

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

**Y-kromosoomi mikroleetsioonide sagedus ja võimalik seos viljakusprobleemidega Eesti meestel**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogia erialal (12 EAP)

Laura Kibena

Juhendaja: Vanemteadur Pille Hallast, PhD

TARTU 2017

## INFOLEHT

Y-kromosoomi mikrodeletsioonide sagedus ja võimalik seos viljakusprobleemidega Eesti meestel.

Antud töös andsin ülevaate peamistest viljatuse põhjustest ning rohkem tähelepanu pöörasin geneetilistele põhjustele. Üheks peamiseks viljatuse geneetiliseks põhjuseks on mikrodeletsioonid Y-kromosoomi *AZF* piirkonnas. Käesolevas töös genotüpiseerisin idiopaatilisi viljakusprobleemidega Eesti mehi ning kahte kontrollgruppi ('Rasedate naiste mehed' ja 'Eesti noored mehed') *AZF* täielike ning *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide suhtes. Tulemused näitasid gr/gr deletsioonide oluliselt kõrgemat sagedust spermatogeneesi häiretega patsientidel võrreldes kontrollidega ning b2/b3 deletsiooni laialdast levikut Eesti populatsioonis.

Y-kromosoom, *AZF* mikrodeletsioonid, *AZFc* osalised mikrodeletsioonid, meeste viljatus, meeste viljakusprobleemid, viljatuse geneetilised põhjused, spermatogeneesi häired

B790 Kliiniline geneetika

The frequency of Y-chromosomal microdeletions and their association to fertility problems in Estonian men.

In this thesis I gave an overview of the main genetic causes of infertility. One of the main genetic cause for infertility are microdeletions in Y-chromosome's *AZF* region. Multiplex-PCR was performed using Estonian male patients with known to have fertility problems and two control groups (partners of pregnant women and young Estonian men) for genotyping *AZF* complete and *AZFc* partial microdeletions. The results showed an association between gr/gr deletions and spermatogenic impairment and a wide distribution of b2/b3 deletion in Estonian men.

Y-chromosome, *AZF* microdeletions, *AZFc* partial microdeletions, male infertility, male fertility problems, genetic causes for infertility, spermatogenic impairment

B790 Clinical genetics

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Viljakusprobleemid.....	7
1.1.1. Meeste viljakusprobleemid ja nende teadaolevad põhjused .....	7
1.1.2. Meeste viljatuse teadaolevad geneetilised põhjused .....	8
1.1.3. Sperma kvaliteeti mõjutavad lisafaktorid.....	10
1.2. Y-kromosoomi ülesehitus .....	11
1.2.1. Y-kromosoomi struktuur .....	11
1.2.2. MSY eukromatiinse ala geenid .....	14
1.3. Spermatogenees .....	17
1.4. Y-kromosoomi <i>AZFa</i> , <i>AZFb</i> ja <i>AZFc</i> mikrodeletsioonid .....	18
1.4.1. <i>AZFa</i> piirkond .....	18
1.4.2. <i>AZFb</i> piirkond .....	19
1.4.3. <i>AZFc</i> piirkond .....	20
1.4.3.1. <i>AZFc</i> osalised mikrodeletsioonid .....	21
1.5. Y-kromosoomi populatsioonigeneetika.....	23
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	25
2.1. Töö eesmärgid ja ülesehitus.....	25
2.2. Materjalid ja meetodika .....	26
2.2.1. Valim.....	26
2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon.....	28
2.2.2.1. Multipleks-PCR I ja II reaktsiooni tingimused .....	30
2.2.2.2. Multipleks-PCR III reaktsiooni tingimused .....	30
2.2.3. Andmete statistiline analüüs.....	31
2.2.3.1. <i>AZFc</i> piirkonna b2/b3 ja gr/gr osaliste deletsioonide sageduste võrdlemine erinevate patsientide ning kontrollgruppide vahel.....	31
2.3. Tulemused.....	32
2.3.1. Protokollide juurutamine ja valideerimine .....	32
2.3.2. <i>AZFa</i> , <i>AZFb</i> , <i>AZFc</i> täielike ning <i>AZFc</i> osaliste mikrodeletsioonide määramine Eesti viljakusprobleemidega meespatsientidel ja kontrollidel .....	33

2.3.2.1. <i>AZFa</i> , <i>AZFb</i> ja <i>AZFc</i> täielike mikrodeletsioonide genotüpiseerimise tulemused .....	34
2.3.2.2. <i>AZFc</i> osaliste mikrodeletsioonide genotüpiseerimise tulemused.....	34
2.3.3. b2/b3 ja gr/gr deletsioonide sageduste võrdlemine erinevate patsientide ja kontrollide gruppide vahel .....	35
2.4. Arutelu .....	38
KOKKUVÕTE .....	41
SUMMARY .....	42
KASUTATUD KIRJANDUS .....	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	49
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS .....	50

## KASUTATUD LÜHENDID

AZF - *Azoospermia factor*, Azoospermia faktor

BMI - *Body Mass Index*, Kehamassiindeks

CNV - *Copy-number variaton*, Koopiaarvu varieeruvus

FSH- *Follicle-stimulating hormone*, Folliikuleid stimuleeriv hormoon

GnRH- *Gonadotropin-releasing hormone*, Gonadotropiini vabastav hormoon

ICSI - *Intra-cytoplasmic sperm injection*, Seemneraku intratsütoplasmaatiline injektsioon

LH- *Luteinizing hormone*, Luteiniseeriv hormoon

MNV - *Multi-nucleotide variant*, Mitme nukleotiidne variant

MSY - *The male-specific region of the human Y-chromosome*, Mees-spetsiifiline piirkond

NRY - *Non-recombining region of the Y-chromosome*, Y-kromosoomi mittekombineeruv regioon

PAR - *The pseudoautosomal region*, Pseudoautosomaalne piirkond

SCO - *Sertoli cell-only syndrome*, Sertoli raku sündroom

SNP - *Single-nucleotide polymorphism*, Ühe nukleotiidne polümorfism

SNV - *Single-nucleotide variant*, Ühe nukleotiidne variant

SSF - *Severe spermatogenic failure*, Raske spermatogeenne häire

STR - *Short tandem repeat*, Lühike tandeemne kordus

STS – *Sequence-tagged site*, Markerjärjestused

TESE - *Testicular sperm extraction*, Testikulaarsete seemnerakkude eraldamine

WHO - *Worlds Health Organization*, Maailma Terviseorganisatsioon

YCM - *Y-chromosome microdeletions*, Y-kromosoomi mikroleletsioonid

## SISSEJUHATUS

Ligikaudu 15% paaridest reproduktiivses eas ei saavuta rasedust 12-kuulise perioodi jooksul, hoolimata regulaarsetest kaitsmata seksuaalvahekordadest. Ligikaudu 50% tahtmatult lasteta paaridel osutavad ebanormaalsed sperma näitajad meeste viljakusega seotud faktoritele (Agarwal et al., 2015; Venkatesh et al., 2014).

Meeste viljatuses mängivad suurt rolli geneetilised faktorid ning eriti olulised on muudatused Y-kromosoomis. Peamisteks teadaolevateks geneetilisteks faktoriteks meeste viljatuses on kromosoomi anomaaliad ning Y-kromosoomi mikrodeletsioonid (Poongothai et al., 2009). Peamised mikrodeletsioonid leiavad aset Y-kromosoomi azoospermia faktori (*AZF*) regioonis, mis on jagatud kolmeks: *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc*. *AZF* piirkond on oluline, kuna ta sisaldab spermatogeneesiks vajalikke gene (Navarro-Costa et al., 2010). *AZFa* piirkonna osalist deleteerumist seostatakse hüpospermatogeneesiga, kuid täielik *AZFa* piirkonna deleteerumine pärsib sugurakkude tootmise ning küpsemise, põhjustades Sertoli raku sündroomi. *AZFb* piirkonna deletsioonid põhjustavad meiootilises profaasis oleva spermatogeneesi peetust või Sertoli rakkude sündroomi, mille tulemusena tekib azoospermia. *AZFc* deletsioonidega indiviididel on näha erinevaid fenotüüpilisi tunnuseid, mis ulatuvad azoospermia kerge oligozoospermiani. *AZFc* deletsioonid on meessoost järglastele edastatavad (Suganthi et al., 2014) ning seega annab meeste viljakust mõjutavate geneetiliste faktorite analüüs väärtuslikke teadmisi viljakusprobleemide all kannatavate patsientide ravimeetodite arendamiseks ning idiopaatilise viljatuse põhjuste määramiseks (O’Flynn O’Brien et al., 2010).

Antud uurimistöo eesmärkideks on juurutada ning valideerida meie uurimisrühmas kolm multipleks-PCR protokollid *AZF* täielike (Krausz et al., 2014) ja *AZFc* osaliste (Lin et al., 2006) mikrodeletsioonide genotüüpiseerimiseks, mida saab edaspidiselt kasutada kliinilises laboris ning võrrelda *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide sagedust idiopaatilistel viljakusprobleemidega Eesti meestel ning kontrollgruppides.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Viljakusprobleemid

Viljakusprobleemid puudutavad umbes 15% paaridest ümber maailma, millest meeste osapool moodustab umbkaudu poole (Agarwal et al., 2015). Viljatuse definitsioon on seksuaalselt aktiivsete, rasestumisvastaseid vahendeid mittekasutavate paaride võimetus saada järglasi ühe aasta jooksul (Venkatesh et al., 2014).

### 1.1.1. Meeste viljakusprobleemid ja nende teadaolevad põhjused

Suuremal osal patsientidest esineb häireid spermatogeneesis ning seda peetakse meestepoolse vähenenud viljakuse ja viljatuse üheks peamiseks põhjuseks. Kõige raskem spermatogeneesi häire vorm on azoospermia, mille puhul spermid ejakulaadis puuduvad. Kergemaks vormiks on oligozoospermia, mille puhul ejakulaadis spermide koguarv Maailma Terviseorganisatsiooni (*Worlds Health Organization*, WHO) definitsiooni kohaselt on vähem kui 39 miljonit (Tabel 1)(WHO, 2010).

**Tabel 1.** Seemnevedeliku alampiirväärtused Maailma Terviseorganisatsiooni (*World Health Organization*, WHO) järgi (WHO, 2010).

Parameetrid	WHO, 2010
Spermide kogu arv	39 miljon/ejakulatsioon
Munandimaht	1,5 ml
Spermide kontsentratsioon	15 miljon/ml
Spermatosoidide liikuvus	40%
Progressiivne liikuvus	32%

Mitmed geneetilised ja keskkonna faktorid mängivad rolli spermatogeneesi normaalses kulgemises, kuid on märkimisväärne osa juhtumeid (umbes 60%), millel pole teadaolevaid põhjuseid (idiopaatilisus)(Punab et al., 2016). Eestis kasutuseloleva rutiinse kliinilise praktika andmete põhjal on meeste viljatuse põhjused Punab et al., 2016 teadusartikli alusel järgmised (Tabel 2):

- Geneetilised põhjused varieeruvad üksikute geenide mutatsioonidest tervete kromosoomide aneuploidiate jm. ümberkorraldusteni (põhjalikumalt käsitletud alapunktis 1.1.2).

- Sekundaarse hüpogonadismi ehk hüpogonadotroopse hüpogonadimi korral on gonadotropiini vabastava hormooni (GnRh) sekretsioon puudu või puudulik ning see põhjustab testikulaarse funktsiooni kahjustust, mis omakorda mõjutab spermatogeneesi ja/või

testosterooni sünteesi. Hüpogonadotroopne hüpogonadism on üks haruldastest konditsioonidest, mille puhul on võimalik viljakus taastada (Fραιetta et al., 2013).

- Urogenitaaltrakti kaasasündinud anomaaliatega alla käivad näiteks neeru hüpoplaasia (vaegmoodustus), krüptorhism (uni- ja bilateraalne; munandi laskumishäire), *triorchidism* (kolm munandit) ja kaasasündinud anorhia (uni- ja bilateraalne; pole munandeid).

- Onkoloogilised haigused nagu munandivähk, eesnäärme kartsinoom, hematoloogilised kasvaja, luu- ja kilpnäärmevähk.

- Seksuaalse funktsiooni häired nagu anorgasmia (võimetus orgasmi saada), anejakulatsioon (ejakulaadi puudumine), retrograadne ehk tagurpidine ejakulatsioon (osaline ja täielik; ejakulaat liigub kusepõide).

- Teised testikulaarsed kahjustused nagu omandatud testiste kahjustused (kiirgus, orhiit/epididümiit ehk munandipõletik) ja sekundaarsed testiste kahjustused (anaboolsed steroidid, ravimid- *salazopryrin, trexan*).

**Tabel 2.** Teadaolevad viljatuse põhjused ja nende sagedus 1737 viljakusprobleemidega Eesti meespatsiendi põhjal (Kohandatud Punab et al., 2016 järgi).

<b>Põhjused</b>	<b>Sagedus Eesti patsientidel (%)</b>
1. Geneetilised põhjused	7,8
2. Sekundaarne hüpogonadism	1,3
3. Kaasasündinud anomaaliad urogenitaaltraktis	10,7
4. Onkoloogilised haigused	3,4
5. Seksuaalse funktsiooni häired	4,4
6. Seemnejuha obstruktsioon (nt vasektoomia)	5,9
7. Teised testikulaarsed kahjustused	6,6

### **1.1.2. Meeste viljatuse teadaolevad geneetilised põhjused**

Meeste viljatusega on seostatud erinevaid geneetilisi faktoreid, mis oma suuruselt varieeruvad tervete kromosoomide arvu anomaaliatega kuni üksikutes geenides toimunud mutatsioonideni (Skakkebaek et al., 2015). Eesti viljakusprobleemidega patsientidel moodustavad geneetilised faktorid 7,8 % teadaolevatest põhjustest ( Tabel 2)(Punab et al., 2016).

Eestis on täna kliinilises praktikas kasutatavate testide tulemuste alusel geneetiliste viljatuse põhjuste jaotuvus järgmine (Punab et al., 2016):

- Autosomaalsed genoomsed ümberkorraldused nagu näiteks translokatsioonid võivad tekkida siis, kui kahes kromosoomis on toimunud järjestuste katkemine ning need erinevatelt



kromosoomidelt pärinevad fragmendid on omavahel kohad vahetanud (Harton and Tempest, 2012). Kromosoomide translokatsioonidega patsientidel on madalam munandimaht ja vereseerumi testosterooni tase, mis võib omakorda põhjustada spermatogeneesi häireid ja kõige ekstreemsematel juhtudel ka azoospermia (Dong et al., 2012). Nagu kromosoomide translokatsioonid, võivad ka genoomilõikude inversioonid (ehk kromosoomi-sisene struktuurne ümberkorraldus) põhjustada viljatust (Harton and Tempest, 2012). Ka Downi sündroomi (47, XX/XY + 21) puhul on viljakus vähenenud (Stefanidis et al., 2011).

- Sugukromosoomi arvuhäirete seas on kõige sagedasem Klinefelteri sündroom (46, XXY)(sagedus 1:660 vastsündinud poisslapse kohta). Selle sündroomiga mehel on üks liigne X kromosoom, mis võib pärineda kummaltki vanemalt. Peamised Klinefelteri sündroomi sümptomid on väiksed munandid, hüpergonadotroopne hüpogonadism ja kognitiivsed häired. Ravimiseks kasutatakse peamiselt testosterooni asendusravi, leevendamaks ägedaid ja pikaajalisi hüpogonadismi tagajärgi (Groth et al., 2013). Üks sagedasemaid on veel 47, XYY kariotüübiga mehed, kes omavad täiendavat Y kromosoomi (sagedus 1:1000 poisslapse kohta). Selle sündroomiga poisslastel võib esineda käitumishäireid, suurem kasvukiirus, kerge õppimiskõhnus, hilinenud kõne- ja keeleoskus (El-Dahtory and Elsheikha, 2009) ning spermatogeneesi häired (Abdel-Razic et al., 2012; Punab et al., 2016).

- *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*) geeni mutatsioonid põhjustavad tsüstilist fibroosi (TF), mis on retsessiivne autosomaalne haigus, kahjustades peamiselt hingamis- ning seedesüsteemi kaudu toimuvat metabolismi (Fanen et al., 2014). Eesti populatsioonis kõige levinumad mutatsioonid *CFTR* geenis on F508del (51,4%) ja 394delTT (15,2%)(Kahre, 2004). On raporteeritud, et >95% meestest, kellel on TF-i, kannatavad obstruktiivse azoospermia all (Ferlin et al., 2006).

- Y-kromosoomi mikrodeletsioone peetakse kõige sagedasemateks struktuurseteks kromosoomianomaaliateks ning meeste viljatuse üheks peamiseks põhjuseks (põhjalikumalt käsitletud alapunktis 1.4)(Yu et al., 2015).

**Tabel 3.** Viljatuse geneetilised põhjused ja nende sagedused 1737 viljakusprobleemidega Eesti mehe põhjal (Kohandatud Punab et al., 2016 järgi).

<b>Geneetilised põhjused</b>	<b>Sagedus (%)</b>
<b>1.Autosomaalsed mutatsioonid</b>	0,7
Inversioonid	0,2
Translokatsioonid	0,3
<b>2.Sugukromosoomi abnormaalsused</b>	4,1
47,XXY (Klinefelteri sündroom)	3,5
47,XYY (XYY sündroom)	0,2
<b>3.CFTR geeni mutatsioonid</b>	0,6
<b>4.Y-kromosoomi mikroleetsioonid</b>	2,3

### 1.1.3. Sperma kvaliteeti mõjutavad lisafaktorid

Tead on erinevaid lisafaktoreid, mis mõjutavad sperma kvaliteeti ja seega meestepoolset viljakust:

- 1) *Suitsetamine.* Tubaka suitsetamine halvendab sperma kvaliteeti mõõdukalt. Palju suitsetavatel meestel (umbes 20 sigaretti päevas) on spermide arv 29% madalam kui mitesuitsetajatel (Ramlau-Hansen et al., 2007). Sigarett sisaldab mitmeid mürgiseid aineid, millest osa (näiteks akroleiin) on reproduktsiooni toksiinid, mis võivad põhjustada munandites oksüdatiivset kahjustust (Bhatt, 2000).
- 2) *Alkohol.* Liigset alkoholi tarbimist on seostatud testikulaarse toksilisusega (Pajarinen and Karhunen, 1994)
- 3) *Kemikaalid.* Erinevad kemikaalid võivad kahjustada spermatogeneesis paljunevaid spermatogooniaid kuni küpsete spermatoosoidideni, põhjustades kas rakusurma, subletaalseid rakukahjustusi või geneetilisi muudatusi (Bhatt, 2000).
- 4) *Ravimid.* Sulfasalasiin, mida kasutatakse põletikuliste soolehaiguste ravimiseks, võib põhjustada oligozoospermiat. Vähi ja autoimmuunhaiguste raviks kasutatavad tsütotoksilised ravimid võivad põhjustada kahjustusi sugunäärmetele. Anaboolsete steroidide ületarvitamisel on suured kõrvalmõjud testistele ning nad põhjustavad oligo/azoospermiat (Krausz and Forti, 2000).
- 5) *Elukeskkonna faktorid.* Pestitsiidid, mõned glükoolestrid (värvides, trükivärvides ja liimides), plii, kaadium ja elavhõbe mõjuvad toksiliselt spermale (Krausz and Forti,

2000). On ka raporteeritud, et keskkonna toksiinid mõjutavad östrogeeni efekte ning võivad põhjustada häireid mehe suguelundkonnas (Sharpe and Skakkebaek, 1993).

- 6) *Vale toitumisrežiim*. Alakaalulistel ning ülekaalulistel võib sagedamini esineda oligozoospermiat ja azoospermiat kui normaalkaalus meestel (Sermondade et al., 2012; Hammoud et al., 2008). Alakaalulisust on seostatud suurenenud, kuid mitte olulise ebanormaalse spermatoosoidide arvu riskiga (Sermondade et al., 2012). Ülekaalulisus võib põhjustada ka erektsiooni häireid ning madalamat motiilsete spermide arvu (Hammoud et al., 2008).

## 1.2. Y-kromosoomi ülesehitus

### 1.2.1. Y-kromosoomi struktuur

Kõigil imetajatel, s.h. inimesel on Y kromosoom meessoospetsiifiline, pärandudes isalt pojale. Y kromosoomil paiknevate geenide oluliseimaks funktsiooniks on loote soo määramine. Y kromosoom on inimese genoomi väikseim kromosoom, olles üle 57 Mb pikk ning ta koosneb lühikesest (Yp) ja pikast (Yq) õlast (Joonis 1)(UCSC genoomibrauser, <https://genome.ucsc.edu/>). Y kromosoomi otstel asuvad pseudoautosomaalsed regioonid (PAR-id), mis rekombineeruvad X kromosoomiga meioosi ajal (PAR1 alati ja PAR2 aegajalt)(Foresta et al., 2001). PAR1 on 2,6 Mb pikk ning asub lühikesel õlal, PAR2 on ainult 0,32 Mb pikk ning asub pikal õlal (Mangs and Morris, 2007). PAR-ide vahel olev ala X kromosoomiga ei rekombineeru ning seda nimetatakse mittekombineeruvaks regiooniks (NRY) (Foresta et al., 2001).

X kromosoomiga mittekombineeruvat piirkonda nimetatakse ka meessoospetsiifiliseks piirkonnaks (MSY) ja see moodustab 95% kromosoomi pikkusest. MSY koosneb heterokromatiinist ja eukromatiinist, neist viimane on tinglikult jaotatud kolme klassi: X-transpositsioneerunud, X-degenereerunud ning amplikonide-rikkad alad (Tabel 4)(Skaletsky et al., 2003).

**Tabel 4.** Inimese MSY piirkonna struktuuri jaotus (Skaletsky et al., 2003 järgi)

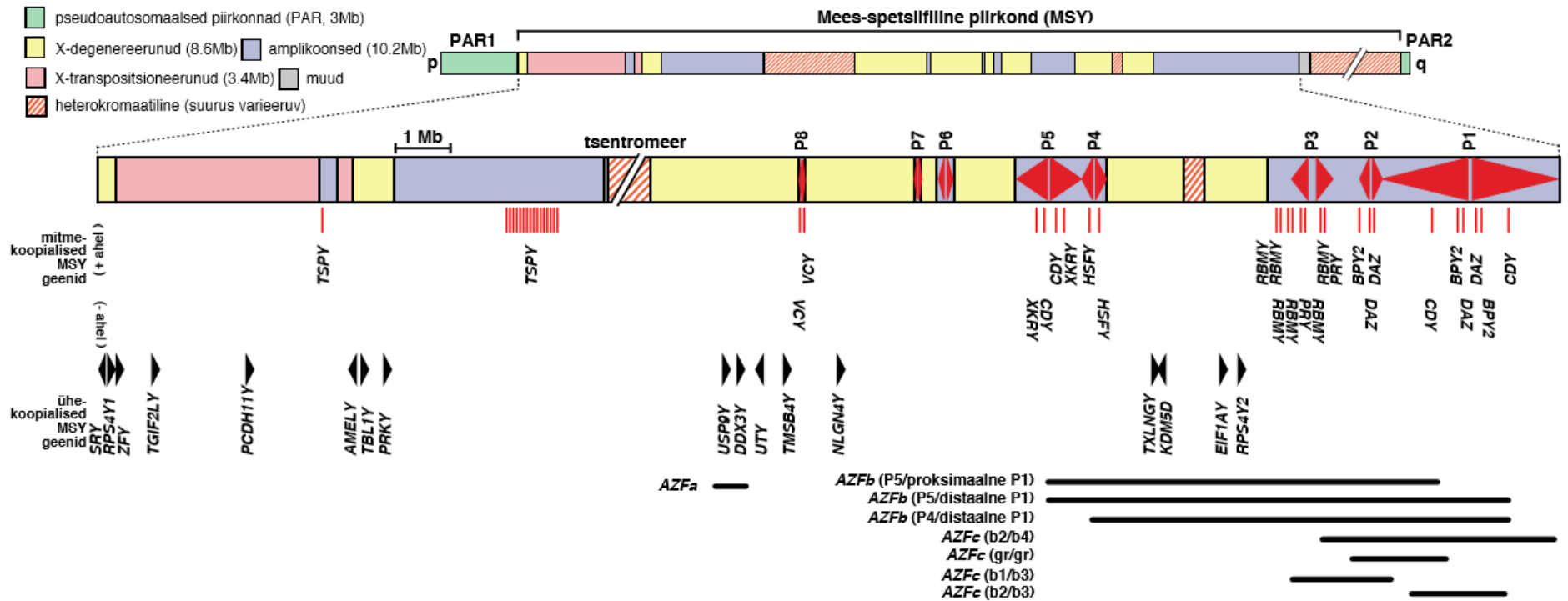
<b>Y-kromosoomi genoomsed lõigud</b>	<b>Pikkus (Mb)</b>	<b>Jaotus kromosoomi peal</b>
<b>1. Eukromatiin</b>	23	8 Mb Yp-l, 14,5 Mb Yq-l
1.1 X-transpositsioneerunud alad	3,4	2 genoomilõiku
1.2 X-degenereerunud alad	8,6	8 genoomilõiku
1.3 Amplikonide-rikkad alad	10,2	7 genoomilõiku
<b>2. Heterokromatiin</b>	41,4	3 genoomilõiku

Heterokromatiin paikneb inimese Y kromosoomis kolme lõiguna: ~ 40 Mb Yq ala, mis moodustab enamuse kromosoomi pikast õlast; ~ 1 Mb pikkune tsentromeerne heterokromatiin ning sellega külgnev ~ 400 kb pikkune tandeemne kordusjärjestus, 125 bp pikkused lihtsad DNA järjestuste kordused (Joonis 1)(Skaletsky et al., 2003). Y-kromosoomi heterokromatiini pikkus varieerub inimeste vahel suurel määral (Repping et al., 2006).

X-tranpositsioneerunud alad on tekkinud X-Y-kromosoomide vahelise massiivse transpositsiooni - DNA segmendi ülemineku ühest kromosoomi osast teise - tulemusena 3-4 miljon aastat tagasi. Need hõlmavad kokku 3,4 Mb, asetledes kahe lõiguna Y-kromosoomi lühikesel õlal ja sisaldavad kahte geeni (Joonis 1, Tabel 5). Need alad on 99% identsed X-kromosoomi pika õla segmendiga Xq21. X-transpositsioneerunud järjestused ei osale X-Y rekombineerumisel meioosi ajal, erinedes sellega pseudoautosomaalsetest aladest (Skaletsky et al., 2003).

X-degenereerunud järjestused on iidsete autosoomide (mittesugukromosoom) jäänused, millest on tänapäeva X ja Y kromosoomid arenenud. X-degenereerunud järjestused on kaheksa segmendina Yp-s ja Yq-s, nende pikkus on kokku 8,6 Mb ning seal paiknevad geenid kodeerivad 16 erinevat valku või valguperekonda (Joonis 1)(Skaletsky et al., 2003).

Amplikonide-rikkad alad sisaldavad endas genoomseid segmente, mida iseloomustab väga kõrge omavaheline DNA järjestuste identsus (kuni 99,9%). Nende alade pikkus on kokku 10,2 Mb ning nad on jaotunud seitsme segmendina mõlemal kromosoomi õlal (Joonis 1). Kolmest eukromatiini klassist on amplikonide-rikkad alad kõige geenitihedamad. Seal asuvad kaheksa palindroomi, mis hõlmavad 5,7 Mb ja moodustavad umbes 25% kogu MSY-i alast. Palindroom on DNA-lõik, mille järjestust päri- ja tagurpidi lugedes on täpselt samasugune. Y-kromosoomi palindroomide õlgade omavaheline järjestuse identsus on väga kõrge, üle 99,9%. Kaheksast palindroomist kuus sisaldavad valke kodeerivaid gene, mis kõik on testise-spetsiifilise avaldumisega. Lisaks on palindroomides ka vähemalt seitse reguloorset RNA-geeni, mis on ka üksnes või peamiselt ekspresseeritud munandites. Amplikonide-rikkas regioonis asub ka lihtsaid tandeemseid DNA kordusjärjestusi ning 5 ümberpööratud kordusjärjestust (IR- *inverted repeats*), pikkustega 62-298 kb (Skaletsky et al., 2003).



**Joonis 1.** Inimese Y kromosoomi järjestuste skemaatiline joonis, näitamaks kromosoomi ülesehitust, ühe- ja mitmekoopialiste valkukodeerivate geenide ning korduvate *AZF* mikrodeletsioonide ligikaudset asukohta. Palindroomid (P1-P8) on näidatud punaste kolmnurkadega (Skaletsky et al., 2003). B2/b3 deletsiooni asukoht on joonisel ligikaudne, kuna see on tekkinud inversiooniga Y kromosoomil ning seega tema täpne kujutamise referentsjärjestuse taustal pole võimalik.

### **1.2.2. MSY eukromatiinse ala geenid**

MSY eukromatiinse piirkonnas on 156 teadaolevat transkriptsiooniüksust, millest ilmselt pooled kodeerivad valke. 78-st valke kodeerivatest üksustest 60 kuuluvad üheksasse erinevasse MSY spetsiifilisse geeniperekonda (Tabel 5). Ülejäänud 18 valke kodeerivat geeni on unikaalsed ehk esinevad ühe geenikoopiana. Seega kodeerib MSY vähemalt 27 erinevat valku või valguperekonda, millest 12 on transkribeeritud kõikjal kudedes, 11 üksnes või enamjaolt testistes ning ülejäänud 4 mujal (Tabel 5). 78-st transkriptsiooniühikust, mis on arvatavasti RNA geenid, on 13 unikaalsed ja ülejäänud 65 kuuluvad 15-sse MSY spetsiifilisse geeniperekonda. Arvestades kokku nii valkukodeerivad kui mittekodeerivad transkriptsiooniühikuid, siis on MSY spetsiifilisi geeniperekondi 24. Amplikoni-rikastes järjestustes on identifitseeritud üheksa erinevat valkukodeerivat geeniperekonda koopianumbritega 2-35, millest kõik on peamiselt või üksnes ekspresseeritud testistes (Skaletsky et al., 2003).

**Tabel 5.** Inimese MSY eukromatiinse ala geenide kirjeldus (Andmed võetud: Skaletsky et al., 2003 ja veebileht *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>)).

MSY piirkond	Geeni sümbol	Koopia number	Ekspressioon	Funktsioon
X-transpositsioneerunud	<i>TGIF2LY</i>	1	Testised	<i>TGFB</i> ( <i>transforming growth factor beta</i> )-induced factor homeobox 2-like, Y-linked. Kodeerib <i>TALE/TGIF</i> perekonna transkriptsioonifaktoreid ja võib reguleerida <i>TGIF2LX</i> -i.
	<i>PCDH11Y</i>	1	Lootajaju, aju	<i>Protocadherin 11</i> Y-linked. Arvatakse, et omab rolli kesknärvisüsteemis rakk-raku interaktsioonides.
Kokku		2		
X-degenereerunud	<i>SRY</i>	1	Peamiselt testistes	<i>Sex determining region Y</i> . Määrab soo ja on oluline munandite arenguks.
	<i>RPS4Y1</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Ribosomal protein S4</i> . Kodeerib ribosoomivalku S4.
	<i>ZFY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Zinc finger protein</i> , Y-linked. Kodeerib tsinksõrme sisaldavat valku, mis võib toimida kui transkriptsioonifaktor.
	<i>AMELY</i>	1	Hambad	<i>Amelogenin</i> , Y-linked. Osaleb hambaemali arengus.
	<i>TBL1Y</i>	1	Lootajaju, eesnääre	<i>Transducin (beta)-like</i> , Y-linked. Osaleb signaaliülekanes, RNA protessingus, geeni regulatsioonist ja tsütoskeleti arengus.
	<i>PRKY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Protein kinase</i> , Y-linked. Võib olla seotud neeru-epiteeli morfogeneesiga, makrofaagide ja granulotsüütide küpsemisega. Selle geeni ja X-liitelise geeni ebanormaalse rekombinatsiooni tulemusel võivad tekkida XX-mehed ja XY-naised.
	<i>USP9Y</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Ubiquitin specific peptidase 9</i> , Y-linked. Kodeerib valku, mis on sarnane ubikitiin-spetsiifilistele proteaasidele.
	<i>DBY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Dead box helicase</i> , Y-linked. Seotud ATP seondumisega, hüdroolüüsiga, RNA sidumisega ja molekulisest interaktsioonide moodustamisega.
	<i>UTY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing</i> , Y-linked. Osaleb valk-valgu interaktsioonides ning on koesobivuse antigeen, mis võib esile kutsuda meessugurakkude äratõukereaktsiooni.
<i>TMSB4Y</i>	1	Kõikides	<i>Thymosin beta 4</i> , Y-linked. Kodeerib aktiini eraldavat valku.	

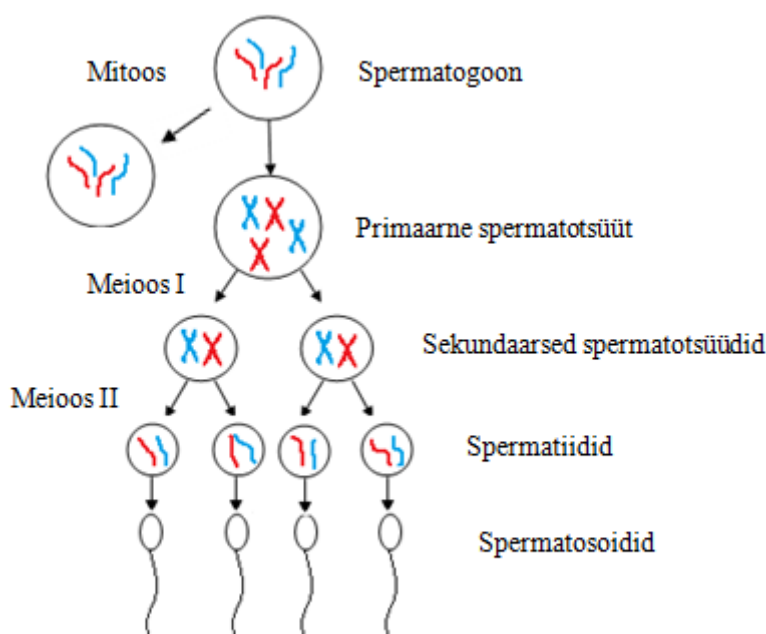
			kudedes	
	<i>NLGN4Y</i>	1	Looteaju, aju, eesnääre, testised	<i>Neurologin 4, Y-linked</i> . Oluline funktsionaalsete sünapside moodustamiseks.
	<i>TXLNGY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Taxilin Gamma Pseudogene, Y-Linked</i> . Funktsioon pole teada.
	<i>SMCY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Lysine (K)-specific demethylase 5</i> . Kodeerib valku, mis sisaldab tsinksõrme domeeni ning on koosobivus antigeen, mis võib põhjustada äratõukereaktsiooni naises mees doonorrakkude suhtes.
	<i>EIF1AY</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked</i> . Kodeerib valku, mis on seotud eukarüootse translatsiooni initsiatsiooniga, sidudes Met-tRNA 40S ribosomaalsetele subühikutele.
	<i>RPS4Y2</i>	1	Kõikides kudedes	<i>Ribosomal protein S4, Y-linked 2</i> . Kodeerib ribosomaalset valku.
	Kokku	16		
Amplikonide rikas	<i>TSPY</i>	35	Testistes	<i>Testis specific protein, Y-linked 1</i> . Osaleb spermatogeneesis.
	<i>VCY</i>	2	Testistes	<i>Variable charge, Y-linked</i> . VCX/Y geenid kodeerivad väikseid ja väga laetud teadmata funktsiooniga valke.
	<i>XKRY</i>	2	Testistes	<i>XK, Kell blood group complex subunit-related, Y-linked</i> . Kodeeritud valk koosneb mitmest transmembraansest domeenist ja võib funktsioneerida kui membraanne transporter.
	<i>CDY</i>	4	Testistes	<i>Chromodomain protein, Y-linked</i> . Kodeeritav valk võib käituda geenide repressorina.
	<i>HSFY</i>	2	Testistes	<i>Heat shock transcription factor, Y-linked</i> . Kuumašokivalkude transkriptsioonilised aktivaatorid.
	<i>RBMY</i>	6	Testistes	<i>RNA binding motif protein, Y-linked</i> . Osaleb spermatogeneesis.
	<i>PRY</i>	2	Testistes	<i>PTPN13-like, Y-linked</i> . Kodeerib valku, mis on sarnane proteiin-türosiin-fosfataasile.
	<i>BPY2</i>	3	Testistes	<i>Basic charge, Y-linked, 2</i> . On seotud meessugurakkude arenguga ja viljatusega.
	<i>DAZ</i>	4	Testistes	<i>Deleted in azoospermia</i> . Kodeerib RNA-d siduvat valku, mis on oluline spermatogeneesis.
	Kokku	60		



### 1.3. Spermatogeneees

Spermatogeneesi eesmärgiks on igapäevaselt luua ja säilitada diferentseerunud spermatooside. Uuendamise tagavad spermatogeensete tüvirakkude ja spermatogoonide järjestikulised mitootilised jagunemised. On kaks võimalust: (1) sugurakk kas läbib mitoosi faasi, et ennast kahekordistada või (2) siseneb meioosi faasi, et vähendada enda kromosoomide sisaldust poole võrra ning diferentseeruda spermatiidiks (Joonis 2). Spermatiidide diferentseerumist spermatoosideks nimetatakse spermiogeneesiks. Kõik faasid toimuvad samaaegselt, et tagada pidev spermatooside tootmine (Sutovsky and Manandhar, 2006).

Spermatogenees on reguleeritud hüpotaalamuselt sekreteeritava gonadotropiini hormooni (GnRH) poolt, mis initseerib hüpofüüsilt produtseeritava luteniseeriva hormooni (LH) ning folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) vabanemist (Sutovsky and Manandhar, 2006). Folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH) ning androgeenid (näiteks testosteroon Leydigi rakkudes) toodetakse vastusena luteniseerivale hormoonile. Peale suguküpsuse saavutamist FSH ning androgeenid vähendavad algsugurakkude apoptoosi minekut. Androgeenid on vajalikud spermatogoonide proliferatsiooniks ning lubavad spermatotsüütidel läbida meioosi ning formeeruda spermatiidideks. Mõlemad, nii FSH kui ka androgeenid reguleerivad spermatogeneesi läbi Sertoli rakkude retseptorite. Sertoli rakud on olulised kõikides spermatogeneesi aspektides, spermatogoonia arengust kuni spermatogeneesi protsesside lõpuni (O'Shaughnessy, 2014).



**Joonis 2.** Mehe sugurakkude areng spermatogoonist spermatoosidideni.

#### 1.4. Y-kromosoomi *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* mikrodeletsioonid

Spermatogenees on oluline paljunemisprotsess, mida reguleerivad mitmed Y-kromosoomi spetsiifilised geenid (Tabel 5). Enamik nendest geenidest paiknevad azoospermia faktori regioonis (*AZF*) (Yu et al., 2015), mis asub Y-kromosoomi pika õla (Yq) eukromatiinses osas ning on jagatud *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* regioonideks (Vogt et al., 1996). Y-kromosoomi eukromatiinse ala mikrodeletsioone on seostatud spermatogeensete häiretega juba 40 aastat tagasi (Tiepolo and Zuffardi, 1976) ning nad on ka üheks sagedasemaks viljatuse geneetiliseks põhjuseks (Punab et al., 2016).

Arvatakse, et mitmed Y-kromosoomi deletsioonid kahjustavad reproduktiivset süsteemi, mis välistab nende edastamise järgmisesse põlvkonda ja seega tagab nende harva esinemise populatsioonis (Repping et al., 2003). Need mikrodeletsioonid võivad ülekande käigus suureneda või tekkida *de novo* (Dai et al., 2012). Testikulaarset päritolu deletsioonid võivad tekkida igas spermatogeenses või spermigeenses etapis. Kõige sagedamini tekivad deletsioonid meiootilises profaasis olevates primaarsetes spermatotsüütides, kui diploidsetest kromosoomidest saavad haploidsed kromosoomid (Edwards ja Bishop, 1997).

*AZF* deletsioonidega mehed on tavaliselt viljatud ning sellest järeldatult võiks oletada, et deletsioonid ei saa kanduda üle nende järglastele. Viimastel aastakümnetel ICSI (*Intracytoplasmic sperm injection*) ja TESE (*Testicular sperm extraction*) meetodid on aidanud azoospermiaga või raske oligozoospermiaga meestel lapsi saada, kuid need meetodid suurendavad YCM-ide (*Y-chromosome microdeletions*- Y-kromosoomi mikrodeletsioonid) ülekandumist meessoost järeltulijale (Yu et al., 2015).

##### 1.4.1. *AZFa* piirkond

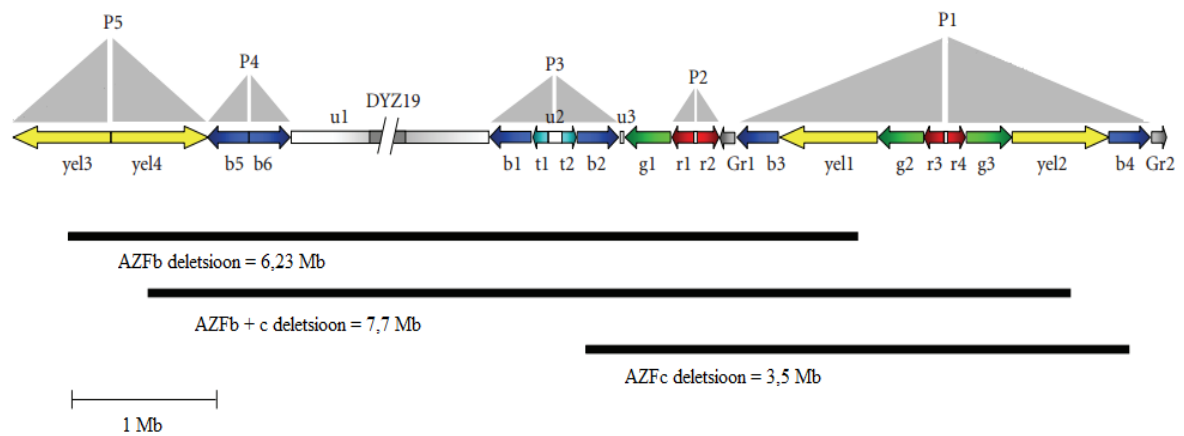
*AZFa* piirkond on ~0,8 Mb pikk ja sinna piirkonda kuuluvad kandidaatgeenid *USP9Y* (*Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked*) ja *DBY* (*Dead box helicase, Y-linked*) (Sun et al., 1999). *AZFa* piirkonna osalist deleteerumist on seostatud hüpospermatogeneesiga, kuid täielik *AZFa* deleteerumine blokeerib seminaalses torukeses sugurakkude tootmise ning küpsemise (Suganthi et al., 2014). *USP9Y* ei ole normaalseks spermatogeneesiks vajalik, kuid võib avaldada oma efekte viljakusele kombinatsioonis *AZFa* piirkonnas olevate teiste kandidaatgeenidega (Yu et al., 2015). *AZFa* deletsioon tekib homoloogse intrakromosomaalse rekombinatsiooni teel (Kamp et al., 2000) ning eemaldab mõlemad geenid, nii *USP9Y* kui ka *DBY*. *AZFa* deletsioon põhjustab Sertoli raku sündroomi, mis on konditsioon, kus leidub küll Sertoli rakke, kuid ejakulatsioonis puuduvad spermid (O'Flynn O'Brien et al., 2010). *AZFa* deletsiooni sagedus SCO (*Sertoli cell-only syndrome*) patsientide seas on 9% (Kamp et al., 2001) ning võrreldes teiste *AZF* piirkonna mikrodeletsioonidega moodustab *AZFa*

deleteerumine ainult 5%-lise osakaalu kõikidest *AZF* piirkonna täielikest mikrodeletsioonidest (Krausz, 2011).

#### **1.4.2. *AZFb* piirkond**

*AZFb* piirkond moodustab 6,2 kuni 7,7 Mb pikkuse ala MSY järjestustes ja kattub *AZFc* piirkonnaga 1,5 Mb, mis viitab sellele, et täielik *AZFb* piirkonna deleteerumine eemaldab alati mingi osa *AZFc* piirkonnast. *AZFb* piirkond sisaldab endas palindroome P2-P5 ning samuti P1 proksimaalset osa, mille sisse kuuluvad mitmeid nii ühekoopialised geenid kui ka mitmekoopialised geeniperekonnad. P5/proksimaalne-P1 deletsioon hõlmab kuni 6,2 Mb ning eemaldab 32 geeni ja transkripti. P5/distaalne-P1 deletsioon hõlmab kuni 7,7 Mb ning eemaldab 42 geeni ja transkripti (Repping et al., 2002). Ühekoopialisteks geenideks on *KDM5D* (*lysine (K)-specific demethylase 5D*), *EIF1AY* (*Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked*), *RPS4Y2* (*Ribosomal protein S4 Y isoform 2*) ja *CYORF15* (*Chromosome Y open reading frame 15A and 15B*). Tulenevalt *AZFb* piirkonna proksimaalses osas olevatest amplikonide-rikastest järjestustest, sisaldab ta ka 7 multikoopialist geeniperekonda: *XKRY* (*XK, Kell blood group complex subunit-related, Y-linked*), *HSFY* (*Heat shock transcription factor, Y-linked*), *CDY* (*Chromodomain protein, Y-linked*), *BPY2* (*Basic charge, Y-linked, 2*) ja *DAZ* (*Deleted in azoospermia*). Liikmed nendest geeniperekondadest moodustavad kokku 20 transkriptsiooniüksust (Navarro-Costa et al., 2010). *AZFb* piirkonna deletsioon tekib palindroomide P5 ja P1 proksimaalse osa homoloogilise rekombinatsiooni teel ning põhjustab meiootilises profaasis oleva spermatogeneesi peetust või Sertoli raku sündroomi, mis toob kaasa azoospermia tekke (Ferlin et al., 2003; Repping et al., 2002). *AZFb* mikrodeletsioonide sagedus võrreldes *AZFa* mikrodeletsioonidega on suurem, kuid võrreldes *AZFc* mikrodeletsioonidega väiksem, moodustades 10%-lise osakaalu kõikidest *AZF* piirkonna täielikest mikrodeletsioonidest (Krausz, 2011).

*AZFb* amplikonid on jagatud kuute perekonda, neist pooled (yel3, yel4, b5, b6, b1, t1, t2) on ainuomased *AZFb* piirkonnale ning ülejäänud on jagatud *AZFc* piirkonnaga (b2, g1, r1, r2, Gr1, b3, yel1, g2, r3, r4, g3, yel2)(Joonis 3)(Navarro-Costa et al., 2010).



**Joonis 3.** *AZFb* ja *AZFc* piirkondi moodustavate ampliconide järjestus. Ampliconide perekonnad on omavahelise kõrge DNA järjestuse identtsuse põhjal defineeritud erinevate värvidega (*yellow*, *blue*, *turquoise*, *green*, *red* ja *grey*) ning iga perekonna liige numbriga. Modifitseeritud Navarro-Costa et al., 2010 artikli põhjal.

### 1.4.3. *AZFc* piirkond

*AZFc* piirkond (3,5 Mb) hõlmab enda alla 3 palindroomi (P1-P3)(Joonis 3), mis on moodustunud kuuest amplicoonide perekonnast (*blue* (b), *turquoise* (t), *red* (r), *yellow* (y), *green* (g), *grey* (gr))(pikkustega 115-678 kb)(Joonis 3, 4). *AZFc* piirkond koosneb täielikult ampliconidest ning on eriti vastuvõtlik deletsioonidele. *AZFc* palindroomne kompleks sisaldab 11 transkriptsiooniüksuse perekonda, millest kõik on peamiselt või täielikult ekspresseeritud testistes (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Kolm kõige sagedasemat *AZFc* osalist mikrodeletsiooni on gr/gr, b2/b3 ja b1/b3 (vaadata põhjalikumalt alapunkti 1.4.3.1)(Lardone et al., 2007). *AZFc* mikrodeletsioonid on tekkinud homoloogiliste rekombinatsioonide tõttu ampliconide vahel (Noordam et al., 2011). *AZFc* mikrodeletsioonide esinemissagedus *AZFa* ja *AZFb* piirkonna mikrodeletsioonidega võrreldes on tunduvalt suurem, moodustades 75%-lise osakaalu kõikidest *AZF* piirkonna täielikest mikrodeletsioonidest (Krausz, 2011).

*AZFc* piirkonna täielikku deletsiooni nimetatakse b2/b4 deletsiooniks (3,5 Mb), mis tekib b2 ja b4 ampliconide homoloogilise rekombinatsiooni tõttu (Repping et al., 2003). See deletsioon kõrvaldab kogu *AZFc* regiooni (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001) ja seega 8 testistespetsiifilist geeniperekonda (Tabel 6)(Repping et al., 2003). *AZFc* piirkonna täielik deleteerumine on enamiku spermatogeensete häirete põhjuseks (Lardone et al., 2007), tekitab azoospermiat või rasket oligozoospermiat (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). 3,5 Mb pikkune b2/b4 deletsioon suurendab SSF-i (*severe spermatogenic failure* - raske spermatogeenne häire) riski 145 korda ning moodustab ~6% SSF-ist (Rozen et al., 2012).

Deletsioonid, mis sisaldavad lisaks *AZFc* regioonile veel mingit ala (*AZFb+AZFc* ja *AZFa+AZFb+AZFc*), on seostatud spermatoosidide puudumisega testistes (Silber et al., 1998) ning nende deletsioonide sagedus teiste *AZF* piirkonna mikrodeletsioonide hulgas on 10% (Krausz, 2011).

#### **1.4.3.1. *AZFc* osalised mikrodeletsioonid**

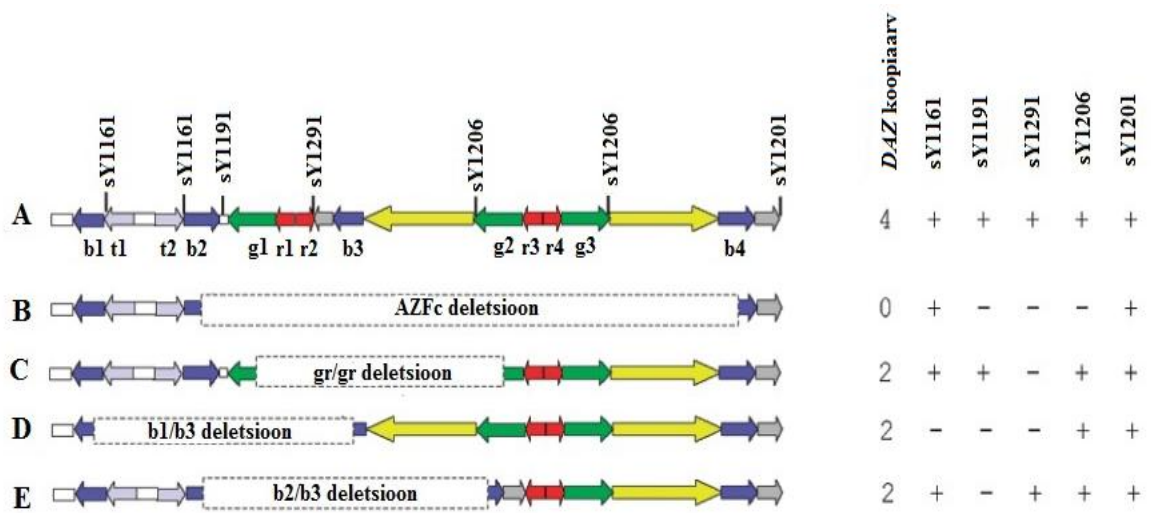
Deletsioonid, mis hõlmavad Y-kromosoomi *AZFc* piirkonda on kõige levinumad raskete spermatogeneesi häirete (SSF) geneetilised põhjused (Rozen et al., 2012). Kõige sagedasemad *AZFc* osalised mikrodeletsioonid on jaotatud järgmiselt:

- Gr/gr deletsioon (1,6 Mb) on põhjustatud g1/g2, r1/r3 ja r2/r4 ampliconide vahelise homoloogilise rekombinatsiooni poolt. Gr/gr deletsioon ei kõrvalda täielikult ühtegi testis-spetsiifilist geeniperekonda ega transkriptsiooniühiku perekonda, vaid selle asemel vähendab 8 selliste perekonna koopiate numbreid (Tabel 6) ning see võib mõjutada toodetud sperme (Repping et al., 2003). Gr/gr deletsioonid on tugevas korrelatsioonis meeste viljatuse ning madala spermatoosidide arvuga ning seda eriti Kaukaasia populatsioonides (Bansal et al., 2016). 1,6 Mb pikkune gr/gr deletsioon peaaegu kahekordistab SSF-i riski, ent <2% selle deletsiooniga meestest on mõjutatud (Rozen et al., 2012).

- B2/b3 deletsioon (1,8 Mb) arvatakse olevat põhjustatud kas gr/gr inversioonist, millele järgneb b2/b3 deletsioon või b2/b3 inversioonist, millele järgneb gr/gr deletsioon (Stouffs et al., 2011). B2/b3 deletsioon eemaldab 12 testis-spetsiifilist geeni või transkripti (Tabel 6)(Repping et al., 2004). Metaanalüüsid on näidanud, et b2/b3 deletsiooni seostamine spermatogeennsete häiretega ja viljatusega on märkimisväärselt suurem mongoolastel, mulattidel, ida-aasialastel ja aafriklastel kui kaukaaslastel, eurooplastel, lõuna-aasialastel ja dravidianlastel (Bansal et al., 2016). B2/b3 deletsioon on sagedane (leidub ühel 90-st mehest), kuid ei näi olevat riskifaktor SSF-ile (Rozen et al., 2012).

- B1/b3 deletsioon (1,6 Mb) on põhjustatud b1 ja b3 ampliconide vahelise homoloogilise rekombinatsiooni poolt. B1/b3 deletsioon kõrvaldab täielikult *PRY* geeniperekonna ning vähendab teiste geeniperekondade ja transkriptsiooniühiku perekondade koopiaarve seitsme võrra (Tabel 6)(Repping et al., 2003). 1,6 Mb pikkune b1/b3 deletsioon näib SSF-i riski suurendavat koefitsiendiga 2,5, ent <2% selle deletsiooniga meestest on mõjutatud (Rozen et al., 2012).

Järeldusena, *AZFc* piirkonna täielik (b2/b4) deletsioon ning tagasihoidliku mõjuga gr/gr deletsioon on suuresti vastutavad *AZFc* piirkonna panusest SSF-ile (Rozen et al., 2012).



**Joonis 4.** Y-kromosoomi *AZFc* regiooni sagedasemad mikroleetsioonid ning nende määramiseks kasutatavate markerjärjestuste (STS- *sequence-tagged site*) mustrid. A. *AZFc* regiooni struktuur, kus erinevate väga kõrge DNA järjestuse identsusega amplikonide kordused on näidatud erinevate värvidega. B. *AZFc* täielik deletsioon. C, D, E. *AZFc* osalised deletsioonid. *DAZ* geeni kooptia numbrid ja STS markerite olemasolu (+) või puudumine (-) on näidatud paremal. Modifitseeritud Lin et al., 2006 artikli põhjal.

**Tabel 6.** *AZFc* piirkonnas asuvad geeni perekonnad ja nende koopia-arvud ning erinevate deletsioonide poolt eemaldatud geenid (Andmed võetud: Repping et al., 2003, 2004).

Geen	Ilma				
	deletsioonideta Y-kromosoom	<i>AZFc</i> (b2/b4) deletsioon	b2/b3 deletsioon	gr/gr deletsioon	b1/b3 deletsioon
<i>RBM1</i>	6	6	6	6	4
<i>BPY2</i>	3	0	2	2	2
<i>DAZ</i>	4	0	2	2	2
<i>CDY</i>	2	0	1	1	2
<i>PRY</i>	2	2	2	2	0
<i>CSPG4LY</i>	2	0	1	1	2
<i>GOLGA2LY</i>	2	0	1	1	2
<i>TTY3</i>	2	0	1	1	2
<i>TTY4</i>	3	0	1	2	2
<i>TTY5</i>	1	1	1	1	0
<i>TTY6</i>	2	2	2	2	0
<i>TTY17</i>	3	0	1	2	2
Kokku	32	11	20	23	20

### 1.5. Y-kromosoomi populatsioonigeneetika

Tänu oma mees-spetsiifilisele pärandumisele ning enamikus oma pikkuses ristisirde puudumisele omab Y kromosoom mees-liini omapärast ajalugu, kus domineerib geograafiliselt struktureeritud geneetiline triiv. Rekombinatsioonist pääsemise tõttu kanduvad MSY haplotüübid tavaliselt edasi ühelt põlvkonnalt teisele puutumatu, muutudes peamiselt läbi suhteliselt harva tekkivate mutatsioonide, mitte läbi meiotilise rekombinatsiooni nagu ülejäänud kromosoomid (Jobling and Tyler-Smith, 2003).

Inimese Y kromosoomis on nüüdseks kirjeldatud üle 65 000 geneetilise polümorfismi, hõlmates ühe nukleotiidsed variante (SNV), mitme-nukleotiidsed variante (MNV), insertioone ja deletsioone (indelid), lühikesi tandemseid kordusi (STR) ning koopiaarvu varieeruvusi (CNV) (Poznik et al., 2016). Kasutades madala mutatsioonikiirusega binaarseid polümorfisme nagu ühe-nukleotiidsed polümorfismid (SNP-d), saab kergesti ehitada unikaalse Y-kromosoomi fülogeneetilise puu (Jobling and Tyler-Smith, 2003). Inimese Y-kromosoomi binaarsed haplogrupid on määratud tähtede ja numbritega (The Y Chromosome Consortium, 2002).

Suur osa Y-kromosoomi liinidest Ida-Euroopa ja Ida-Aasia inimpopulatsioonides kuuluvad haplogruppi (hg) NO, mis koosneb kahest tütarlaadist N-M231 ja O-M175. O-klaad hõlmab enamiku Ida- ja Kagu-Aasia meesliinidest. Haplogrupp N on suure sagedusega Ida-Euroopa populatsioonides (Ilumäe et al., 2016; Rootsi et al., 2007). N3a3-VL29 liin

esineb üle kolmandiku tänapäeva meessoost olevate eestlaste, lätlalaste ja leedukate seas, kuid esineb ka karjalastel, soomlastel ning saamidel. Ka slaavi keeli kõnelevate valgevenelaste, ukrainlaste ja venelaste seas on levinud Y-kromsoomi haplogrupp N3, millest moodustab 75% haplogrupp N3a3 (Ilumäe et al., 2016), kuid enamus venelaste Y kromosoome kuulub haplogruppi R1a (Balanovsky et al., 2008). N haplogruppi on fikseerunud *AZFc* osaline mikroleetsioon b2/b3 ning seetõttu on olemas kõikidel seda Y-kromosoomi tüüpi kandvatel meestel (Repping et al., 2004; Zhang et al., 2007).

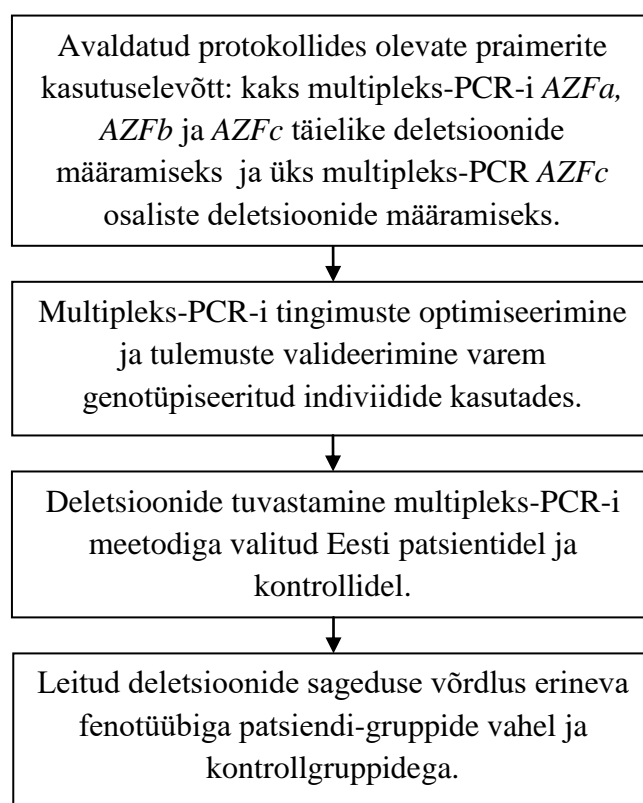


## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid ja ülesehitus

Käesoleva töö eesmärgid on :

- 1) Juurutada ning valideerida meie oludes kolme multipleks-PCR-i protokollid, mida saab edaspidiselt kasutada kliinilises laboris.
  - a. *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* täielike mikrodeletsioonide määramise kaks multipleks-PCR-i
  - b. *AZFc* sagedasemate (b2/b3, gr/gr, b1/b3) osaliste deletsioonide määramise multipleks-PCR
- 2) Eesti idiopaatilise viljakusprobleemidega patsientide (azoospermia, krüptozoospermia, raske oligozoospermia, oligozoospermia) ja kontrollgruppide ('Eesti noored mehed', 'Rasedate naiste mehed') genotüpiseerimine *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* täielike ja *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide suhtes, kasutades väljatöötatud multipleks-PCR-ide protokolle ning leitud deletsioonide sageduste võrdlus valimi erinevate gruppide vahel.



**Joonis 5.** Töö ülesehitus. Töö praktiline osa põhineb kahel protokollil: Krausz et al., 2014 ja Lin et al., 2006.

## 2.2. Materjalid ja meetodika

### 2.2.1. Valim

Antud töös kasutatud patsientide valim korjati Tartu Ülikooli Kliinikumi Meestekliinikus (koordineeritud Dr. M. Punabi poolt). Patsientideks loeti mehi, kellel ei õnnestunud 12 kuuga last eostada. Kasutatud patsiendid on TÜ Kliinikumis defineeritud kui idiopaatilised ehk neil pole Tabelis 2 loetletud (k.a. Y-kromosoomi *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* mikrodeletsioone) viljatuse põhjusi diagnoositud. Vastavalt spermide arvule ejakulaadis on töös kasutatud idiopaatilised patsiendid jagatud nelja gruppi: azoospermia, krüptozoospermia, raske oligozoospermia ning oligozoospermia (Tabel 7, 8)(Punab et al., 2016). Rasedate naiste meeste kui tõestatud viljakate kontrollgrupp koguti aastatel 2010-2014 Tartu Ülikooli Naistekliinikus ning Lääne-Tallinna Keskhaiglas. Noorte Eesti meeste kontrollgruppi kuuluvad inividid koguti ajateenistusse astuvate meeste hulgast aastatel 2003-2004 Tartu Ülikooli Meestekliinikumis ning nende kohta viljakuse andmed puuduvad. Töös kasutatud valimite kogumine on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee poolt ja on kaetud lubadega nr. 112/3, 152/4, 221/M-5, 221/T-6 ja 112/3. Iga uuringus osaleja on selleks andnud kirjaliku informeeritud nõusoleku. Varasemalt on valimeid kasutatud järgnevates töödes: Ehala-Aleksejev and Punab, 2015; Erenpreiss et al., 2017; Grigorova et al., 2008, 2010, Punab et al., 2002, 2016.

**Tabel 7.** Patsientide erinevate fenotüüpide definitsioonid (Andmed võetud: Punab et al., 2016).

Fenotüüp	Spermide arv ejakulaadis
Azoospermia	0
Krüptozoospermia	< 1
Raske oligozoospermia	1-10
Oligozoospermia	10-38

\*spermide arv miljonites

**Tabel 8.** Käesolevas töös kasutatud valimi iseloomustus.

		<b>Indiviidide arv</b>	<b>Spermiide koguarv (miljonit/ejakulatsioonis)</b>	<b>Vanus (aastates)</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>
<b>Patsiendid</b>	Azoospermia	104	0	33 (18-70)	25,3 (18,6-37,4)
	Krüptozoospermia	88	0,329 (0,02-0,95)	32 (18-54)	26,1 (21,8-36,7)
	Raske oligozoospermia	319	4,7 (1,0-10,0)	32 (20-66)	25,9 (18,4-47,7)
	Oligozoospermia	679	23,1 (10,0-38,8)	31 (19-67)	26,1 (17,8-53,0)
	<b>Kokku</b>	<b>1190</b>			
<b>Kontrollid</b>	Noored Eesti mehed	485	221,0 (0,8-3141,6)	18 (16-25)	22,0 (16,2-39,6)
	Rasedate naiste mehed	324	295,2 (4,5-2227,5)	31 (20-57)	24,8 (11,5-42,4)
	<b>Kokku</b>	<b>809</b>			

\*mediaan (miinimum, maksimum)

### 2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon

PCR-i reaktsioonid viidi läbi kolme erineva multipleksiga. Multipleks-PCR I ja II (Krausz et al., 2014) on *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* täielike mikroleetsioonide ning multipleks-PCR III (Lin et al., 2006) *AZFc* osaliste mikroleetsioonide tuvastamiseks (Tabel 9). Kõik kolm multipleks-PCR-i sisaldavad viit praimeripaari.

Multipleks-PCR-ides I ja II amplifitseeritakse igast *AZF* piirkonnast paralleelselt kahte erinevat STS markerit – kui need on puudu mõlemas multipleks-PCR-is, defineeritakse see vastava *AZF* piirkonna täisdeletsioonina, kuid kui üks on puudu, siis osalise deletsioonina. Lisaks on mõlemas multipleks-PCR-is praimerid amplifikatsioonireaktsiooni toimumise (*ZFX/Y*) ja indiviidi soo kontrollimiseks (*SRY*)(Tabel 9).

Multipleks-PCR III sisaldab primereid nelja erineva *AZFc* piirkonna regioonides asuvate STS markerite jaoks ning ühte praimeripaari (*sY1201*) amplifikatsiooni toimumise kontrollimiseks, mis paikneb uuritavatest deletsioonidest tavaliselt puutumata jäävas Y-kromosoomi piirkonnas (Joonis 4, Tabel 9).

PCR-i produktide olemasolu kontrolliti 2% agarosgeelil (0,5x TBE). Geelile kanti 5 mikrolitrit amplifikatsiooni produkti ning fragmentide pikkuse määramiseks 3 mikrolitrit *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (Solis Biodyne) või *MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use 103 ng/μl* (Thermo Scientific) pikkusmarkerit. Amplifikatsiooni produktide pikkused varieerusid 124 kuni 677 aluspaarini (Joonis 6, Tabel 9).

**Tabel 9.** Kasutatud multipleks-PCR-ide iseloomustus.

<b>Praimerite kombinatsioonid</b>	<b>Deletsioon</b>	<b>Praimeri järjestus 5'-3' suunas</b>	<b>Produkti pikkus</b>
<b>Multipleks I</b>			
ZFX/Y_F		ACCACTGTA CTGACTGTGATTACAC	495 bp
ZFX/Y_R		GCACtCTTTGGTATCtGAGAAAGT	
SRY_sY14F		GAATATTCCCGCTCTCCGGA	470 bp
SRY_sY14R		GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	
AZFa_sY86F	<i>AZFa</i>	GTGACACACAGACTATGCTTC	318 bp
AZFa_sY86R		ACACACAGAGGGACAACCCT	
AZFb_sY127F	<i>AZFb</i>	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	274 bp
AZFb_sY127R		CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	
AZFc_sY254F	<i>AZFc</i>	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	380 bp
AZFc_sY254R		GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	
<b>Multipleks II</b>			
ZFX/Y_F		ACCACTGTA CTGACTGTGATTACAC	495 bp
ZFX/Y_R		GCACtCTTTGGTATCtGAGAAAGT	
SRY_sY14F		GAATATTCCCGCTCTCCGGA	470 bp
SRY_sY14R		GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	
AZFa_sY84F	<i>AZFa</i>	AGAAGGGTCCTGAAAGCAGGT	328 bp
AZFa_sY84R		GCCTACTACCTGGAGGCTTC	
AZFb_sY134F	<i>AZFb</i>	GTCTGCCTCACCATAAAACG	303 bp
AZFb_sY134R		ACCACTGCCAAA ACTTTCAA	
AZFc_sY255F	<i>AZFc</i>	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	124 bp
AZFc_sY255R		CTCGTCATGTGCAGCCAC	
<b>Multipleks III</b>			
sY1161_F	b1/b3	CGACACTTTTGGGAAGTTTCA	330 bp
sY1161_R		TTGTGTCCAGTGGTGGCTTA	
sY1201_F		CCGACTTCCACAATGGCT	677 bp
sY1201_R		GGGAGAAAAGTTCTGCAACG	
sY1191_F	<i>AZFc</i> , b2/b3, b1/b3	CCAGACGTTCTACCCTTTCG	368 bp
sY1191_R2		CCCACTCTAGCCTGATGAG	
sY1291_F2	<i>AZFc</i> , gr/gr, b1/b3	GATTCACGGTGACTAGGCTGAG	561 bp
sY1291_R2		AATGGGAGAAAAGTTCTGCAACG	
sY1206_F2	<i>AZFc</i>	AGGAGGCAGAGATTGATCTC	412 bp
sY1206_R2		TAGAAGAGACATGTGTGGCC	

### 2.2.2.1. Multipleks-PCR I ja II reaktsiooni tingimused

PCR-i reaktsioonisegu mahuga 12,5 µl sisaldas 10 x puhvrit B1(Solis Biodyne), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM dNTP segu, 2 µM multipleks-PCR I või II praimereid (Tabel 9), 1U Firepol polümeraasi (Solis Biodyne), MQ-d ja 20 ng genoomset DNA-d.

PCR viidi läbi Applied Biosystems'i GeneAmp® PCR System 2700 masinaga järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95 °C	5 min	
Denaturatsioon	95 °C	45 sek	} 32 tsükli
Praimerite seondumine	57 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	1 min	
Inkubatsioon	72 °C	10 min	
Säilitamine	4 °C	∞	

### 2.2.2.2. Multipleks-PCR III reaktsiooni tingimused

PCR-i reaktsioonisegu mahuga 10 µl sisaldas 10x puhvrit B1 (Solis Biodyne), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-d, 2,5 mM dNTP-d, 2 µM multipleks-PCR III praimereid sY1291 ja sY1201, 3 µM praimereid sY1191, sY1206 ja sY1161 (Tabel 9), 1U Firepol polümeraasi (Solis Biodyne), MQ-d ja 20 ng genoomset DNA-d.

PCR viidi läbi Applied Biosystems'i GeneAmp® PCR System 2700 masinaga järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95 °C	5 min	
Denaturatsioon	95 °C	30 sek	} 32 tsükli
Praimerite seondumine	63 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	1 min	
Inkubatsioon	72 °C	10 min	
Säilitamine	4 °C	∞	

### 2.2.3. Andmete statistiline analüüs

#### 2.2.3.1. AZFc piirkonna b2/b3 ja gr/gr osaliste deletsioonide sageduste võrdlemine erinevate patsientide ning kontrollgruppide vahel

B2/b3 ja gr/gr deletsioonide sageduste võrdlemiseks kasutasin *GraphPad Quickcalcs* kodulehe Fisher'i täpset testi (<https://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>). Statistilise olulisuse piiriks loeti väärtust  $p \leq 0,05$ .

B2/b3 ja gr/gr deletsioonide šansside suhte (*odds ratio*) ning 95% usaldusvahemiku (*confidence interval*) arvutamiseks patsientide ja kontrollide vahel kasutasin *VassarStats* kodulehte (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Protokollide juurutamine ja valideerimine

Krausz et al., 2014 protokollil põhjal valisin I ja II multipleks-PCR-i kuuluvad praimerite kombinatsioonid, et tuvastada *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* täielikke mikrodeletsioone. *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide määramiseks võtsin kasutusele Lin et al., 2006 protokollid, kust sain III multipleks-PCR-i jaoks praimerite kombinatsioonid. Nende multipleks-reaktsioonide juurutamiseks meie laboris proovisin PCR-i optimeerimiseks erinevaid praimerite seondumistemperatuure ning kontsentratsioone.

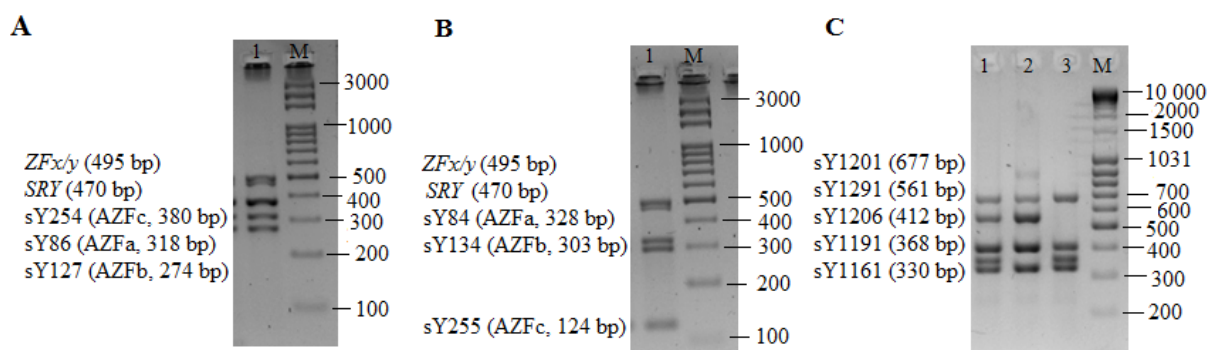
Multipleks-PCR I, II ja III kombinatsioonide praimerite optimaalsete seondumistemperatuuride leidmiseks katsetasin järgmisi temperatuure: 57 °C, 59 °C, 61 °C, 63 °C ja 65 °C. Multipleks-PCR-i I ja II praimerite optimaalseks seondumistemperatuuriks sobis 57 °C ning multipleks-PCR III-le 63 °C.

Kõigi kolme multipleks-PCR-i jaoks praimerite optimaalsete lõppkontsentratsioonide tuvastamiseks katsetasin 1 µM, 2 µM ning 3 µM kontsentratsioone. Multipleks-PCR I ja II kõigile praimeritele sobis kontsentratsioon 2 µM ning multipleks-PCR III erinevatele praimerite sobisid lõppkontsentratsioonid 2 µM (sY1291 ja sY1201) ning 3 µM (sY1191, sY1206 ja sY1161).

Multipleks-PCR I ja II täpsuse kontrollimiseks kasutasin 18 patsienti, kellel oli varasemalt TÜ Kliinikumis teostatud testimiste põhjal teada *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* mikrodeletsioonide olemasolu. Tuvastasin 12 *AZFc* ja kaks *AZFb* mikrodeletsiooniga indiviidi. Lisaks tuvastasin ühe *AZFb* osalise mikrodeletsiooniga indiviidi (marker sY134 multipleks-PCR-is II puudu, kuid sY127 multipleks-PCR-is I olemas) ning kolm indiviidi, kellel oli deleteerunud nii *AZFb* kui *AZFc* piirkonnad. Saadud tulemused kattusid täielikult TÜ Kliinikumi testide tulemustega (Dr. M. Punabi suulised andmed).

Lisaks olid töös kasutatud 1190 idiopaatilist patsienti varem TÜ Kliinikumis *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* täielike deletsioonide suhtes testitud. Ka mina ühelgi patsiendil neid deletsioone ei tuvastanud, mis kinnitas kasutatud genotüpiseerimismetoodika täpsust ja usaldusväärsust (Tabel 10).





**Joonis 6.** Multipleks-PCR-ide geelielektroforeesi tulemused. Multipleks-PCR I (A) ja II (B) amplifikatsiooni tulemused kasutades deletsioonideta indiviidi (1). Multipleks-PCR III amplifikatsiooni tulemus (C) ilma *AZFc* osalise mikrodeletsioonideta (1), b2/b3 mikrodeletsiooniga (2) ja gr/gr mikrodeletsiooniga (3) indiviidil. M – DNA pikkusmarker. Igast geelipildist vasakul pool on loetletud amplifitseeritud fragmendid ning nende oodatavad pikkused, paremal pool osade DNA pikkusmarkeri fragmentide pikkused aluspaarides.

### 2.3.2. *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* täielike ning *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide määramine

#### Eesti viljakusprobleemidega meespatsientidel ja kontrollidel

Y-kromosoomi *AZF* täielike ning *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide suhtes genotüpiseeriti 1190 patsienti ning 809 kontrollgruppi kuuluvat indiviidi (Tabel 10).

**Tabel 10.** Patsientide ja kontrollide *AZF* täielike ja *AZFc* b2/b3, gr/gr ja b1/b3 osaliste mikrodeletsioonide genotüpiseerumise tulemused.

Grupp	b2/b3	gr/gr	b1/b3	<i>AZFa, b, c</i>	Kokku
<b>Patsiendid</b>					
Azoospermia	29 (27,9%)	2 (1,9%)	0 (0%)	0 (0%)	104
Krüptozoospermia	27 (30,7%)	6 (6,8%)	0 (0%)	0 (0%)	88
Raske oligozoospermia	111 (34,8%)	11 (3,4%)	0 (0%)	0 (0%)	319
Oligozoospermia	222 (32,7%)	14 (2,1%)	0 (0%)	0 (0%)	679
<b>Kokku</b>	<b>389 (32,7%)</b>	<b>33 (2,8%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>1190</b>
<b>Kontrollid</b>					
Rasedate naiste mehed	122 (37,7%)	4 (1,2%)	0 (0%)	0 (0%)	324
Eesti noored mehed	136 (28,0%)	7 (1,4%)	1 (0,2%)	1* (0,2%)	485
<b>Kokku</b>	<b>258 (31,9%)</b>	<b>10 (1,2%)</b>	<b>1 (0,1%)</b>	<b>1* (0,1%)</b>	<b>809</b>

\* osaline *AZFa* deletsioon

### **2.3.2.1. *AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* täielike mikrodeletsioonide genotüpiseerimise tulemused**

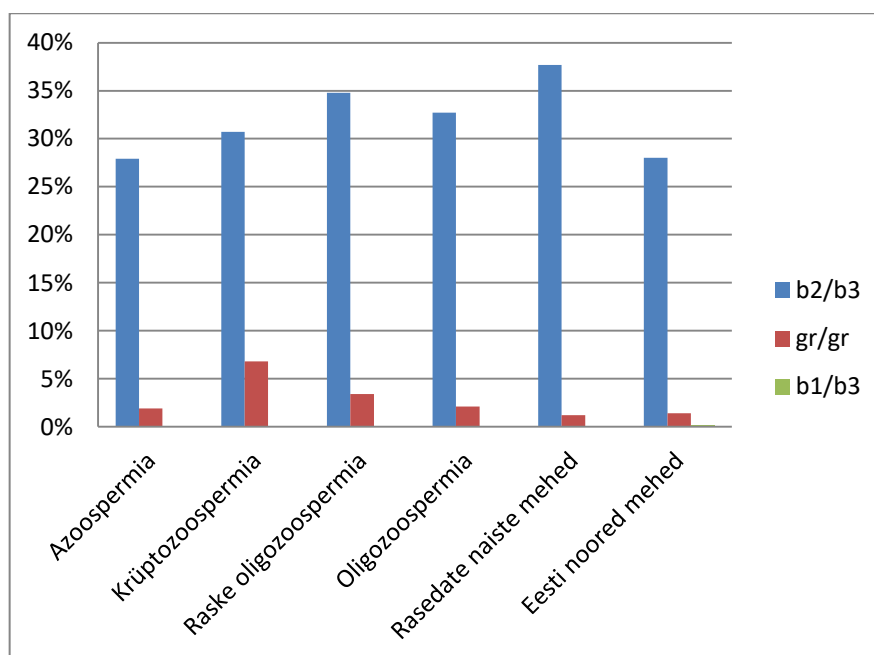
*AZFa*, *AZFb* ja *AZFc* täielike mikrodeletsioonide tuvastamiseks kasutasin multipleks-PCR kombinatsioone I ja II (Joonis 6, Tabel 9). Antud töö raames genotüpiseeritud idiopaatiliste viljakusprobleemidega patsientide seas *AZF* täielikke deletsioone ma ei tuvastanud (Tabel 10). Ka kontrollgruppide seas ma ei tuvastanud *AZF* piirkonna täielikke mikrodeletsioone, kuid 'Eesti noorte meeste' kontrollgrupis esines üks *AZFa* piirkonna osaline mikrodeletsioon. Sellel indiviidil oli puudu multipleks-PCR II kuuluv sY84 STS fragment.

### **2.3.2.2. *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide genotüpiseerimise tulemused**

*AZFc* osaliste mikrodeletsioonide b2/b3, gr/gr ja b1/b3 tuvastamiseks kasutasin multipleks-PCR kombinatsiooni III (Joonis 6, Tabel 9). Teostatud genotüpiseerimise tulemustest lähtuvalt võib öelda, et Eesti populatsioonis on kõige levinum b2/b3 deletsioon (Joonis 7, Tabel 10). Patsientide seas oli b2/b3 deletsiooni osakaal kõige suurem raske oligozoospermia (34,8%) ning kõige väiksem azoospermia (27,9%) grupis. Kontrollide seas esines 'Rasedate naiste meeste' grupis rohkem b2/b3 deletsioone (37,7%) kui 'Eesti noorte meeste' grupis (28,0%)(Tabel 10).

Gr/gr deletsioone esines patsientide seas kõige rohkem krüptozoospermia grupis (6,8%) ning kontrollide seas rohkem 'Eesti noortel meestel' (1,4%). 'Eesti noorte meeste' kontrollgrupis esines ka üks b1/b3 deletsioon (Tabel 10).

Lisaks kolmele kõige sagedasemale (b2/b3, gr/gr ja b1/b3) *AZFc* osalisele mikrodeletsioonile, esines kasutatud valimis ka paar haruldasemat osalist mikrodeletsiooni. Mõlemas kontrollgrupis ('Rasedate naiste mehed' ja 'Eesti noored mehed') oli ühel indiviidil puudu sY1206 STS markeri fragmendid ning ühel azoospermia patsiendil oli puudu sY1201 ning sY1291 STS markerite fragmendid.



**Joonis 7.** AZFc osaliste mikrodeletsioonide osakaal protsentides erinevate patsientide ning kontrollide seas.

### 2.3.3. b2/b3 ja gr/gr deletsioonide sageduste võrdlemine erinevate patsientide ja kontrollide gruppide vahel

AZFc osaliste deletsioonide sageduste võrdlemise erinevate patsientide ja kontrollide gruppide vahel viisin läbi ainult b2/b3 ja gr/gr deletsioonide jaoks, kuna b1/b3 ning teisi osalisi deletsioone leidsin ainult üksikutel indiviididel (vaadata alapunkti 3.2.2.2).

B2/b3 deletsiooni sageduste erinevus kõiki patsiente ning kõiki kontrolle võrreldes on statistiliselt mitteoluline (32,7% versus 31,9%;  $p=0,7333$ ; OR=1,037; 95% CI=0,857-1,256). Samuti on statistiliselt mitteolulised sageduste erinevused kõikide patsientide ning 'Rasedate naiste meeste' (32,7% versus 37,7%;  $p=0,0978$ ; OR=0,804; 95% CI=0,623-1,038) ning patsientide ning 'Eesti noorte' kontrollgruppide vahel (32,7% versus 28%;  $p=0,0635$ ; OR=1,246; 95% CI=0,988-1,572). Kõikidest erinevate gruppide vahel paarikaupa läbiviidud b2/b3 deletsioonide sageduste võrdlustes esines ainus statistiliselt oluline erinevus 'Rasedate naiste meeste' ning 'Eesti noorte meeste' kontrollgruppide vahel ( $p=0,0044$ , Tabel 11).

Gr/gr deletsiooni sageduste erinevus võrreldes omavahel korruga kõiki patsiente ning kõiki kontrolle on statistiliselt oluline (2,8% versus 1,2%,  $p=0,0267$ ; OR=2,279; 95% CI=1,117-4,650), samas kui erinevus kõikide patsientide ning eraldi 'Rasedate naiste meeste' (2,8% versus 1,2%;  $p=0,1533$ ; OR=2,282; 95% CI=0,802-6,488) ja 'Eesti noorte meeste' (2,8% versus 1,4%;  $p=0,1150$ ; OR=1,948; 95% CI=0,856-4,433) vahel statistilise olulisuse nivood ei ületanud. Gr/gr deletsioonide sageduste paarikaupa võrdluses esines statistiliselt oluline väärtus krüptozoospermikute ja oligozoospermikute vahel ( $p=0,0197$ ) ning

krüptozoospermikute ja mõlema kontrollgrupi vahel ('Rasedate naiste mehed',  $p=0,0081$ ; OR=5,854; 95% CI=1,614-21,227; 'Eesti noored mehed',  $p=0-0077$ ; OR=4,997; 95% CI=1,638-15,242)(Tabel 11).

Saadud tulemused viitavad sellele, et gr/gr deletsioon on Eesti populatsioonis spermatogeneesi häirete riskifaktor, samas kui b2/b3 deletsiooni sagedus patsientide ja kontrollide vahel oluliselt ei erine ning seega teda riskifaktoriks lugeda ei saa.

**Tabel 11.** b2/b3 ja gr/gr deletsioonide gruppide vaheliste sageduste erinevuste paarikaupa võrdlemisel saadud Fisheri täpse testi *p*-väärtused (statistiliselt olulised väärtused on *kald*- ja **rasvases** kirjas).

<b>gr/gr</b>	<b>b2/b3</b>					
	Azoosp.	Krüptozoosp.	Raske oligozoosp.	Oligozoosp.	Rasedate naiste mehed	Eesti noored mehed
Azoosp.		0,7504	0,2302	0,3675	0,0773	1
Krüptozoosp.	0,1456		0,5257	0,8089	0,2608	0,6094
Raske oligozoosp.	0,7434	0,2229		0,5178	0,4613	0,0507
Oligozoosp.	1	<b>0,0197</b>	0,1977		0,1353	0,0942
Rasedate naiste mehed	0,6360	<b>0,0081</b>	0,0715	0,4515		<b>0,0044</b>
Eesti noored mehed	0,6630	<b>0,0077</b>	0,0857	0,5079	1	

\*olulisuse nivoo  $p \leq 0,05$

\*\* Azoospermia, krüptozoospermia, raske oligozoospermia ja oligozoospermia

## 2.4. Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli juurutada ning valideerida meie oludes kaks multipleks-PCR-i protokollid *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* täielike (Krausz et al., 2014) ning *AZFc* osaliste (Lin et al., 2006) mikrodeletsioonide sageduste määramiseks Eesti populatsioonis, mida saab kasutada kliinilises laboris viljatuse põhjuste määramiseks.

Käesoleva töö raames viidi läbi Y-kromosoomi *AZF* täielike ning *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide genotüpiseerimine, uurimaks nende mikrodeletsioonide sagedust ning seost viljakusprobleemidega Eesti idiopaatilistel patsientidel ning kontrollidel. Varem avaldatud protokollide kasutuselevõtt oli edukas ning valideerimise tulemused kattusid 100% varasemalt TÜ Kliinikumis läbiviidud genotüpiseerimise tulemustega. Antud töö raames genotüpiseeritud indiviididel *AZF* piirkonna täielikke deletsioone ei esinenud. 'Eesti noorte meeste' kontrollgrupis ühel indiviidil leiti *AZFa* osaline deletsioon. Sellel indiviidil oli puudu multipleks-PCR II kuuluv sY84 STS fragment, kuid antud metoodikat kasutades pole võimalik öelda kui suur ala deleteerunud on ning kas piirkonnas asuvad kandidaatgeenid *DBY* ja *USP9Y* on sellesse hõlmatud.

*AZFc* piirkonna osalise gr/gr deletsiooni leidis viljakusprobleemidega patsientidest 2,8%-l (Tabel 10), kuid krüptozoospermia patsientidest 6,8%-l ning esines statistiliselt oluline erinevus gr/gr deletsioonide sageduses patsientide ning kontrollide vahel (2,8% versus 1,2%), mis viitab Eesti populatsioonis gr/gr deletsiooni ja spermatogeneesi häirete vahelisele seosele. Statistiliselt oluliseks osutus ka gr/gr deletsioonide sageduse võrdlus krüptozoospermia patsientide ning mõlema kontrollgrupi (6,8% versus 1,2% ja 1,4%) vahel, mis viitab gr/gr deletsiooni ja krüptorhismi vahelisele seosele. Ka Bansal et al., 2016 töö põhjal on seostatud gr/gr deletsiooni spermatogeneesi häiretega Kaukaasia (Euroopa) populatsioonides, kuid mitte Mongoolia (Hiina, Jaapan ja Korea) ega segunenud populatsioonides (Ameerika) ning olulisemalt kõrgemat deletsiooni sagedust krüptozoospermia patsientidel pole varem kirjeldatud (näiteks: Giachini et al., 2007; Kunej et al., 2003).

Kasutatud Eesti kontrollgruppides oli gr/gr deletsiooni sagedus keskmiselt 1,2%, mis on märgatavalt madalam kui Rozen et al., 2012 artikli põhjal näiteks Vietnamis (15%), Tuneesias (7,1%), Indias (6,7%), Poolas (2,5%) ning Ameerikas (2,1%). Selle põhjuseks võib olla see, et umbkaudu kolmandik Eesti meestest kannab Y-kromosoomi haplogrupiga N, kus b2/b3 on fikseerunud (Ilumäe et al., 2016; Repping et al., 2004; Rootsi et al., 2007; Zhang et al., 2007). Sellises Y-kromosoomis ei saa tekkida gr/gr deletsiooni, kuna *AZFc* piirkonna struktuur on muutunud.

Töö tulemuste põhjal on *AZFc* osalistest mikrodeletsioonidest Eesti meeste seas sagedaseim b2/b3 deletsioon, esinedes 32,7%-l patsientidest ning 31,9%-l kontrollidest (Tabel 10). Deletsioon on Eestis kõrge sagedusega, kuna ligikaudu 30% Eesti meestest kannavad fikseerunud b2/b3 deletsiooniga N haplogruppi (Ilumäe et al., 2016; Repping et al., 2004; Rootsi et al., 2007; Zhang et al., 2007). Ainus statistiliselt oluline b2/b3 sageduste erinevus esines 'Eesti noorte meeste' (28,0%) ja 'Rasedate naiste meeste' (37,7%) uuringugruppide vahel. Kuna Y-kromosoomi haplogruppide jaotus on väga tundlik geneetilisele triivile, siis suure tõenäosusega viitab leitud erinevus rahvusgruppide osakaalude erinevusele kasutatud valimites. 'Eesti noorte meeste' seas on tulenevalt valimi korjamise strateegiast vene juurtega mehi ilmselt rohkem kui 'Rasedate naiste meeste' hulgas, ning nende Y-kromosoomi haplogruppide jaotuvus on seetõttu tõenäoliselt erinev (Balanovsky et al., 2008), muutes seega ka b2/b3 deletsiooni esinemise sagedust. Kahjuks pole rahvuse info hetkel kõigi töös kasutatud indiviidide jaoks kättesaadav ja seetõttu pole seda võimalik arvesse võtta.

Minu töö tulemustest lähtuvalt ei näi b2/b3 deletsioon mõjutavat Eesti meeste viljakust. Varasemalt on b2/b3 deletsiooni on seostatud spermatogeneesi häiretega idaaasialastel (Hiina, Jaapan, Korea, Malaisia ja lähedased piirkonnad) ning aafriklastel (Tuneesia ja Maroko), kuid mitte kaukaaslastel (Põhja-India), eurooplastel ega lõunaasialastel (India ja Sri Lanka)(Bansal et al., 2016). Balti riikide populatsioonide kohta on ka varem raporteeritud, et b2/b3 deletsioon ei mõjuta paljunemisvõimet (Repping et al., 2004). Ka Rozen et al., 2012 poolt teostatud 20 000 indiviidil põhinevas uuringus ei leitud seost b2/b3 deletsiooni ning spermatogeneesi häirete vahel. B2/b3 deletsiooni sagedus erinevates populatsioonides on järgmine: Vietnamis (0,93%), Poolas (2,2%), Ameerikas (0,8%), Tuneesias (0,52%) ning Indias (0,5%)(Rozen et al., 2012). Bansal et al., 2016 avaldatud andmete põhjal on b2/b3 deletsiooni sagedus Ida-Aasias (Hiina, Jaapan, Korea, Malaisia ja lähedased piirkonnad)(4,83%), Lõuna-Aasias (India ja Sri Lanka)(1,48%), Aafrikas (1,39%) ning Euroopas (0,55%).

Seega saab antud töö tulemuste põhjal öelda, et gr/gr deletsioon on spermatogeneesi häirete riskifaktoriks ka Eestis, kuid Eesti mehed on selle eest kaitstud tänu b2/b3 deletsiooni kõrgele sagedusele.

Lisaks sagedasematele (b2/b3, gr/gr ja b1/b3) *AZFc* piirkonna osalistele deletsioonidele esines ka mõni haruldasem deletsiooni variant. Mõlemas kontrollgrupis ('Rasedate naiste mehed' ja 'Eesti noored mehed') oli ühel indiviidil puudu sY1206 STS marker, mis paikneb Y-kromosoomil kahes positsioonis. Selle markeri puudumine viitab kogu

nende kahe positsiooni vahelise ala deletsioonile (Joonis 4). Selle markeri vahelisel alal asub 2 koopiat *DAZ* ning 2 koopiat *BPY2* geeni, mis võivad olla deleteerunud.

Ka azoospermia patsientide seas leidis üks indiviid haruldase *AZFc* piirkonna osalise mikrodeletsiooniga. Sellel indiviidil olid puudu sY1201 ning sY1291 STS marker, mis viitab keerulisemale genoomsele ümberkorraldusele. Kuna need STS markerid ei asu Y-kromosoomi referentsjärjestusel füüsiliselt kõrvuti ning sY1206 STS marker on alles, võib tegemist olla kas kahe erineva deletsiooniga või Y-kromosoomi alade vahel toimunud inversiooniga (Joonis 4). Inversioon seletaks kahe markeri kõrvuti paiknemist ning nende vahele jääva ala deleteerumist ning sY1206 STS markeri olemasolu. sY1201 ja sY1291 STS markeri vahele jäävad geenid on 2 koopiat *DAZ*, 2 koopiat *BPY2* ning 2 koopiat *CDY*. Leitud haruldasemate deletsioonide ulatuse ning geenide sisalduse määramiseks oleks vaja teha lisa analüüse, näiteks genotüüpiseerida tihedamalt paiknevaid STS markereid.

Edasise töö käigus on plaanis krüptozoospermia patsientide arvu suurendada 300 indiviidi võrra, et kinnitada leitud gr/gr deletsiooni sageduse seos krüptorhismiga. Lisaks on kavas teha põhjalikumad statistilised analüüsid uurimaks *AZFc* osaliste deletsioonide võimalikke seoseid erinevate sperma parameetritega (bitestikulaarne maht, munandimaht, spermide koguarv, spermatoosoidide kontsentratsioon jm) ning võtta analüüsis arvesse erinevad lisafaktorid (vanus, suitsetamine ning BMI).



## KOKKUVÕTE

Käesolevas uurimistöös anti ülevaade peamistest meeste viljatuste põhjustest. Suuremat tähelepanu pöörati geneetilistele faktoritele, eriti Y-kromosoomi *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* täielikele ning *AZFc* osalistele mikrodeletsioonidele, mida on kirjeldatud kui ühte peamist praeguseks teadaolevat viljatuse geneetilist põhjust (Yu et al., 2015). Kirjeldati *AZF* piirkondades asuvaid genee ning nende mõju viljakusele. Töö eesmärgiks oli uurida *AZF* regioonide mikrodeletsioonide võimalikku seost spermatogeneesi häiretega Eesti meestel.

Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli juurutada ning valideerida meie oludes kolm multipleks-PCR-i protokoll (Krausz et al., 2014; Lin et al., 2006) ning kasutada neid Eesti idiopaatiliste viljakusprobleemidega patsientide ning kahe kontrollgrupi genotüpiseerimiseks *AZF* täielike ning *AZFc* osaliste mikrodeletsioonide suhtes. Deletsioonide sageduste võrdlemisel kasutati Fisheri täpset testi ning arvutati patsientide ja kontrollide deletsioonide esinemise vaheline šansside suhe (*odds ratio*), et teha kindlaks tulemuste statistiline olulisus.

Töö tulemusel leiti patsientide ning kontrollide vahel statistiliselt oluline erinevus gr/gr deletsiooni sageduses, näidates seost spermatogeneesi häiretega Eesti populatsioonis. Võrreldes paljude teiste populatsioonidega on Eesti meestel gr/gr deletsiooni esinemissagedus madalam, viidates kõrge sagedusega b2/b3 deletsiooni potentsiaalselt kaitsvale efektile, kuna neil juba muutunud Y-kromosoomi struktuuri tõttu gr/gr deletsiooni tekkida ei saa. Statistiliselt oluliselt kõrgem sagedus esines krüptozoospermia patsientidel, mis viitab gr/gr deletsiooni potentsiaalselt olulisemale rollile selles patsientide grupis. Lisaks näitasid tulemused b2/b3 deletsiooni suurt levikut Eesti populatsioonis, kuid Eesti meestel see deletsioon ei näi spermatogeneesi mõjutavat. Tegemist on sagedase deletsiooniga, kuna ligikaudu 30% Eesti populatsioonist kannab Y-kromosoomi haplogruppi N, milles on fikseerunud b2/b3 deletsioon (Zhang et al., 2007).

*AZF* mikrodeletsioonide genotüpiseerimist saab kasutada kliinilises laboris viljakusprobleemidega patsientide viljatuse põhjuste määramisel.

# **The frequency of Y-chromosomal microdeletions and their association to fertility problems in Estonian men**

**Laura Kibena**

## **SUMMARY**

Infertility is defined as inability to conceive a child during a 12-month period. Approximately 15% of couples around the world are affected by infertility problems, with male causes in roughly half of the cases (Agarwal et al., 2015; Venkatesh et al., 2014).

Genetic factors play a major role in male infertility and especially important are genetic changes in the Y chromosome. The main genetic causes of infertility are chromosomal anomalies and microdeletions in the Y-chromosome (Poongothai et al., 2009). Microdeletions of the *AZF* regions of the Y-chromosome are recognized as the most frequent structural chromosomal abnormalities. Most of the essential genes for spermatogenesis are located in a specific region known as the azoospermia factor region (*AZF*) in the long arm of the human Y-chromosome (Yu et al., 2015).

This study aimed to address the possible relation between Y-chromosomal *AZF* microdeletions and fertility problems in Estonian men. In this study three multiplex-PCR protocols were used to genotype idiopathic Estonian patients with spermatogenic impairment and two control groups (partners of pregnant women and young Estonian men) for *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* complete (Krausz et al., 2014) and *AZFc* partial microdeletions (Lin et al., 2006).

This study found that gr/gr deletions have a significantly higher frequency among patients with spermatogenic impairment compared to controls, thus having a potential role in spermatogenic failure. The frequency of gr/gr deletions in Estonian men is lower compared to many other populations, potentially due to the high frequency of the b2/b3 deletion that makes the rise of the gr/gr impossible. In addition, association was found between the gr/gr deletion and cryotorhidism, which has not been previously reported (Giachini et al., 2007; Kunej et al., 2003). The current study did not find any association between b2/b3 deletion and spermatogenic impairment in Estonian men, unlike some studies involving other populations (Bansal et al., 2016; Eloualid et al., 2012). Due to the high frequency of Y-chromosomal haplogroup N in Estonian men where the b2/b3 deletion is fixed, approximately 30% of males carry the deletion among both the patients and controls used in this study.

Analysis of genetic factors that affect male infertility give valuable knowledge about the creation of treatments for patients and a determination of idiopathic infertility causes (O'Flynn O'Brien et al., 2010).

## KASUTATUD KIRJANDUS

Abdel-Razic, M.M., Abdel-Hamid, I.A., and ElSobky, E.S. (2012). Nonmosaic 47,XYY syndrome presenting with male infertility: case series. *Andrologia* 44, 200–204.

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

Balanovsky, O., Roots, S., Pshenichnov, A., Kivisild, T., Churnosov, M., Evseeva, I., Pocheshkhova, E., Boldyreva, M., Yankovsky, N., and Balanovska, E. (2008). Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 236–250.

Bansal, S.K., Jaiswal, D., Gupta, N., Singh, K., Dada, R., Sankhwar, S.N., Gupta, G., and Rajender, S. (2016). Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci. Rep.* 6, 19798.

Bansal, S.K., Gupta, G., and Rajender, S. (2016). Y chromosome b2/b3 deletions and male infertility: A comprehensive meta-analysis, trial sequential analysis and systematic review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 768, 78–90.

Bhatt, R.V. (2000). Environmental influence on reproductive health. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 70, 69–75.

Dai, R.-L., Sun, L.-K., Yang, X., Li, L.-L., Zhu, H.-B., and Liu, R.-Z. (2012). Expansion and *De Novo* Occurrence of Y Chromosome Microdeletions Occurring via Natural Vertical Transmission in Northeastern China. *J. Int. Med. Res.* 40, 1182–1191.

Dong, Y., Du, R.-C., Jiang, Y.-T., Wu, J., Li, L.-L., and Liu, R.-Z. (2012). Impact of Chromosomal Translocations on Male Infertility, Semen Quality, Testicular Volume and Reproductive Hormone Levels. *J. Int. Med. Res.* 40, 2274–2283.

Edwards, R.G., and Bishop, C.E. (1997). On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 549–554.

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

El-Dahtory, F., and Elsheikha, H.M. (2009). Male infertility related to an aberrant karyotype, 47,XYY: four case reports. *Cases J.* 2, 28.

Eloualid, A., Rhaissi, H., Reguig, A., Bounaceur, S., El Houate, B., Abidi, O., Charif, M., Louanjli, N., Chadli, E., and Barakat, A. (2012). Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One* 7, e34902.

Erenpreiss, J., Punab, M., Zilaitiene, B., Hlevicka, S., Zayakin, P., Matulevicius, V., Tomas Preiksa, R., and Jørgensen, N. (2017). Semen quality of young men from the general population in Baltic countries. *Hum. Reprod.* 1–7.

Fanen, P., Wohlhuter-Haddad, A., and Hinzpeter, A. (2014). Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *52*, 94–102.

Ferlin, A., Moro, E., Rossi, A., Dallapiccola, B., and Foresta, C. (2003). The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J. Med. Genet.* *40*, 18–24.

Ferlin, A., Arredi, B., and Foresta, C. (2006). Genetic causes of male infertility. *Reprod. Toxicol.* *22*, 133–141.

Foresta, C., Moro, E., and Ferlin, A. (2001). Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocr. Rev.* *22*, 226–239.

Fraietta, R., Zylberstejn, D.S., and Esteves, S.C. (2013). Hypogonadotropic Hypogonadism Revisited. *Clinics* *68*, 81–88.

Giachini, C., Nuti, F., Marinari, E., Forti, G., and Krausz, C. (2007). Partial AZFc deletions in infertile men with cryptorchidism. *Hum. Reprod.* *22*, 2398–2403.

Grigorova, M., Punab, M., Ausmees, K., and Laan, M. (2008). FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum. Reprod.* *23*, 2160–2166.

Grigorova, M., Punab, M., Poolamets, O., Kelgo, P., Ausmees, K., Korrovits, P., Vihljajev, V., and Laan, M. (2010). Increased Prevalance of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 100–108.

Groth, K.A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C.H., and Bojesen, A. (2013). Klinefelter Syndrome-A Clinical Update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 20–30.

Hammoud, A.O., Wilde, N., Gibson, M., Parks, A., Carrell, D.T., and Meikle, A.W. (2008). Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil. Steril.* *90*, 2222–2225.

Harton, G.L., and Tempest, H.G. (2012). Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J. Androl.* *14*, 32–39.

Illumäe, A.-M., Reidla, M., Chukhryaeva, M., Järve, M., Post, H., Karmin, M., Saag, L., Agdzhoyan, A., Kushniarevich, A., and Litvinov, S. (2016). Human Y Chromosome Haplogroup N: A Non-trivial Time-Resolved Phylogeography that Cuts across Language Families. *Am. J. Hum. Genet.* *99*, 163–173.

Jobling, M.A., and Tyler-Smith, C. (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 598–612.

Kamp, C., Hirschmann, P., Voss, H., Huellen, K., and Vogt, P.H. (2000). Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a

result of intrachromosomal recombination events. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2563–2572.

Kamp, C., Huellen, K., Fernandes, S., Sousa, M., Schlegel, P.N., Mielnik, A., Kleiman, S., Yavetz, H., Krause, W., and Küpker, W. (2001). High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 987–994.

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

Krausz, C., and Forti, G. 2000. Clinical Aspects of Male Infertility, p.1-21. In K. McElreavey (ed.), *The Genetic Basis of Male Infertility. Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol. 28., Springer Berlin Heidelberg, Germany.

Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., Tüttelmann, F., European Academy of Andrology, and European Molecular Genetics Quality Network (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2, 5–19.

Kunej, T., Zorn, B., and Peterlin, B. (2003). Y chromosome microdeletions in infertile men with cryptorchidism. *Fertil. Steril.* 79 Suppl 3, 1559–1565.

Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L.G., Minx, P.J., Cordum, H.S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Silber, S., Oates, R., and Rozen, S. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.* 29, 279–286.

Lardone, M.C., Parodi, D.A., Ebensperger, M., Peñaloza, P., Cornejo, V., Valdevenito, R., Pommer, R., and Castro, A. (2007). AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure. *Fertil. Steril.* 88, 1318–1326.

Lin, Y.-W., Hsu, C.-L., and Yen, P.H. (2006). A two-step protocol for the detection of rearrangements at the AZFc region on the human Y chromosome. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 347–351.

Mangs, A.H., and Morris, B.J. (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr. Genomics* 8, 129–136.

Navarro-Costa, P., Plancha, C.E., and Gonçalves, J. (2010). Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 936569.

Noordam, M.J., Westerveld, G.H., Hovingh, S.E., van Daalen, S.K.M., Korver, C.M., van der Veen, F., van Pelt, A.M.M., and Repping, S. (2011). Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2457–2463.

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

O'Shaughnessy, P.J. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 55–65.

Pajarinen, J.T., and Karhunen, P.J. (1994). Spermatogenic arrest and “Sertoli cell-only” syndrome--common alcohol-induced disorders of the human testis. *Int. J. Androl.* 17, 292–299.

Poongothai, J., Gopenath, T.S., and Manonayaki, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.* 50, 336–347.

Poznik, G.D., Xue, Y., Mendez, F.L., Willems, T.F., Massaia, A., Wilson Sayres, M.A., Ayub, Q., McCarthy, S.A., Narechania, A., and Kashin, S. (2016). Punctuated bursts in human male demography inferred from 1,244 worldwide Y-chromosome sequences. *Nat. Genet.* 48, 593–599.

Punab, M., Zilaitiene, B., Jorgensen, N., Horte, A., Matulevicius, V., Peetsalu, A., and Skakkebaek, N.E. (2002). Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int. J. Androl.* 25, 243–252.

Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., Korrovits, P., and Laan, M. (2016). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts STUDY QUESTION: What are the primary causes of severe male factor infertility? *Hum. Reprod.* 32, 18–31.

Ramlau-Hansen, C.H., Thulstrup, A.M., Aggerholm, A.S., Jensen, M.S., Toft, G., and Bonde, J.P. (2007). Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum. Reprod.* 22, 188–196.

Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., Van Der Veen, F., Oates, R.D., Page, D.C., and Rozen, S. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 906–922.

Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L., van Daalen, S.K.M., Korver, C.M., Pyntikova, T., Kuroda-Kawaguchi, T., de Vries, J.W.A., Oates, R.D., and Silber, S. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat. Genet.* 35, 247–251.

Repping, S., van Daalen, S.K.M., Korver, C.M., Brown, L.G., Marszalek, J.D., Gianotten, J., Oates, R.D., Silber, S., van der Veen, F., and Page, D.C. (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 83, 1046–1052.

Repping, S., van Daalen, S.K.M., Brown, L.G., Korver, C.M., Lange, J., Marszalek, J.D., Pyntikova, T., van der Veen, F., Skaletsky, H., and Page, D.C. (2006). High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat. Genet.* *38*, 463–467.

Rootsi, S., Zhivotovsky, L.A., Baldovič, M., Kayser, M., Kutuev, I.A., Khusainova, R., Bermisheva, M.A., Gubina, M., Fedorova, S.A., and Ilumäe, A.-M. (2007). A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* *15*, 204–211.

Rozen, S.G., Marszalek, J.D., Irenze, K., Skaletsky, H., Brown, L.G., Oates, R.D., Silber, S.J., Ardlie, K., and Page, D.C. (2012). AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 890–896.

Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Shayeb, A.G., Bonde, J.P., Jensen, T.K., Van Wely, M., Cao, J., Martini, A.C., and Eskandar, M. (2012). BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* *19*, 221–231.

Sharpe, R.M., and Skakkebaek, N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet.* *341*, 1392–1395.

Silber, S.J., Alagappan, R., Brown, L.G., and Page, D.C. (1998). Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum. Reprod.* *13*, 3332–3337.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jorgensen, N., Swan, S.H., and Sapra, K.J. (2015). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* *96*, 55–97.

Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., and Bieri, T. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* *423*, 825–837.

Stefanidis, K., Belitsos, P., Fotinos, A., Makris, N., Loutradis, D., and Antsaklis, A. (2011). Causes of infertility in men with Down syndrome. *Andrologia* *43*, 353–357.

Stouffs, K., Lissens, W., Tournaye, H., and Haentjens, P. (2011). What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* *17*, 197–209.

Suganthi, R., Vijesh, V.V., Vandana, N., and Fathima Ali Benazir, J. (2014). Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *Int. J. Fertil. Steril.* *7*, 253–266.

Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., Oates, R., and Page, D.C. (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet.* 23, 429-32.

Sutovsky P., and Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis, p. 1-30. In C.J.D. Jonge, and C.L.R. Barratt (ed.), *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*. Cambridge University Press, New York.

Zhang, F., Lu, C., Li, Z., Xie, P., Xia, Y., Zhu, X., Wu, B., Cai, X., Wang, X., and Qian, J. (2007). Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J. Med. Genet.* 44, 437–444.

The Y Chromosome Consortium (2002). A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 12, 339–348.

Tiepolo, L., and Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.* 34, 119–124.

Venkatesh, T., Suresh, P.S., and Tsutsumi, R. (2014). New insights into the genetic basis of infertility. *Appl. Clin. Genet.* 7, 235–243.

Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Köhn, F.M., Schill, W.B., Farah, S., Ramos, C., et al. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5, 933–943.

World Health Organization, D. of R.H. and R. 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn. Geneva: World Health Organization.

Yu, X.-W., Wei, Z.-T., Jiang, Y.-T., and Zhang, S.-L. (2015). Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 14634–14646.



## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

<http://www.proteinatlas.org/>

<https://genome.ucsc.edu/>

<https://graphpad.com/quickcales/contingency1.cfm>

<http://vassarstats.net/odds2x2.html>

## **LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS**

Mina Laura Kibena (sünnikuupäev: 06.05.1995)

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

„Y-kromosoomi mikrodeletsioonide sagedus ja võimalik seos viljakusprobleemidega Eesti meestel“, mille juhendaja on Pille Hallast,

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 31.12.2020 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 29. mai 2017