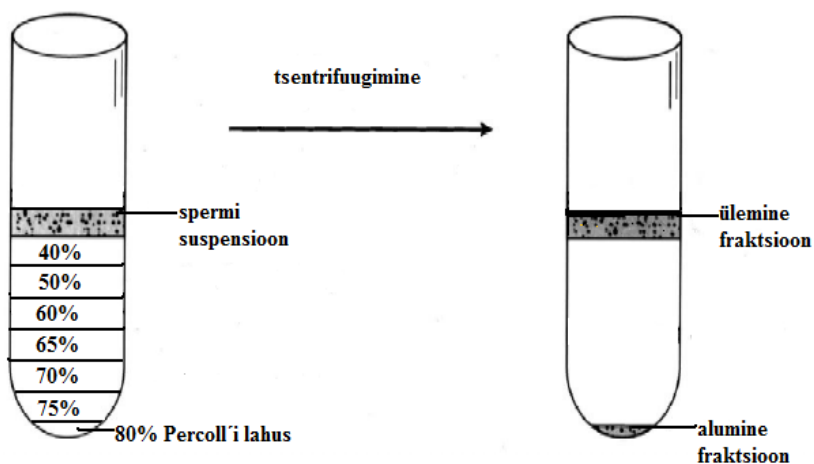
4.3.1 Füüsikalised meetodid soomääramiseks

Tihedusgradiendil põhinev soo määramine – Percoll'i gradiendi meetod

DNA erinev hulk X ja Y kromosoomide sisaldavates spermides põhjustab ka spermide omavahelise kaalu ja tiheduse erinevuse. Seetõttu on võimalik neid teineteisest eristada, kasutades kas pidevat või mittepidevat tiheduse gradienti. Pideva tihedusega gradientide korral toimub tiheduse kasv ülemisest, madalama tihedusega gradiendist kuni alumise, suurema tihedusega gradiendini. Astmelisel ehk mittepideval gradiendil on erinevalt pidevast gradiendist kindlad piirid iga osa vahel ning gradiendid moodustatakse, kasutades ühte või mitut erineva tihedusega Percolli lahust (nimetatud selle leiutaja Håkan Pertofti järgi)(Pertoft, 2000; Swamy ja Kaul, 2009). Inimese ja veise spermide puhul on kasutatud Percoll'i tiheduse

gradiendis tsentrifugimist nii spermide suguselekterimiseks kui ka nende IVF-i (*in vitro* viljastamise) jaoks ettevalmistamiseks (Machado *et al.*, 2009).

Tihedusgradiendis tsentrifugimisel sadenevad liikuvad ja intaktse tuumaga spermid kiiremini ning koonduvad kihti, milles on suurem tihedus (tuubi alumisse fraktsiooni). Kahjustunud ja hukkunud spermid jäävad aga ülemisse fraktsiooni. Selline jaotumine põhjustabki tsentrifugituubis fraktsioonide tekkimise (Kobayashi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Kobayashi jt kasutasid veise sperma sooselektsiooniks mittepidevat Percoll'i gradiendi meetodit, millele järgnevalt teostati tulemuste kontroll fluorestsents *in situ* hübriidisatsiooniga (FISH). Tsentrifugimise järgselt jaotusid veise spermid Percoll'i gradiendis kaheks selgelt eristuvaks fraktsiooniks (joonis 9): 1) alumine fraktsioon, mis koosnes liikuvatest spermidest ja 2) ülemine fraktsioon, mis moodustus vähem liikuvatest spermidest. Katse tulemustest selgus, et X-kromosoomi sisaldavate spermide osakaal oli 80%-lises Percoll'i kihis (alumine fraktsioon) suurem ning ülemises kihis väiksem. Alumises kihis oli Y-kromosoomide hulk 44,3% ning ülemises 52,9%. Kuna Y-kromosoomide suhte erinevus ülemises ja alumises fraktsioonis ei olnud märkimisväärne, siis seetõttu ei ole see tehnoloogia realselt rakendatav (Kobayashi *et al.*, 2004).



Joonis 9. Spermide eraldamine Percoll'i gradiendi meetodi abil. Peale tsentrifugimist on liikuvad spermid koondunud alumisse (suurema tihedusega) kihti ning vähem liikuvad on jäänud ülemisse kihti (joonis on koostatud Pertoft, 2000 järgi).

Spermide sorteerimine ruumala järgi

Meetod põhineb üksikute spermide ruumala määramisel interferentsmikroskoobiga. Van Munster jt (1999b) tegid katse, milles võrdlesid veise spermide pea ruumala erinevusi spermis oleva DNA sisaldusega. Tulemustest selgus, et X- ja Y-kromosoomi sisaldava spermide pea ruumala on võrreldav spermis oleva DNA koguse (3,5-4%) erinevusega ning seetõttu võib ruumala kasutada markerina, et eristada X- ja Y-kromosoomi sisaldavaid sperme. Nad näitasid, et X-kromosoomi sisaldava spermide pea ruumala on ligikaudu 1% suurem kui Y-kromosoomi sisaldaval spermil (van Munster *et al.*, 1999a).

Aastal 2002 kasutasid nad oma katses interferentsmikroskoopia optilisi vahendeid koos rakusorteringa, et sorteerida värvimata veise sperme sõltuvalt nende pea ruumalast. Tulemustest järelkus, et uue meetodiga oli võimalik sorteerida X- ja Y-fraaksioone puhtusega 60%-66%, mis on aga madalam tavapärasest läbivoolu tsütomeetriga sorteerimisest. Meetodi eeliseks on aga, et spermide eristamiseks ei ole vaja kasutada rakkude värvimist ega ka UV-kiirgusega ergastamist. See tehnoloogia ei ole aga siiani veel praktiliselt rakendatav (van Munster, 2002).

4.3.2 Immunoloogilised meetodid

X- ja Y- kromosoomi sisaldavate spermide pinnaantigeenide erinevus

Immunoloogiliste meetodite põhimõte seisneb selles, et kui oleks võimalik spermide pinnalt isoleerida selline valk, mis on spetsiifiline ainult X- või Y-kromosoomi spermile, siis oleks võimalik selle vastu kasutada spetsiifilisi antikehasid ning nende abil spermide sugu määrata (Johnson *et al.*, 1999).

Imetajate soo määramiseks on tehtud erinevaid immunoloogilisi katseid (Hendriksen *et al.*, 1993; Howes *et al.*, 1997). Esimene sellealane töö (Bradley *et al.*, 1987) keskendus H-Y antigeenidele e. Y-kromosoomi koesobivuse faktorile (*ingl.k histocompatibility antigene*), mis arvati olevat kodeeritud Y-kromosoomi poolt. Aastal 1987 teatasid Bradley jt. et, H-Y epitoop paikneb spermide pead katvas plasmamembraanis ja saba vaheosas. Sills jt (1998) näitasid aga oma töös, et uuritav molekul esineb mõlemas nii X kui ka Y kromosoomis ning seetõttu ei ole see geen immunoloogilise selektsiooni jaoks sobiv marker.

Antigeensed erinevused ei saa spermis tekkida aga ilma, et ei toimuks transkriptide translatsioon (Gur ja Breitbart, 2006). Antigeeni olemasolu, mis on võimeline eristama X- ja Y-kromosoomi kandvaid sperme sõltub kahest eeldusest: 1) haploidises spermatoiidis toimub geeniekspressioon, mis on seotud sugukromosoomidega või kontrollitud sugukromosoomide

poolt; 2) geeni ekspressiooni produkt jääb spermiga seotuks (Howes *et al.*, 1997). Algselt arvati, et spermatogeneesi jooksul muutuvad sugukromosoomid transkriptsiooniliselt inaktiivseks, kuid Nagamine jt (1990) ja Hendriksen jt (1995) tõestasid oma töödes vastupidist näidates, et post-meiootiliselt esineb mõlemas sugukromosoomis teatud geenide transkriptsioon.

Kuigi need tulemused näitasid, et transkriptid on seotud üksnes X- või Y-kromosoomi sisaldavate spermidega, siis tegelikult võivad ekspressiooni produktid liikuda ka naaberrakkude vahel tsütoplasmaatiliste sildade abil. Need tsütoplasmaatilised sillad seovad post-meiootilisi X- ja Y-spermatiide omavahel ning seetõttu võivad transkriptid jaotuda mõlema raku vahel (Seidel, 1999; Howes *et al.*, 1997).

Selleks, et uurida, kas X- või Y-kromosoomi spetsiifiline pinnavalk on olemas, tehti katse metssea spermidega. Spermid sorteeriti X ja Y populatsioonidesse puhtusega ~ 90%. Seejärel eraldati valgud ning analüüsiti neid. Spermi pinnal määrati ligikaudu 1000 erinevat valku, kuigi ühtki erinevust ei leitud X spermist eraldatud valkude võrdlemisel Y spermist leitud valkudega (Hendriksen *et al.*, 1996).

4.4 Spermi sorteerimise kvaliteedi hindamine

Sperma sorteerimise kvaliteeti saab hinnata kasutades mitmeid erinevaid meetodeid, nagu DNA kordusanalüüsi, PCR-i ja FISH-i (Johnson, 1995). Sorteeritud spermide puhul, mille DNA sisalduse erinevus on suurem kui 3%, on võimalik sorteerimise kvaliteeti hinnata „kiire kordusanalüüsi“ abil (Welch ja Johnson, 1999). Liikide puhul, mille DNA sisalduse erinevus X ja Y kromosoomide sisaldavate spermide vahel on väike (nt. inimene), kontrollitakse puhtust PCR või FISH-abil (Johnson *et al.*, 1993; Welch *et al.*, 1995; Maxwell *et al.* 2004).

DNA kordusanalüüs

Sorteerimise kvaliteedi hindamiseks võib kasutada kiiret kordusanalüüsi, mis tähendab kord juba läbivoolu tsütomeetriga sorteeritud spermide uut analüüsimist sama meetodi abil (Cran ja Johnson, 1996). Kordusanalüüs on täpne, usaldusväärne ja kiire, kuid tema negatiivseteks külgedeks on: 1) uue analüüsi teostus samade vahenditega (spermi sorter, Hoechst 33342), mida kasutati ka esmase sorteerimise läbi viimisel; 2) kiire kordusanalüüs võib anda ebatäpse tulemuse juhul, kui DNA sisalduse erinevus X ja Y kromosoomide vahel on väike (Welch ja Johnson, 1999).

Fluorestsents *in situ* hübridisatsioon (FISH)

Teine kvaliteedi hindamise meetod põhineb fluorestsents *in situ* hübridisatsioonil ning saadud tulemuste analüüsimisel mikroskoobiga (Cran ja Johnson, 1996). X ja Y spermide hulka saab hõlpsalt määrata kasutades kolme värviga FISH-i meetodit, mille puhul on kaks proovi mõlema sugukromosoomi jaoks ja üks proov autosoomi jaoks, mis hübridiseeritakse üheaegselt spermi kromosoomidele (Han *et al.*, 1993; Flaherty ja Matthews, 1996). FISH on kasulik eriti juhul kui DNA erinevus kromosoomide vahel on väga väike (nt. inimene 2,8%), mistõttu annab FISH täpsema tulemuse kui kordusanalüüs (Johnson *et al.*, 1993).

Polümeraas-ahelreaktsioon (PCR)

Kolmandaks sorteerimise täpsuse hindamise meetodiks on PCR. PCR on väga spetsiifiline ja tundlik meetod, mille abil on võimalik üksikuid sperme kiirelt ja täpselt hinnata (Flaherty ja Matthews, 1996).

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Veise suguselekteeritud spermide kvaliteedi õigsust kontrolliti PCR-iga. Tulemused ei erinenud nendest, mis saadi läbivoolu tsütomeetriga sorteeritud spermidele tehtud kordusanalüüsiga (Welch *et al.*, 1995; Hamano, 2007). PCR-i meetodi rakendamine üksikutele sorteeritud X ja Y spermidele, kasutades soospetsiifilisi primereid on efektiivne, kuid aeganõudev meetod. Seetõttu amplifitseeriti kõrgelt konserveerunud tsink-sõrme alleel, mis paikneb mõlemas X ja Y kromosoomis, kasutades selleks astmelist alleel spetsiifilist PCR-i (nested allele-specific PCR) (Welch *et al.*, 1995; Espinosa-Cervantes ja Córdova-Izquierdo, 2012).

Reaalaja kvantitatiivne PCR (Real-time PCR)

Kvantitatiivne reaalaja PCR meetodit saab kasutada veise suguselekteeritud spermide puhtuse hindamiseks (Puglisi *et al.*, 2006). Kvantitatiivse PCR-i puhul kasutatakse fluorestsentsvärviga märgistatud proove, mille abil on võimalik tulemusi hinnata reaalajas. Andmed saadakse analüüsides sadu üksikuid reaktsioone. Antud meetod on sugukromosoomide hulga kvantifitseerimiseks kiire ja usaldusväärne (Parati *et al.*, 2006).

ARUTELU

Soo järgi loomade järglaste selekteerimine on pakkunud huvi inimestele juba aastaid, sest selle kasu nähakse mitmes igapäeva valdkonnas, nagu kariloomakasvatases, lemmikloomakasvatases, ohustatud liikide säilitamises jne. Hetkel on ainus reaalselt rakendatav spermide sooselekttsiooni meetod Beltsiville spermide sortimise tehnoloogia, mille abil on võimalik efektiivselt ja suure puhtusega sperme sortida. Meetod põhineb läbivoolu tsütomeetri abil DNA-ga seonduva fluorestseeruva värvi koguse mõõtmisel ning selle alusel X/Y kromosoomide eristamisel. See tehnoloogia võimaldab sorteerida mitmete loomade, nagu veiste, sigade, lammaste jt sperme (Johnson et al. 1999).

Kuigi nimetatud meetod sorteerib sperme efektiivselt ja võimaldab saada terveid ja elujõulisi järglasi, on sellel tehnoloogial mitmeid puudusi. Olulisim nendest puudustest on seotud spermi elu- ja liikumisvõime vähenemisega sorteerimisprotsessis. Läbivoolu tsütomeetriga sorteerimine mõjutab spermide kvaliteeti järgmiselt: 1) kõrge rõhk rakusorteeris kahjustab rakke; 2) sorteerimisele kuluv aeg on pikk, mis mõjutab spermide eluvõimekust (Bulitko ja Padrik, 2011); 3) sorteerimisprotsessis saavad kahjustada enamasti spermide membraanid, mis vähendab nende liikumisvõimet. Spermide liikuvuse muutus ja membraanide kahjustused omakorda vähendavad spermide viljastumisvõimet võrreldes tavaspermaga (Jaakma, 2011).

Teine, kuid mitte vähemtähtis puudus on seotud sorteerimise protsessi aeglusega, sest sortimine toimub üks rakk korraga. Lisaks sellele esineb protsessi jooksul suur spermide kadu. Seetõttu jääb sorteeritud spermide hulk kordades alla tavaspermaga seemendamiskoostele. See omakorda muudab kogu protsessi majandsulikult kulukaks.

Kolmas probleem on seotud sortimisprotsessis kasutatava värviga. Põhjus on selles, et sorteerimisel kasutatav fluorestsentsvärv jääb spermi DNA-ga seotuks ning seetõttu ei teata, kuidas see edaspidi käitub ning millist mõju see võib viljastatud munaraku edasisele arengule avaldada. Probleem peitub selles, et värv seondub kõigi kromosoomidega ja jääb nendega seotuks. Samas aga oleks vaja eristada sperme ainult vastava sugukromosoomi sisaldamise või mittesisaldamise põhjal.

Spermide kvaliteedinäitajate vähenemine, sorteerimisprotsessi aeglus ja DNA-ga seonduvate värvide kasutamine on viinud vajaduseni otsida uusi, alternatiivseid meetodeid läbivoolu tsütomeetrialet. Alternatiivsetest meetoditest, mida võiks kasutada läbivoolu tsütomeetri asendamiseks, on hetkel enim uuritud kahte: füüsikalisi- ja immunoloogilisi meetodeid.

Füüsikalistest meetoditest on kõige paremaid tulemusi andnud spermide ruumala erinevusel põhinev selekteerimine. Nimetatud tehnoloogia peamiseks eeliseks on see, et ei ole vaja

kasutada DNA-ga seonduvaid värve. Üks peamised puudusi, mis selle meetodiga kaasneb, on see, et sorteerimise puhtus jääb madalamaks, mille tõttu selle tehnoloogia rakendamine praktikas on küsitav. Samuti on selline sorteerimine aeganõudev ja eeldab spetsiaalse aparatuuri olemasolu.

Immunoloogilised meetodid keskenduvad peamiselt pinnaantigeenide erinevuste tuvastamisele X- ja Y-spermide vahel. Selleks, et uurida, kas X- või Y-kromosoomi spetsiifiline pinnavalk on olemas, tehti katse metssea spermidega. Spermi pinnal määrati ligikaudu 1000 erinevat valku, aga erinevusi X-spermi ja Y-spermi valkude vahel ei leitud (Hendriksen et al., 1996). Seetõttu ei ole pinnaantigeenidel põhinevate erinevuste kasutamine soomääramiseks hetkel veel rakendatav.

Immunoloogiliste meetodite peamiseks eelisteks rakusorteri ees on: 1) võimalus kasutada lihtsamat ja mitte nii kallist tehnikat; 2) tegemist ei ole invasiivse protsessiga, mistõttu võimaldab vältida DNA-ga seonduvate värvide kasutamist ja fluorestsentsvärvidega märgitud DNA laserkiirtega ergastamist ning seega on oht DNA kahjustamiseks väiksem (Blecher et al., 1999 ; Hendriksen 1999).

Kõiki eelpool mainitud meetodeid, nii Beltsville'i sooselektiooni meetodit kui ka alternatiivseid tehnoloogiaid, on võimalik kontrollida, kasutades erinevaid nukleiinhapnehübridisatsioonil põhinevaid meetodeid, nagu FISH ja PCR. FISH-i tehnoloogial on mitmeid eeliseid PCR tehnoloogia ees: 1) analüüsitakse üksikuid sperme, selle asemel, et uurida terveid populatsioone; 2) on võimalik kiirelt ja täpselt loendada suuri spermide hulki; 3) üheaegselt kahe või kolme proovi hübridiseerimisel rakule on spermis võimalik määrata ka aneuploidsuse esinemist (XX, YY, XY) (Flaherty ja Matthews, 1996).

Spermide sooselektiooniks on samuti võimalik kasutada hübridisatsioonil põhinevaid tehnoloogiaid. Hübridisatsioonipõhiste meetodite idee seisneb selles, et teadaolevale DNA järjestusele on võimalik seondada sellega komplementaarne proov, mis aitab tuvastada spetsiifilisi piirkondi sihtmärk DNA-s. Seega oleks võimalik selliseid proove kasutades sorteerida spermid vastavalt X- ja Y-kromosoomi sisaldusele.

Hübridisatsiooniks on võimalik kasutada nii sünteetilisi oligonukleotiide kui ka PCR-i abil valmistatud pikemaid proove, mis on sageli märgistatud näiteks fluorestseeruvate värvidega. Selline märgistamine aitab detekteerida kromosoomil olevaid spetsiifilisi piirkondi (Habermann *et al.*, 2005). Üks võimalusi, kuidas hübridisatsioonil põhinevaid meetodeid oleks võimalik elusrakkude puhul soo selekteerimiseks rakendada, on kasutada lühikesi rakku penetreeruvaid peptiide (CPPs, *cell penetrating peptides*). CPP-d on lühikesed aminohappejärjestused, mis võivad rakku siseneda kahel viisil: energiast sõltuva endotsütoosi kaudu või energiast sõltumata otse läbi membraanse kaksikkihi (Fonseca *et al.*, 2009). Kui

nende peptiididega siduda spetsiifilised nukleiinhappejärjestused, siis on võimalik neid järjestusi kanda peptiidide abil rakku, mille järel saavad spetsiifilised nukleiinhapped seonduda komplementaarsuse alusel uuritava kromosoomi piirkonnaga. Üks võimalustest, kuidas spetsiifilisi nukleiinhappeid rakku kanda, on neid nanopartiklite vahendusel siduda CPP-ga (Rath et al., 2013; Klein et al., 2010). Teine võimalus on spetsiifiliste järjestuste sidumine CPP-ga ilma nanoosakeseta ning selle rakku viimine.

Meie töörühm töötab välja ja katsetab hübriidisatsioonil põhinevat meetodit, millega oleks võimalik sorteerida sperme nii, et spermid selle protsessi jooksul võimalikult vähe kahjustuksid. Käesoleval hetkel on eemärgiks leida erineva pikkusega spetsiifilisi nukleiinhappejärjestusi X- ja Y-kromosoomi korduvatele piirkondadele, mille abil oleks võimalik määrata spermi sugu. Peamiseks eesmärgiks on väljatöötatud nukleiinhappejärjestuste rakendamine sooseleksiooniks, kasutades CPP-l põhinevat tehnoloogiat.

KOKKUVÕTE

Aastaid on üritatud välja töötada tehnoloogiaid, et läbi viia soomääramist, mis võimaldaks parandada kariloomade geneetilisi omadusi, säilitada haruldasi loomatõuge, suurendada järgaste hulka jne.

Käesoleval hetkel on ainus efektiivne kariloomade soomääramise meetod Beltsville spermide selekteerimise tehnoloogia. See meetod võimaldab sorteerida ühes tunnis korraga miljoneid sperme suure sortimispuhtusega. Antud tehnoloogia on rakendatav veiste, lammaste, sigade jt loomade X- ja Y-spermide sortimiseks. Sorteeritud sperme on kasutatud näiteks veiste kunstlikuks viljastamiseks, mille tulemusena on saadud terveid ja eluvõimelisi järglasi.

Kuigi läbivoolu tsütomeeter selekteerib sperme efektiivselt, on sellel meetodil puudujääke. Üks peamisi puudusi selle tehnoloogia kasutamisel on sorteerimisprotsessi aeglus, sest spermide sorteerimine toimub ükshaaval. See omakorda muudab selle tehnoloogia majanduslikult kulukaks ning on viinud vajaduseni otsida uusi, alternatiivseid lahendusi spermide sortimiseks.

Viimastel aastatel on spermide soomääramise meetoditest enim uuritud kahte tehnoloogiat, mis põhinevad: füüsikalistel ja immunoloogilistel erinevustel. Mõlema tehnoloogia puhul on peamisteks puudusteks siiani jäänud korduvkatsete ebaõnnestumised ja sorteerimistulemuste ebapiisav täpsus. Seetõttu ei ole need hetkel ka tööstuslikult rakendatavad.

Pidev uurimistöö alternatiivsete lahenduste leidmiseks nii füüsikaliste, immunoloogiliste kui ka hübriidisatsioonipõhiste meetodite valdkonnast annab lootust, et lähitulevikus on võimalik kasutada uusi ja efektiivsemaid tehnoloogiaid soomääramiseks.

METHODS FOR SEX SELECTION OF SPERM IN FARM ANIMALS

Summary

Triin Kitsemets

In many years numerous attempts have been made to preselect the sex of offspring in farm animals, because gender preselection has tremendous benefits in the livestock industry. Controlling sex ratio has got many advantages, for instance, it permits faster genetic progress, higher productivity and economic benefits. Dairy farmers can breed more heifers for milk production and beef cattle breeders more bulls for meat production.

Currently the only method that can be used for sexing mammalian spermatozoa with a high accuracy is the Beltsville sperm sexing technology. The method is based on the separation of X- and Y-bearing spermatozoa by their DNA content difference. This method uses flow cytometry to measure the sperm DNA content difference via fluorophore fluorescence that is bound to the DNA. According to measured results spermatozoa are sorted into three different populations (X, Y and unmeasured). This technology will produce millions of sperms per hour with a high accuracy that usually exceeds 90%. per sample. Although this procedure is currently widely used for gender preselection in most livestock species, it is still far from ideal. One limitation is that sperm are sorted one at the time, which makes the procedure relatively slow considered to the needs for conventional artificial insemination. This also makes the procedure expensive. Sex preselection in farm animals should be inexpensive and efficient, therefore there is on-going research for new alternative methods for mammalian sperm sexing.

In recent years there have been attempts to separate X- and Y-sperm by at least two different mechanisms based on physical properties, for example, volume of the sperm head and by using immunological differences, for example, surface antigenic differences. Those new approaches have shown promising results for sperm sexing, although they all have problems related to accuracy and repeatability, which prevent their wider commercialization.

At the moment our research group is trying to work out a hybridisation based method for sperm sexing. The main objective of our research is to develop specific oligonucleotide sequences which are complementary to the specific repeatable DNA sequences in X- and Y-chromosomes. The future goal will be the gender preselection by binding those short oligonucleotide sequences to the transport peptides, which will help to carry the cargo into the live cells so that oligonucleotides can bind to the specific regions on the chromosome.

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid:

- Andrabi, S., M. H., (2007). "Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation." *Journal of assisted reproduction and genetics* 24(12): 561–9.
- Aul, R. B., and Oko, R. J., (2001). "The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis." *Developmental biology* 239(2): 376–87.
- Balhorn, R., (1982). "A model for the structure of chromatin in mammalian sperm." *The Journal of cell biology* 93(2): 298–305.
- Balhorn, R., (2007). "The protamine family of sperm nuclear proteins." *Genome biology* 8(9), 227.
- Baskaran, R., and Rao, M. R., (1990). "Interaction of spermatis specific proteinTP2 with nucleic acid in vitro." *The Journal of Biological Chemistry*. 265(34):21039–21047.
- Blecher, S. R., Hower, R., Li. S., Detmar, J., Blahut. (1999). "A new approach to immunological sexing of sperm." *Theriogenology*. 52(99): 1309–1321.
- Boissonneault, G., (2002). "Chromatin remodeling during spermiogenesis." *FEBS Letters*, 514(2-3): 111–114.
- Bradley, M. P., Forrester, I. T., and Heslop B. F. (1987). "Identification of a male-specific (H-Y) antigen on the flagellar plasma membrane of ram epididymal spermatozoa." *Human Genetics* 75: 362–367.
- Brewer, L., Corzett, M., and Balhorn, R. (2002). "Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins." *The Journal of biological chemistry* 277(41): 38895–38900.
- Buffone, M. G., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H. K., and Gerton, G.L. (2012). "Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility." *Molecular reproduction and development* 79(1): 4–18.
- Burt, D. W. (2009). "The cattle genome reveals its secrets." *Journal of biology* 8(4): 36.
- Canavez, F., C., Luche, D. D., Stothard, P., Leite, K. R.M., Sousa-Canavez, J.M., Plastow, G., Meidanis, J., Souza, M.A., Feijao, P., Moore, S.S., and Camara-Lopes, L.H. (2012). "Genome sequence and assembly of *Bos indicus*." *The Journal of heredity* 103(3): 342–8.
- Cao, W., Gerton, G. L., and Moss, S. B. (2006). "Proteomic profiling of accessory structures from the mouse sperm flagellum." *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5(5): 801–10.

- Carrell, D. T., Emery B.R., and Hammoud, S. (2007). "Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?" *Human reproduction update* 13(3): 313–27.
- Check, J.H., and Katsoff, D. (1993). "A prospective study to evaluate the efficacy of modified swim-up preparation for male sex selection." *Hum Reprod* 8: 211–214.
- Cran, D. G., and Johnson, L. A. (1996). "The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa." *Human reproduction update* 2(4): 355–63.
- Dadoune, Jean-Pierre. (2003). "Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins." *Microscopy research and technique* 61(1): 56–75.
- Downing Meisner, A., Klaus, A., V. and O’Leary, M., A. (2005). "Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia)." *Journal of morphology* 263(2): 179–202.
- Dvoráková, K., Moore, H.D., Sebková, N., and Palecek, J. (2005). "Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization." *Reproduction (Cambridge, England)* 130(1): 61–9.
- Ericsson, R J, Langevin, C. N., and Nishino, M. (1973). "Isolation of fractions rich in human Y sperm." *Nature* 246: 421–424.
- Espinosa-Cervantes, R, and Córdova-Izquierdo, A. (2012). "Sexing sperm of domestic animals." *Tropical animal health and production.* 45(1):1-8.
- Ferrara, D., Pariante, P., Matteo, L. D., Serino, I., Oko, R., and Minucci. S. (2013). "First evidence of Prothymosin alpha localization in the acrosome of mammalian male gametes." *Journal of cellular physiology* (January): 1–30.
- Flaherty, S P, and Matthews, C. D., (1996). "Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods." *Molecular human reproduction* 2(12): 937–42.
- Flesch, F M, and B M Gadella. (2000). "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization." *Biochimica et biophysica acta* 1469(3): 197–235.
- Fonseca, S. B, Mark P Pereira, and Shana O Kelley. (2009). "Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications." *Advanced drug delivery reviews* 61(11): 953–64.
- Fuentes-Mascorro, G, H Serrano, and Rosado, A. (2000). "Sperm chromatin." *Archives of andrology* 45(3): 215–25.
- Gaffney, E.A., H. Gadêlha, D.J. Smith, J.R. Blake, and J.C. Kirkman-Brown. (2011). "Mammalian Sperm Motility: Observation and Theory." *Annual Review of Fluid Mechanics* 43(1): 501–528.

- Gallagher, D. S., Davis, S.K., Donato, De. M., Burzlaff, J.D., Womack, J.E., Kumamoto, A.T., and Taylor, J.F. (1999). "Applications of chromosomal fish in the Bovidae with emphases on physical mapping in domestic cattle and comparative cytogenetic analyses of the tribe Bovini." *Animal biotechnology* 10(3): 105–8.
- Garner. (1983). "Quantification of the X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flow Cytometry ' X-Y.'" 312–321.
- Garner, D. L. (2009). "Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm." *Theriogenology* 71(1): 11–21.
- Garner, D. L., and Seidel G, E. (2008). "History of commercializing sexed semen for cattle." *Theriogenology* 69(7): 886–95.
- Garner, Duane L. (2006). "Flow cytometric sexing of mammalian sperm." *Theriogenology* 65(5): 943–57.
- Godde, James S, and Kiyoe Ura. (2009). "Dynamic alterations of linker histone variants during development." *The International journal of developmental biology* 53(2-3): 215–24.
- Gosálvez, J., Ramirez, M. A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K. M., Kjelland, M. E., and Moreno, J.F (2011). "Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features." *Theriogenology* 75(2): 197–205.
- Groudine, Mark, and Kathleen F Conkin. (1985). "Chromatin Structure, and de novo methylation of sperm DNA: implications for activation of the paternal genome." 228(4703): 1061-1068.
- Gur, Y., and Breitbart, H. (2006). "Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes." 20(4): 411–416.
- Habermann, F. A., Winter, A., Olsaker, I., Reichert, P., and Fries, R.(2005). "Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization." *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzucht und Züchtungsbiologie* 122: 22–7.
- Hamano, K. (2007). "JSAR Innovative Technology Award Sex Preselection in Bovine by Separation of X- and Y-Chromosome Bearing Spermatozoa." 53(1): 27-38.
- Han, T.-L., Ford, J.H., Webb, G.C. et al. (1993). "Simultaneous detection of X- and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization." *Mol Reprod* 34: 308–313.
- Hassanin, A., and Ropiquet, A. (2004). "Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937." *Molecular phylogenetics and evolution* 33(3): 896–907.
- Hendriksen, P. J. M. (1999). "Do X and Y Spermatozoa Differ in Proteins?" *Theriogenology* 52(99): 1295–1307.

- Hendriksen P. J., Hoogerbrugge J. W., Themmen A. P., Koken M. H., Hoeijmakers J. H., Oostra B.A, van der Lende T and Grootegoed J. A. (1995). "Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse." *Developmental Biology* 170: 730–733.
- Hendriksen P. J, Welch G. R., Grootegoed J. A., Van der Lende T and Johnson L A. (1996). "Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis." *Molecular Reproduction and Development* 45: 342–350.
- Hendriksen, P. J. M., Tieman, M., Lende, T. and Johnson, L.A. (1993). "Binding of anti-H-Y antibodies to separated X and Y chromosome bearing porcine and bovine sperm." *Mol Reprod Dev* 35: 189–196.
- Hennig, W. (2005). "DNA Packaging in Sperm." 1–6.
- Ho, H. C, and Suarez, S.S., (2003). "Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility." *Bio Reprod* 68: 1590–1596.
- Hohenboken, W. D. (1999). "Application of sexed semen in cattle production." *Theriogenology* 52(99): 1421–1433.
- Howes, E. A., Miller, N. G., Dolby, C., Hutchings, A., Butcher, G. W., and Jones, R. (1997). "A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting." *Journal of reproduction and fertility* 110(2): 195–204.
- Inaba, K. (2011). "Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components." *Molecular Human Reproduction* 17(8): 524–538.
- Jain, A., Yathish, H, M., Jain, T., and Sharma, A. (2011). "Efficient production of sexed semen by Flow Cytometry, A review." *Agri, cultural Review* 32: 36–45.
- Johnson, L, A. (1995). "Sex Preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome." *Reprod Fertil Dev*, 7(4): 893–903.
- Johnson, L. A, Rath, D., Vazquez, J. M., Maxwell, W. M. C., and Dobrinsky, J. R. (2005). "Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application." *Theriogenology* 63(2): 615–24.
- Johnson, L. A, Welch, G. R., and Rens, W. (1999). "The Beltsville Sperm Sexing Technology: High-Speed Sperm Sorting Gives Improved Sperm Output for In Vitro Fertilization and AI." *J Anim Sci*, 77(2): 213-220
- Johnson, L. A., Welch, G. R., Keyvanfar, K., Dorfmann, A., Fugger, E. F., Schulman, J. D. (1993). "Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked disease." *Hum. Reprod* 8: 1733–1739.

- Jones, R., James, P. S., Oxley, D., Coadwell, J., Suzuki-Toyota, F., and Howes, E. A. (2008). "The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins." *Biology of reproduction* 79(3): 421–31.
- Kaneko, S., Yamaguchi, J., Kobayashi, T., Iizuka, R. (1983). "Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation." *Fertility and sterility* 40: 661–665.
- Kikkawa, Y., Takada, T., Sutopo, N. K., Namikawa, T., Yonekawa, H., and Amano, T. (2003). "Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle." *Animal genetics* 34(2): 96–101.
- Kitamura, K., Iguchi, N., Kaneko, Y., Tanaka, H., and Nishimune, Y. (2004). "Characterization of a novel postacrosomal perinuclear theca-specific protein, CYPT1." *Biology of reproduction* 71(6): 1927–35.
- Klein, S., Petersen, S., Taylor, U., Barcikowski, S., and Rath, D. (2010). "Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy." *Journal of Biomedical Optics* 15.
- Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H., and Sato, E. (2004). "Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization." *The Journal of reproduction and development* 50(4): 463–9.
- De Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., and Varmus, H. E. (1990). "Structure and variability of human chromosome ends." *Molecular and cellular biology* 10(2): 518–27.
- Lee, H-L., Kim, S-H., Ji, D-B., and Kim, Y-J. (2009). "A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen." *Journal of Veterinary Science* 10(3): 249.
- Longo, F. J., Krohne, G., and Franke, W., W. (1987). "Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements." *The Journal of cell biology* 105(3): 1105–20.
- Machado, G. M., Carvalho, J.O., Filho, E. S., Caixeta, E. S., Franco, M. M., Rumpf, R., and Dode, M. A. N. (2009). "Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos." *Theriogenology* 71(8): 1289–97.
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Hollinshead, F.K., Bathgate, R., Graaf, De. S.P., Eriksson, B. M., Gillan, L., Morton and O'Brien, J.K. (2004). "Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox." *Animal reproduction science* 82-83(2004): 79–95.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., and Zhao, M.. (2003). "Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis." *Chromosoma* 111(8): 483–8.
- Moruzzi, J. F. (1979). "Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa." *Journal of reproduction and fertility* 57(2): 319–23.

- Mukai, C., and Travis, A. J. (2012). "What sperm can teach us about energy production." *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 47 (4): 164–9.
- Van Munster, E. B., Stap, J., Hoebe, R. A., te Meerman, G. J., and Aten, A. J. (1999a). "Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X and Y bearing spermatozoa: potentials and limitations." *Theriogenology* 52(99): 1281–1293.
- Van Munster, E. B., Stap, J., Hoebe, R. A., te Meerman, G. J., and Aten J. A. (1999b). "Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content." *Cytometry* 35(2): 125–8.
- Munster, E. B. Van. (2002). "Interferometry in Flow to Sort Unstained X- and Y-Chromosome-Bearing Bull Spermatozoa." *Cytometry*, 47(3): 192–199.
- Nagamine C. M., Chan K., Hake L. E., and Lau Y. F. (1990). "The two candidate testis-determining Y genes (Zfy-1 and Zfy-2) are differentially expressed in fetal and adult mouse tissues." *Genes and Development*: 63–74.
- O'Brien, J. K., Steinman, K., and Robeck, T., R. (2009). "Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation." *Theriogenology* 71(1): 98–107.
- Parati, K., Bongioni, G., Aleandri, R., and Galli, A. (2006). "Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR." *Theriogenology* 66(9): 2202–9.
- Pertoft, H. (2000). "Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll." *Journal of biochemical and biophysical methods* 44(1-2): 1–30.
- Prasad, S., Rangasamy, S., and Satheshkumar S. (2010). "Sex preselection in domestic animals - Current status and future prospects." *Veterinary World* 3: 346–348.
- Puglisi, R., Vanni, R., Galli, A., Balduzzi, D., Parati, K., Bongioni, G., Crotti, G., Duchi, R., Galli, C., Lazzari, G., and Aleandri, R. (2006). "In vitro fertilisation with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR." *Reproduction (Cambridge, England)* 132(3): 519–26.
- Quinlivan W. L. G., Preciado, K., Long, T. L., Sullivan, H. (1982). "Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography." *Fertility and sterility* 37: 104–107.
- Rath, D., Barcikowski, S., de Graaf, S., Garrels, W., Grossfeld, R., Klein, S., Knabe, W., C Knorr, C., Kues, W., Meyer, H., Michl, J., Moench-Tegeder, G., Rehbock, C., Taylor, U., and Washausen, S. (2013). "Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects." *Reproduction (Cambridge, England)* 145(1): R15–30.
- Seidel, G. E. (1999). "Sexing mammalian spermatozoa and embryos – State of the art." *J Reprod Fertil Suppl* 54: 477–487.
- Seidel, G. E. (2007). "Overview of sexing sperm." *Theriogenology* 68(3): 443–6.

- Seidel, G. E, and Garner, D. L. (2002). "Review Current status of sexing mammalian spermatozoa." *Reproduction*. 124(6): 733–743.
- Seidel, G. E. (2003). "Sexing mammalian sperm—intertwining of commerce, technology, and biology." *Animal Reproduction Science*. 79(3-4): 145–156.
- Sills E. S., Kirman I., Colombero L. T., Hariprashad J., Rosenwaks, Z., and Palermo G., D. (1998). "H-Y antigen expression patterns in human X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa." *American Journal of Reproductive Immunology* 40: 43–47.
- Song, Y. H, and E. Mandelkow. (1995). "The anatomy of flagellar microtubules: polarity, seam, junctions, and lattice." *The Journal of cell biology* 128(1-2): 81–94.
- Steen O, Adimoelja A, Steeno J. (1975). "Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa with the Sephadex gel-filtration method." *Andrologia* 7: 95–97.
- Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A., and Oko, R. (2003.) "Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction." *Microscopy research and technique* 61(4): 362–78.
- Zhao, M, Shirley, C. R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., and Behringer, R. R. (2004). "Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation." *Genesis*. 38(4):200–213.
- Toshimori, K. (2003). "Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue." *Microscopy research and technique* 61(1): 1–6.
- Touré, A, Lhuillier, P., Gossen, J. A., Kuil, C. W., Lhôte, D., Jégou, B., Escalier, D., and Gacon, G. (2007). "The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse." *Human molecular genetics* 16(15): 1783–93.
- Toure, A., Rode, B., Hunnicutt, G.R., Escalier, D., and Gacon, G. (2011). "Septins at the annulus of mammalian sperm." *Biological chemistry* 392(8-9): 799–803.
- Ward, W. S. (1993). "Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa." *Biology of reproduction* 48(6): 1193–201.
- Ward, W. S. (2010). "Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development." *Molecular human reproduction* 16(1): 30–6.
- Ward, W. S., and Coffey, S. D. (1991). "DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa." *Bio Reprod*. 44(4): 569–574.
- Watkins A. M, Chan P. J, Kalugdan T. H, Patton W. C, Jacobson J. D and King. A. (1996). "Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa." *Molecular Human Reproduction* 2: 709–712.
- Welch, G. R., and Johnson, L. A. (1999). "Sex Preselection: Laboratory Validation of the Sperm Sex Ratio of Flow Sorted X- and Y-sperm by sort Reanalysis for DNA." *Theriogenology*: 52(8):1343–1352.

Welch G. R., Waldebießer G. C., Wall R. J., Johnson L. A. (1995). "Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. *Anim Biotechnol.*" *Anim Biotechnol* 6: 131–139.

Vilfan, I. D., Conwell, C. C., and Hud N.V. (2004). "Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine." *The Journal of biological chemistry* 279(19): 20088–95.

Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., and Sautibre, P. (1998). "Nuclear basic proteins in spermatogenesis." *Biochimie.* 80(2): 117–128.

Yan, J, Feng, H. L., Chen Z-J., Hu, J., Gao, X., and Qin, Y. (2006). "Influence of swim-up time on the ratio of X- and Y-bearing spermatozoa." *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 129(2): 150–4.

Raamatud:

Barratt, C., Jonge D. C. 2010. The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. p.3; 5; 109-110; 112-113 Cambridge University Press.

Gilbert, S. F. 2010. Developmental Biology. p, 123-124. Ninth edition.

Gordon, I. R. 2005. Reproductive Technologies in Farm Animals. p105. Cambridge, MA, USA: CABI.

Jaakma, Ü. 2011. Suguselekteritud sperma kasutamise soovitused soost järglaste saamiseks, innatsükli reguleerimine ja suguorganite patoloogiad veistel. Riikliku programmi „Põllumajanduslikud rakendusuurimused ja arendustegevus aastatel 2009-2014“ lisa 4. Eesti Maaülikool. Tartu.

Kallajoki, M. 1986. The sperm surface and the acrosome: a cytochemical study using sugar residue specific labels and a monoclonal antibody. p.13. Turun Yliopisto.

Kantanen, J. 1999. Genetic diversity of domestic cattle (*Bos taurus*) in North Europe, p7 University of Joensuu *publications in science*.

Kärner, J. 1997. Sissejuhatus arengubioloogiasse. p.50. Tartu Ülikooli Kirjastus.

Pirhonen, A. 1994. Mammalian Protamines. Primary Structure and Patterns of Phosphorylation in Spermatozoa from Different Species. p. 15-17; 20-25; 28-32. Kuopio.

Sklar, L. A. 2005. Flow Cytometry for Biotechnology. p.26-27. USA: Oxford University Press.

Strachan, T., Read, A. 2011. Human molecular genetics. p.147. 4th ed., New York; Abingdon: Garland Science.

Swamy, P. M., Kaul, A. K 2009. Laboratory manual on Biotechnology. p.43. Meerut, IND: Global Media.

Womack, J. 2012. Bovine genomics. p.76-77. USA: Wiley.

Kasutatud veebiaadressid:

¹http://www.science20.com/news_releases/chromosomes_are_so_20th_century_male_genes_really_determine_baby_gender_says_study (23.05.2013)

Tänuavaldused

Tahan tänada oma juhendajat Ants Kurg'e igakülgse abi eest ning mulle antud võimaluse eest teha oma lõputöö biotehnoloogia õppetoolis. Samuti tänan oma teist juhendajat Ott Scheler'it tema kannatlikkuse, abivalmiduse ning lennukate ideede eest, mis muutsid igapäevase laboritöö huvitavaks ja vaheldusrikkaks.

Täna ka teisi inimesi, kes on mind minu bakalaureuse õppeaastate jooksul juhendanud: Andres Salumets, Kersti Lilleväli, Triin Tekko, Monika Nõmm jt.

Täna oma peret ning Anethi, Helenit, Karl-Alarit jt, kes olid mulle selle töö valmimisel toeks ja abiks.

Lihlitsents lõputöö elektrooniliseks avaldamiseks

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Triin Kitsemets _____
(*autori nimi*)
(sünnikuupäev: _____29.06.1988_____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

_____ Kariloomade sooselektiooni meetodid

_____,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on _____prof. Ants Kurg Ph. D ja Ott Scheler Ph.D

_____,
(*juhendaja nimi*)

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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____28.05.2013_____ (*kuupäev*)