

709291

doi:10.25143/prom-rsu_2011-02_pd

RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE

Agrita Puzuka

**VĪRIEŠA REPRODUKTĪVĀS PATOLOĢIJAS
ĢENĒTISKO RISKĀ FAKTORU IZVĒRTĒJUMS
LATVIJAS POPULĀCIJĀ**

Promocijas darbs

(specialitāte – medicīniskā ģenētika)

Promocijas darba zinātniskie vadītāji:

RSU prof., Dr.h.biol. Astrīda Krūmiņa

LU prof., Dr.biol. Viesturs Baumanis

Rīga, 2011

0221007641

709291

RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE

Agrita Puzuka

VĪRIEŠA REPRODUKTĪVĀS PATOLOĢIJAS
ĢENĒTISKO RISKĀ FAKTORU IZVĒRTĒJUMS
LATVIJAS POPULĀCIJĀ

Promocijas darbs

(specialitāte – medicīniskā ģenētika)

Promocijas darba zinātniskie vadītāji:

RSU prof., Dr.h.biol. Astrīda Krūmiņa

LU prof., Dr.biol. Viesturs Baumanis

Rīga, 2011

0221007641

Anotācija

Neauglība ir aktuāla mūsdienu problēma. Šī problēma skar 10 – 15% pāru, un aptuveni puse no šiem gadījumiem ir saistīti ar vīrieša neauglību. Vīrieša neauglības ģenētiskie iemesli meklējami vīrišķā dzimuma normālu attīstību un spermatogēzes procesus nosakošajos gēnos, kas lokalizēti gan cilvēka Y hromosomā, gan autosomās.

Cilvēka Y hromosomā lokalizētie fertilitātes marķiergēni ļauj pētīt neauglīgu vīriešu Y hromosomas AZF (azoospermijas) reģionu mikrodelēcijas un to korelāciju ar vīriešu neauglību. Ieviešot spermatogēzes traucējumu molekulāri ģenētisko analīzes metodi, tika noteikts, ka Y hromosomas mikrodelēciju biežums vīriešiem ar idiopātisku neauglību ir 5% un AZF mikrodelēcijas novēro azoospermijas vai smagas oligozoospermijas gadījumā. Ir izstrādāts algoritms, kas var palīdzēt ārstiem atlasīt vīrieša neauglības gadījumus, kuros ir svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas.

Cilvēka Y hromosomai raksturīgos polimorfismus – bialēliskos marķierus un mikrosatelītus, veiksmīgi iespējams izmantot, lai noteiktu “neauglības haplogrupu” eksistenci. Pētot Y haplogrupu izplatību vīriešiem ar idiopātisku neauglību un kontroles grupu (latvieši trīs paaudzēs), atrastas statistiski ticamas atšķirības, kas liecina par noteiktu Y hromosomas variantu – “neauglības” haplogrupu iespējamību.

Ir zināma korelācija ar cilvēka 7. hromosomā lokalizētā gēna *CFTR* mutācijām un vīriešu neauglību. Analizējot Latvijas neauglīgo vīriešu un kontroles grupas paraugu gēna *CFTR* delF508, R117H mutācijas, kā arī 8. introna poli-T un poli-TG polimorfismus, netika atklāta statistiski nozīmīga šo mutāciju un polimorfismu saistība ar vīriešu neauglību, kas norāda, ka gēnam *CFTR* nav tiešas ietekmes uz spermatogēzes procesu.

Pētījuma ietvaros analizēto vīriešu neauglības ģenētiskā riska iemeslu apzināšana aizpilda līdz šim Latvijā neaplūkotu molekulārās ģenētikas aspektu un ir nozīmīga šo pacientu neauglības ģenētiskajai konsultēšanai.

Saīsinājumi

AZF	Y hromosomas rajons, kurā atrodas par spermatogēnēzi atbildīgi gēni, azoospermijas faktors
CBAVD	Iedzimts abpusējs sēklas vada trūkums (<i>Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens</i>)
CF	Cistiskā fibroze – smaga ģenētiska slimība
CFTR	Gēns, kas kodē cistiskās fibrozes transmembrānas regulatoro proteīnu (<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>)
CUAVD	Iedzimts vienpusējs sēklas vada trūkums (<i>Congenital Unilateral Absence of Vas Deferens</i>)
DAZ	Y hromosomas AZF rajonā lokalizēts gēns (<i>Deleted in Azoospermia</i>)
DYS	Y hromosomas mikrosatelītu apzīmējums (<i>DNA Y-chromosome Segment</i>)
EMQN	Eiropas molekulārās ģenētikas kvalitātes kontroles apvienība (<i>European Molecular Genetics Quality Network</i>)
FISH	Hromosomu analīzes metode – fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija (<i>Fluorescent In Situ Hybridisation</i>)
FSH	Folikulus stimulējošais hormons
HERV	Endogēnam retrovīrisam līdzīga sekvenca cilvēka genomā (<i>Human Endogenous Retroviral Sequence</i>)
Hg	Y hromosomas haplogrupa
HGP	Cilvēka genoma projekts (<i>Human Genome Project</i>)
ICSI	Intracitoplazmātiskā spermijas injekcija (<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>)
IVF	Mākslīgā apaugļošana (<i>In Vitro Fertilisation</i>)
LH	Lutenizējošais hormons
MSY	Vīriešiem specifisks Y hromosomas eihromatīna reģions (<i>Male Specific Y chromosome region</i>)
NR1	Y hromosomas rajons, kurā nenovēro rekombināciju (<i>Non Recombinant region of human Y chromosome</i>)
PAR	Y hromosomas galos izvietoti pseidoautosomālie rajoni, kas ir X-Y hromosomu homologie rajoni un var rekombinēties mejozes laikā.
PCR	Molekulārā analīzes metode – polimerāzes ķēdes reakcija (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRINS	Hromosomu analīzes metode – PCR un fluorescentām iezīmēm, kas atbilst noteiktiem hromosomu rajoniem (<i>Primed In Situ Labeling</i>)
RFLP	Molekulārā analīzes metode – restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma analīze
SCOS	Sertoli šūnu sindroms (<i>Sertoli Cell Only Syndrome</i>)
SNP	Viena nukleotīda polimorfisms (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SRY	Y hromosomas īsā plecā lokalizēts vīrišķo dzimumu nosakošs gēns (<i>Sex-determining Region Y</i>)
STR	Y hromosomas mikrosatelītu apzīmējums (<i>Short Tandem Repeats</i>)
STS	Y hromosomai specifiskas sekvences (<i>Sequence Target Sites</i>)
T	Testosterons
TESE	Spermatozoīdu ekstrakcija no sēkliniekiem (<i>Testicular Sperm Extraction</i>)
WHO	Pasaules Veselības organizācija (<i>World Health Organization</i>)
Yp	Y hromosomas garais plecs
Yq	Y hromosomas garais plecs

Definīcijas

Azoospermija	Pilnīgs spermatozoīdu trūkums ejakulātā
<i>CFTR</i> haplotips	<i>CFTR</i> gēna 8. introna polimorfisma variants, ko nosaka timīna (T) un timīna-guanīna (TG) dinukleotīdu atkārtojumu skaits
Homologā rekombinācija	Hromosomas ietvaros notiekoša rekombinācija (apmaiņa), ko nodrošina DNS nukleotīdu apmaiņa starp diviem līdzīgiem vai vienādiem DNS rajoniem
Idiopātiska neauglība	Neauglība, kuras iemesls nav zināms/nosakāms
Lokuss	Gēna vai gēnu saimes vieta hromosomā
Marķieris	Unikāla DNS secība ar zināmu lokalizācijas vietu hromosomā, ko izmanto, lai identificētu noteiktu DNS fragmentu
Mikrodelēcija	Delēcijas, kuru izmēri ir mazāki par 5-10Mb
Mikrosatelīts	Specifiskas, daudzkārt atkārtotas DNS nukleotīdu secības cilvēka genomā (STR jeb DYS)
Mutācija	Kvalitatīvas vai kvantitatīvas izmaiņas DNS molekulā, kas var izmainīt bioloģiskās funkcijas, populācijā satopamas retāk nekā 1%
Neauglība	Dzimumbriedumu sasniegušu divu pretēja dzimuma personu nespēja radīt bērnu gada laikā, dzīvojot regulāru dzimumdzīvi bez kontracepcijas
Neobstruktīva azoospermija	Spermatoģenēzes patoloģijas dēļ radusies azoospermija
Obstruktīva azoospermija	Vīriešu reproduktīvā trakta nosprostošanās dēļ radusies azoospermija
Polimorfisms	Izmaiņas DNS molekulā, kas populācijā sastopamas biežāk nekā 1% un kuras pretēji mutācijām neizraisa saslimšanu
Poli-T trakts	Gēna <i>CFTR</i> 8. introna timīna (T) atkārtojumu secība
Poli-TG trakts	Gēna <i>CFTR</i> 8. introna timīna-guanīna (TG) dinukleotīdu atkārtojumu secība
Smaga oligozoospermija	Samazināts spermatozoīdu skaits ejakulātā ($<5 \times 10^6$ /ml)
<i>Vas deferens</i>	Sēklas vads
Y hromosomas haplogrupa	Y hromosomas variants/līnija, ko nosaka viena nukleotīda polimorfisms (SNP)
Y hromosomas haplotips	Y hromosomas variants/līnija, ko nosaka daudzkārt atkārtotas secības – mikrosatelīti (STR jeb DYS)
Y hromosomas klasteris	Vairāku ģealoģiski radniecīgu Y haplogrupu kopums

Saturs

Anotācija.....	2
Saīsinājumi.....	3
Definīcijas.....	4
Satura rādītājs.....	5
Ievads.....	7
Darba hipotēze.....	8
Darba mērķis.....	8
Darba novitāte.....	9
Darba praktiskā nozīme.....	9
1. Literatūras apskats.....	11
1.1. Neauglības problēma.....	11
1.2. Vīriešu neauglības klīniskās formas.....	12
1.3. Vīriešu neauglības ģenētiskā riska faktori.....	13
1.3.1. Hromosomu aberācijas, kuras ir iemesls vīriešu neauglībai.....	14
1.3.2. Submikroskopiskās delēcijas, kuras ir iemesls vīriešu neauglībai.....	17
1.3.3. Gēnu mutācijas, kuras ir iemesls vīriešu neauglībai.....	18
1.3.3.1. Androgēnu receptora gēna lokuss.....	19
1.3.3.2. Gēnu <i>FSHR</i> un <i>LHR</i> lokuss.....	22
1.3.3.3. Gēna <i>KAL-1</i> lokuss.....	23
1.3.3.4. Vīriešu neauglības sindromi ar poligēnu iedzimšanas ainu.....	24
1.4. Y hromosomas raksturojums.....	29
1.4.1. Y hromosomas Yq11 lokusa raksturojums.....	33
1.5. Y hromosomas mikrodelēcijas un vīriešu neauglība.....	37
1.5.1. Y hromosomas mikrodelēciju kandidātģēni.....	38
1.5.2. Y hromosomas mikrodelēciju rašanās mehānisms.....	41
1.5.3. Y hromosomas mikrodelēciju biežums.....	43
1.5.4. Daļēja AZFc rajona delēcija un Y hromosomas polimorfisms....	44
1.6. Y hromosomas "neauglības" haplogrupas.....	47
1.7. Gēns <i>CFTR</i> un vīriešu neauglība.....	51
1.7.1. Gēna <i>CFTR</i> raksturojums un biežākās mutācijas.....	51
1.7.2. Cistiskā fibroze (CF) un iedzimts bilaterāls sēklas vada trūkums (<i>CAVD</i>).....	54
1.7.2.1. Gēna <i>CFTR</i> 8. introna poli-T polimorfisms.....	56
1.7.2.2. Gēna <i>CFTR</i> 8. introna poli-TG polimorfisms.....	59
1.7.3. Gēna <i>CFTR</i> mutācija R117H un vīriešu neauglība.....	60
1.7.4. Gēna <i>CFTR</i> mutācijas un citas vīriešu neauglības formas.....	61
1.8. Mākslīgā apaugļošana un vīriešu neauglības ģenētisko faktoru pārmantošanas risks pēcnācējos.....	63
2. Materiāli un metodes.....	66
2.1. Paraugi.....	66
2.1.1. DNS izdalīšana.....	67
2.2. Y hromosomas mikrodelēciju analīze.....	68
2.3. Y hromosomas haplogrupu analīze.....	70
2.4. Y hromosomas haplotipu analīze.....	73
2.5. Gēna <i>CFTR</i> mutācijas delF508 noteikšana.....	74
2.6. Gēna <i>CFTR</i> mutācijas R117H noteikšana.....	75
2.7. Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfismu analīze.....	76

2.8.	Gēla elektroforēze.....	78
2.9.	DNS sekvenēšana.....	79
2.10.	Datu statistiskā apstrāde.....	81
3.	Rezultāti.....	82
3.1.	Y hromosomas mikrodelēcijas neauglīgiem vīriešiem.....	82
3.1.1.	Y hromosomas mikrodelēciju biežums dažādos pētījumos.....	86
3.2.	Y hromosomas haplogrupas un vīriešu neauglība.....	88
3.2.1.	Y hromosomas haplotipi neauglīgiem vīriešiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām.....	90
3.3.	Gēna <i>CFTR</i> molekulārā izpēte.....	94
3.3.1.	Gēna <i>CFTR</i> mutāciju delF508 un R117H analīze.....	94
3.3.2.	Gēna <i>CFTR</i> 8. introna poli-T un poli-GT polimorfisma analīze..	95
3.2.2.1.	Gēna <i>CFTR</i> 8. introna poli-T polimorfisms.....	95
3.2.2.2.	Gēna <i>CFTR</i> 8. introna poli-TG polimorfisms.....	98
3.2.2.3.	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG trakta haplotips – T/TG.....	103
3.3.3.	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfismu analīze vīriešiem ar smagu neauglības formu.....	105
3.3.4.	Gēna <i>CFTR</i> 8. introna poli-T un poli-GT polimorfismu variācijas dažādos pētījumos.....	108
4.	Diskusija.....	112
4.1.	Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodes ieviešanas nepieciešamība Latvijā.....	112
4.1.1.	Ieteiktais algoritms Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas shēmā.....	113
4.1.1.1.	Y hromosomas mikrodelēciju analīze neauglības diagnozes precizēšanai un slimības etioloģijas noteikšanai.....	115
4.1.1.2.	Y hromosomas mikrodelēciju analīze azoospermijas pacientiem pirms sēklinieku biopsijas veikšanas.....	116
4.1.1.3.	Y hromosomas mikrodelēciju analīze un pāra ģenētiskā konsultēšana pirms tiek veikta mākslīgās apaugļošana.....	118
4.2.	Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājums.....	119
4.2.1.	Pilnu AZFa+b+c Y hromosomas delēciju noteikšanas metodes – citoģenētiskās pret molekulārajām.....	123
4.3.	Y hromosomas haplogrupas un to saistība ar vīriešu neauglību.....	126
5.	Secinājumi.....	133
6.	Izmantotā literatūra	134
	Pielikumi.....	145
	Y hromosomas haplogrupu filoģenētiskais koks.....	145
	EMQN novērtējums.....	146
	Publikācijas.....	150

Ievads

Neauglība ir aktuāla problēma mūsdienās. Šī problēma skar apmēram 10 – 15% pāru, un apmēram puse no šiem gadījumiem raksturojas ar vīrieša neauglību. Vairāk kā 60% gadījumu vīrieša reproduktīvo funkciju traucējumu iemesls nav zināms, t.i., nav atklājams ar klīniskiem izmeklējumiem. No zināmajiem, biežāk novērotajiem neauglības cēloņiem lielākā nozīme ir hormonālas dabas traucējumiem, kā arī citoģenētiskai patoloģijai. Šīs ģenētiskās izmaiņas galvenokārt meklējamas normālu vīrišķā dzimuma attīstību un spermatogēnēzes procesus nosakošajos gēnos, kas lokalizēti gan cilvēka Y hromosomā, gan autosomās.

Cilvēka Y hromosomas garā pleca eihromatiskajā rajonā atrodas AZF (azoospermijas faktors) lokuss, kurā lokalizēti gēni, kas atbild par normālu spermatogēnēzes norisi, līdz ar to par vīrieša auglību. AZF reģions sastāv no trim rajoniem AZFa, AZFb un AZFc. Šie rajoni satur gēnus, no kuru ekspresijas ir atkarīga vīrieša fertilitāte. Ir zināms, ka neauglīgiem vīriešiem, kuriem klīniski diagnosticēta ar spermas kvantitāti vai kvalitāti saistīta patoloģija, Y hromosomas AZF rajonos ir atklātas mikrodelēcijas. Turklāt no tā, kurā AZF rajonā ir lokalizētas šīs mikrodelēcijas, ir atkarīga neauglības smaguma pakāpe. Mikrodelēcijas AZFa rajonā aptur spermatogēnēzes procesu tā sākumstadijā; izlocītajos sēklas kanāliņos neatrod vīrišķās germinatīvās šūnas. Savukārt mikrodelēcijas AZFb rajonā apstādina spermatogēnēzes procesu pirms germinatīvo šūnu meiotiskās dalīšanās, bet dažādi samazināta spermatozoīdu skaita un defektīvas morfoloģijas varianti ir AZFc rajona mikrodelēciju sekas. Latvijā Y mikrodelēciju analīze līdz šim nebija veikta.

Uzskata, ka vīriešu neauglību izraisīšie ģenētiskie faktori korelē ar kādiem noteiktiem Y hromosomai raksturīgiem neitrāliem polimorfismiem vai mikrosatelītu variantiem. Par pamatu izmantojot Latvijas populāciju raksturojošos Y hromosomas haplogrupu un mikrosatelītu datus, ir iespējams noskaidrot, vai saglabājas tādi pat varianti ar līdzīgu frekvenci arī analizējot neauglīgu vīriešu DNS paraugus.

Tā kā ir zināms, ka vīriešiem ar idiopātisku neauglību Y hromosomas mikrodelēcijas atrod ~ 10% gadījumu, tad jādomā arī par citu ģenētiska rakstura mehānismu esamību, kuriem ir būtiska nozīme vīriešu neauglības attīstībā. Viens no tādiem faktoriem ir mutācijas un polimorfismi cistiskās fibrozes izcelsmē iesaistītajā gēnā *CFTR*. Smaga šī gēna kodētā proteīna nepietiekamība vīriešiem izpaužas kā *vas*

deferens trūkums (*Congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD*) un obstruktīva azoospermija. Biežākās mutācijas gēnā *CFTR*, kas korelē ar vīriešu neauglību, ir delF508 un R117H, kā arī poli-T un poli-TG trakta 5T/12TG alēles klātbūtne gēna *CFTR* 8. intronā.

Darba hipotēze

1. Cilvēka Y hromosomā lokalizētie fertilitātes marķiergēni ļauj pētīt vīriešu Y hromosomas AZF reģionā lokalizētās mikrodēlēcijas un to korelāciju ar vīriešu neauglību.
2. Cilvēka Y hromosomai raksturīgos polimorfismus – bialēliskos marķierus un mikrosatelītus, veiksmīgi iespējams izmantot, lai noteiktu “neauglības haplogrupu” eksistenci Latvijas populācijā.
3. Nosakot cilvēka 7. hromosomā lokalizētā gēna *CFTR* mutācijas un polimorfismus iespējams spriest par šo mutāciju un polimorfismu saistību ar vīriešu neauglību.

Darba mērķis:

Veikt idiopātiskas vīriešu neauglības molekulāri ģenētisko izpēti Latvijā.

Darba uzdevumi:

1. Atlasītu pacientu grupai ar idiopātiskiem spermatogēnēzes traucējumiem noteikt Y hromosomas garā pleca AZFa, AZFb un AZFc rajonu mikrodēlēcijas.
2. Veikt eksistējošo Y hromosomas mikrodēlēciju analīzes metožu salīdzinājumu, lai izvērtētu to piemērotību ātrai un precīzai Y hromosomas mikrodēlēciju noteikšanai molekulārās ģenētikas laboratorijā.
3. Izstrādāt algoritmu, kas ļautu ārstiem-andrologiem atlasīt pacientus, kam svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodēlēcijas.
4. Aprobēt un ieviest Latvijā ērtu un efektīvu Y hromosomas mikrodēlēciju analīzes metodi kā vīriešu neauglības molekulārās diagnostikas veidu.
5. Vīriešiem ar idiopātisku neauglību noteikt Y hromosomas neitrālo polimorfismu variantus – Y haplogrupas un haplotipus, kā arī izvērtēt saistību starp noteiktām Y hromosomas haplogrupām un spermatogēnēzes traucējumiem.

6. Veikt Y hromosomas mikrodēlēciju analīzi vīrišķā dzimuma cistiskās fibrozes slimniekiem ar zināmiem gēna *CFTR* mutāciju variantiem.
7. Neauglīgiem vīriešiem analizēt gēna *CFTR* mutāciju delF508 un mutāciju R117H, kā arī noteikt 8. introna poli-T un poli-GT polimorfismus.
8. Veikt gēna *CFTR* 8. introna poli-T un poli-GT polimorfismu salīdzinājumu neauglīgiem vīriešiem un kontroles grupas vīriešiem.

Darba zinātniskā novitāte

Darba novitāte ir līdz šim Latvijā nenoskaidroto vīriešu neauglības molekulāri ģenētisko faktoru izpēte. Noskaidrots, ka vīriešiem ar azoospermiju un smagu oligozoospermiju Y hromosomas mikrodēlēciju biežums ir 5%, kas atbilst šo mikrodēlēciju frekvencei citās Eiropas valstīs. Noteikta Y hromosomas variantu – Y haplogrupu korelācija ar spermatoģenēzes traucējumiem. Apzināti gēna *CFTR* divu mutāciju (delF508 un R117H) un poli-T/poli-TG polimorfismu varianti vīriešiem ar idiopātisku neauglību. Pirmoreiz Latvijā parādīta neauglības molekulāri ģenētiskās izpētes nozīme vīriešu reproduktīvās patoloģijas diagnostikā, neauglības ģenētisko faktoru asociācijas pētījumos un ģenētiskajā konsultēšanā.

Darba praktiskā nozīme

Darba ietvaros izstrādāta un ieviesta ērta un efektīva spermatoģenēzes traucējumu molekulārā analīzes metode, ar kuras palīdzību Latvijā iespējams diagnosticēt Y hromosomas mikrodēlēcijas. Izveidots algoritms, kas varētu palīdzēt ārstiem atlasīt vīriešu neauglības gadījumus, kuros ir svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodēlēcijas. Ieteikts veikt molekulāri ģenētisko analīzi visiem idiopātiskās neauglības gadījumiem, kad hormonu līmenis un kariotips ir normāls, bet spermatozoīdu skaits ir $<5 \times 10^6/\text{mL}$. Mikrodēlēciju analīze vīriešiem ar vieglākām neauglības formām nav rekomendējama, jo Y hromosomas mikrodēlēciju biežums šajā grupā ir ļoti zems. Y hromosomas mikrodēlēciju analīze ļauj precizēt neauglības diagnozi, atklāt slimības etioloģiju, bez tam tā ir informatīva neauglības ģenētiskajā konsultēšanā, it īpaši pirms mākslīgās apaugļošanas veikšanas.

Darba izstrādes vieta, laiks un finansējums

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā un Latvijas Valsts Biomedicīnas pētījumu centrā laika posmā no 2005 līdz 2010 gadam.

Promocijas darbs izstrādāts LZP granta Nr. 04.1198 „Y hromosomas molekulārā polimorfisma pētījumi vīriešu reproduktīvās patoloģijas un populācijas raksturojumam”, LZP sadarbības projekta Nr. 05.0023 „Latvijas populācijas molekulāri ģenētiskais raksturojums” un LZP sadarbības projekta Nr. 10.0010 “Slimību etioloģijas, patogēneses un cilvēka novecošanās procesu ģenētiskā izpēte Latvijas populācijā” ietvaros.

Dārbs tapis ar ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu.

1. Literatūras apskats

1.1. Neauglības problēma

Neauglība ir pasaulē izplatīta sociāla un medicīniska problēma, kas skar aptuveni 15% pāru (Oehninger et al., 2001). Neauglība tiek definēta kā slimība, ja pie regulārām dzimumattiecībām, partneriem nelietojot kontraceptīvos līdzekļus, grūtniecība neiestājas gada laikā. Dati, kas pieejami par pēdējiem 20 gadiem, parāda, ka aptuveni 30% gadījumu neauglība ir vīrieša veselības stāvokļa dēļ, bet 20% gadījumu neauglības iemesls meklējams abos partneros.

Vīrieša neauglība ir bieži sastopama un smaga veselības problēma. Neauglības problēma skar ne tikai vīrieša spēju kļūt par bērna bioloģisko tēvu, bet tai piemīt arī emocionāls, psiholoģisks un sociāls raksturs. Diemžēl, neskatoties uz šīs veselības problēmas biežo sastopamību Eiropā un pasaulē un tās vispārējo nozīmi, tai nav pievērsta pietiekami liela uzmanība.

Aptuveni 7% vīriešu cieš no neauglības, un, iespējams, šim skaitlim ir tendence pieaugt. Vīriešu neauglībai var būt daudz un dažādi iemesli. Nozīmīgākie no tiem ir anatomiskie defekti, endokrinopātijas, imunoloģiskas problēmas, ejakulācijas traucējumi un dažādi ārējās vides faktori. 40% gadījumu neauglības cēlonis nav zināms, tādēļ tiek lietots apzīmējums "idiopātiskā neauglība". Daļējs skaidrojums tam, ka bieži neauglības iemesls nav zināms, varētu būt vēl joprojām nepilnīgā izpratne par mehānismiem, kas nodrošina vīrieša auglības molekulāri ģenētisko pamatu (Vogt et al., 2004). Lai izprastu neauglības problēmas ģenētisko dabu, nenoliedzami ir jāizzina tie gēni, kas ir iesaistīti spermatoģenēzes procesos, spermatozoīdu nobriešanā un normālā spermatozoīdu funkcionēšanā, kā arī ir nepieciešams pievērst uzmanību arī jaunu tehnoloģiju ieviešanai neauglības klīniskās diagnostikas un terapijas praksē.

Pēdējo 20 gadu laikā ir panākti ievērojami sasniegumi vīriešu neauglības ārstēšanā. Viens no pirmajiem panākumiem šajā jomā bija intracitoplazmatiskas spermas injekcijas (*intracytoplasmatic sperm injection, ICSI*) metodes izveide un ar to saistītā mākslīgās apaugļošanas (*in vitro fertilisation*) ieviešana klīniskā praksē. Ar šo

tehnoloģiju palīdzību ir palīdzēts tūkstošiem neauglīgu vīriešu kļūt par savu bērnu bioloģiskajiem tēviem. Savukārt mākslīgās apaugļošanas pozitīvam aspektam līdztekus aktualizējies jautājums par ģenētisko defektu pārmantošanu pēcnācējiem, kas no bioloģiskā (dabiskās izlases) viedokļa līdz šim tika ierobežots, neļaujot šos defektus pārnest dabīgā ceļā. Lai arī kādai daļai vīriešu intracitoplazmatiskas spermas injekcijas metode un mākslīgā apaugļošana ir spējusi palīdzēt neauglības gadījumā, vīriešu neauglības zinātniskie pētījumi nav apstājušies, jo diemžēl vēl ir daudz tādu gadījumu, kuru neauglības ģenētiskais pamats ir daudz komplicētāks, lai to būtu iespējams atrisināt ar šo tehnoloģiju palīdzību.

1.2. Vīriešu neauglības klīniskās formas

Vīriešu neauglību var iedalīt vairākās grupās un klasificēt pēc dažādiem kritērijiem. Tā kā šī darba mērķis ir parādīt ģenētiskā riska faktoru izvērtējumu vīriešu neauglības gadījumā, tad, pirms iedziļināties šajā jautājumā, nepieciešams veltīt uzmanību vīrieša neauglības klīnisko aspektu īsam raksturojumam. Lai labāk parādītu vīrieša neauglības klīniskās formas, tiks izmantota klasifikācija (1.1. tabula) pēc tā, vai ar ārstniecības metožu palīdzību iespējams panākt dabisku apaugļošanu (Baker, 2008).

1.1. tabula. Vīrieša neauglības klasifikācija pēc tā, vai ar ārstēšanas palīdzību iespējams panākt dabisku apaugļošanu

Neauglības veids	Biežums
Neārstējama neauglība	12%
<ul style="list-style-type: none"> • Primārs izlocīto sēklas kanālu trūkums 	12%
Ārstējamas formas	18%
<ul style="list-style-type: none"> • Antispermijas antivielas • Obstruktīva azoospermija • Gonadotropīna deficīts • Seksuālo funkcijas slimības • Toksīni 	7% 10% 0,5% 0,5% 0,02%
Neārstējama sub-neauglība (subfertility)	70%
<ul style="list-style-type: none"> • Oligozoospermija • Astenospermija un teratozoospermija • Normospermija ar funkcionāliem defektiem 	35% 30% 5%

Savukārt pēc spermatogrammas (spermas analīze) datiem, vīriešu neauglības klīniskās formas iespējams klasificēt, pamatojoties uz spermatozoīdu morfoloģiskajām īpatnībām (WHO 1999), kas apkopotas 1.2. tabulā.

1.2. tabula. Vīrieša neauglības klasifikācija pēc spermatogrammas datiem

Neauglības veids	Apraksts
Normospermija	20x10 ⁶ spermatozoīdu /ml vai vairāk; 50% vai vairāk spermatozoīdu, kas kustas uz priekšu, vai 25% vai vairāk spermatozoīdu, kas kustas ātri; 30% vai vairāk normāla morfoloģija.
Oligozoospermija	Spermatozoīdu koncentrācija < 20x10 ⁶ /ml.
Astenospermija	< 50% spermatozoīdi, kas kustas uz priekšu, vai < 25% spermatozoīdu, kas kustas ātri.
Teratozoospermija	< 30% spermatozoīdu ar normālu morfoloģiju.
Oligoastenoteratozoospermija	Samazināts spermatozoīdu daudzums, kustības traucējumi un morfoloģijas defekti (izmaiņas trijos kritērijos)
Azoospermija	Ejakulātā neatrod spermatozoīdus
Aspermija	Nav ejakulāta

1.3. Vīriešu neauglības ģenētiskā riska faktori

Šobrīd ir attīstītas daudzas jaunas metodes ģenētisko slimību noteikšanai, un nenoliedzami liela nozīme vīriešu neauglības ģenētikas izpratnē ir „Cilvēka genoma projektam” (*Human Genome Project, HGP*). Tāpat kā visās molekulārās bioloģijas nozarēs, arī neauglības ģenētikā neatbildētos jautājumus par iespējamo kandidātģēnu funkcijām un to etioloģiju konkrēto slimību gadījumos cerēja atrisināt līdz ar cilvēka genoma sekvences noskaidrošanu. Pēc *HGP* datiem ir zināms, ka cilvēka genomu veido 20 000 – 25 000 ģēnu. Analizējot pieejamos cilvēka sekvences datus un pētot iespējamo auglības ģēnu darbību dzīvnieku modeļos, tika noskaidrots, ka aptuveni 3000 ģēnu produktu mijiedarbojoties nodrošina vīrieša (un sievietes) auglības cikla ģenētisko kontroli (Hackstein et al., 2000; Cooke et al., 2002; Matzuk & Lamb, 2002). Tādējādi kļūst acīmredzams, ka vīrieša auglība nav atkarīga tikai no daudzo ģēnu ekspresijas dzimumšūnās, bet to ietekmē arī ģēnu grupas, kas, viena otru aktivējot, nodrošina vīrišķo

dzimumdziedzeru un vīrieša somatisko attīstību. Cilvēkiem auglības gēnu molekulārie pētījumi ir apgrūtināti, tāpēc, ka cilvēks nav eksperimentāla suga. Vīrieša neauglības statuss tiek atklāts tikai tad, kad pāris, kurš vēlas bērnu un nespēj to ieņemt, vērsas pēc padoma neauglības klīnikā. Diemžēl šo pāru klīniski ģenētiskā izmeklēšana var tikt izvērstā tikai tad, ja diagnoze ir "idiopātiska neauglība". Tādējādi šie gadījumi veido atsevišķu apakšgrupu, kas tomēr ir samērā liela – 40%. Līdz ar to ģenētiskos traucējumus, kuri ir vīriešu neauglības cēlonis, var iedalīt trijās grupās: (1) hromosomālās aneiploīdijas un pārkārtējumi, kuru rezultātā ir izmainīta noteiktās hromosomās lokalizētu gēnu ekspresija; (2) submikroskopiskas delēcijas (piemēram, mikrodelēcijas), kur vairāku tuvu lokalizētu gēnu delēciju vai pārkārtējumu rezultātā ir izmainīta normālā gēnu ekspresijas aina; (3) atsevišķu gēnu defekti, kur viena gēna ekspresija ir mainīta vai zaudēta, kā rezultātā ir attīstījusies vīrieša neauglība (Vogt, 2004)

1.3.1. Hromosomu aberācijas, kuras ir iemesls vīriešu neauglībai

Normālu cilvēka kariotipu veido 46 hromosomas, no kurām divas atbild par cilvēka dzimumu, attiecīgi sievietēm šīs divas dzimumhromosomas ir X hromosomas (46,XX), bet vīriešiem šo komplektu veido viena X un viena Y hromosoma (46,XY). Dažādas hromosomu struktūras pārmaiņas pieņemts apzīmēt ar terminu *hromosomu aberācijas*. Hromosomu aberācijas atklātas apmēram 14% azoospermijas un 5% oligozoospermijas pacientu (Van Assche et al., 1996). Lielākā daļa hromosomu anomāliju, kuras ir cēlonis vīrieša neauglībai, ir saistītas tieši ar dzimumhromosomām.

Biežākā dzimumhromosomu patoloģija vīriešiem ir Klainfeltera sindroms, kad vīriešu kariotipā ir viena papildus X hromosoma (47,XXY). Šī sindroma biežums starp vīriešiem ir 1 : 500 – 1 : 1000 (Huynh et al., 2002). Parasti Klainfeltera sindroma pacientiem ir azoospermija, vai arī to sēkliniekos atrodams neliels spermatozoīdu skaits (Tournaye et al., 1996). Līdz ar to literatūrā reti ir aprakstīti gadījumi, kad Klainfeltera sindroma pacienti dabiskā ceļā var kļūt par bioloģiskajiem bērna tēviem, (Foss & Lewis, 1971). Vēl joprojām nav zināms, kāpēc Klainfeltera pacienti ir neauglīgi un kāpēc apmēram 20% gadījumu personām ar Klainfeltera sindromu ir kariotips 46,XY/47,XXY (mozaikas forma). Tā kā šo pacientu grupā tiek novērots, ka pēcmejotisko dzimumšūnu

(nobriedušu spermatozoīdu) skaits ir samazināts, tad šo faktu mēģina izskaidrot ar iespējamiem traucējumiem mejozes sākuma etapos – dzimumhromosomu konjugācijas procesā, kur otrā X hromosoma konjugē (nostājas pāri) ar Y hromosomu. Savukārt dzīvnieku modeļpētījumos ar pelēm parādīts, ka traucējumi vīrišķajās dzimumšūnās notiek jau embrionālās attīstības laikā (Mroz et al., 1999).

Klainfeltera sindroma pacienti ar palielinātu X hromosomu skaitu kariotipā (48,XXX^Y; 49,XXXX^Y) sāk vairāk līdzināties sievišķajam fenotipam. Ir traucēta dzimumlocekļa attīstība, kā arī bieži novērojama ir sēklinieku nenoslīdēšana jeb kriptorhisms. Tas parāda X hromosomu skaita ietekmi uz vīrišķo gonādu attīstību, kā arī to, ka abu dzimumhromosomu (X un Y) līdzsvars ir izšķirošs agrīnā embrionālās attīstības procesā. Abās dzimumhromosomās lokalizēto un funkcionāli aktīvo gēnu atklāšana ir ļāvusi izprast dzimumhromosomu ģenētiskā līdzsvara molekulāro pamatu. Ir zināms, ka agrās embrionālās attīstības laikā, kad notiek X hromosomas inaktivācijas process, X hromosomā lokalizētie X un Y hromosomu homologie gēni netiek inaktivēti un tādēļ šo gēnu ekspresija Klainfeltera sindroma gadījumā ir pastiprināta. Ir arī zināms, ka mutācijas gēnā *UDT* atrastas sēklinieku audzēja (*testicular germ cell tumour, TGCT*) gadījumā. Savukārt šīs mutācijas novēro arī tiem pacientiem, kuriem bērnībā bijis kriptorhisms. Nesen atklāts, ka minētais gēns (gēns *UDT*) atrodas X hromosomā (Xq27). Līdz ar to Klainfeltera sindroma pacientiem, kuriem bērnībā bija konstatēta sēklinieku nenoslīdēšana, varētu būt palielināts risks šī audzēja attīstībai (Rapley et al., 2000).

Bieža dzimumhromosomu patoloģija ir vīrieši ar divām Y hromosomām kariotipā (biežums 1 : 750; kariotips 47,XYY). Šo vīriešu auglības statuss ir variabls. Ja XYY vīrietis ir neauglīgs, tad parasti novēro oligozoospermiju. Šo indivīdu neauglības hromosomālais iemesls ir palielināta Y bivalentu (45 – 75% no analizētiem gadījumiem) veidošanās spermatoģenēzes laikā (Berthelsen et al., 1981).

Vīrieši ar mozaīkas formas kariotipu 45,X/46,XY pārstāv 4% no neauglīgo vīriešu grupas. Šiem pacientiem novēro gonādu nepilnīgu vai traucētu attīstību, ārējie dzimumorgāni var būt normāli, taču bieži iespējamās tādas anomālijas kā mazs dzimumloceklis, hipospārijas (uretras atveres attīstības defekts), samazināts sēklinieku lielums. Indivīdi ar mozaīkformas kariotipa 45,X/46,XY variantu var būt arī ar sievišķo fenotipu, šādu gadījumu sastopamību var izskaidrot ar smalko līdzsvaru starp vīrišķā un

sievišķā dzimuma diferenciaciju agrās embrionālās attīstības sākumā. Veicot šo pacientu Y hromosomu krāsošanu ar fluorescentām krāsvielām (akrihīnu), tika noskaidrots, ka Y hromosomas lielums ir normāls, taču Y hromosomas garā pleca distālajā daļā trūkst viena no fluorescentām iezīmēm, kas parasti atbilst Yq12 rajonam. Šajās “nefluorescentajās” Y hromosomās tika atrasta pārrāvumu “karstā” vieta – Yq11 un noskaidrots, ka “nefluorescentā” hromosoma veidojusies, saplūstot divām Y hromosomām, kur abās pirms tam noticis pārrāvums Yq11 rajonā, līdz ar to izveidojot dicentrisku Y hromosomas īso plecu izohromosomu. Minēto hromosomālo pārkārtojumu rezultātā pacientiem ir traucēta gametogēnēze – tiek izjaukta meiotiskā X un Y hromosomas konjugācija, jo notiek Y izohromosomas īso plecu sapārošanās savā starpā (Chandley et al., 1989). Tā kā Y hromosoma ir pārrauta Yq11 kritiskajā punktā, tad šie pacienti pieder neauglīgo vīriešu grupai, kuriem raksturīga Y hromosomas garā pleca (Yq11) lokalizētā azoospermijas faktora (AZF) delēcija (aprakstīts tālākajās nodaļās).

Neauglīgi vīrieši ar azoospermijas variantu un 45,X kariotipu arī pieskaitāmi pacientu grupai AZF delēcijām. Tiem ir nelīdzsvarots kariotips, jo ir notikusi Y hromosomas garā pleca (Yq11) delēcija, un otra Y hromosomas īsā pleca daļa, kas satur gēna *SRY* lokusu, ir translocēta uz kādu no autosomām (biežāk uz 13, 15 vai 22 hromosomu). Šāda veida translokācijas var dažādi ietekmēt vīrieša auglību, jo vīrieši ar vienu un to pašu translokācijas formas kariotipu var būt gan auglīgi, gan neauglīgi, un šādas atšķirības var novērot pat vienas ģimenes locekļiem. Biežāk ģimenes ciltskokos vīriešu kariotipā novēro Y hromosomas garā pleca distālās daļas (Yq12) translokāciju uz kādu no akrocentrisko hromosomu īsajiem pleciem. (Vogt, 1996), līdz ar to šie gadījumi arī pieskaitāmi AZF pacientu grupai.

Vīrieši ar 46,XX kariotipu sastopami ļoti reti, sindroma biežums ir 1 : 20 000 jaundzimušo vīrišķā dzimuma indivīdu, kas ir apmēram 2% no visiem vīriešu neauglības gadījumiem. Šiem indivīdiem vīrišķā dzimuma un sēklinieku attīstība ir normāla, jo Y hromosomas īsā pleca distālā daļa (Yp11), kas satur vīrišķā dzimuma nosakošo (*SRY*) lokusu, ir translocēta uz X hromosomas īsā pleca distālo daļu (Xp22). Taču šiem vīriešiem raksturīga azoospermija, jo nav Y hromosomas garā pleca ar spermatogēnēzei svarīgo AZF rajonu. Izmainīts vīrišķais fenotips (piemēram, nenoslīdējuši sēklinieki, mazs dzimumloceklis, hipospādijs) 46,XX personām ir iespējams tikai tad, ja X un Y

hromosomas pārrāvuma un savienšanās punkts ir ļoti tuvu gēnam *SRY* un īslaicīgi traucē gēna *SRY* aktivitāti vīrišķā dzimuma determinācijas laikā (Boucekkine et al., 1994).

Hromosomālās aneiploīdijas un translokācijas starp autosomām (reciprokās un Robertsona translokācijas) ir sastopamas daudz retāk nekā dzimumhromosomu anomālijas, kaut gan autosomu struktūras izmaiņas (translokācijas, inversijas) 10 reizes biežāk atrod neauglīgu nekā auglīgu vīriešu populācijās (Van Assche et al., 1996). Ir zināms, ka azoospermijas un smagas oligozoospermijas pacientu (ar normālu somatisko kariotipu) sēkliniekos atrastajos spermatozoīdu priekštečos un spermatozoīdos var novērot palielinātu hromosomu neatiešanas gadījumu skaitu (Palermo et al., 1998). It īpaši pericentriskās inversijas, kas skar 1, 3, 5, 6, 10 hromosomu, izmaina mejozes gaitu un noved pie samazināta spermatozoīdu skaita vai pat azoospermijas. Arī Robertsona translokācijas starp 13. un 14. hromosomu 60% gadījumu rada traucējumus gametoģenēzes laikā, kā rezultātā vīrietis ir neauglīgs (Vogt, 1995). Attīstoties digitālās diferencēšanas metodei, tika veikta transkriptu analīze un noteikts, kuri transkripti ekspresējas sēkliniekos. Pēc tam katram transkriptam tika meklēti tam atbilstošie hromosomu rajoni un iegūtie dati salīdzināti ar rezultātiem, kas iepriekš iegūti, pētot neauglīgu vīriešu hromosomas, kurās atrastas līdzsvarotās translokācijas. Tā tika identificēti vairāki tā saucamie karstie punkti hromosomās, kuros biežāk notiek pārrāvumi. Karstie punkti tika atklāti 1. hromosomā (1p31-33), 3. hromosomā (3p21.1-9), 6. hromosomā (6p21, 6p22.1), 7. hromosomā (7q31) un X hromosomā (Xq28). Daži no šiem lokusiem reprezentē rajonus, kas ir pazīstami kā sēkliniekos ekspresēto gēnu atrašanās vietas, citi savukārt varētu liecināt par iepriekš nezināmiem gēniem, kuri, iespējams, ir iesaistīti sēklinieku darbības traucējumos (Olsen et al., 2001).

1.3.2. Submikroskopiskas delēcijas, kuras ir iemesls vīriešu neauglībai

Liela Y hromosomas garā pleca delēcijas viennozīmīgi korelē ar vīrieša neauglību. Cilvēka Y hromosomas molekulārajos pētījumos atklāts kritiskais reģions, kas atbildīgs par spermatoģenēzes procesu (sīkāk aprakstīts tālākās nodaļas). Visa šī reģiona delēcija ir iemesls defektīvai spermatoģenēzei un Sertoli šūnu sindroma (*Sertoli cell only syndrome, SCOS*) attīstībai. *SCOS* raksturojas ar maziem sēkliniekiem, azoospermiju,



palielinātu folikulus stimulizējošā hormona (FSH) un normālu testosterona līmeni (Foresta et al., 1998). Savukārt nelielas delēcijas kritiskajā Y hromosomas reģionā, sauktas par mikrodelēcijām, var būt par cēloni izmaiņām spermatogēnes procesā, kas var novest pie azoospermijas vai smagas oligozoospermijas (Vogt, 1998; Krausz & McElreavey, 1999). Detalizētāk Y hromosomas mikrodelēcijas tiks apskatītas tālākajās nodaļās.

1.3.3. Gēnu mutācijas, kuras ir iemesls vīriešu neauglībai

Dzīvniekmodeļu pētījumos ar pelēm veikti daudzi gēnu izslēgšanas eksperimenti un noskaidrots, ka vairāk nekā 3000 gēnu, kas tiek ekspresēti vīrišķās (un sievišķās) dzimumšūnās, izraisa neauglību vai samazinātu auglību (Cooke et al., 2002; Matzuk & Lamb, 2002). Lai arī lielākajai daļai šo peles gēnu ir atrasti homologi cilvēka genomā, vēl joprojām bieži nav zināms, tieši kuri ir neauglības gēni un kādas ir šo gēnu funkcijas cilvēka dzimumšūnās. Salīdzinot grauzēju un cilvēka gēnu sekvences, tika atrasts, ka daudzi par reprodiktīvo funkciju atbildīgie gēni ir ļoti diverģenti, t.i., ar atšķirīgu ekspresiju grauzēju un cilvēka sēkliniekos. Šo gēnu sekvences veido 10% no visām secībām, kurām raksturīga augsta diverģence (Makalowski & Boguski, 1998), kas liecina par ātru reprodiktīvo proteīnu evolūciju (Swanson & Vacquier, 2002). Aktuāls ir jautājums, kāpēc cilvēka spermatogēnes funkciju pētījumi netiek veikti tieši ar vīrieša auglības gēniem. Ir zināms, ka vidējais cilvēka gēnu mutāciju biežums ir $10^{-4} - 10^{-6}$ (Vogel & Motulsky, 1986), un, iespējams, ka tāds pats mutāciju biežums ir arī vīriešu auglības gēnos. Tā kā lielākoties neauglības pētījumi veikti eksperimentos ar pelēm, noskaidrots, ka lielākā daļa iespējamo vīrieša auglības gēnu ir homologi peles gēniem, parādīts, ka šo gēnu izslēgšana peles modelpētījumos saistīta ar reprodiktīvās funkcijas traucējumiem, tad šobrīd nav zināms, cik liels ir cilvēka gēnu mutāciju ātrums lielā idiopātisku neauglības pacientu grupā. Turklāt cilvēks nav eksperimentāls objekts, un tāpēc vīrieša auglības gēnu molekulārās ģenētikas pētījumi praktiski tiek veikti tikai tādiem gēniem, kuriem ir augsts mutāciju ātrums. Līdz ar to divi nozīmīgākie cilvēka hromosomu rajoni, kuri parāda saistību ar vīrieša neauglību, ir cilvēka Y hromosomas garā pleca (Yq11) azoospermijas faktora (AZF) gēnu delēcijas un mutācijas cistiskās

fibroses gēnā (*CFTR*), kas atrodas cilvēka 7. hromosomas garajā plecā (7q31.2). AZF gēnu delēcijas visbiežāk tiek atrastas pacientiem ar azoospermiju, kuras iemesls nav sēklas kanālu nosprostojušs (ne-obstruktīva azoospermija) (Vogt, 1998; Krausz & McElreavey, 1999), savukārt gēna *CFTR* mutācijas visvairāk atklātas pacientiem ar iedzimtu bilaterālu sēklas vada trūkumu (*congenital bilateral absence of the vas deferens, CBAVD*), kas ir azoospermijas obstruktīvā forma (Oates & Amos, 1994) (sīkāk aprakstīts tālākās nodaļās).

Bez pieminētajām divām lielākajām gēnu grupām, kuru mutācijas ir iemesls vīrieša neauglībai, ir zināmi arī citi gēni. Tomēr šo gēnu skaits ir salīdzinoši neliels. Lielākā daļa šo gēnu ir iesaistīta sēklinieku attīstības ģenētiskajā regulācijā, vai arī tiem ir dalība dažos vīrieša somatiskās attīstības posmos. No klīniskā viedokļa labāk zināmās patoloģijas ir androgēnu nejutības sindroms (testikulārās feminizācijas sindroms), ko izraisa mutācijas androgēna receptora (*AR*) gēnā, idiopātiskais hipo- un hiper-gonadotropiskais hipogonādisms, kura iemesls ir mutācijas folikulus stimulējošā un lutenizējošā hormonu receptoru (*FSHR/LHR*) gēnos, arī mutācijas gēnā *KAL-1*, kas ir iemesls Kalmana sindroma attīstībai. Savukārt poligēna (vairāki gēni nosaka vienas slimības attīstību) iedzimšanas aina ir novērota jau pieminētajam Kalmana sindromam, kā arī Kārteidženera sindromam un globozoospermijai. Retāk klīnikā sastopamas mutācijas gēnos *INSL3* un *LGR8-GREAT*, kas izraisa kriptorhismu (sēklinieku nenoslīdēšanu), mutācijas gēnā *DMI*, kuru rezultātā vīrieša neauglība ir saistīta ar miotoniskās distrofijas sindromu, un CAG atkātojumu skaita polimorfismu mitohondriālās DNS polimerāzes (*POLG*) gēnā, kas arī saistīts ar vīriešu neauglību (Vogt et al., 2004).

1.3.3.1. Androgēnu receptora gēna lokuss

Androgēnu receptors ir atbildīgs par Volfa vadu diferenciācijas uzsākšanu un attiecīgi ārējo vīrišķo dzimumpazīmju attīstības ierosināšanu embrionālās attīstības laikā. Pieaugušiem vīriešiem androgēna receptors ir iesaistīts spermatogēnēzes procesa regulācijā (McPhaul et al., 1999).

Androgēna receptora (*AR*) gēns ir lokalizēts X hromosomā (Xq) un kodē androgēnu receptoru, kas ir lielas intracelulāro receptoru ģimenes pārstāvis. Receptori parasti ir inaktivēti, ja pie tiem nav piesaistījušies atbilstošie ligandi. Ligandi ir

androgēnie hormoni – testosterons vai dihidrotestosterons, kuri piedalās normālā vīrišķā dzimuma diferenciācijā embrionālās attīstības laikā, pubertātes nodrošināšanā un spermatogēzes norisē. Testosterona veidošanās sākas embrionālās attīstības 8. nedēļā Leidiga šūnās un atbild par sēklinieku veidošanos no Volfa vadiem, un ietver arī sēklinieku piedēkļu, sēklas vadu un sēklas pūslīšu veidošanos. Ārējo vīrišķo dzimumpazīmju (dzimumloceklis un sēklinieku maisiņš) attīstībai nepieciešams dihidrotestosterons, kas savukārt rodas no testosterona 5α -reduktāzes hormona darbības rezultātā (Heinlein & Chang, 2002).

Androgēna receptora gēns tiek ekspresēts Sertoli šūnās un nodrošina dažādās dzimumdiferenciācijas fāzēs vīrišķā dzimuma un dzimumšūnu pareizu attīstību. Pēc ligandu piesaistīšanās androgēnu receptors veido dimēru, ceļo uz kodolu un saistās ar specifisku palindromu DNS secību, ko pieņemts apzīmēt kā *ARE* (androgēnu atbildes elementu, *androgene response element*) saistīšanās vietu. Piesaistoties daudziem kodolā esošajiem ko-aktivatoriem, AR proteīna dimērs aktivē daudzu mērķa gēnu transkripciju. Androgēnu receptora proteīnam ir garš N-terminālais peptīda domēns (TAD domēns), kuru kodē gēna *AR* 1. eksons, un tā funkcija ir modulēt *AR* atkarīgo gēnu transkripcijas aktivitāti. Gēna 2. un 3. eksons kodē peptīda domēnu, kas atbild par saistīšanos ar DNS, un 4. – 8. eksons kodē C-terminālo peptīda domēnu, kas atbild par androgēnu piesaistīšanu. TAD domēna izmērs ir variabls, jo satur daudzkārt atkārtojšos glutamīnu (kodē CAG trinukleotīdu atkārtojumi; to skaits ir 9 – 36) un glicīnu (kodē GGC trinukleotīdu atkārtojumi; to skaits ir 16 – 27) traktu. Minētais polimorfisms ietekmē AR receptora aktivitāti: aktivitāte pastiprinās, ja šo atkārtojumu skaits ir mazāks, un tiek samazināta, palielinoties atkārtojumu skaitam (Tut et al., 1997). Vēl joprojām nav skaidrs, cik ļoti samazinātai jābūt šī receptora aktivitātei, lai tas atstātu iespaidu uz spermatogēzi. Lielā salīdzinošā pētījumā, kas ietvēra 600 auglīgus un 674 neauglīgus vīriešus no Eiropas populācijām, abās pētāmajās grupās netika atrastas statistiski ticamas atšķirības CAG atkārtojumu skaitā gēnā *AR* (Rajpert-De Meyts et al., 2002). Tas pats tika apstiprināts citos pētījumos, kur salīdzināja 119 eiropiešu izcelsmes neauglīgus vīriešus ar 280 vīriešiem no indiešu populācijas (Tangaraj et al., 2002). Nesenos pētījumos tomēr ir pierādīta palielināta CAG atkārtojumu skaita korelācija ar lielāku azoospermijas vai smagas oligozoospermijas risku. Veicot CAG polimorfisma molekulāros pētījumus

dažādās populācijās, novērots, ka ASV populācijā raksturīgi 20,7 atkārtējumi, Singapūras populācijā 22,4, Austrālijas – 21,8 un Dānijas – 20,7 trinukleotīda atkārtējumi un ka minēto atkārtējumu skaits korelē ar neauglību (Krausz, 2007).

Ja CAG atkārtējumu skaits ir apmēram 38, tad tas ir saistīts ar smagu neiroleģeneratīvu slimību – Kenedija sindromu, kas raksturīgs ar progresīvu motoro neironu deģenerāciju un vieglu androgēnu rezistenci ar vēlīnu izpausmi. Kenedija sindroma gadījumā CAG atkārtējumu skaits variē no 38 līdz 62 (Dadze et al., 2002). Slimības cēlonis ir neparasti garais poliglutamīna trakts *AR* gēnā. Taču pārsteidzoši, ka Kenedija sindroma pacienti nav neauglīgi. Līdz ar to nav zināms, kā palielināts CAG atkārtējumu skaits TAD domēnā var izraisīt gan vīriešu neauglību, gan muskuļu atrofiju. Bez šaubām androgēni sekmē gan vīrišķo dzimumšūnu veidošanās sākumu, gan spermatozoīdu noformēšanos, tāpēc arī gēnam *AR* ir jābūt iesaistītam spermatoģenēzes ģenētiskās regulācijas procesā.

Gēnā *AR* ir atrastas vairāk nekā 300 punktveida mutācijas, kas atspoguļo *AR* dimērā proteīna funkcionālā kompleksa struktūras mainīgo dabu, un tādējādi kopā ar daudziem ko-aktivatoriem tas var darboties kā sēkliniekiem specifisks transkripcijas faktors. Noskaidrots, ka biežākām gēna *AR* mutācijām nav specifiskas patoloģijas, taču ir zināma saistība ar vairākiem variabliem patoloģiskiem fenotipiem. Smagākais fenotips izpaužas kā pilnīgs androgēnu nejutības sindroms (*complete androgen insensitivity syndrome, CAIS*), kad indivīds ar vīrišķo kariotipu 46,XY androgēnu receptoru trūkuma dēļ embrionālās attīstības laikā attīstās pēc sievišķā tipa ar raksturīgām ārējām sievišķām dzimumzīmēm. Otrs ir variants, kad mutācijas gēnā *AR* izraisa daļēju androgēnu nejutības sindromu (*partial androgene insensitivity syndrome, PAIS*). Šajā gadījumā personas fenotipā var dominēt sievišķais tips, var sastapt gan viena, gan otra dzimuma anatomiskās struktūras, vai arī tas var izpausties pēc vīrišķā tipa. Šiem vīriešiem raksturīgs mazs dzimumloceklis, nepareiza urīnizvadatveres lokalizācija, kriptorhisms, daļēji vai pilnīgi attīstītas Volfa vadu struktūras (atkarīgs no androgēnu receptoru nejutības). Vieglākā *AR* mutāciju izraisītā vīriešu neauglības forma ir vāja androgēnu nejutība (*mild androgen insensitivity, MAIS*). Šo fenotipu dažādība ir saistīta ar variablu trinukleotīdu polimorfismu gēnā *AR* (Vogt et al., 2004).

1.3.3.2. Gēnu *FSHR* un *LHR* lokuss

Gonadotropīni – folikulus stimulējošā hormona (FSH) un lutenizējošā hormona (LH) receptori – pieder ar G-proteīnu saistīto receptoru saimei. Receptoriem raksturīgs liels ektacelulārais domēns, kas saista FSH un LH hormonus. Proteīna transmembrānu daļu veido septiņas reizes plazmatisko membrānu šķērsojošs transmembrānas domēns, kas saistās ar intracelulāro domēnu, kas savukārt savienots ar G-proteīnu. Šo receptoru darbība iedarbina adenilātciklāzes kaskādes signālpārneses ceļu. Abiem hormoniem ir līdzīgs mehānisms, kā tie piesaistās attiecīgam receptoram un aktivē G-proteīnu, kas norāda uz šo hormonu kodējošo gēnu kopīgu izcelsmi un funkcionālo saistību. To pierāda arī tas, ka abu gēnu (*FSHR* un *LHR*) homologie rajoni atrodas cilvēka 2. hromosomas īsajā plecā (2p21) un tiem ir līdzīga eksonu struktūra. *FSHR* ekstracelulāro domēnu kodē gēna *FSHR* 1. – 9. eksons, savukārt gēna *LHR* 1. – 10. eksons kodē *LHR* ekstracelulāro domēnu. Arī transmembrānas domēnu kodē abu gēnu garākais un pēdējais eksons (1251 nt *FSHR*; 1200 nt *LHR*). Interesanti, ka dažādi spermatoģenēzes un vīrieša auglības traucējumi diagnosticēti vīriešiem, kas homozigotiski pēc A189V mutācijas gēna *FSHR* 7. eksonā (Aittomaki et al., 1998). Līdz ar to aktuāls ir jautājums par FSH hormona un gēna *FSHR* nozīmi spermatoģenēzes iniciācijā. FSH/*FSHR* darbība ir nepieciešama, lai palielinātu sēklinieku lielumu, taču spermatoģenēze var notikt arī smagas FSH nejutības gadījumā, ja testosterona produkcija ir normāla. Šie novērojumi tika apstiprināti, inaktivējot gēnu *FSHR* un FSH peļu modeļeksperimentos (Abel et al., 2000). Izmaiņas vīriešu auglības statusā nenovēroja arī, veicot gēna *FSHR* viena nukleotīda polimorfismu (*single nucleotide polymorphism*, SNP) analīzi. Pētījumā tika analizēti trīs polimorfismi – viens promotera rajonā un divi 10. eksonā, kas ietekmē FSH līmeni sievietēm, bet vīriešiem minētie SNP neparādīja nekādu efektu (Simoni et al., 2002).

Daudzas gēna *LHR* mutācijas ir iemesls pilnīgai vai daļējai LH hormona nejutībai un ir saistītas ar dažādām vīrišķo gonādu anomālijām (Sultan & Lumbross, 1998). Vīriešu neauglības iemesls ir traucēta vīrišķā dzimuma attīstība embrionālā un pubertātes laikā, kas izpaužas kā vīrišķais pseidohermatofrodītisms.

Ar dzimumu ierobežota agrīna pubertāte vīrišķiem indivīdiem ir novērota pacientiem ar agrīni aktivētu LH signāla transdukcijas ceļu (Sultan & Lumbross, 1998). Šo patoloģiju ierosina divas gēna *LHR* mutācijas (D578G un M571I), kas lokalizētas

hormona receptora sestajā transmembrānas domēnā. *LHR* mutāciju un patoloģisko fenotipu variāciju raksturs ir līdzīgs kā androgēna receptora gēna mutāciju gadījumā (aprakstīs iepriekš).

Vīriešu neauglību, kuras iemesls ir tikai gonadotropīnu gēnu mutācijas, sastop reti. FSH un LH ir heterodimēriskas molekulas, kurām kopīga α subvienība (kopīga arī ar horiongonadotropīnu, tiroīdstimulējošo hormonu) un specifiska β subvienība. Gēns, kas kodē kopīgo α subvienību, atrodas 6. hromosomā (6q12-21). FSH β subvienību kodē gēns, kas lokalizēts 11. hromosomā (11p13), un LH β subvienību – gēns, kas atrodas 19. hromosomā (19q13.32). FSH ir nepieciešams Sertoli šūnu proliferācijai un spermas kvalitātes saglabāšanai sēklīņiekos. FSH darbība varētu būt dažāda peles un cilvēka dzimumšūnās, tā kā vīriešiem ar FSH- β mutāciju novēro azoospermiju, bet pēc FSH- β mutācijas homozigotiskām pelēm raksturīgi mazi sēklinieki un oligozoospermija, taču tās ir auglīgas. Literatūrā aprakstīta tikai viena LH- β gēna mutācija, kas ir saistīta ar vīriešu neauglību (Acherman et al., 2001).

1.3.3.3. Gēna *KAL-1* lokuss .

KAL-1 lokuss atrodas X hromosomā (Xp22.3) (Del Castillo et al., 1992). Gēns *KAL-1* netiek inaktivēts X hromosomas inaktivācijas procesā, un šim gēnam Y hromosomā atrodas tā nefunkcionāls homologs. Gēna *KAL-1* secība ir ļoti līdzīga dažādu sugu indivīdiem, tai skaitā arī *Caenorhabditis elegans* (Bulow et al., 2002). Iespējamam gēna kodētam proteīnam anosminam-1 (*anosmin-1*) ir galvenā loma gonadotropīnu atbrīvojošā hormona (*gonadotropin-releasing hormone, GnRH*) transporta nodrošināšanā pa neironiem un ožas nervu uz hipotalāmu. Šis proteīns ir ļoti līdzīgs tādiem proteīniem kā kināzes un fosfatāzes, kā arī citiem proteīniem, kuri iesaistīti nervu šūnu adhēzijas un aksonu izveides nodrošināšanā. Līdz ar to iespējams, ka gēnam *KAL-1* varētu būt specifiska nozīme nervu impulsa pārvades kontrolē un ka gonadotropīnu atbrīvojošais hormons varētu būt atbildīgs par reproduktīvās funkcijas un seksuālās tieksmes regulāciju (Vogt et al., 2004).

Mutācijas gēnā *KAL-1* (delēcijas un punktveida mutācijas) (Bick et al., 1992) izraisa Kallmana sindromu (*Kallmann syndrome*), kam raksturīgs hipogonadotrofais hipogonādisms un ožas trūkums. Tā kā šo sindromu biežāk novēro vīriešiem (1:10000)

nekā sievietēm (1:50000), tad tiek uzskatīts, ka iedzimšanas aina ir saistīta ar X hromosomu (*KAL-1* lokuss), lai gan ir aprakstīti gadījumi, kad slimība iedzimst autosomāli dominantī (*KAL-2* lokuss) vai autosomāli recesīvi (*KAL-3* lokuss). Slimības autosomāli dominantās iedzimšanas ainas molekulārais pamats ir noskaidrots nesēn, kad atrastas mutācijas fibroblastu augšanas faktora receptora gēnā (*FGFR1*, vai *KAL-2* lokuss), kas lokalizēts cilvēka 8. hromosomas īsajā plecā (8p11-12) (Dode et al., 2003). Noskaidrots, ka abu gēnu *KAL-1* un *FGFR1* ko-ekspresija novērota dažādos embrionālās attīstības periodos, kas arī liecina par abu proteīnu funkcionālo mijiedarbību. Tā kā vairāki gēni atbild par šī sindroma attīstību, tad ir grūti izskaidrot šī sindroma genotipa-fenotipa saistību. Citi pētījumi parāda, ka delēcijas gēnā *KAL-1*, kas atrodas Xp22.3 rajonā, var ietvert arī kādu blakusesošu gēnu, piemēram, gēnu *DAX-1*. Tā kā *DAX-1* mutācijas ir iemesls iedzimtam hipogonadotropam hipogonādismam un adrenokortikotropā hormona deficītam, līdz ar to arī dažiem Kalmana sindroma pacientiem ar nieru aģenēzi var atrast gēna *KAL-1* mutācijas, kas ietekmē *DAX-1* gēna ekspresiju (Seminara et al., 2000). Kallmana sindroms ir otrs biežākais vīriešu neauglības iemesls pēc Klainfeltera sindroma. Pacientiem raksturīgs pilnīgs sekundāro dzimumpazīmju trūkums, palielināts kriptorhisma risks, mazs dzimumloceklis un sēklinieku biopsija parāda neattīstītus sēkliniekus (Pittelound et al., 2002).

1.3.3.4. Vīriešu neauglības sindromi ar poligēnu iedzimšanas ainu

Vislabākais vīriešu neauglības sindroma piemērs, kas saistīts ar mutācijām dažādos gēnos, ir **nekustīgu skropstiņu sindroms** (*immotile cilia syndrome, primary ciliary dyskinesia, PCD*) vai saukts arī par **Kārteidženera sindromu** (*Kartagener syndrome, KS*) *situs inversus* (apgriezts orgānu novietojums, spoguļa attēla novietojums) gadījumā. PCD biežums ir 1:20000 – 1:60000, bet KS ir biežāk sastopams 1:8000 – 1:25000. Vīriešiem ar Kārteidženera sindromu spermatozoīdi (to astes) ir nekustīgi, un arī pacientu elpošanas ceļos esošās skropstiņas ir nekustīgas. Nekustības iemesls ir pilnīgs dineīna proteīnu (aksonēma pirkstveida izaugumi) trūkums, kura normālā funkcija ir izveidot normālu aksonēmu, t.i. savienot savā starpā skropstiņas vai viciņas pamatelementus – mikrotubuļus. Līdz ar to var uzskatīt, ka dineīna proteīns nodrošina skropstiņu un spermatozoīdu astes kustību. Taču Kārteidženera sindroma pacientu

spermatozoīdu šķērsriezuma ultrastruktūras pētījumi parāda, ka šie defekti ir variabli un ka arī vīriešiem ar Kārteidženera fenotipu spermatozoīdu kustīgums var nebūt traucēts. Pēc ciltskoku analīzes datiem noskaidrots, ka *KS* iespējama autosomāli recesīva iedzimšanas aina, taču ir ziņots arī par autosomāli dominanta un ar X hromosmu saistīta iedzimšanas tipa iespējamību. Kārteidženera sindromam raksturīga ģenētiskā heterogenitāte, ko nosaka mutācijas dažādos gēnos, arī tādos, kas iesaistīti vienā un tajā pašā ģenētiskās regulācijas ceļā. Cilvēka genoma saistības analīzes (*linkage analysis*) pētījumos ir noskaidrots plašais un heterogēnais lokuss, kas atbild par PCD sindromu, un pirmie trīs gēni, kuru mutācijas atbild par Kārteidženera sindroma fenotipu. Šie trīs gēni ir *DNAH1*, *DNAH5* un *DNAH11*. Gēns *DNAH1* atrodas 9. hromosomas īsajā plecā (9p13-21) un kodē aksonēma vidējo jeb intermediālo ķēdi, gēns *DNAH5* lokalizējas 5. hromosomas īsajā plecā un kodē aksonēma smago ķēdi, un gēns *DNAH11* atrodas 7. hromosomas īsajā plecā (7p21) un atbild par otras aksonēma smagās ķēdes izveidi. Aksonēms sastāv no apmēram 250 dažādiem proteīniem, tādēļ sagaidāms, ka mutācijas citos gēnos, kas atbild par dineīna proteīnu izveidi, arī izpaudīsies kā Kārteidženera fenotips (Blouin et al., 2000; Bartoloni et al., 2002).

Par poligēnu iedzimšanas ainu tiek diskutēts arī **globozoospermijas** gadījumā. Globozoospermijai raksturīgs, ka spermatozoīdu galviņa ir apaļa (normāli ir ovāla) un ir novērojamas izmaiņas akrosomā. Apaļgalvaino spermatozoīdu skaits spermatogrammā variē no 14 līdz 71%. Zināmi divi globozoospermijas tipi. Pirmajam tipam raksturīgs pilnīgs akrosomas un akrosomālo fermentu trūkums un sfērisks hromatīna izvietojums kodolā. Šādi spermatozoīdi nav spējīgi penetrēt olšunas *zona pellucida* slāni, kas arī ir šo pacientu neauglības iemesls. Otrā tipa gadījumā novēro nelielu akrosomas aktivitāti un fragmentētu kodolu, ko apņem citoplazmas pūslīši. Pētot apaļgalvaino spermatozoīdu ģenētisko materiālu, izmantojot *FISH* metodi, ar attiecīgām zondēm tika iezīmētas (13., 15., 18., 21., X un Y) hromosomas, kuras biežāk novēro hromosomu neatiešanas gadījumos. Daži autori atklāja palielinātu hromosomu aneiploīdijas gadījumu skaitu (Carell & Liu, 2001) globozoospermijas pacientiem, savukārt citos pētījumos tas netika novērots (Vicari et al., 2002). Neskatoties uz šīm atšķirībām, visos pētījumos ir novērots palielināts spermatozoīdu hromatīna struktūras bojājumu skaits, kas liecina par augstu mutāciju nastu šo pacientu spermatozoīdu kodolu DNS.

Gēnu *INSL3* un *LGR8-GREAT* lokuss un kriptorhisms. Gēni *INSL3* un *LGR8-GREAT* ir iesaistīti sēklinieku noslīdēšanas molekulārajā mehānismā. Sēklinieku noslīdēšana no vēdera dobuma sēklinieku maisiņā notiek divās nesaistītās fāzēs: abdominālajā un cirkšņa fāzē. Svarīgs veidojums, kas nodrošina sēklinieku noslīdēšanu, ir mezenhīmas audu veidots *gubernaculum*, kas savieno sēklinieku ar cirkšņa kanālu. Šis veidojums embrionālās attīstības laikā ātri izveidojas vīrišķajiem embrijiem, bet nav atrodamams sievišķajiem embrijiem. Tā kā *Insl3* proteīna trūkums peļu tēviņiem izpaužas kā bilaterāla sēklinieku nenoslīdēšana (kriptorhisms) (Nef & Parada, 1999), tiek uzskatīts, ka mutācijas šajā gēnā varētu būt kriptorhisma iemesls arī cilvēkam.

Kriptorhisms ir viena no biežākajām cilvēka iedzimtajām anomālijām (2% jaundzimušiem zēniem). Kriptorhisms var būt iemesls vīrieša neauglībai, turklāt tas palielina dzimumšūnu audzēja attīstības risku. Lielākoties kriptorhisma etioloģija nav zināma, un izskatās, ka arī šī patoloģija ir ģenētiski heterogēna. Cilvēkiem gēns *ISL3* atrodas 19. hromosomā (19p13.2). Gēns pazīstams arī kā relaksīnam līdzīgais faktors (*relaxin-like factor*, RLF) un Leidiga šūnu insulīnam līdzīgais proteīns (*LEY I-L*) un pieder insulīna/relaksīna hormonu virsdzimtai. Gēns *ISL3* pārsvarā ekspresējas Leidiga šūnās. Gēna *ISL3* mutācijas tomēr nav bieži sastopamas pacientiem ar kriptorhismu. Izmantojot vienpavediena konformācijas polimorfisma analīzi (*single-strand conformational polymorphism*, SSCP), tika veikta gēna *INSL3* kodējošā rajona mutāciju analīze 145 bijušajiem kriptorhisma pacientiem un 36 kontrolēm (pieauguši vīrieši, bez novērota kriptorhisma). Tika identificētas divas mutācijas, R49X un P69L, un vairāki polimorfismi (Tomboc et al., 2000).

INSL3 ir ligands *LGR8* vienam no nesen identificētiem, ar G proteīnu saistītam receptoram (*LGR4-8*), kas homologs gonadotropīna un tirotropīna receptoriem. Transgēnām pelēm, kurām trūkst gēns *LGR8*, arī novēro kriptorhismu. Vēl viens peļu neauglības gēns, ko apzīmē kā *GREAT* (*G-protein-coupled REceptor Affecting Testis descent*), tika pētīts 61 kriptorhisma pacientam. Šajā pētījumā *GREAT* receptora vienā domēnā izdevās atrast unikālu *missense* mutāciju T222P. Divi sekvenču varianti 12. eksonā (A/G transversija 957 un 993 nukleotīdu pozīcijā) tika atklāti 40 no 61 kriptorhisma pacientiem, taču arī kontroles grupā parādījās trīs dažādi haplotipi (A957 un A993, A957 un G993, G957 un G993). Nelielais mutāciju skaits gēnos *INSL3* un

GREAT/LGR8 liecina par to, ka šīs biežās patoloģijas cēlonis meklējams arī citos gēnos. Veicot hromosomu analīzi, jau ir atklāti daži kandidātgēni, kuri, iespējams, atrodas 1., 2., 8., 9., 22., X un Y hromosomās (Kumagai et al., 2002).

Miotoniskā muskuļu distrofija (DM) ir autosomāli dominanta patoloģija, kas raksturīga ar pavājinātu muskuļu relaksāciju. Galvenais gēns, kas 95% gadījumu atbild par slimību, atrodas cilvēka 19. hromosomā (19q13.2-3). Tā kā gēna kodētā proteīna N-terminālais domēns ir ļoti līdzīgs cAMP atkarīgajai serīna-treonīna proteīnkināzei vai miotīnam-1 (*myotonin-1*, saukts arī par DMPK), tad tiek uzskatīts, ka DMPK ir enzīms, kas fosforilē citus proteīnus. Miotonisko distrofiju izraisa mutācijas, kuru rezultātā tiek sintezēta defektīva RNS molekula, kas tiek uzkrāta šūnas kodolā netranslēta veidā, jo tās 15. eksonā ir palielināts CTG tripletu atkārtojumu skaits. Veseliem cilvēkiem CTG atkārtojumu skaits variē no 5 līdz 35 kopijām, miotoniskās distrofijas pacientiem ar viegliem slimības simptomiem šis skaits ir vidēji 50, savukārt pacientiem ar smagu slimības ainu atkārtojumu skaits pieaug līdz pat vairākiem tūkstošiem. Šai slimībai raksturīga anticipācija, ar katru nākamo paaudzi tā kļūst arvien smagāka un smagāka. Parasti slimības pirmās izpausmes parādās jaunībā, lai gan tā var sākties jebkurā vecumā un ir ļoti variabla slimības smaguma ziņā. Miotoniskās distrofijas klīniskajai aintai raksturīgas psihiķes izmaiņas, matu zudums, katarakta un neaeglība. Neaeglīgajiem pacientiem ar hipogonādismu parasti novērojamas zemas intelektuālās spējas, bet somatiskie defekti ir vāji izteikti. Līdzīgi Kenedija slimībai, klīniski novērojama dzimumorgānu patoloģija redzama tikai pēc pubertātes. Neaeglīgiem *DM* pacientiem raksturīga sēklinieku atrofija, libido un potences zudums (Groenen & Wieringo, 1998). Salīdzinot miotoniskās distrofijas pacientu un veselu vīriešu spermatozoīdu nobriešanu un akrosomālās reakcijas ar dažādu diagnostikas metožu palīdzību, tika noskaidrots, ka *DM* pacientu dzimumšūnās ir traucēts nobriešanas periods un spermatozoīdi nespēj veikt akrosomālo reakciju (Hortas et al., 2000). Abas pieminētās anomālijas izskaidro miotoniskās distrofijas pacientu neaeglības iemeslu.

DNS polimerāzes G (*POLG*) lokuss un mitohondriālā DNS. Cilvēka *POLG* gēna lokuss, kas kodē mitohondriālās polimerāzes katalītisko subvienību, atrodas 15. hromosomas garajā plecā (15q25) (Zullo et al., 1997). *POLG* ir vienīgā polimerāze, kas atbildīga par mitohondriālās DNS replikāciju. Proteīnam raksturīgs poliglutamīna trakts,

ko kodē vairākas reizes atkārtoti CAG tripleti, kas atrodas gēna *POLG* 1. eksonā. CAG atkārtojumu skaita polimorfismam, salīdzinot ar gēna *AR* polimorfismu, ir daudz mazāk variāciju. Zināms, ka dažādās etniskās populācijās CAG atkārtojumu skaits 88% gadījumu ir desmit kopijas un (CAG)₁₀ alēli neatrod tikai 1% indivīdu. Tas liecina par stipru pozitīvo selekciju par labu šai alēlei. Visās populācijās, kurās veikta gēna *POLG* analīze, mutantais genotips, kad indivīdam nav (CAG)₁₀ alēle (apzīmēts “*abs10*” *POLG*-alēle), biežāk atrasts neauglīgiem vīriešiem ar viduvēju oligozoospermijas formu (Rovio et al., 2001).

Veicot neauglīgu vīriešu, kuru fenotips nav azoospermija, spermatozoīdu DNS analīzi, “*abs10*” *POLG*-alēles klātbūtne tika atrasta 9 no 99 (9%) – šī alēle atrasta homozigotiskā formā. Balstoties uz standarta Hārdija-Veinberga likumsakarībām, homozigotisko mutantu “*abs10/abs10*” genotipa biežums varētu būt apmēram 1,7%. Tā kā “*abs10/abs10*” genotipu (*POLG* genotips) biežāk sastop neauglīgiem vīriešiem (9%), tas liecina par *abs10* alēles saistību ar vīrieša neauglību. *POLG* genotips DNS, kas izdalīta no pacientu asinīm vai spermas, bija vienāds, līdz ar to tiek izslēgta audu specifiska *de novo* mutāciju iespēja. *POLG* alēles ietekmi uz vīrieša auglību apstiprina arī šie dati: 35% neauglīgu vīriešu “*abs10*” alēle atrasta heterozigotiskā stāvoklī, savukārt auglīgiem vīriešiem alēles biežums ir tikai 18% vai 23% vispārīgā populācijā (Rovio et al., 2001).

Tā kā mitohondriālai DNS (mtDNS) ir liela nozīme spermatoģenēzes procesā un spermatozoīdu funkcionēšanā, ticama ir hipotēze, ka mutācijas, kas uzkrājas mtDNS, var izraisīt mtDNS polimerāzes defektus, kas savukārt izraisa spermatozoīdu diferencēšanās traucējumus. Līdz ar to “*abs10*” *POLG* alēle negatīvi ietekmē vīrišķo dzimumšūnu diferencēšanās procesu, bet citos audos tās kaitīgā ietekme nav novērota. Dažādās populācijās “*abs10/abs10*” *POLG* variants biežāk atrasts vīriešiem ar vidējas pakāpes oligozoospermiju. Šo vīriešu spermas kvalitātes rādītāji bija zemāki nekā pieņemts normā: spermatozoīdu skaits bija mazāks nekā 20 miljoni/ml, kustīgums mazāks nekā 50%, vairāk nekā 90% spermatozoīdu novēroja morfoloģijas defektus. Pētot dažādus *POLG* variantus Eiropas populāciju vīrišķajiem pārstāvjiem ar vidējas smaguma pakāpes oligozoospermiju, “*abs10*” atrasta 5 – 10% gadījumu vīriešiem ar idiopātisku neauglību. Iespējams, ka mtDNS polimerāzes defektīva replikācijas funkcija rada izmaiņas

spermatozoīdu mtDNS sekvenču dinamikā. Spermatozoīdu kustīgums un citi spermatozoīdu kvalitātes rādītāji korelē ar neskartu mtDNS sekvenci, turklāt neauglīgu vīriešu mtDNS bieži ir novērotas delēcijas (Kao et al., 1998; O'Connell et al., 2000). Nesen ir noskaidrota asociācija starp astenozoospermiju un mtDNS haplogrupu T, ar punktveida mutāciju mtDNS gēnā, kas kodē mitohondriālo tRNS (Ruiz-Pesini et al., 2000). Astenozoospermija sastopama 30% vīriešu neauglības gadījumā. Līdz ar to visi gēni, kas atbild par mtDNS saglabāšanu un replikāciju, var tikt uzskatīti par vīriešu neauglības kandidātgēniem. Spermatozoīdu kustīgums ir atkarīgs no mitohondrijos saražotās enerģijas. Līdz ar to jau sen ir izteiktas hipotēzes, ka traucējumi spermatozoīdu kakliņā lokalizēto mitohondriju enerģijas metabolismā arī sekmē vīrieša neauglības attīstību (Vogt et al., 2004).

1.4. Y hromosomas raksturojums

Y hromosoma ir viena no mazākajām cilvēka hromosomām, tā ir ~ 60Mb gara, kas ir tikai 2% no cilvēka genoma (Quintana-Murci et al., 2001). Lielākā daļa Y hromosomas (95%) sastāv no tai unikālas DNS nukleotīdu secības, kas nav homologa ar citām cilvēka hromosomām. Šo hromosomas daļu pieņemts saukt par *NR*Y – rajonu, kas mejozes laikā nerekombinējas ar X hromosomu vai kādu no autosomām. Y hromosomas īsā un garā pleca galos ir izvietoti pseidoautosomālie rajoni – PAR1 un PAR2 (5% no Y hromosomas), kas ir X-Y homologie rajoni un var rekombinēties mejozes laikā. Gēniem, kas atrodas PAR rajonos, nav konstatēta saistība ar cilvēka dzimuma determinēšanu.

Y hromosomas gēnus pēc ekspresijas veida var iedalīt divās galvenajās grupās. Pirmās grupas gēni tiek ekspresēti dažādos audos, un šiem gēniem ir atrasti homologi X hromosomā. Otrās grupas gēniem piemīt sēkliniekiem specifiska funkcija, un tiem nav homologu X hromosomā. Gandrīz visi sēkliniekos ekspresētie gēni ir sastopami vairākās kopijās.

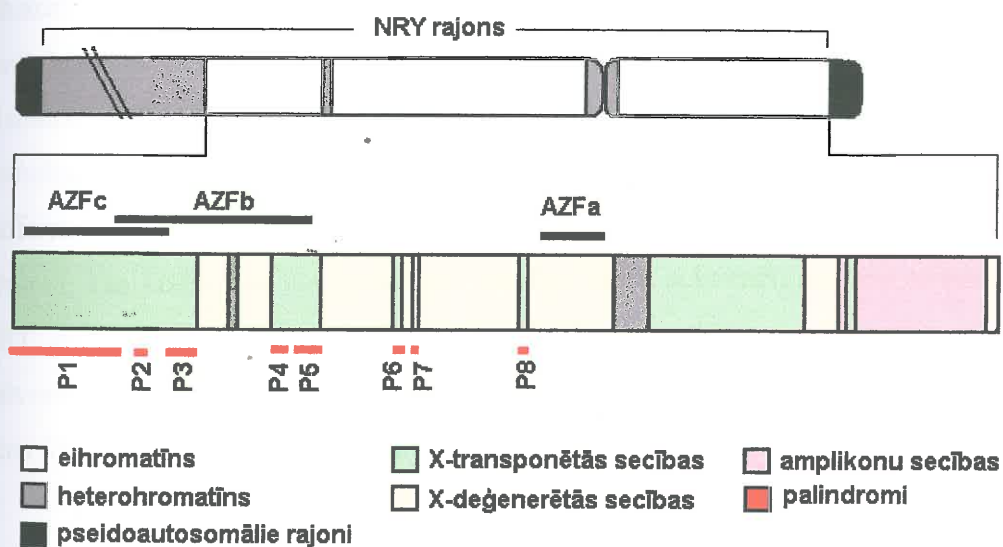
Daudzi Y hromosomas pseidogēni (genomiskas DNS secības, kas pēc uzbūves līdzīgas gēna secībām, bet tām nepiemīt funkcionāla aktivitāte; tiek uzskatīti par izzudušu funkcionālo gēnu pēctečiem) ir aktīvi X hromosomā (piem., gēni *STSP*, *KALP*, *GYG2P*). Daži no gēniem, kas ir aktīvi cilvēka Y hromosomā, ir pseidogēni citiem placentāļiem

(Lahn & Page, 1997). Hromosomu evolūcijas pētījumi ir parādījuši, ka daži Y hromosomas gēni cēlušies no autosomu gēniem retrotranspozīcijas rezultātā. Tādi ir gēns *CDY*, kam nav introni, un cits piemērs ir *DAZ* gēni, kas satur intronus. Somaiņu autosomālais gēns *ANT3* placentāļiem un arī cilvēkam atrodams Y hromosomas PAR1 rajonā (Bachtrog & Charlesworth, 2001). Vislabāk izpētītais gēns Y hromosomā ir gēns *SRY*, kas atrodas Y hromosomas īsajā plecā un ir atbildīgs par vīrišķā dzimuma diferenciāciju embrionālās attīstības laikā. Gēns *SRY* tika kartēts Y hromosomā ar molekulārām metodēm, analizējot pacientus ar 46,XY genotipu, bet sievišķo fenotipu (Sinclair et al., 1990).

Y hromosomas *NRX* rajonam raksturīga heterohromatīna un eihromatīna mozaīkas struktūra (1.1. att.). Heterohromatīna rajoni ir nevienmērīgi izkliedēti hromosomā: viena daļa atrodas centromēras rajonā (~ 1Mb) (Tyler-Smith et al., 2003), savukārt otrs heterohromatīna bloks (~ 40 Mb) ietver lielāko daļu no Y hromosomas garā pleca distālā rajona. Šie divi heterohromatīna bloki sastāv no tandēmiskiem atkārtojumiem. Pēdējā laikā ir atklāts arī trešais heterohromatīna bloks – stingri norobežots, kas stiepjas ~ 400 kb garumā, ietverot sevī vairāk nekā 3000 tandēmiskos 125 bp garus atkārtojumus, tādā veidā pārtraucot proksimālo Y hromosomas īsā pleca eihromatīna sekvenci (Skaletsky et al., 2003). Heterohromatīna rajoni netiek īpaši pētīti, jo tiek uzskatīts, ka tie nesatur gēnus, un otrkārt šo kompakto, ģenētiski neaktīvo un daudzu atkārtoto sekvenču bagāto rajonu izzināšana sagādā lielas grūtības kartēšanas un sekvenēšanas projektos pašreiz lietoto klonēšanas un sekvenēšanas metožu nepilnību dēļ. Savukārt pētot augļu mušiņas – *Drosophila sp.* – Y hromosomas heterohromatīna rajonu, ir atklāti daži gēni, tādējādi, iespējams, arī cilvēka Y hromosomas heterohromatīna blokos varētu būt gēni (Bachtrog & Charlesworth, 2001).

NRX rajona eihromatīna daļas sekvenču noskaidrota un raksturota 2003. gadā (Skaletsky et al., 2003). *NRX* eihromatīna rajonu pieņemts apzīmēt par vīriešiem specifisko Y hromosomas reģionu – *MSY* (*male specific Y chromosome region*). Y hromosomā ir sastopamas trīs klašu eihromatīna sekvenču: X-transponētās, X-deģenerētās sekvenču un amplikoni. *MSY* rajona DNS secība kopumā sastāda ~ 23 Mb (Skaletsky et al., 2003). Visas trīs eihromatīna klases satur vismaz 156 zināmas transkripcijas vienības, no kurām 78 kodē 27 dažādus proteīnus. No šiem 27 gēniem 16

ekspresējas dažādos audos, bet 11 ir ekspresēti galvenokārt sēkliniekos. No 78 proteīnus kodējošām transkripcijas vienībām 60 ir deviņu dažādu *NRY* specifisku gēnu saimju pārstāves, katrai no tām raksturīga > 98% nukleotīdu identitāte (gan introniem, gan eksoniem) starp saimes pārstāvjiem, un tie ir sastopami vairākās kopijās. Atlikušās 18 proteīnus kodējošās transkripcijas vienības ir unikālas – atrastas tikai vienā kopijā *NRY* rajonā. Pārējās 78 *NRY* rajona transkripcijas vienības nav pierādītas kā proteīnus kodējošas, un daudzas no tām, iespējams, ir nekodējošas. No šīm transkripcijas vienībām 13 ir unikālas, un atlikušās 65 veido 15 *NRY* rajonam specifiskas saimes. Ņemot vērā abu veidu transkripcijas vienības – gan kodējošās, gan nekodējošās, Y hromosomas eihromatīna rajons satur 24 *NRY* specifiskas saimes, kas kopā veido 125 no 156 *NRY* transkripcijas vienībām.



1.1. attēls. Y hromosomas strukturālā organizācija un tās eihromatīna klašu shēma (pēc Skaletsky et al., 2003; Sadeghi-Nejad & Farrakhi, 2007).

Lielākā daļa no X transponētajām (*X-transposed region*) Y hromosomas eihromatīna sekvencēm (99%) ir identiskas ar X hromosomā satopamām sekvencēm. X-transpozoni (~3,4 Mb) savu nosaukumu ieguva pateicoties tam, ka to klātbūtne Y hromosomas sastāvā ir hromosomu evolūcijas rezultāts, kad pirms 30 – 40 miljoniem gadu notika liela X hromosomas gēnu transpozīcija uz Y hromosomas *NRY* rajonu. Pēc

tālākiem hromosomu evolūcijas notikumiem inversijas rezultātā *NRY* īsā pleca X-transponētais sekvenču bloks tika pārdalīts divos nesaistītos segmentos. Šajos segmentos šobrīd ir atrasti tikai divi gēni un abiem ir homologi X hromosomā (Xq21). No visām trim *NRY* eihromatīna klasēm X-transponētām secībām raksturīgs vismazākais gēnu blīvums. Taču šīs secības ir bagātas ar daudziem atkārtotiem elementiem. (Skaletsky et al., 2003). Piemēram, cilvēka genomam raksturīgais *LINE1* (garais iestarpinātais kodola elements 1, *long interspersed nuclear element 1*) atkārtojums aizņem 36% no Y hromosomas X-transponētā segmenta garuma (Venter et al., 2001).

NRY reģiona **X-deģenerētās** (*X-degenerate region*) sekvences satur unikālus – vienā kopijā pārstāvētus gēnus vai pseidogēnus, kuriem ir 60 – 96% homologija ar X hromosomas sekvencēm. Šīs klases gēni iespējams ir evolucionārais mantojums no senajām autosomām, kas bija par pamatu X un Y hromosomu izveidei. 13 no 27 proteīnus kodējošajiem gēniem ir homologi pseidogēniem, kuriem ir X hromosomai raksturīga intronu un eksonu struktūra. Pārējiem 14 proteīnus kodējošiem homologi ir funkcionāli X/Y saistītie gēni, kas kodē ļoti līdzīgas, bet ne identiskas proteīnu izoformas. Piemēram, funkcionālu Y-saistīto gēnu *RPS4Y1* un *RPS4Y2* pilnas sekvences ir homologas ar X-saistīto gēnu *RPS4X*, bet tie kodē divas dažādas ribosomālā proteīna S4 izoformas. Kopumā X-deģenerēto sekvenču rajonos lokalizēti 16 no 27 Y hromosomas gēniem, kas kodē dažādus proteīnus. Svarīgi, ka šo sekvenču rajonos atrodas 15 no 16 *NRY* gēniem, kas ekspresējas dažādos audos, savukārt no 11 *NRY* gēniem, kuri galvenokārt tiek ekspresēti sēkliniekos, tikai viens gēns – vīrišķo dzimumu nosakošais gēns *SRY* pieder pie X-deģenerētajām sekvencēm.

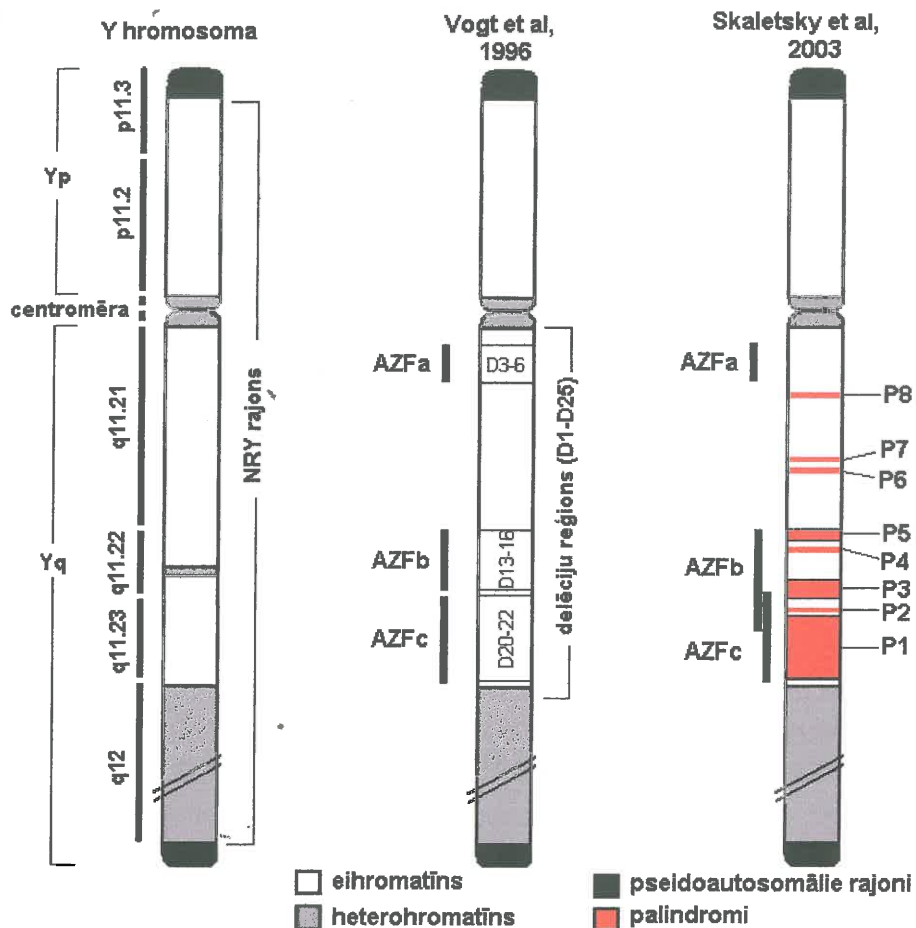
Trešā eihromatīna sekvenču klase ir **amplikoni** (*ampliconic region*), kas veidoti no vairākkārt pavairotām (amplificētām) sekvencēm (99,9% homologija starp amplikoniem). Amplikoni evolūcijas gaitā ir radušies gēnu konversijas (ģenētiskās informācijas apmaiņa, ko nodrošina homologas secības) rezultātā: X-deģenerēto gēnu (*RBMY* un *VCY*) konversija un amplifikācija; autosomās lokalizēto gēnu (3. hromosomas gēns *DAZ*) konversija amplifikācija; un autosomālo gēnu (*CDY*) retropozīcija amplifikācija. Amplikoni ir novietoti septiņos segmentos, un to kopējais garums ir 10,2 Mb. Tie ir izklaidēti Y hromosomas garā pleca eihromatīna rajonā un īsā pleca proksimālajā daļā. No visām trim eihromatīna klasēm amplikoni kodē vislielāko

transkriptu skaitu (gan kodējošo, gan nekodējošo). Ir atrastas deviņas atšķirīgas NRY-specifisko proteīnu kodējošās gēnu saimes ar dažādu kopiju skaitu, kas atkārtotas divās kopijās (*VCY*, *PRY*), trījās kopijās (*BPY2*), četrās kopijās (*CDY*, *DAZ*), sešās kopijās (*RBMY*), līdz pat 35 kopijām (*TSPY*). Šo gēnu kopiju skaits dažādās populācijās var būt variabls. Kopumā šīs deviņas kodējošās saimes ietver aptuveni 60 transkripcijas vienību. Turklāt amplikonu sekvences ietver arī vismaz 75 citas transkripcijas vienības, kas proteīnus nekodē. No šīm 75 nekodējošajām transkripcijas vienībām 65 ir 15 NRY specifisko saimju pārstāves, un atlikušās 10 ir sastopamas vienā kopijā. Kopā amplikonu sekvences satur 135 no 156 līdz šīm identificētajām NRY transkripcijas vienībām. No visām trim eihromatīna klasēm amplikoni satur vismazāk atkārtotos elementus. Visas deviņas amplikonu rajonos sastopamās proteīnus kodējošās saimes tiek ekspresētas galvenokārt vai tikai sēkliniekos (Skaletsky et al., 2003).

1.4.1. Y hromosomas Yq11 lokusa raksturojums

Visbiežāk vīrieša auglības traucējumi saistīti ar Y hromosomas pārkārtojumiem, kuri ietver Yq11 lokusu. Jau pirms vairāk nekā 30 gadiem tika atklāts, ka lielas intersticiālas Y hromosomas garā pleca delēcijas atrodamas azoospermijas pacientiem (Tieppolo & Zuffardi, 1976). Pirms pilnas Y hromosomas sekvences noskaidrošanas veicot azoospermijas pacientu DNS paraugu Y hromosomas *MSY* rajona rūpīgu kartēšanu, tika noskaidrots, ka delēcijas notiek Yq11 lokusā jeb AZF rajonā (delitēts azoospermijas gadījumā). AZF rajonu sīkāk iedala AZFa, AZFb un AZFc apakšrajonos jeb delēciju intervālos AZFa, AZFb un AZFc. Sākotnēji tika uzskatīts, ka šie rajoni nepārklājas (Vogt et al., 1996). Pēc pilnas Y hromosomas *MSY* sekvences noskaidrošanas tika precizēta AZFb un AZFc rajonu lokalizācijas vieta. Sekvences dati parāda, ka AZFa lokuss atrodas Y hromosomas garā pleca 11 segmenta (Yq11) (1.2. attēls) proksimālajā daļā (Yq11.21), savukārt AZFb un AZFc rajoni pārklājas un atrodas distālajā segmenta daļā (Yq11.23) (Repping et al., 2002).

Pēc Y hromosomas pilnas sekvences analīzes (publicēta *GenBank* datubāzē) zināms, ka Y hromosomas garā pleca Yq11 lokuss pārsvarā veidots no specifiskiem atkārtoto sekvenču blokiem (Tilford et al., 2001).

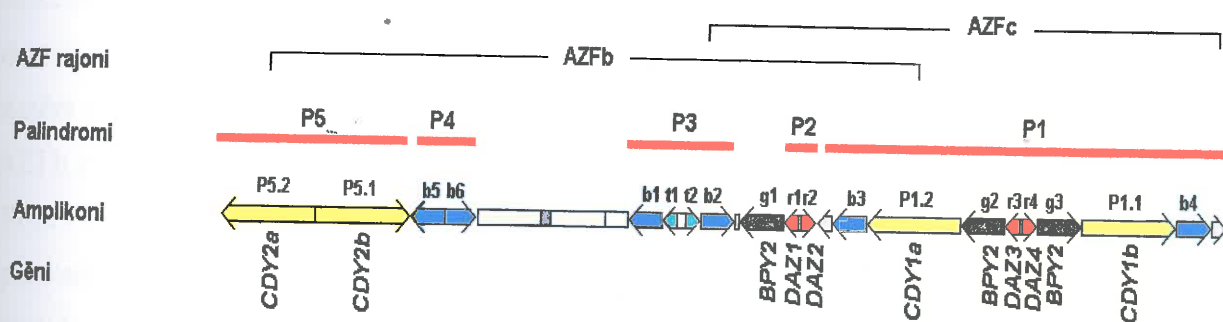


1.2. attēls. Y hromosomas strukturālā organizācija. Yq11 lokuss un AZF rajoni (pēc Vogt et al., 1996; Foresta et al., 2001; Skaletsky et al., 2003; Sadeghi-Nejad & Farrakhi, 2007). Attēla kreisajā pusē parādīta Y hromosomas citoģenētisko joslu shēma, pa vidu – Vogt et al ieteiktas AZF rajonu atrašanās vietu attēlojums Y hromosomas delēciju reģionos, pa kreisi Skaletsky et al uz Y hromosomas sekvences datiem balstītā AZF rajonu atrašanās vietu shēma un Y hromosomas palindromu secību attainojums.

AZFa rajonu veido ~ 1100 kb, un tam raksturīgi divi *HERV* (cilvēka endogēno retrovīrusu, *Human Endogenous Retroviral*) sekvenču bloki, kas atrodas 700 kb attālumā viens no otra (Blanko et al., 2000). *HERV* sekvenses ir liela izkliedēto atkārtojumu apakšgrupa, un tās veido aptuveni 1% no cilvēka genoma. Pēc plašu cDNS skrīnīga programmu un AZF gēnu bankā pieejamās AZF sekvenses analīzes datiem ir noskaidrots, kādi gēni lokalizēti katrā AZF rajonā (Lahn & Page, 1997; Tilford et al., 2001). AZFa

rajonā atrodas divi gēni: *USP9Y* un *DBY*. AZFa rajonā varētu atrasties arī gēns *UTY*, kas, pēc ģenētiskās kartēšanas datiem, atrodams tuvu *HERV* robežai AZFa rajona distālajā daļā (Lahn & Page, 1997; Vogt et al., 1997).

AZFb un AZFc rajoni kopā izveido piecus lielus atkārtoto secību blokus, kurus sauc par palindromiem (apzīmē P1, P2, P3, P4 un P5) (1.3. attēls). P1 palindromu (3Mb) veido pieci dažādi amplikoni. P1 atrodas AZFc rajona distālajā daļā un aizņem 2/3 no AZFc delēciju intervāla. (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Repping et al., 2002). Pārējie četri palindromi (P2 – P5) atrodas AZFb rajona distālajā daļā un AZFc rajona proksimālajā daļā, kas savstarpēji pārklājas. AZFb rajona distālā daļā atrodas P2 (270 Kb), P3 (730 kb) un AZFc rajona proksimālajā daļā – P4 (380 kb) un P5 (900 kb) palindromi. Palindromiskās DNS struktūras reti sastopamas eikariotu genomā. Tām raksturīga nestabilitāte, t.i., no paaudzes uz paaudzi tās pārmantojas izmanīti (Akgun et al., 1997).



izmēri svārstās robežās no 115 līdz 600 kb, un tos sauc par *turquoise* (tirkīzs), *green* (apzīmējums "g"; zaļš), *blue* (apzīmējums "b"; zils) un *red* (apzīmējums "r"; sarkans) (1.3. attēls). Minētās amplikonu secības, iespējams, radušās daudzu tandēmu duplikāciju un inversiju rezultātā. Unikālā AZFc rajona DNS struktūra izskaidro Y hromosomas Yq11 lokusa distālās daļas augsto mutāciju biežumu, jo starp identiskiem vienādā virzienā vērstiem amplikoniem iespējama homologā rekombinācija. Homologās rekombinācijas dēļ var tikt zaudēti citas secības (amplikoni), kas atrodas starp identiskajiem amplikoniem (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Bieži šādas homologās rekombinācijas novēro starp Y hromosomas amplikonu b2 un b4 secībām, kas ir iemesls AZFc rajona delēcijai (sīkāks apraksts 1.4.2. nodaļā).

AZFb un AZFc rajonā atrodas 24 gēni, no kuriem lielākā daļa pārstāvēti daudzās kopijās, un līdz ar to šajā rajonā lokalizētas 46 gēnu kopijas (Simoni et al., 2004). Unikālajā AZFb delēciju intervālā lokalizēti 16 gēni: *CDY2*, *CYorf14*, *CYorf15A/B*, *EIF1AY*, *HSFY*, *PRY*, *RBM1*, *RPS4Y2*, *SMCY*, *TTY5*, *TTY6*, *TTY9*, *TTY10*, *TTY13*, *TTY14*, *XKRY*. Gēni, kas apzīmēti ar *CYorf* simbolu, kodē proteīnus ar nezināmu funkciju, bet gēni, kas apzīmēti ar *TTY* simbolu, iespējams, ir RNS kodējošie gēni, jo to eksonu sekvenču atšķiras no tām eksonu secībām, kuras satur informāciju par proteīnu sintēzi (Lahn & Page, 1997). Gēni *CDY2*, *RPS4Y2*, *XKRY* sastopami vairākās kopijās AZFb rajona proksimālajā daļā. Gēni *BPY2.1*, *CDY1.1*, *DAZ1*, *DAZ2*, *TTY3.1*, *TTY4.1*, *TTY17* atrodas Y hromosomas daļā, kur AZFb-AZFc rajoni pārklājas – AZFb rajonā tie pārsvarā pārstāvēti vienā kopijā, bet AZFc rajonā tie pārstāvēti vairākās kopijās un izveido AZFc rajonam raksturīgās gēnu saimes. AZFc rajonu veido 12 gēni un transkriptu vienības, kas pārstāvēti vairākās kopijās, kopā izveidojot 32 kopijas (Repping et al., 2003). AZFc rajona unikālajā daļā atrodas tikai divi gēni (*CSPG4LY* un *GOLGA2LY*). Y hromosomas *DAZ* gēni pārstāvēti četrās kopijās. *DAZ1/DAZ2* gēnu pāris atrodas AZFb-AZFc rajonā, savukārt *DAZ3/DAZ4* atrodas AZFc rajona unikālajā daļā (McElreavey et al., 2007).

1.5. Y hromosomas mikrodelēcijas un vīriešu neauglība

Y hromosomā lokalizētajiem gēniem ir liela nozīme vīrišķo dzimumšūnu attīstības regulācijā. Apmēram 7% neauglīgu vīriešu ir sastopamas nelielas delēcijas Y hromosomā, kuras pieņemts saukt par mikrodelēcijām. Vīrišķā dzimuma nosakošais gēns – *SRY*, kurš atrodas Y hromosomas īsajā plecā un nosaka sēklinieku diferenciāciju embrionālās attīstības laikā, gandrīz vienmēr ir neskarts. Šī gēna izmaiņas notiek reti, un, ja notiek, tad tās noved pie vīrišķā dzimuma nomaiņas pret sievišķo. Y hromosomas strukturālās izmaiņas – mikrodelēcijas – novērojamas Y hromosomas garajā plecā un fenotipā izpaužas kā vīrieša neauglība (Raicu et al., 2003).

Nav šaubu, ka Y hromosomas mikrodelēcijas ir saistītas ar spermatogēnēzes traucējumiem, jo nevienā no daudzajiem pētījumiem tās nav atrastas vīriešiem ar normāliem spermas rādītājiem (Krausz et al., 2006). Tā kā dažos gadījumos spermatozoīdi, lai arī samazinātā skaitā, veidojas arī vīriešiem ar Y mikrodelēcijām (piem., *AZFc* delēcijas) un apaugļošanās rezultātā var iestāties grūtniecība, tad Y mikrodelēcijas labāk uzskatīt par oligozoospermijas (samazināts spermatozoīdu skaits) vai azoospermijas (spermatozoīdu trūkums) iemeslu. Turklāt vīrieša neauglības fenotips ir atkarīgs no tā, kurš Y hromosomas *AZF* rajons ir skarts (Simoni et al., 2004).

Pilna *AZFa* rajona mikrodelēcijas atbild par Sertoli šūnu sindromu (Sertoli cell only syndrome; izlocītajos sēklas kanāļos var atrast tikai pirmējās vīrišķās dzimumšūnas – spermatogonijus) un azoospermiju (Vogt et al., 1996; Krausz et al., 2000; Kamp et al., 2001; Kleiman et al., 2001; Hopps et al., 2003). Šīs mikrodelēcijas dēļ izlocītajos sēklas kanāļos spermatozoīdi nenobriest un nenoformējas, un vīrietim ar šo mikrodelēcijas veidu nav iespējams tik piepēcnācēja arī ar *ICSI* tehnikas palīdzību.

Arī pilna *AZFb* rajona vai *AZFb* un *AZFc* rajonu mikrodelēciju gadījumā sēklinieku histoloģiskā aina parāda *SCOS* vai spermatogēnēzes traucējumus, kuru rezultātā attīstās azoospermija. Arī šajos gadījumos nerekomendē veikt mākslīgo apaugļošanu (Simoni et al., 2004).

AZFc rajona delēcijas raksturojas ar variablu klīnisko un histoloģisko fenotipu (Reijo et al., 1996; Luetjens et al., 2002; Oates et al., 2002). *AZFc* rajona delēcijas sastop vīriešiem ar azoospermiju vai smagu oligozoospermiju, un retos gadījumos tās var būt

pārmantotas no tēva dēlam dabīgā ceļā. Līdz ar to vīrietis ar AZFc delēciju var kļūt par tēvu ar mākslīgās apaugļošanas palīdzību, taču dēli arī mantos AZFc delēciju un būs neauglīgi (Simoni et al., 2004).

1.5.1. Y hromosomas mikrodelēciju kandidātģēni

Gēni, kas lokalizēti minētajos trīs AZF reģionos, kodē RNS saistošos proteīnus un var būt iesaistīti gēnu ekspresijas regulācijā, RNS metabolismā, RNS procesēšanā un tās transportā caur kodola porām, kā arī RNS splaisīgā (Skaletsky et al, 2003).

Vairāki gēni, kas atrodas AZF reģionos, tiek ekspresēti sēkliniekos un tādēļ var tikt uzskatīti par "AZF kandidātģēniem". Tomēr, pamatojoties uz neauglīgo pacientu pētījumiem, tikai daži no minētajiem gēniem patiešām var būt atbildīgi par AZF fenotipu.

Gēns *RBMV* (RNS-saistošais motīvs, Y hromosoma) bija pirmais no AZF kandidātģēniem, kurš tika atklāts (izolēts 1993. gadā) un klonēts, izmantojot pacienta DNS, kurā bija Y hromosomas garā pleca proksimālā rajona delēcija (Ma et al., 1993). Vēlāk tika noskaidrots, ka patiesībā tā ir gēnu saime ar 20 – 50 gēniem un pseidogēniem, kas atrodami abos Y hromosomas plecos, iekļaujot arī gēnu klasteri AZFb reģionā. Šo gēnu klasteri tāpēc nosauca par gēnu *RBMV* saimi. Pētot šo gēnu nozīmi spermatogēnēzē, tika noskaidrots, ka tie tiek ekspresēti sēkliniekos izlocītajos sēklas kanāliņos tikai vīrišķo dzimumšūnu priekštečos: spermatogonijos, spermatocītos un spermatīdās. Gēnu *RBMV* patiesā funkcija vīrišķo dzimumšūnu attīstībā vēl joprojām ir neskaidra. Gēni *RBMV* tiek uzskatīti par svarīgākajiem AZFb reģiona kandidātģēniem, pamatojoties, pirmkārt, uz to ekspresiju sēkliniekos, otrkārt, tāpēc, ka to trūkums novērots daļai neauglīgu pacientu, un, treškārt, šiem gēniem ir atklāts homologs *Rbm* gēns peles genomā, kura delēcija izraisa peļu tēviņu neauglību.

Divus gadus vēlāk tika identificēts nākamais AZF kandidātģēns, kurš lokalizēts AZFc reģionā. Mēģinot atrast korelāciju starp smagiem spermatogēnēzes traucējumiem un biežām *de novo* mikrodelēcijām Y hromosomā, tika klonēts cits gēns, kurš atbilst Y hromosomas garā pleca distālās daļas DNS fragmentam (Reijo et al, 1995). Šī fragmenta delēcija pirms tam tika novērota pacientam ar azoospermiju. Gēnu nosauca par *DAZ* gēnu – deletēts azoospermijas gadījumā (*deleted in azoospermia*), un sākotnēji uzskatīja, ka tas

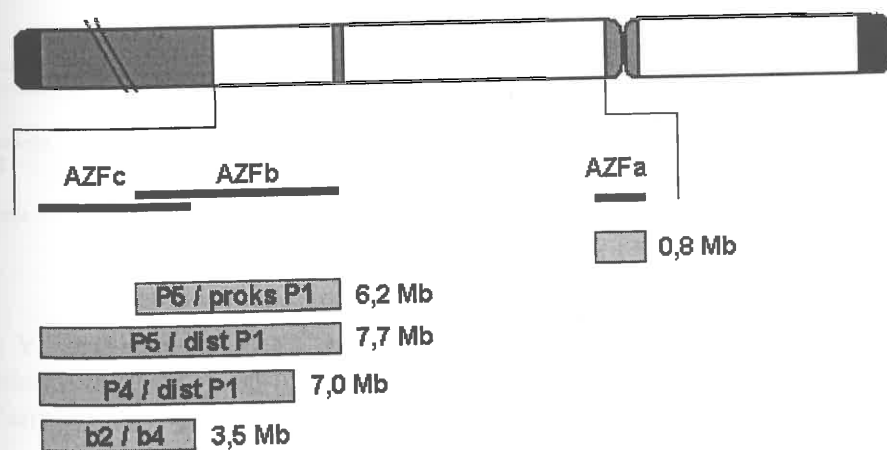
ir viens gēns. Turpmākie pētījumi pierādīja, ka gēns *DAZ* ir multigēnu saimes loceklis, kas ir vairāk nekā vienā kopijā Y hromosomā, respektīvi, AZFc reģionā (Vogt et al., 1997). Līdz ar to gēnu *DAZ* pārdēvēja par “*DAZ* gēnu saimi”. *DAZ* gēnu transkriptu skaits nav zināms. Izmaiņas *DAZ* gēnu kopiju skaitā ir pierādītas, izmantojot fluorescento *in situ* hibridizāciju, “reālā laika” polimerāzes ķēdes reakciju (*real time polymerase chain reaction, RT-PCR*) un sekvenču radniecisko variantu analīzi (*sequence family variant analysis, SFV*) (McElreavey et al., 2007). Līdz ar to tika pierādīts, ka katrs indivīds satur divus vai vairākus *DAZ* gēnu transkriptu variantus (apakšgrupas), kuri atšķiras pēc diviem parametriem: gan pēc kopiju skaita, gan *DAZ* atkārtojumu izvietojuma transkriptā. Šie *DAZ* transkripti, iespējams, radušies no viena gēna alternatīvā splaisinga rezultātā vai arī no dažādiem *DAZ* gēniem. Tāpat kā gēns *RBMY* (AZFb kandidātgēns), gēns *DAZ* tiek transkribēts un translēts proteīnos tikai vīrišķajās dzimumšūnās: spermatogonijās, spermatīdās un spermatozoīdos. Gēns *DAZ* ir atrasts tikai cilvēku, necilvēkveidīgo pērtiķu (baboni un makaki) un cilvēkveidīgo pērtiķu Y hromosomā. Visos citos zīdītājos tas ir autosomās lokalizēts gēns, kas pārstāvēts vienā kopijā. Iespējams, ka evolūcijas gaitā gēns *DAZ* nonācis Y hromosomā no tā autosomālā homologa *DAZL1*, kas atrodas trešās hromosomas īsajā plecā (3p24) vienā kopijā. Arī gēns *DAZ* nav vienīgais gēns, kas atrodams Y hromosomas garā pleca distālajā daļā, taču fakts, ka bieži gēna *DAZ* delēcijas novērojamas neauglīgiem vīriešiem, padara šo gēnu par galveno AZFc reģiona kandidātgēnu. Šis fakts tiek apstiprināts ar gēna *DAZ* homologo augļu mušīņas *Drosophila* neauglības gēnu *boule*, kura mutācijas ir cēlonis spermatogēnēzes traucējumiem (Burgoyne et al 1996; Eberhart et al 1996). Turklāt samērā nesen pierādīta gēna *DAZ* loma spermatogēnēzē. Cilvēka *DAZ* transgēns (gēns, kas ar ģenētiskās inženierijas metodēm pārņemts no viena organisma citā) spēj daļēji atjaunot peles auglību, ja eksperimentos iepriekš veikta peles homologā gēna *Dazl* inaktivācija (Foresta et al 2001). Bez gēna *DAZ* AZFc reģionā kartēti vairāki citi gēni: *CDY1* (*testis-specific chromodomain protein Y-1*), *BPY2* (*testis-specific basic protein Y-2*), *PRY* (*testis-specific PTP-BL-related Y protein*) un *TTY2* (*testis-specific transcript Y-2*). Šo gēnu funkcija nav zināma, bet tiem ir līdzīgas īpašības: sastopami vairākās kopijās Y hromosomā, tiek ekspresēti tikai sēkliniekos (Foresta et al., 2001).

AZFa reģiona struktūra un tam raksturīgie gēni noskaidroti vēlāk nekā AZFb un AZFc gēni, un šī reģiona analīze neauglīgos vīriešos liecina, ka AZFa kandidātģēni varētu būt trīs (Lahn et al., 1997; Brown et al., 1998). Pirmais gēns, kas atklāts AZF rajonā un tā delēcija sastopama neauglīgiem pacientiem, bija gēns *DFFRY* (*fat facets-like, Drosophila, Y-linked*), kuru vēlāk pārdēvēja par *USP9Y* gēnu (*ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked*). Šis gēns būtiski atšķiras no citiem AZF kandidātģēniem – gēniem *DAZ* (AZFc kandidātģēns) un *RBM1* (AZFb kandidātģēns), jo nekodē RNS saistošu proteīnu (kā divi iepriekš minētie), bet funkcionē kā ubikvitīna hidrolāze (*ubiquitin hydrolase*). Šis gēns ir pārstāvēts arī vienā kopijā Y hromosomā, un tam ir homologs gēns X hromosomā, kas X hromosomas inaktivācijas laikā sievišķiem indivīdiem netiek inaktivēts, kā arī tiek ekspresēts dažādos audos (Lahn & Page, 1997). *USP9Y* aizņem mazāk nekā pusi no AZFa reģiona, turklāt vairākums neauglīgu vīriešu ar AZFa reģiona delēciju parāda tieši šī gēna trūkumu (Vogt et al., 1996; Foresta et al., 1998; Ferlin et al., 1999). Nesen tika noskaidrots, ka gēna *USP9Y* delēcijas ne vienmēr saistītas ar neauglību, jo tās atrod arī vīriešiem ar normālu spermatozoīdu skaitu (Luddi et al., 2009; Tyler-Smith & Krausz, 2009). Delēcijas AZFa lokusā korelē ar Sertoli šūnu sindroma pirmo tipu (dzimumšūnu trūkums visos izlocītajos sēklas kanāliņos, *Sertoli cell only syndrome, SCOS*) un samazinātiem sēkliniekiem (Vogt et al., 1996). Pētījumi liecina par to, ka arī citi AZFa rajona gēni (*DBY* un *UTY*) varētu būt atbildīgi par spermatoģenēzes traucējumiem (Vogt et al., 2000). Sākotnējie pacientu pētījumi liecināja, ka *USP9Y* deficīts ir cēlonis neauglībai un papildus gēna *DBY* (*DEAD-box Y RNA helicase*) trūkums padara neauglības fenotipu smagāku (Sargent et al., 1999). Vēlāk veiktā daudzpusējā gēnu delēciju (gēna *DBY*) un gēnu ekspresijas analīze ļāva izveidot un pilnveidot AZFa reģiona ģenētisko karti un pierādīt, ka *DBY* ir galvenais kandidātģēns šajā Y hromosomas reģionā (Foresta et al., 2000). Šī gēna nozīme cilvēka spermatoģenēzē ir apstiprināta, pamatojoties uz gēna *DBY* homologiju ar peles proteīnu PL10, kas tiek ekspresēts tikai vīrišķajās dzimumšūnās (Foresta et al., 2000).

1.5.2. Y hromosomas mikrodelēciju rašanās mehānisms

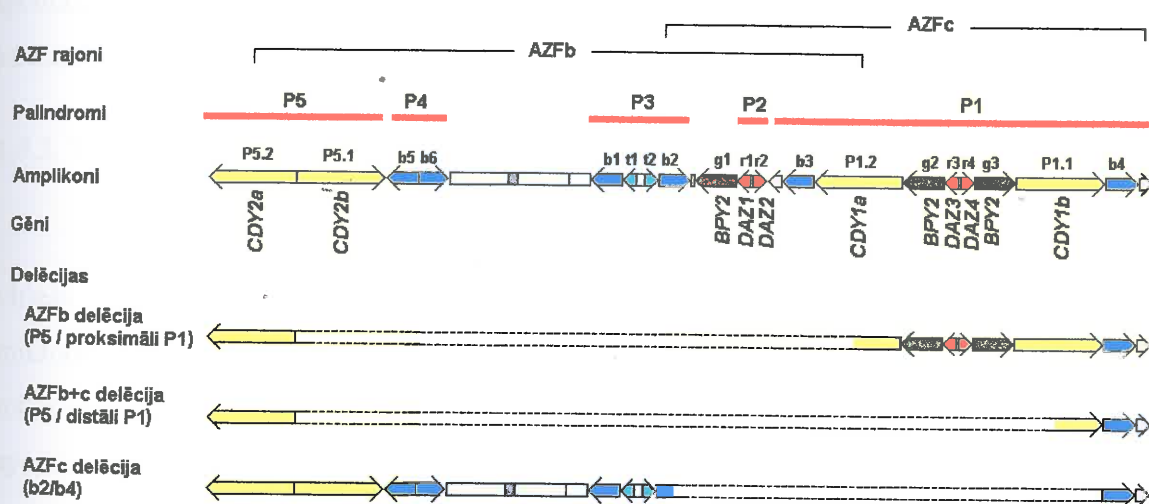
Relatīvi bieži Y hromosomas mikrodelēcijas ir *de novo* notikums, par ko liecina Y hromosomai raksturīga spontāna ģenētiskā materiāla zaudēšana. Y hromosomas nestabilitātes iemesls varētu būt saistīts ar lielu atkārtoto DNS secību klātbūtni hromosomā. Delēcijas var notikt kļūdainas rekombinācijas rezultātā starp X un Y hromosomu homologām vai vienādām sekvencēm (PAR1 un PAR2 rajoni, X un Y hromosomu homologie gēni), vai arī nelīdzsvarotu aberāciju dēļ starp Y hromosomas māshromatīdām, un, iespējams, arī DNS polimerāzes „slīdēšanas“ dēļ replikācijas laikā (polimerāze uztver atkārtotās sekvences kā DNS kļūdas un izlaiž jeb pārlec tām pāri, līdz ar to tiek pazaudēti kādi DNS fragmenti) (Raicu et al., 2003).

Y hromosomas nestabilitāti ilustrē arī tas, ka Y hromosomas mikrodelēcijas var tikt pārmantotas no paaudzes uz paaudzi, t.i., no auglīga tēva neauglīgam dēlam (Krausz et al., 1999; Chang et al., 1999). Tēva vecums arī varētu būt viens no delēciju iemesliem. Iespējams arī, ka eksistē kāds noteikts Y hromosomas haplotips, kas stimulē delēciju rašanos AZF reģionos. Tādā veidā daži indivīdi varētu būt vairāk pakļauti *de novo* mutācijām nekā citi (Raicu et al., 2003). Līdz ar pilnu Y hromosomas sekvences noskaidrošanu tika izprasts arī *de novo* mutāciju rašanās mehānisms.



1.4. attēls. Y hromosomas pilnu AZF rajonu mikrodelēciju iespējamie varianti (pēc Simoni et al., 2004). Shēmā attēloti iespējamo AZF rajonu mikrodelēciju veidi un to izmērs.

Vairākas zinātnieku grupas vienlaikus ir noteikušas AZFa rajona delēcijas rašanās mehānismu. Šīs delēcijas notiek tā sauktajās retrovīrusu sekvencēs (HERV; bagātas ar identiskām DNS secībām), kur starp identiskiem vienā virzienā vērstiem sekvenču blokiem (HERV_{Yq1} un HERV_{Yq2}) notiek homologās rekombinācijas, kuru rezultātā rodas delēcijas (Blanco et al., 2000; Kamp et al., 2000; Sun et al., 2000). Pilnas AZFa rajona delēcijas gadījumā tiek pazaudēts 792 kb liels fragments (1.4. attēls), kas satur abus AZFa rajona neauglības kandidātģēnus *USP9Y* un *DBY*. Delēcijas, kas skar tikai vienu no abiem ģēniem, ir atklātas tikai vienas zinātnieku grupas pētījumos (Foresta et al., 2000), bet pārējiem vairāk nekā 1600 pacientiem, kuru paraugus analizējušas citas grupas, viena gēna delēcija nav novērota. Nav arī iespējams parādīt, kāds ir mehānisms, kas atbildētu tikai par viena gēna delēciju, kas savukārt apstiprina to, ka AZFa rajona delēcijas rezultātā tiek pazaudēti abi ģēni (Simoni et al., 2004).



1.5. attēls. Y hromosomas AZFb un AZFc rajonu mikrodelēciju iespējamie varianti (pēc Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Repping et al., 2002; Ferlin et al., 2007; Sadeghi-Nejad & Farrakhi, 2007).

Pilnas AZFb rajona delēcijas rezultātā tiek pazaudēts 6,2 Mb (1.4. un 1.5. attēls) liels Y hromosomas fragments, kas satur 32 ģēnu kopiju un transkriptu vienības. Delēcijas iemesls ir homologā rekombinācija starp P5 palindromu (dzeltenais amplicons

P5.2) un P1 palindroma (dzeltenais amplikons P1.2) proksimālo daļu (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Repping et al., 2002).

Visbiežāk sastopamais delēciju veids neauglīgu vīriešu Y hromosomās ir klasiskās pilna AZFc rajona delēcijas (zaudēti 3,5 Mb) (1.4. un 1.5. attēls). Delēcijas iemesls ir homologās rekombinācijas starp Y hromosomas zilo (*blue*) amplikonu b2 un b4 secībām, respektīvi, starp Y hromosomas P3 un P1 palindromiem, kuru rezultātā no Y hromosomas AZFc rajona pazūd 21 gēna un transkripcijas vienību kopijas (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001).

Pilna abu AZF rajonu (AZFb un AZFc) delēcija var rasties divu notikumu dēļ: ja notiek homologā rekombinācija starp Y hromosomas palindromu P5 un P1 palindroma distālo daļu (7,7 Mb delēcija; pazaudētas 42 kopijas) vai ja notiek rekombinācijas starp palindromu P4 un palindroma P1 distālo rajonu (7,0 Mb delēcija; zaudētas 38 kopijas) (Repping et al., 2002).

Tātad Y hromosomas unikālā atkārtoto DNS nukleotīdu bagātā secība ir iemesls spontānai spermatogēnēzes nozīmīgu gēnu zaudēšanai homologisko rekombināciju dēļ, kā rezultātā attīstās spermatogēnēzes traucējumi un līdz ar to neauglība.

1.5.3. Y hromosomas mikrodelēciju biežums

Šobrīd zinātniskajos rakstos ir atrodami dati par vairāk nekā 3000 neauglīgu vīriešu un 1300 pierādītiem tēviem (Ferlin et al., 2007). Apkopojot šos datus, mikrodelēcijas atklātas tikai neauglīgiem vīriešiem, un to biežums ir ~ 7,3%. Visvairāk Y mikrodelēcijas atrastas pacientiem ar azoospermiju – 66%, mazāk vīriešiem, kuru spermatozoīdu skaits < 5 miljoni/ml – 28%, un 6% gadījumu vīriešiem, kuru spermatozoīdu skaits > 5 miljoni/ml. Šie dati liecina par to, ka mikrodelēciju biežums neauglīgu vīriešu Y hromosomās varētu būt ap 7%. Taču mikrodelēciju frekvence variē dažādās publikācijās no 1% (van der Ven et al, 1998) līdz 55% (Foresta et al, 1998). Variācijas mikrodelēciju biežumā galvenokārt ir saistītas ar dažādiem pacientu atlases kritērijiem un ar metodoloģisko pieeju dažādībām (Krausz & Forti, 2006).

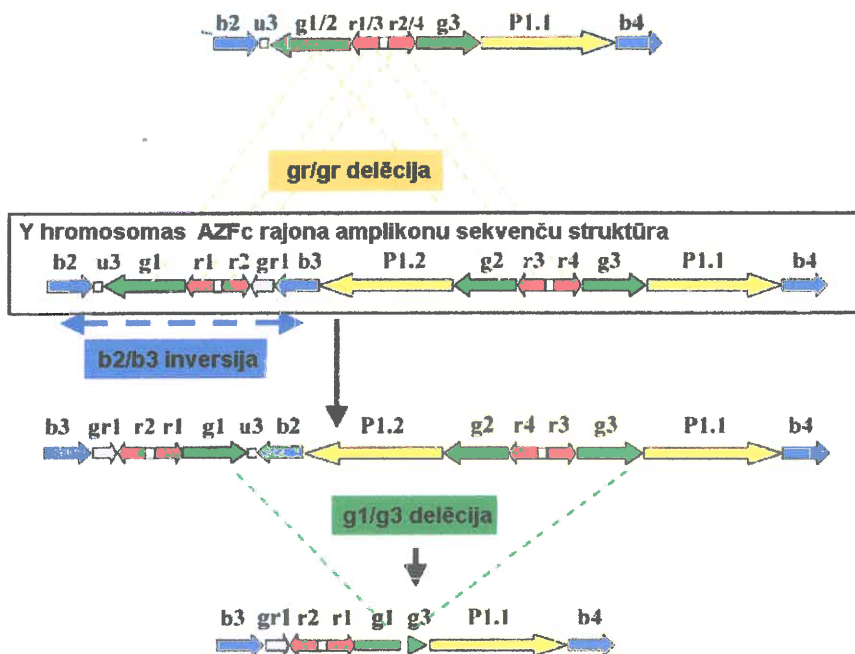
Biežāk mikrodelēcijas atrod AZFc rajonā, kas ir 79% no visām Y mikrodelēcijām, tad seko AZFb (9%) un AZFb+c (6%) vai arī AZFa+b+c (3%) delēciju varianti, reti sastopamas arī AZFa rajona delēcijas (3%) (Simoni et al., 2004).

1.5.4. Daļēja AZFc rajona delēcija un Y hromosomas polimorfisms

AZFc rajona daļējo delēciju izcelsme skaidrojama ar unikālo, Y hromosomai raksturīgo, atkārtoto sekvenču bloku klātbūtni AZF rajonā (1.3. attēls).

Korelācija starp daļēju AZFc rajona delēciju un samazinātu spermatozoīdu skaitu (un/vai auglību) ir neskaidra. Dažas no šīm daļējām delēcijām izmaina normālu spermatogēnēzes gaitu, savukārt citas vīrieša auglību neietekmē. Taču šī korelācija ir kompleksa un dati, kas vienas populācijas pētījumos parāda tiešu korelāciju starp AZFc rajonā atrastu noteiktu daļējas delēciju variantu, citā populācijā var izrādīties neinformatīvi (McElreavey et al., 2007).

Zināms, ka rekombinācijas var notikt starp jebkuru amplikonu pāri, kas vērsti vienā un tajā pašā virzienā, kā rezultātā izveidojas invertēto sekvenču delēcija, savukārt šīs delēcijas ietekmē vīrieša neauglību. Izmantojot Sauzerna hibridizācijas jaunākās metodes, parādīts, ka lielākajai daļai vīriešu *DAZ* gēni ir pārstāvēti četrās kopijās, taču neliela daļa vīriešu (6%) šajā pētījumā uzrādīja, ka to Y hromosomās lokalizēti seši *DAZ* gēni (Yen et al., 2001).



1.6. attēls. Y hromosomas daļējo AZFc rajona delēciju veidi un to rašanās mehānisma shēmas (pēc Ferlin et al., 2007). Krāsainās bultiņas (katra pēc sava krāsu koda; pēc Kuroda-Kawaguchi et al., 2001) atspoguļo attiecīgās amplikonu secības.

Literatūrā aprakstīta liela AZFc rajona daļēja delēcija, ko nosauc par **g1/g3 delēciju** (1.6. attēls), kas ietver u3 sekveni un divus DAZ gēnus: *DAZ3* un *DAZ4* (Fernandes et al., 2004). Citas zinātnieku grupas darbs parāda, ka šī delēcija ietver arī gēnu *CDY1b* (šo delēciju par u3-gr/gr). Šī delēcija, domājams, radusies inversijas rezultātā, skārusi secību, kas atradās starp b2/b3 amplikoniem, kam sekoja rekombinācija starp g1 un g3 secībām, un rezultātā notika invertētās secības un DAZ3/4 rajona delēcija (Machev et al., 2004).

Otrs šīs delēcijas rašanās variants varētu būt gr/gr inversija (g1, r1, r2 rekombinējās ar r3, r4, g3), kam seko b2/b3 delēcija (Repping et al., 2004). Domājams, ka pastāv abi mutāciju rašanās ceļi. Veicot interfāzes kodolu analīzi vīriešiem, kas pārstāvēja 44 dažādas Y hromosomu līnijas, 4 no 44 indivīdiem saturēja gr/gr inversiju, bet 3 no 44 Y hromosomā novēroja b2/b3 inversiju (Repping et al., 2004). Šīs delēcijas (iespējami trīs nosaukumi g1/g3, u3-gr/gr vai b2/b3) dēļ tiek pazaudēta liela daļa AZFc rajona, kas ietver 12 gēnus vai transkriptus, kuri ekspresējas sēkliniekos. Līdz ar to rodas jautājums, cik nopietna ietekme šai delēcijai ir uz vīrieša auglību. Tās biežā sastopamība dažās populācijās liecina par to, ka šī delēcija varētu būt polimorfisms ar nelielu efektu uz auglību vai arī tai nav nekādas ietekmes (McElravey et al., 2007).

Otras lielas AZFc rajona daļējās delēcijas rezultātā (1.6. attēls) tiek pazaudēts 1,6 Mb segments, kas satur divas citas DAZ gēnu kopijas (*DAZ1* un *DAZ2*). Šī delēcija sākotnēji atklāta pieciem no 63 oligozoospermijas paraugiem, bet 107 auglīgu vīriešu kontroles grupas paraugi šo delēciju neuzrādīja, kas varētu liecināt, ka *DAZ1* un *DAZ2* gēnu zudums ir cēlonis samazinātam spermatozoīdu skaitam šo oligozoospermijas pacientu gadījumā (Fernandes et al., 2002). Pēc tam, kad citi zinātnieki šo delēciju novēroja 22 indivīdiem no 689 analizētajiem vīriešu DNS paraugiem, tiek pieņemts delēcijas apzīmējums – **gr/gr delēcija** (iespējami arī šādi nosaukumi: g1/g2, r1/r3 un r2/r4) (Repping et al., 2003). Šajā asociāciju pētījumā gr/gr delēcijas tika atrastas 9 no 237 (3,7%) vīriešiem, kuru neauglības iemesls nav zināms (idiopātiska neauglība). Savukārt pētījumā analizētajiem 148 vīriešu paraugiem, kuru spermatoģenēze bija normāla, šī gr/gr delēcija netika atklāta. Iegūtie dati liecina, ka gr/gr delēcija korelē ar samazinātu spermatozoīdu veidošanos un ir uzskatāma par nozīmīgu spermatoģenēzes traucējumu riska faktoru. Taču šī asociācija starp gr/gr delēciju un neauglību nav tik

vienkārša. Šajā pašā pētījumā autori nosaka katra parauga piederību noteiktai Y hromosomas līnijai vai Y haplogrupai (skatīt vēlāk). Paraugi ar gr/gr delēciju tika atrasti 14 dažādās/neradnieciskās Y hromosomas haplogrupās. Tas norāda, ka šī delēcija cilvēka evolūcijas gaitā ir notikusi vairākkārt. No analizētajiem paraugiem 12 pārstāvēja D2b haplogrupu, un visi saturēja gr/gr delēciju, kas varētu liecināt, ka šis delēcijas variants ir raksturīgs šai haplogrupai. Savukārt tas, ka gr/gr delēcija bija pārstāvēta arī citās haplogrupās, liecina par šī delēcijas veida limitētu ietekmi uz neauglību (Repping et al., 2003).

Vēlāk pierādīts, ka pacientiem ar samazinātu spermatozoīdu skaitu, salīdzinot ar indivīdiem, kam spermas rādītāji atbilst normai, biežāk novērojamas ne tikai gr/gr (ietver *DAZ1* un *DAZ2* gēnus), bet arī g1/g3 (ietver *DAZ3* un *DAZ4* gēnus) delēcijas (Ferlin et al., 2005). Turklāt vēl ir daudzi pētījumi, kuros neatrod gandrīz nekādu vai pilnīgi nekādu korelāciju ar šīm AZFc rajona daļējām delēcijām un traucētu spermatogēzi. Tā, piemēram, etnisko vāciešu populācijā pētot 348 vīriešus ar azoospermiju vai smagu oligozoospermiju, gr/gr delēcijas atrada 4% gadījumu, un normospermisku vīriešu kontroles populācijā gr/gr delēciju biežums bija 1,8%, kas neparāda stipru asociāciju (Hucklenbroich et al., 2005). Līdzīgi rezultāti iegūti arī citu zinātnieku darbos (Machev et al., 2004; Ravel et al., 2006).

Dažos gadījumos daļējās delēcijas ir saistītas ar sekundārām Y hromosomas rajonu duplikācijām. Vienā no sākotnējiem AZFc daļējo delēciju pētījumiem, izmantojot fluorescento *in situ* hibridizācijas metodi, analizējot 22 vīriešu DNS paraugus ar gr/gr delēciju, divos paraugos atklāja sekundāru duplikāciju (Repping et al., 2004). Šī sekundārā duplikācija (b2/b4) tika atrasta arī citā pētījumā, un, iespējams, ka šī duplikācija ir izmainījusi gr/gr delēcijai raksturīgo neauglības fenotipu (Machev et al., 2004). Šī ideja tālāk tika attīstīta, balstoties uz novērojumu, ka aptuveni 6% gadījumu vīriešu Y hromosomās *DAZ* gēni ir pārstāvēti sešās kopijās (Yen et al., 2001). Pēc šo pētījumu datiem, ir izteiktas hipotēzes, ka gr/gr delēcijas var attīstīties dzīves laikā, padarot auglīgu vīrieti – neauglīgu. Iespējams, ka šīm delēcijām lielāka nozīme ir nevis spermatozoīdu skaita redukcijā, bet gan spermatozoīdu kustīgumā un morfoloģijā (McElreavey et al., 2007).

Lai atrisinātu šīs neskaidrības AZFc daļējo delēciju saistībā ar vīriešu auglību, nepieciešami liela mēroga pētījumi, kuros izmantotu klīniski labi raksturotus normospermisku indivīdu un neauglīgu – azospermisku vai oligozoospermisku pacientu DNS paraugus no dažādām etniskām grupām un analizēs izmantotu daudzus informatīvus AZFc rajona marķierus (McElreavey et al., 2007).

1.6. Y hromosomas “neauglības” haplogrupas

Pateicoties tam, ka starp X un Y hromosomām nenotiek (izņemot PAR rajonus) rekombinācija, Y hromosoma tiek pārmantota no tēva dēlam neizmainītā veidā, līdz ar to no paaudzes uz paaudzi tiek nodota viena un tā pati ģenētiskā informācija ar tai raksturīgajiem funkcionālajiem variantiem un neitrālajiem polimorfismiem. Y hromosomas variantu, kam raksturīgi noteikti polimorfismi, kurus var noteikt ar stabiliem bināriem marķieriem, tādiem kā viena nukleotīda polimorfismi (*SNP*) vai insercijām/delēcijām, sauc par Y hromosomas līniju vai haplogrupu (Y Hg). Savukārt, lai definētu Y hromosomas haplogrupas apakšvariantus – haplotipus, tiek izmantoti mikrosatelīti, kas ir variabli dažādās populācijās. Daudzi asociāciju pētījumi ir noteikuši Y haplogrupu izplatību dažādās populācijās un arī to biežumu neauglīgiem vīriešiem (Krausz et al., 2001a; Arredi et al., 2007; Yang et al., 2008; Krausz et al., 2009). Ir zināms, ka Y Hg dažādība ir specifiska noteiktai ģeogrāfiskai vietai un to daudzveidība variē dažādās populācijās (Jobling & Tyler-Smith, 2003). No vīriešu neauglības viedokļa, šie pētījumi ir interesanti, jo, iespējams, varētu identificēt Y hromosomas variantus, kas palielina neauglības risku, tā saucamās neauglības haplogrupas.

Tā kā tika noskaidrots, ka visi polimorfie cilvēka Y hromosomas sekvenču varianti, kurus izmanto populāciju pētījumos, atrodas izklaidus pa visu Y hromosomu un arī AZF rajonā nav atrasti tikai šim rajonam raksturīgi haplogrupu nosakoši polimorfismi, tad sākotnēji nedomāja, ka Y hromosomas haplogrupas varētu saistīt ar samazinātu auglību (Carrell, 2007). Šobrīd ir zināmi daži izņēmumi, kuri neļauj apgalvot, ka tā saucamās neauglības haplogrupas nepastāv (Vogt et al., 2005).

Jau 1999. gadā tika publicēti dati par Itālijas populācijas pētījumiem un iespējamo haplogrupas P (Hg P) asociāciju ar neauglību. Statistiski ticamus rezultātus izdevās

parādīt, pētot P haplogrupas izplatību. Hg P sastopamība kontroles populācijas paraugos bija 42%, savukārt neauglīgu vīriešu paraugos šīs haplogrupas biežums bija 24% (Previdere et al., 1999). Taču šajā pētījumā neauglīgu vīriešu paraugi galvenokārt tika iegūti no Centrālās Itālijas, bet kontroles paraugi pārstāvēja dažādus Itālijas reģionus. Vēlāk tika veikts pētījums, kurā kontrolgrupas paraugi tika izvēlēti no Centrālās Itālijas. Tad Hg P izplatība abās paraugkopās – gan neauglīgu vīriešu (26%), gan kontroles grupā (27%) – bija ļoti līdzīga un statistiski ticamas atšķirības neparādīja (Tyler-Smith, 2008).

Pētījumos, kas aptvēra vairākus Eiropas reģionus (Paracchini et al., 2000; Quintana-Murci et al., 2001; Carvalho et al., 2003), netika atrasta haplogrupu un neauglības korelācija, taču citi zinātnieki, detalizēti atlasot kontroles un Y mikrodelēciju paraugus, pētīja jau pieminēto Centrālītāliju un novēroja palielinātu saitību AZFc rajona daļējām delēcijām ar Y hromosomas haplogrupu E (Arredi et al., 2007). Savukārt Ķīnas Dienvidrietumu apgabala pētījumos lielāka saistība tika novērota Hg O* (Yang et al., 2008). Dānijas populācijā samazināta auglība tika novērota vīriešiem ar Hg K* (Krausz et al., 2001a).

Savukārt Japānas populācijā azoospermijas fenotips tiek asociēts ar Hg D2b. Pētījums parāda, ka vīriešiem ar samazinātu spermatozoīdu koncentrāciju 30 – 40 % gadījumu ir atrastas gr/gr delēcijas un tās reprezentē Hg D2b. Taču, no otras puses, novērotā saistība starp Hg D2b un samazinātu spermatozoīdu skaitu nav pārliecinoša, jo lielākā daļa populācijas pārstāvju, kas pieder šai haplogrupai, ir ar normāliem spermatoģenēzes rādītājiem (40 miljoni mililitrā) (Kuroki et al., 1999; Ewis et al., 2002). Citi zinātnieki (Vogt et al., 2005), aplūkojot šo darbu detalizētāk, konstatē, ka gr/gr delēcijas un Hg D2b asociācijas pētījumā autori nav analizējuši iespējamo b2/b4 duplikāciju biežumu Japānas vīriešu paraugos. Šīm duplikācijām vajadzētu būt biežāk sastopamām Hg D2b pārstāvjiem, jo iepriekš pētījumos (Yen et al., 2001) ir noteikta tieša korelācija ar duplikācijām un to ietekmi uz neauglību. Līdz ar to iespējams, ka vīriešiem ar D2b Y hromosomas variantu ir lielāks spermatoģenēzes traucējumu risks nekā vīriešiem, kas pārstāv citas haplogrupas (Vogt et al., 2005).

Tā kā AZFc rajonu galvenokārt veido Y hromosomas amplikonu secības, tad šajā rajonā, kā jau iepriekš pieminēts, notiek daudzas inversijas un delēcijas. Tiek uzskatīts, ka b2/b3 inversija (g1/g1 delēcija), pretēji gr/gr inversijai, raksturīga Hg O (Repping et

al., 2004). Līdzīgi ģenētiskie pārkārtējumi AZFc rajonā, kas rodas g1/g3 rekombināciju rezultātā (kuras pamatā ir b2/b3 inversija), raksturīgi Hg N. Savukārt citas zinātnieku grupas pētījumos novērots, ka b2/b3 pārkārtējumi ir sastopami ne tikai Hg N gadījumā, bet arī vīriešiem, kas pārstāv Hg F* un Hg I (Machev et al., 2004).

Klasiskās AZFc rajona mikrodelēcijas (b2/b4 delēcija) rezultātā tiek pazaudēti deviņi gēni, kas ietver pārstāvjus no trim gēnu saimēm *BPY2*, *DAZ* un *CDY1* un fenotipā gandrīz vienmēr izpaužas kā spermatogēnēzes traucējumi (Kuroda-Kawaguchiet al., 2001). Pretēji tam, g1/g3 delēcijas (b2/b3 delēcijas), kas ir daļēja iepriekš minētā rajona delēcija, rezultātā tiek zaudēti pieci gēni no deviņiem, kas neatstāj ietekmi uz vīrieša auglību (Fernandes et al., 2004; Repping et al., 2004). Tā kā g1/g3 delēcijas variants ir raksturīgs vīriešiem ar normālu spermatogēnēzi, kas pārstāv Hg N, tiek uzskatīts, ka Hg N pārstāvjiem, zaudējot kādus gēnus no iepriekš pieminētajām gēnu saimēm, var rasties b2/b4 delēcija, kas noved pie spermatogēnēzes traucējumiem (Tyler-Smith 2008).

Y hromosomām, kas pieder pie Hg N3*, raksturīgas g1/g3 delēcijas, kas norāda, ka šī delēcija AZFc rajonā ir izcēlusies no viena kopīga senča. Līdz ar to iespējams, ka visas Y hromosomas, kas pieder Hg N, satur šo delēciju. Ja tā ir, tad iespējams diskutēt arī par Hg N biežumu un izplatību. Šī haplogrupa pārstāv 12% no visām pasaulē izplatītajām haplogrupām, un visvairāk Hg N ir izplatīta Ziemeļeiropā, piemēram, tā sastopama ~52% somu populācijā, savukārt Ziemeļāzijā jakutu populācijā tās biežums ir ~86% (Zerjal et al. 1997). Tiek uzskatīts, ka kopējais Hg N sencis ir dzīvojis pirms ~8800 – 3200 gadiem (Hammer & Zegura, 2002). Pēc publicētajiem datiem iespējams secināt, ka, pirmkārt, šī Y hromosomas līnija ir vecākā un no reproduktīvā viedokļa veiksmīgākā un, otrkārt, tā parāda, ka *DAZ3/DAZ4* gēnu delēcijai (g1/g3 delēcija) nav nekādas lomas vīriešu neauglības attīstībā. Savukārt visas gr/gr delēcijas veidojas citu Y hromosomas AZFc rajona struktūras pārkārtējumu rezultātā un atšķiras no Hg N pārstāvjiem raksturīgās sekvences. Tāpēc gr/gr delēciju gadījumā tās ir raksturīgas citām haplogrupām, bet ne Hg N (Fernandes et al., 2004).

Y hromosomas “neauglības haplogrupu” pētījumos ir jāstopas ar vairākām grūtībām. Atklāti dažādi Y hromosomas AZFc rajona daļējo delēciju polimorfismi, kas atbilst dažādām haplogrupām, piemēram, D, E, K, O un N, un, iespējams, vēl citām šobrīd neidentificētām haplogrupām. Līdz ar to rodas jautājums, pirmkārt: kuri Y hromosomas

gēni AZF rajonā tiešām ir svarīgi spermatogēnei un to delēcijas patiešām ir cēlonis klīniski novērojamai sēklinieku patoloģijai? Otrkārt: kuras gēnu delēcijas ir neitrālas (polimorfās)? Treškārt: kuri AZF rajonu gēni ietekmē spermatogēzes procesus kopā ar kādiem citiem svarīgiem Y hromosomas vai citu hromosomu gēniem (arī vēl nezināmiem), kas atbild par vīrieša auglību, kā šo gēnu delēcijas ietekmē vīrieša auglību, un vai ir iespējamās šo variantu atšķirības starp populācijām (Vogt et al., 2004)?

Cits šo pētījumu klupšanas akmens ir cilvēka genoma projektā iegūtā Y hromosomas sekvenca (references sekvenca), kas tiek ņemta par pamatu Y hromosomas polimorfismu un arī šo neauglības haplogrupu pētījumos. Noskaidrots, ka Y hromosomas references sekvenca pieder vīrietim ar nezināmiem auglības rādītājiem un pārstāv Hg R (Fernandes et al., 2004). Ja šī references Y hromosoma būtu bijusi Hg N pārstāve, tad būtu bijis vieglāk spriest par AZFc rajona amplikonu struktūru, taču nebūtu iespējams izprast AZFc rajona dažādos pārkārtojumu variantus un daļējās šī rajona delēcijas. Šobrīd datu bāzē pieejamā Y hromosomas references sekvencē trūkst arī citi sekveču reģioni, kas satur informāciju par citām Y Hg (Vogt et al., 2005). Lai novērstu aprakstīto problēmu, tiek ieteikts sekvenēt visu AZFc reģionu, ja tas pārstāv dažādas haplogrupas, līdz ar to, iespējams, ka šī pieeja varētu dot nozīmīgāku un precīzāku informāciju par šī amplikoniem bagātā rajona evolūciju, funkcionālo un klīnisko nozīmi (Novaro-Costa et al., 2007).

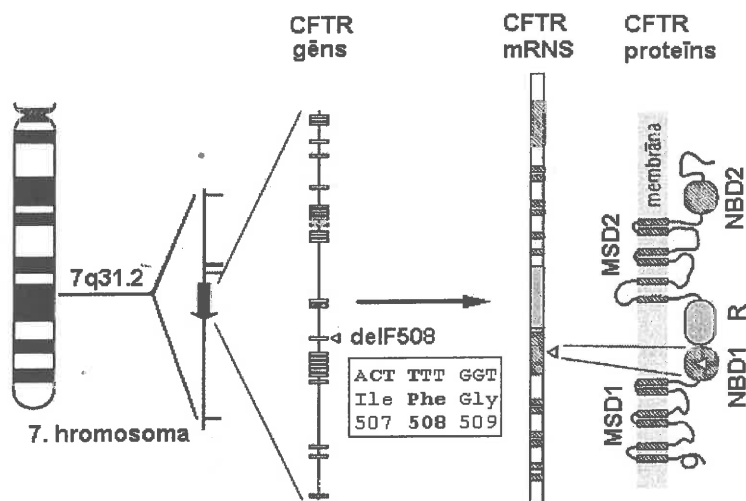
Tomēr svarīgi atzīmēt, ka Y hromosomas haplogrupu asociācija ar neauglību nav aplūkota plānveida pētījumos. Ir pētījumi, kuros Y Hg analīze veikta neauglīgu pacientu DNS paraugiem un salīdzināta ar attiecīgajā populācijā raksturīgiem Y Hg variantiem, bet statistiski ticama saistība nav atrasta (Paracchini et al., 2002; Lu et al., 2007) vai, tieši pretēji, atrastas nozīmīgas atšķirības (Kuroki et al., 1999; Krausz et al., 2001a; Yang et al., 2008). Jāatzīmē, ka dažreiz, atkārtojot analīzes, nav iespējams pierādīt atšķirības (Carvalho et al., 2003). Citas zinātnieku grupas haplogrupu analīzi izmanto kā papildu aspektu, pētot dažādus AZFc rajona daļējo delēciju variantus (Krausz et al., 2009; Navarro-Costa et al., 2010).

1.7. Gēns *CFTR* un vīrieša neauglība

1.7.1. Gēna *CFTR* raksturojums un biežākās mutācijas

Cistiskā fibroze (CF), kuras izcelsmē ir iesaistīts gēns *CFTR*, ir dzīvildzi samazinoša autosomāli recesīva slimība. Simptomi ir šādi: obstruktīva plaušu slimība, aizkuņģa dziedzera darbības traucējumi, gastrointestinālā trakta obstrukcija, paaugstināta elektrolītu koncentrācija sviedros, vīriešiem izpaužas kā sēklas vada trūkums (*vas deferens*) un līdz ar to neauglība.

Gēns, kas atbild par cistisko fibrozi, pirmo reizi tika identificēts 1989. gadā (Rommens et al., 1989), un tas lokalizēts cilvēka 7. hromosomas garajā plecā (7q31.2). *CFTR* gēns ir aptuveni 230 kb garš un sastāv no 27 eksoniem (1.7. attēls).



1.7. attēls. *CFTR* gēna un tā kodētā proteīna shematiskais attēlojums (modificēts pēc Rommens et al., 1989; Zielenski, 2000). Attēla kreisajā pusē attēlota *CFTR* gēna vieta 7. hromosomā. Centrā *CFTR* gēna shematiskais attēlojums un CF pacientiem biežāk satopamā mutācija delF508. Labajā pusē *CFTR* proteīna shēma.

Gēns *CFTR* kodē cistiskās fibrozes transmembrānas regulatoro proteīnu (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), kuru veido 1480 aminoskābes. *CFTR* proteīns pēc savas funkcijas ir hlora jonu kanāls, kas atrodams šūnas plazmatiskajā membrānā. Visvairāk šis proteīns tiek ekspresēts plaušu, aknu, aizkuņģa dziedzera un

ādas šūnās, bez tam vīriešiem – sēklas izviedējvada, sēklas pūslīšu, sēklas vada un sēklinieka piedēkļa šūnās. Mutācijas gēnā *CFTR* ir iemesls dažādiem šī proteīna defektiem, kuru dēļ savukārt var attīstīties tādas slimības kā cistiskā fibroze un iedzimts bilaterāls sēklas vada trūkums (*congenital bilateral absence of the vas deferens*, CBAVD) (Harris, 1992).

CFTR proteīns pēc olbaltumvielu klasifikācijas pieder ABC transporta proteīnu grupai (ATF saistošais proteīns). Salīdzinot *CFTR* proteīnu ar citiem zināmiem ATF saistošiem proteīniem, tas sastāv nevis no četriem, bet gan no pieciem domēniem – diviem transmembrānu domēniem (MSD1 un MSD2), kas veido hlora jonu kanālu, diviem nukleotīdus saistošiem domēniem (NBD1 un NBD2), kas saista un hidrolizē ATF, un regulatoro domēnu (R) (1.7. attēls). *CFTR* proteīns ir vienīgais zināmais ABC grupas pārstāvis, kuram ir regulatorais domēns, kura fosforilēšana vai defosforilēšana nodrošina hlora jonu transporta regulāciju šūnā (Riordon et al., 1989).

Aptuveni 70% gadījumu cistiskās fibrozes pacientu DNS paraugos atrod trīs nukleotīdu delēciju gēnā *CFRT* 10. eksonā. Šīs delēcijas rezultātā tiek zaudēta aminoskābe fenilalanīns (Phe), kas atrodas proteīna sekvenču 508. pozīcijā (1.7. attēls). Līdz ar to šo mutāciju ir pieņemts apzīmēt kā delF508. Normāla gēna *CFTR* gadījumā šūnas citoplazmā tiek sintezēts pareizs *CFTR* proteīns, kas tālāk tiek transportēts uz endoplazmatisko tīklu un Goldži kompleksu tā tālākai procesēšanai. Visbeidzot *CFTR* proteīns tiek integrēts šūnas plazmatiskajā membrānā un funkcionē kā hlora jonu kanāls. DelF508 mutācijas gadījumā tiek zaudēta aminoskābe fenilalanīns, kura normāli ietilpst pirmā nukleotīdus saistošā domēna (NBD1) sastāvā. Kad šāds *CFTR* proteīns ar delF508 mutāciju sasniedz endoplazmatisko tīklu, šūnas kontroles mehānisms atpazīst defektīvo proteīnu un iznīcina to, kā rezultātā proteīns netiek integrēts šūnas membrānā. Personām, kas ir homozigotiskas pēc šīs mutācijas, attīstās slimības smagā forma, jo šūnās nav hlora jonu kanālu. Līdz ar to ir izjaukts nātrijs un hlora jonu līdzsvars šūnās, kas noved pie biežas konsistences organisma sekrētu veidošanās un tādu orgānu kā plaušu un aizkuņģa dziedzera disfunkcijas. Vīriešiem tiek skarta arī reproduktīvā sistēma (Harris, 1992).

CFTR mutāciju izplatība dažādās populācijās ir atšķirīga. Biežāk sastopamā gēna *CFRT* mutācija delF508 ir sastopama 70% gadījumu Ziemeļeiropas populācijās, savukārt daudz mazāks šīs mutācijas biežums ir Austrumeiropas populācijās. Citas biežākās gēna

CFTR mutācijas arī izplatītas dažādās populācijās atšķirīgi, un to biežums ir 1 – 2% no gēna *CFTR* mutācijām (Cuppens & Cassiman, 2004).

Ir zināmas vairāk nekā 1600 mutācijas gēnā *CFTR* (<http://genet.sickkids.on.ca/cftr>; 2009). Lielākā daļa šo mutāciju ir radušās viena nukleotīda nomaiņas dēļ. Ir iespējams, ka vienai un tai pašai personai var būt viena vai vairākas mutācijas gēnā *CFTR*, un, vadoties pēc tā, kā šīs mutācijas ir lokalizētas cilvēka hromosomās, izšķir heterozigotus, kuriem tikai vienā gēna *CFTR* alēlē ir notikusi mutācija, cistiskās fibrozes slimniekus, kas ir homozigotiski pēc viena un tā paša mutācijas veida, vai arī kompaunda heterozigotas, personas, kuras slimo ar CF, bet to hromosomās atrodamas divas dažādas gēna *CFTR* mutācijas.

Mutācijas, kas atklātas *CFTR* gēnā var iedalīt vismaz piecās grupās:

- I. Mutācijas, kuru rezultātā tiek traucēta *CFTR* proteīna normāla izveide (biosintēze). To iemesls ir nepareizs translācijas terminācijas signāls *CFTR* mRNS molekulā. Zināms, ka puse no gēna *CFTR* mutācijām pieder šai grupai. Tādas ir nonsense mutācijas, rāmja nobīdes vai splaisa saita mutācijas, kā rezultātā proteīns netiek producēts vai tā koncentrācija ir ļoti zema.
- II. Mutācijas, kas saistītas ar defektu *CFTR* proteīna pēctranslācijas etapā. *CFTR* proteīns tiek veidots, bet nenotiek tā pareiza modifikācija (foldings), un līdz ar to arī nenotiek proteīna nobriešana (glikozilēšana). Šādi proteīni tiek novirzīti uz endoplazmatisko tīklu, bet netiek transportēti uz šūnas plazmatisko membrānu. Šīs grupas biežākā gēna *CFTR* mutācija ir delF508.
- III. Mutācijas, kuru dēļ tiek traucēta *CFTR* proteīna funkciju regulācija, līdz ar to šūnās ir samazināts aktīvu hlora jonu kanālu skaits. *CFTR* ir nepareizi aktivēts, jo mutāciju dēļ nevar notikt ATP piesaiste un hidrolīze NBD domēniem vai regulatorā (R) domēna fosforilēšana. Biežākā šīs grupas mutācija ir *missense* mutācija G551D.
- IV. Mutācijas, kuras veicina nepareizu *CFTR* proteīna darbību, izmainot Cl jonu vadītspēju. Dažas no šīs grupas mutācijām samazina Cl jonu caurlaidību (piem., R117H), citas, tieši otrādi, palielina Cl jonu plūsmu.
- V. Mutācijas, kuru dēļ ir traucēta citu jonu kanālu (piem., nātrija kanālu) darbība, kuru regulācijā pastarpināti ir iesaistīts *CFTR* proteīns.

Cistiskās fibrozes fenotipus var iedalīt smagajās un vieglajās slimības formās, kas atšķiras pēc simptomu smaguma pakāpes, kura atkarīga no CFTR proteīna daudzuma, kas tiek ekspresēts šūnas plazmatiskajā membrānā. Smagās cistiskās fibrozes formas ģenētiskā līmenī satur mutāciju (I, II vai III grupas), kas vērā ņemami samazina CFTR proteīna līmeni, savukārt vieglais slimības fenotips ir saistīts ar mutācijām (IV un V grupa), kas gēna *CFTR* funkcijas un daudzumu ietekmē vieglākā formā (Cuppens & Cassiman, 2004; Castellani et al., 2008).

1.7.2. Cistiskā fibroze (CF) un iedzimts sēklas vada trūkums (CAVD)

Zināms, ka neauglīgiem vīriešiem 25% gadījumu novēro azoospermiju. Savukārt no azoospermijas gadījumiem 30% ir reproduktīvās sistēmas daļu nosprostojuma rezultāts jeb obstruktīva azoospermija, un pārējie gadījumi raksturīgi ar primāru testikulāru disfunkciju (neobstruktīva azoospermija). Turklāt 6% obstruktīva azoospermija ir attīstījusies iedzimta abpusēja sēklas vada trūkuma dēļ (*congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD*). *CBAVD* biežums neauglīgu vīriešu grupā ir 2% (Chillon et al., 1995).

Iedzimts abpusējs *vas deferens* trūkums raksturīgs 100% ar abpusēju sēklinieka piedēkļu (*epididymis*), sēklas vadu (*vas deferens*) un 80% ar sēklas pūslīšu trūkumu. Cistiskās fibrozes vīrišķā dzimuma pacientiem *CBAVD* ir sastopams 95% gadījumu. Eksperimentos ir novērota arī CFTR proteīna ietekme uz sēklas izsviedējvada, sēklas pūslīšu, sēklas vada un sēklinieka piedēkļa distālās daļas attīstību. No klīniskā viedokļa, lielai daļai vīriešu ar *CBAVD* novērojami subklīniski cistiskās fibrozes simptomi, tādi kā nelielas novirzes no hlora jonu normālas koncentrācijas sviedros, polipi degunā un hroniski sinusīti, kas arī sākotnēji lika domāt par šo abu slimību saistību. Aptuveni 70% *CBAVD* pacientu ir vismaz viens cistiskās fibrozes simptoms vieglā formā, kas apstiprina ideju, ka *CBAVD* ir viegla vai nepilnīga cistiskās fibrozes forma.

Pamatojoties uz to, ka *CBAVD* raksturīgā klīniskā aina ir līdzīga tai, kas novērojama vīriešiem, kas slimo ar cistisko fibrozi, tika izteikta doma, ka abu šo šķietami dažādo slimību pamatā ir viens un tas pats ģenētiskais mehānisms. Šīs hipotēzes patiesums tika pierādīts, atklājot mutācijas gēnā *CFTR* ne tikai cistiskās fibrozes

pacientiem, bet arī neauglīgiem vīriešiem ar *CBAVD*.

Cistiskās fibrozes pacientiem gēna *CFTR* abās alēlēs atrodas tā saucamās smagās mutācijas, savukārt pacientiem ar mazāk smagu klīnisko ainu (piemēram, ar normālu aizkuņģa dziedzera darbību un vieglu plaušu slimību) ir sastopama smagā mutācija vienā gēna *CFTR* kopijā, bet otrā kopijā ir vieglā mutācija, vai arī šiem pacientiem abas gēna *CFTR* alēles satur vieglās mutācijas (Chillon et al., 1995).

Volfa vada anomālijas, kas sastopamas abu slimību – gan cistiskās fibrozes, gan *CBAVD* – gadījumā, liecina par vienu un to pašu ģenētisko cēloni, proti, mutācijām gēnā *CFTR*. Pilns mutāciju skrīnings pacientiem ar *CBAVD* atklāj dažādu, bet pārklājošos mutāciju spektru, kas pārstāv *CFTR* genotipus, kuri ir novēroti arī CF pacientiem (Philipson et al., 2000). Tā kā mutācijas gēnā *CFTR* tika atrastas arī *CBAVD* gadījumā, tika pieņemts, ka arī šajā gadījumā abās gēna *CFTR* kopijās jābūt mutācijām, taču izrādījās, ka vairākumā gadījumu *CBAVD* pacientu mutācijas tika atrastas tikai vienā *CFTR* gēna kopijā un vēl daļai indivīdu mutācijas gēna *CFTR* kodējošā rajonā vispār netika atrastas (Philipson et al., 2000). Zinātnieku grupa 1996. gadā apkopoja informāciju par 420 publicētiem *CBAVD* pacientiem un noskaidroja, ka 19% gadījumu šīm personām sastop divas *CFTR* mutācijas, 47% indivīdu ir vienas mutācijas nesēji un 34% mutācijas nav iespējams identificēt (Lissens et al., 1996). Savukārt citi zinātnieki savā pētījumā parādīja, ka 60% *CBAVD* pacientu ir gēna *CFTR* mutācijas nesēji, 20% kompaunda heterozigoti un 20% gadījumu mutāciju nav izdevies atrast (Phillipson et al., 2000), kas apstiprina iepriekš atrasto datu patiesumu. Arī franču zinātnieku grupa veica lielu pētījumu 327 *CBAVD* pacientiem, analizējot visu gēna *CFTR* kodējošo rajonu, kā arī eksonu/intronu robežsekvences (Claustres et al., 2000). Mutācijas tika atrastas 516 (78,9%) no analizētajiem 654 *CFTR* gēniem, kas pārstāvēja *CBAVD* pacientu grupu; 70,95% *CBAVD* pacientu mutācijas tika atrastas abās gēna *CFTR* alēlēs, 15,90% *CBAVD* pacientu mutācija tika atrasta tikai vienā *CFTR* kopijā, un 13,15% gadījumu mutācijas gēnā *CFTR* netika atrastas. Pacientiem, kuru gēna *CFTR* abās kopijās tika atklāta mutācija, vismaz viena mutācija pārstāvēja gēna *CFTR* mutāciju IV vai V grupu, tātad vieglās mutācijas. Taču 88% gadījumu viena gēna *CFTR* alēle pārstāvēja smago mutāciju klasi, bet otra vieglo, savukārt 12% gadījumu abās hromosomās bija lokalizētas vieglās gēna *CFTR* mutācijas. Šie rezultāti atšķiras no cistiskās fibrozes pacientu datiem,

kur 88% gadījumu slimnieku *CFTR* gēnos atrodamas abas smagās mutācijas un apmēram 11% gadījumu vienā gēna kopijā ir smagā *CFTR* mutācija, bet otrā kopijā vieglā (Claustres et al., 2000; Dequeker et al., 2009; Schwarz et al., 2009).

1.7.2.1. Gēna *CFTR* 8. introna poli-T polimorfisms

Tā kā pētījumos (Lissens et al., 1996; Philipson et al., 2000) tika atklāti arī tādi *CBAVD* pacienti, kuriem mutācijas gēnā *CFTR* neizdevās atrast, tad tika izteikta hipotēze, ka, iespējams, ir vēl citas mutācijas, kas lokalizētas gēna *CFTR* proteīna nekodējošajās sekvencēs (intronos) un kurām ir liela loma *CBAVD* attīstībā. Iespējams, ka tieši šādu mutāciju dēļ *CFTR* proteīna daudzums ir samazināts, kas savukārt izraisa sēklas vada nosprostošumu, taču *CFTR* proteīna daudzums ir pietiekams, lai citi orgāni, kas parasti cistiskās fibrozes gadījumā ir skarti, varētu normāli funkcionēt. Samazināto *CFTR* proteīna daudzumu varētu izskaidrot ar normāla mRNS trūkumu. Līdz ar to tika pievērsta pastiprināta uzmanība *CFTR* mRNS pētījumiem. Normālu indivīdu audos tika konstatētas dažādas mRNS molekulas, kurām trūka 4., 9 vai 12. eksons (Chillon et al., 1995). 9. eksons kodē daļu no pirmā nukleotīdus saistošā *CFTR* proteīna domēna. Ir zināms, ka transkripti bez 9. eksona veido *CFTR* proteīnu, kas nenobriest, un tādēļ netiek transportēts uz plazmatisko membrānu (Cuppens et al., 1998). Nepietiekams *CFTR* līmenis izraisa nātrija un ūdens reabsorbcijas izmaiņas sēklinieka piedēkļa lumenā, līdz ar to notiek hlora jonu sekrēcijas izmaiņas, kā rezultātā sēklinieka piedēklī esošais šķidrums sabiezē un embrionālās attīstības laikā tiek traucēta Volfa vadu diferenciācija, kas nepieciešama sēklas kanālu un sēklas pūslīšu normālai izveidei. Līdz ar to minētās pārmaiņas izraisa neauglības attīstību (Chan et al., 2009).

Tālākos pētījumos tika parādīts, ka tas, vai mRNS molekulā būs vai nebūs 9. eksons, ir atkarīgs no variablās timīnu sekvences gēna *CFTR* 8. introna beigās (Chu et al., 1993). Šī sekvence ir zināma kā poli-T secība (poli-T trakts) un satur attiecīgi piecu, septiņu vai deviņu timīnu atkārtojumus (respektīvi, 5T, 7T un 9T alēlēs) (1.8. attēls). Tā kā 5T alēle ir iemesls samazinātai normālā *CFTR* mRNS veidošanai, līdz ar to ir pierādīta šī DNS varianta loma *CBAVD* patoģenēzē (Chu et al., 1993).

Poli-T trakta 5T alēles variants ir biežākā mutācija *CBAVD* gadījumā un tiek klasificēta kā vieglā gēna *CFTR* mutācija (Chillon *et al.*, 1995; Costes *et al.*, 1995). Ja pacients ir homozigotisks pēc šīs mutācijas, tad viņa šūnās tiek sintezēts defektīvs *CFTR* transkripts ar 9. eksona delēciju un līdz ar to *CFTR* proteīns, kas nespēj veikt savu funkciju (Chu *et al.*, 1993; Mak *et al.*, 1997; Teng *et al.*, 1997). Eiropas izcelsmes *CBAVD* pacientiem 5T mutācija ir sastopama 21% gadījumu, savukārt kontroles grupā tikai 5% gadījumu (Cuppens & Cassian, 2004).

Arī iepriekš pieņemtais apgalvojums, ka 5T alēle vienmēr ir saistīta ar *CBAVD*, it īpaši, ja tā ir atrodama kompaunda heterozigotām kopā ar smago *CFTR* gēna mutāciju vai arī homozigotiskā formā ar otru tādu pašu 5T alēli, ne vienmēr ir patiess, jo ne visi vīrieši, kuri ir kompaunda heterozigoti pēc smagās mutācijas un 5T polimorfisma, cieš no *CBAVD*. Kā piemēru var minēt tēvus, kuru bērni slimo ar cistisko fibrozi. Līdz ar to poli-T trakta 5T variantu klasificē kā mutāciju ar nepilnu penetranci (Cuppens *et al.*, 1998).

Papildus izpratne par iespējamo mehānismu, kas parādīja fenotipiskās atšķirības, cistiskās fibrozes un *CBAVD* pacientu gadījumā tika apstiprinātas ar *CFTR* transkriptu analīzes palīdzību. Pētījumā analizēti *CFTR* transkripti ar dažādu poli-T trakta garumu, kas iegūti no veselu indivīdu deguna gļotādas un *vas deferens* šūnām. Ievērojami vairāk defektīvo transkriptu tika novērots *vas deferens* šūnās, salīdzinot ar tā paša indivīda deguna epitēlija šūnām, kurās vairāk tika atrasti funkcionāli aktīvi *CFTR* transkripti. Audu specifiskais diferenciālais splaisings varētu būt izskaidrojums tam, kāpēc *CBAVD* pacientiem nav novēroti bojājumi citos orgānos (Mak *et al.*, 1997).

Pārsteidzoši rezultāti tika iegūti, pētot vēl citas vīriešu neauglības formas, tādas kā obstruktīva azoospermija vai oligozoospermija, kuru iemesls nav *CBAVD*. Šajā grupā gēna *CFTR* mutācijas/polimorfismi bija pārstāvēti vairāk, nekā tika paredzēts. Tomēr pretēji *CBAVD* pacientiem, vīriešu DNS paraugos, kas pārstāvēja obstruktīvas azoospermijas grupu, reti tika atrastas *CFTR* mutācijas, kas raksturīgas *CBAVD* gadījumā. Tā kā šajā grupā nenovēro *CBAVD* raksturīgās mutācijas, savukārt biežāk sastop dažādus polimorfismus, tika ierosināts, ka tieši *CFTR* polimorfismu varianti varētu būt saistīti ar obstruktīvu azoospermiju vai citām ar *CFTR* saistītām slimībām (Zielenski *et al.*, 2000).

1.7.2.2. *CFTR* gēna 8. introna poli-TG polimorfisms

Bez polimorfā poli-T lokusa gēnā *CFTR* ir atklāti un aprakstīti vairāk nekā 120 polimorfi lokusi (<http://genet.sickkids.on.ca/cftr>; 2009). Dažas no alēlēm, kas atrastas polimorfajos lokusos, atrodas eksonos, kas kodē pirmo nukleotīdus saistošo gēna *CFTR* domēnu, kā arī minēto eksonu/intronu robežsecībās, un bieži sastopamas vispārējā populācijā. Pētījumos noskaidrots, ka TG dinukleotīdu polimorfisms (poli-TG trakts) arī saistīts ar vīriešu neauglību. Poli-TG trakts arī atrodas 8. intronā un ir novietots pirms poli-T trakta 5' galā, turklāt ir iespējami dažādi poli-TG polimorfisma (1.8. attēls) alēļu varianti (Cuppens et al., 1998).

Gēna *CFTR* poli-TG trakta analīze parādīja – jo garāka TG atkārtojumu sekvenca, jo lielāka iespējamība, ka splaisinga laikā tiks izgriezts arī 9. eksons, kas nepieciešams normāla proteīna veidošanai (Cuppens et al., 1998). Jāatzīmē, ka šajā pētījumā kvalitatīvā un kvantitatīvā analīze tika veikta paraugiem, kas iegūti no pacientiem, kuri cieš no hroniska deguna nosprostošanas vai sinusīta. Veicot gēna *CFTR* 5T alēles asociāciju analīzi, īsie TG atkārtojumi tika atrasti tikai veseliem cilvēkiem, taču netika atrasti pacientiem. Iegūtie rezultāti pārliecinoši apstiprina hipotēzi, ka TG dinukleotīda polimorfisms ietekmē *CFTR* proteīna izveidi. Bet splaisinga mehānisma molekulārie pētījumi ir pierādījuši, ka kādi no splaisingā iesaistītajiem faktoriem ir mazāk efektīvi, ja 8. introna poli-TG rajonu veido liels skaits TG dinukleotīdu atkārtojumu (Pagani et al., 2000; Buratti et al., 2001).

Poli-T variantu 5T var atrast kombinācijā ar TG11, TG12, TG13 alēlēm (attiecīgi 11,12, vai 13 TG atkārtojumi). TG12 atkārtojumi kombinācijā ar T7 alēli – TG12-T7 *CFTR* haplotips, TG11-T9 haplotips vai TG13 atkārtojumi kombinācijā ar T5 variantu, novieto introna/eksona robežnukleotīdu mazāk labvēlīgā pozīcijā un veicina nepareizu splaisinga norisi. Līdz ar to abi polimorfismi – gan poli-TG, gan poli-T – nosaka *CFTR* transkriptu daudzumu, no kuriem tiks translēts funkcionāli aktīvs *CFTR* proteīns, un tādējādi ietekmē hlora jonu transportu šūnās, kurās tiek ekspresēts gēns *CFTR* (Cuppens et al., 1998).

Poli-TG polimorfisma varianti nosaka 5T mutācijas – slimību izraisošās alēles, penetranci un slimības smaguma pakāpi. Tādus mutantus *CFTR* gēnus, kas satur vairākus

alēļu un/vai polimorfismu kombināciju variantus, klasificē kā gēna *CFTR* polivariantus. Piemēram, viens tāds polivariants ir TG12/T5 gēna *CFTR* haplotips, kas ir bieži atrodams *CBAVD* pacientu *CFTR* gēnos. Šie gēna *CFTR* polivarianti arī izskaidro faktu, kāpēc dažiem pacientiem gēnā *CFTR* nav iespējams atrast klasiskās gēna *CFTR* mutācijas. Tā saucamais vieglais polivariants TG11-T5 ir reti sastopams *CBAVD* pacientu DNS paraugos, savukārt TG12-T5 ir biežākais polimorfismu variants, kas atrodams šo pacientu *CFTR* gēnos (Cuppens & Cassian, 2004; Tamburino, 2008; Gallati, 2009). TG13-T5 genotips var izraisīt cistisko fibrozi, kurai nav raksturīga aizkuņģa dziedzera disfunkcija. Savukārt indivīdiem, kas ir kompaunda heterozigoti pēc vienas smagās mutācijas un 5T alēles, piemēram, CF pacientu tēvi, 5T alēle bieži sastopama kopā ar vieglo TG11 alēli. Tas, ka TG atkārtojumu daudzums nosaka, vai 5T polimorfisms būs patogēns vai labdabīgs, ir pierādīts lielā internacionālā pētījumā: 5T alēle blakus lielam TG atkārtojumu skaitam pierāda asociāciju ar slimības fenotipu (Groman et al., 2004).

1.7.3. Gēna *CFTR* mutācija R117H un vīriešu neauglība

Salīdzinot ar kontroles populāciju, *CFTR* mutāciju spektrs *CBAVD* pacientiem un cistiskās fibrozes slimniekiem ir atšķirīgs. Piemēram, *CFTR* gēna IV klases mutācija R117H vairāk sastopama *CBAVD* pacientu grupā, bet ne CF personām (Cuppens & Cassian, 2004). Šīs mutācijas biežums ir aptuveni 22% *CBAVD* gadījumā, bet tikai 0,8% gadījumu šo mutāciju atrod pacientiem ar klasisko cistiskās fibrozes formu (Gervais et al., 1999; Philipson et al., 2000).

Dažām gēna *CFTR* mutācijām ir novērota korelācija ar konkrētu poli-T atkārtojumu skaitu gēna 8. intronā. Cistiskās fibrozes gadījumā biežākā mutācija delF508 viennozīmīgi korelē ar 9T alēli, savukārt R117H mutācija sastopama gan ar 5T, gan ar 7T alēļu variantiem (Chu et al., 1993)

Gēna *CFTR* 4. eksona mutācijai R117H un 8. introna poli-T trakta 5T alēlei piemīt sinerģisks efekts, un to mijiedarbība nosaka slimības fenotipu. R117H mutācija pārstāv aptuveni 0,8% no visām gēna *CFTR* mutācijām. R117H ir *missense* mutācija, kuras rezultātā notiek *CFTR* proteīna transmembranālā domēna aminoskābes arginīna nomaiņa uz histidīnu (Sheppard et al., 1993). R117H mutācija pēc mutāciju klasifikācijas

tiek definēta kā vieglā gēna *CFTR* mutācija, jo tās klātbūtne būtiski neizmaina hlora jonu kanāla aktivitāti. Ir zināms, ka indivīds, kas ir heterozigots pēc R117H mutācijas vienā hromosomā un heterozigotisks pēc 5T polimorfisma otrā hromosomā (gēni *trans* pozīcijā), nav slims ar tipisko cistisko fibrozi, taču viņam varētu būt atipiskā cistiskās fibrozes forma. Pretēji iepriekš aprakstītajam, ja personas vienā un tajā pašā hromosomā gēnā *CFTR* ir gan R117H mutācija, gan 5T alēles variants (gēni *cis* pozīcijā), tad izpaužas slimības smagā forma (Kieswetter et al., 1993). Salīdzinot ar šo abu mutāciju biežumu vispārīgā populācijā un pacientiem ar atipisku cistisko fibrozi, biežāk R117H mutācija un 5T alēles variants sastopams atipiskas CF gadījumā (Pont-Kingdon et al., 2004).

Līdz ar to R117H mutācija var izraisīt gan *CBAVD*, gan cistisko fibrozi (Kiesewetter et al., 1993). Tā kā R117H biežāk ir saistīta ar 5T vai 7T alēli, tad *CBAVD* pacientiem R117H mutāciju atrod kopā ar poli-T trakta 5T alēli, kas veido tā saucamo vieglo R117H-T7 haplotipu. Cistiskās fibrozes pacientiem savukārt atrod smago R117H-T5 haplotipu, bet jāpiebilst, ka arī R117H-T7 haplotipu var sastapt CF pacientu hromosomās (Cuppens & Cassiman, 2004). Tādējādi R117H mutācija kopā ar 7T alēli ietekmē vīrieša reproduktīvo sistēmu un nav pietiekama, lai izraisītu citus cistiskai fibrozei raksturīgus simptomus, turklāt 5T alēle pastiprina R117H mutācijas fenotipisko izpausmi, kuras rezultātā attīstās cistiskā fibroze bez aizkuņģa dziedzera darbības traucējumiem (Zielenski et al., 2000).

1.7.4. Gēna *CFTR* mutācijas un citas vīrieša neauglības formas

Ir publicēti dati par to, ka gēna *CFTR* mutācijas var būt iemesls arī citām neauglības formām. Vairāki pētījumi ir pierādījuši, ka gēnam *CFTR* ir ietekme uz spermatoģenēzi, savukārt citi noliedz šo faktu (Mak et al., 2000).

Cistiskās fibrozes vīriešu sēklinieku biopsijas analīzē atklātas histoloģiski redzamas izmaiņas spermatoģenēzē (Denning et al., 1968; Gottlieb et al., 1991). Sēklinieku biopsija tika veikta CF pacientiem, kuri sasnieguši pēcpubertātes vecumu. Biopsijas materiāla analīze parādīja samazinātu spermatozoīdu skaitu, kā arī spermatozoīdu morfoloģijas izmaiņas. Turklāt *CBAVD* pacientu gadījumā izmaiņas

spermatogēnēzē netika novērotas. Līdz ar to, ka CF pacientu veselības statuss ir stipri zemāks nekā *CBAVD* gadījumā, tiek uzskatīts, ka izmainītā spermatogēnēzes aina, ko var novērot histoloģiskos izmeklējumos, ir uzturvielu trūkuma, gonadotoksisko medikamentu (antibiotikas, kortikosteroīdi) vai hroniskas slimības sekas, nevis spermatogēnēzes primārais defekts. Spermatogēnēzes traucējumi *CBAVD* gadījumā var būt saistīti ar ietilgušu testikulāro vadu un/vai sēklinieka piedēkļa nosprostoju. To, ka izmaiņas spermatogēnēzē izraisa nosprostoju, apstiprina pētījumi, kuros analizēta sēklinieku darbība vīriešiem pēc vazektomijas veikšanas (Mak et al., 2000).

Grauzēju spermatogēnēzes pētījumi parāda gēna *CFTR* lomu šī procesa regulācijā, kas savukārt vedina uz domām, ka, iespējams, gēnam *CFTR* tomēr ir nozīme spermatogēnēzē. Grauzēju spermatogēnēzes laikā *CFTR* transkripti atrasti postmeiotiskās spermatīdās, kur arī novēro maksimālo gēna *CFTR* ekspresiju. Spermatīdas tiek pārveidotas par spermatozoīdiem – notiek kodola kondensācija un citoplazmas tilpuma samazināšanās. Tiek uzskatīts, ka citoplazmas zaudēšana notiek, pateicoties intracelulārā ūdens reabsorbcijai, un procesā piedalās hlora jonu kanāli. Tā kā šīs fāzes laikā gēna *CFTR* ekspresija ir maksimālā, tiek pieņemts, ka tomēr kādi vieglie, cistisko fibrozi vai *CBAVD* slimību neizraisošie *CFTR* polimorfismi ir iesaistīti citu vīriešu neauglības formu attīstībā (Trezise et al., 1993; Chan 2009). Līdzīgi eksperimenti ir veikti arī, pētot *CFTR* ekspresiju cilvēka sēkliniekos, taču nav izdevies pierādīt to, ka spermatīdās ir traucēta citoplazmas izžušana (Tizzano et al., 1994; Dube et al., 2008).

Tieša gēna *CFTR* ietekme uz spermatogēnēzi ir pierādīta arī ar necerēti lielo gēna *CFTR* mutāciju biežumu oligozoospermijas gadījumos (van der Ven et al., 1996; Gallati, 2009). Taču jāatceras, ka samazinātu spermatozoīdu daudzumu šo vīriešu grupā varētu skaidrot ar reproduktīvās sistēmas vadu nosprostoju, bet ne ar defektīvu spermatogēnēzi (Mak et al., 2000). Daudzi pētījumi ir veikti, lai noskaidrotu gēna *CFTR* mutāciju saistību ar citām neauglības formām. Analizējot 56 neauglīgu vīriešu (neiekļaujot *CBAVD*) DNS paraugus, septiņi (12,5%) saturēja vienu *CFTR* mutāciju (Traystman et al., 1994). Savukārt nelielā pētījumā 17 obstruktīvas azoospermijas pacientiem, kuru gadījumā sēklas vads un/vai priekšdziedzeris neiztrūkst, bet ir nosprostots, mutācijas gēnā *CFTR* tika identificētas astoņās no 34 (23,5%) hromosomām. Jāpiemin, ka pieci no astoņiem mutantiem gēniem *CFTR* saturēja 5T alēli

(Jarvi et al., 1995). Citi zinātnieki vismaz vienu *CFTR* mutāciju atrod 14 no 80 (17,5%) idiopātiskiem neauglīgiem vīriešiem ar samazinātiem spermas kvalitātes rādītājiem un trim no 21 (14,5%) azoospermijas pacientiem bez *CBAVD*. Pētījumā noteikto mutāciju biežums bija augstāks nekā attiecīgo CF mutāciju nesēju biežums vispārējā populācijā (Van Der Ven et al., 1996). Citā pētījumāniecīgs nobriedušu spermatīdu skaits sēklinieku biopsijas analizē tika konstatēts *CBAVD* vīriešiem, kuriem gēna *CFTR* 8. intronā ir 5T alēle, salīdzinot ar pacientiem bez šīs mutācijas, kas liecina, ka poli-T trakta 5T alēle varētu ietekmēt spermatogēnēzes normālu norisi (Larriba et al., 1998). Savukārt veicot gēna *CFTR* mutāciju analīzi intracitoplazmatiskās spermas injekcijas (*intracytoplasmic sperm injection, ICSI*) kandidātiem, kas pārstāv oligoastenoteratozoospermijas grupu, *CFTR* mutācijas tika atklātas četriem no 75 (3%) pacientiem, kas neatšķīrās no mutāciju sastopamības biežuma vispārējā populācijā (Tuerlings et al., 1998). Šie pētījumi parāda, ka visiem vīriešiem ar azoospermiju būtu ieteicams veikt gēna *CFTR* mutāciju analīzi (Mak et al., 2000; Gallati, 2009). Tomēr gēna *CFTR* mutāciju nozīme citās vīriešu neauglības formās nav līdz galam skaidra, un tādēļ ir nepieciešami tālāki pētījumi.

1.8. Mākslīgā apaugļošana un vīrieša neauglības ģenētisko faktoru pārmantošanas risks pēcnācējos

Mākslīgās apaugļošanas metodes *in vitro* apaugļošana (*IVF*) un intracitoplazmatiskā spermas injekcija (*ICSI*) ir ieguvušas lielu popularitāti smagas vīrieša neauglības ārstēšanā. *ICSI* tehnika ir radikāli pārmainījusi neauglīgu vīriešu ārstēšanu, ļaujot vīrietim, kurš bez šīs tehnikas nekad nevarētu radīt savus pēcnācējus, kļūt par tēvu. Pēcnācējiem, kas iegūti ar šo metožu palīdzību, diemžēl ir palielināts ģenētisko defektu risks: *in vitro* mehānisms, kas atlasa vai, tieši otrādi, izslēdz defektīva spermatozoīda izmantošanu, nav tik precīzs kā *in vivo*; ir zināms, ka ir iespējami gametu fizikālie bojājumi – tādi kā meiotiskās dalīšanās vārpstas bojājums; spermatogēnēzes procesos iesaistīto mutanto gēnu pārnese var izraisīt somatiskas anomālijas pēcnācējos; izmainītais hormonu līmenis un manipulācijas ar gametām var izraisīt aizkavētu DNS replikāciju, gēnu mutācijas vai mejozes un mitozes traucējumus; hromosomālās anomālijas (lai arī nav atrodamas somatiskajās šūnās) biežāk sastopamas vīriešu

spermatozoīdos, kas cieš no azoospermijas vai smagas oligozoospermijas (Chan et al., 2002).

Eksistē trīs ģenētiskās anomālijas, kas saistītas ar vīrieša neauglību, un tām ir jāpievērš uzmanība, pirms tiek veikta mākslīgā apaugļošana. Šīs patoloģijas ir Y hromosomas mikrodelēcijas *CBAVD* un Klainfeltera sindroms.

Sakarā ar mākslīgās apaugļošanas tehniku parādīšanos un izmantošanu praksē arī spermatozoīdi ar Y hromosomas AZFc rajona mikrodelēcijām ir spējīgi apaugļot ovocītus un ierosināt embrionālās attīstības sākumu. AZFc rajona mikrodelēciju vertikālā pārnese (tiek nodotas, neizlaižot paaudzi, no tēva dēlam) noved pie ģimenes neauglības, jo mikrodelēciju izraisītā neauglība var tikt pārmantota no paaudzes uz paaudzi ar *ICSI* procedūras palīdzību (Raicu et al., 2003; Mau-Kai et al., 2008; Poongthai et al., 2009).

Pacienti ar Y hromosomas mikrodelēcijām AZFc rajonā var izvēlēties *ICSI* kā ārstēšanas veidu, un procedūras efektivitāte īpaši neatšķirsies no tādiem vīriešu neauglības gadījumiem kā neobstruktīva azoospermija. Taču ar *ICSI* palīdzību vīrieša pēcnācējiem (vīrišķā dzimuma) tiks pārnestas arī šīs Y hromosomas mikrodelēcijas. Tāpēc pacientiem būtu jāpiedāvā iespēja noteikt Y hromosomas mikrodelēciju klātbūtni Y hromosomā pirms *ICSI* metodes izmantošanas. Pacientus vajadzētu informēt par faktu, ja šīs mikrodelēcijas ir atklātas Y hromosomā, tad tās tiks arī nodotas iespējamam vīrišķā dzimuma pēcnācējam (dēlam) un arī pēcnācējam izpaudīsies kā neauglība (Rodavalho et al., 2008). Jāpievērš uzmanība arī tam, ka dēlam neauglības forma var būt smagāka nekā tēvam, jo AZFc rajona delēcijām ir tendence kļūt lielākām no paaudzes uz paaudzi. Protams, sievišķā dzimuma pēcnācējs nebūs neauglīgs. Interesants ir arī fakts, ka dzimumu attiecības pēcnācējos, kuru tēviem ir Y hromosomas mikrodelēcijas, ir vienādas, kas parāda to, ka AZF mikrodelēciju klātbūtne neietekmē Y hromosomas atiešanu uz gametām mejozes laikā (Chan et al., 2002).

ICSI ir vienīgā neauglības ārstēšanas pieeja arī *CBAVD* pacientiem. Kā zināms, šiem vīriešiem galvenokārt ir obstruktīva azoospermija ar normālu spermatoģenēzi sēkliniekos. Taču šo indivīdu spermatozoīdu genomā var būt mutācijas gēnā *CFTR*, kas palielina ar cistisko fibrozi slima bērna piedzimšanas risku. Turklāt lielākā daļa *CBAVD* pacientu ir *CFRT* gēna I, II vai III grupas mutāciju (slimības smagās formas mutācijas) nesēji, un līdz ar to mutācijas pārmantojamības risks ir 50% (1/2). Pieņemot, ka vidēji

populācijā CF smagās mutācijas delF508 nesēju biežums ir 1/25, tas nozīmē, ka risks bērnam mantot šo mutāciju no *CBAVD* pacienta veselās partneres arī ir 50% (1/2), līdz ar to kopējais risks ($1/2 \times 1/2 \times 1/25$), ka šādam pārim būs slims bērns, ir 1:100 (salīdzinājumam risks CF bērnam kontrolpopulācijā ir 1:2500). Līdz ar to, kad tiek veikta ģenētiskā konsultācija, veselajam partnerim būtu jāpārbauda *CFTR* mutāciju klātbūtne, un tad varētu precīzāk spriest par slima bērna piedzimšanas risku. Taču komerciāli pieejamie gēna *CFTR* mutāciju noteikšanas testi pārbauda tikai biežākās *CFTR* mutācijas, tāpēc pastāv varbūtība, ka netiks noteiktas retāk izplatītās mutācijas. (Cuppens & Cassiman, 2004).

Vairākos pētījumos ir noteikta arī CF mutāciju korelācija ar *in vitro* apaugļošanas procedūras veiksmīgumu. Apaugļošanās gadījumu skaits bija ievērojami zemāks vīriešiem ar *CBAVD* un delF508 mutāciju nekā *CBAVD* pacientiem bez šīs mutācijas. Bet gēna *CFTR* mutācijas neietekmēja spermatozoīdu funkcijas, ja *in vitro* apaugļošana tika veikta ar mikromanipulācijas palīdzību (Boucher et al., 1999).

Arī R117H mutācija samazina mākslīgās apaugļošanas efektivitāti. Pētot divus pārus, kur vienam no vīriešiem bija R117H, bet otram – R117C mutācija, grūtniecība neiestājās, neskatoties uz 25 embriju pārnesi deviņu ciklu laikā. Savukārt embriji, kas iegūti no kompaunda heterozigotiskiem vīriešiem ar delF508/R117H genotipu, raksturīgi ar pietiekamu embriju implantācijas biežumu. Tomēr būtu nepieciešams lielāks pētījumu skaits, lai varētu spriest par specifisku CF mutāciju korelāciju ar pozitīvu vai negatīvu *ICSI* iznākumu (Philipson et al., 2000).

2. Materiāls un metodes

2.1. Paraugi

Pētījumā izmantoti 100 neauglīgu vīriešu DNS paraugi, kas iegūti no šo pacientu perifērajām asinīm (2.1. tabula). Pētījumā iekļautie pacienti bija 24 – 46 gadus veci. Vidējais neauglības ilgums bija 4,5 gadi (robežās no 1 līdz 20 gadiem). Visi pacienti pirms asins parauga nodošanas tika iepazīstināti ar informāciju par ģenētiskajiem pētījumiem un ir parakstījuši piekrišanas formas. Pētījums ir apstiprināts Centrālajā Medicīnas Ētikas komitejā.

Pacientu asins paraugi iegūti, sadarbojoties ar RSU androloģijas laboratorijas vadītāju un klīnikas “Piramīda” andrologu Dr.med J.Ērenpreisu, EGV klīnikas ārstu V.Lejiņu un VSIA “Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas” Medicīniskās ģenētikas klīnikas DNS laboratorijas vadītāju N.Proņinu un ārstiem I. Grīnfeldi un J.Bāru.

Neauglīgo vīriešu atlasē kritēriji bija šādi:

- Idiopātiski azoospermijas (nav spermatozoīdi), oligozoospermijas ($<20 \times 10^6$ spermatozoīdi/ml), teratozoospermijas (anomālijas spermatozoīdu kustīgumā un galviņas morfoloģijā) gadījumi;
- No pētījuma tika izslēgti visi azoospermijas un oligospermijas gadījumi, kuru iemesls ir izlocīto sēklas kanāliņu trūkums (*Congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD*) vai nosprostojums, endokrīnās sistēmas traucējumi, citoģenētiska patoloģija vai kādi citi zināmi traucējumi, kas var izraisīt neauglību.

Kontroles grupām tika izmantoti sekojoši paraugi no RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas kolekcijas (1. tabula):

- Lai veiktu Y hromosomas haplogrupu salīdzinājumu, kā kontroles tika izmantoti 153 vīriešu (trīs paaudzēs latvieši, nav radnieciski pa mātes un tēva līniju) DNS paraugi;
- Lai veiktu gēna *CFTR* poli-T un poli-TG polimorfismu salīdzinājumu, kā kontroles tika izmantoti 60 vīriešu (latvieši trīs paaudzēs, nav radnieciski pa mātes un tēva līniju) DNS paraugi, kā arī 15 DNS paraugi, kas iegūti no cistiskās fibrozes vīrišķā dzimuma pacientiem.

2.1. tabula. Pārskats par analizētajiem paraugiem

Indivīdu / analizēto DNS paraugu skaits	Analīzes nosaukums	Analīzes metodes
100 neauglīgi vīrieši	Y hromosomas mikrodelēciju analīze	Multipleksās polimerāzes ķēdes reakcijas (<i>polymerase chain reaction, PCR</i>)
	Y hromosomas haplogrupu analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (<i>RFLP</i>) analīzi un DNS sekvenēšana
	Y hromosomas haplotipu analīze	Y hromosomas mikrosatelītu (<i>Y-STR</i> jeb <i>DYS</i>) genotipēšana
	Gēna <i>CFTR</i> mutācijas delF508 analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu heterodupleksu analīzi
	Gēna <i>CFTR</i> mutācijas R117H analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu <i>RFLP</i> analīzi
	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfisma analīze	DNS sekvenēšana
153 vīrieši (latvieši trīs paaudzēs) – kontroles grupa	Y hromosomas haplogrupu analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu <i>RFLP</i> analīzi un DNS sekvenēšana
	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfisma analīze	DNS sekvenēšana
15 vīrieši, cistiskās fibrozes pacienti	Y hromosomas mikrodelēciju analīze	Multipleksās <i>PCR</i>
	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfisma analīze	DNS sekvenēšana

2.1.1. DNS izdalīšana

Y hromosomas mikrodelēciju skrīningam DNS tika iegūta no pētījumā izmantoto neauglīgo vīriešu perifēro asins paraugiem ar Nucleon BACC1 komerciālo komplektu (Amersham, USA). Savukārt DNS no kontroles grupu pārstāvju asins paraugiem bija izdalīta ar fenola-hloroforma metodi (un uzglabāta RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas kolekcijā).

2.2. Y hromosomas mikrodēlēciju analīze

Y hromosomas mikrodēlēcijas tika noteiktas ar polimerāzes ķēdes reakcijas (*polymerase chain reaction, PCR*) palīdzību, kuras gaitā tika pavairoti noteikti specifiski Y hromosomas reģioni.

Analīzē tika izmantoti Y hromosomas sekvencei specifiski rajoni (*PCR* marķieri), kas ļauj noteikt Y hromosomas mikrodēlēciju klātbūtni vai to trūkumu neauglīgu vīriešu DNS paraugos. Šie *PCR* marķieri tagad tiek dēvēti kā Y hromosomas sekvencei specifiski rajoni – *STS* (*sequence target sites*), un ar fizikālās kartēšanas palīdzību Y hromosomā tādi ir atklāti vairāk nekā 300. Katrs *STS* nosaka zināmu sekvenci genomiskajā DNS, un tā amplifikācija ar *PCR* palīdzību liecina par šīs secības/*STS* klātbūtni Y hromosomā, savukārt *STS* trūkums liecina par delēciju. *STS* var būt specifisks gēnam, gēna saimei vai kādai anonīmai sekvencei.

Katra *PCR* tika veikta multipleksā *PCR* formā. Multipleksais reakcijas formāts ir lietderīgs, lai izvairītos no negatīva rezultāta tehnikas kļūdas dēļ, jo multipleksā *PCR* ietver vairākas iekšējās kontroles. Ir pieņemts, ka iekšējā AZF mikrodēlēciju *PCR* kontrole ir gēns *ZFX/ZFY*. Gēns *ZFX/ZFY* izvēlēts kā DNS klātbūtnes kontrole, jo ar specifiskiem praimeriem iespējams amplificēt unikālu sievietes X hromosomas DNS fragmentu (gēns *ZFX*) un arī unikālu vīrieša Y hromosomas DNS fragmentu (gēns *ZFY*). Papildus nepieciešamas gan pozitīvās, gan negatīvās ārējās kontroles. Par pozitīvo kontroli kalpo sievietes DNS un vesela vīrieša DNS paraugs (saturēs *ZFY*, *SRY* un visu trīs AZF rajonu *STS*), savukārt negatīvā kontrole ir ūdens. Principā pietiek ar viena *STS* analīzi visos trijos AZF rajona reģionos – AZFa, AZFb un AZFc, lai noteiktu mikrodēlēcijas klātbūtni vai iztrūkumu kādā no šiem reģioniem. Tomēr divu *STS* analīze katrā AZF reģionā palielina analīzes precizitāti, jo iespējams, ka delēcijas var skart vairākus *STS* vienā reģionā. Tāpēc ir pieņemts, ka, veicot Y hromosomas analīzi, ir jāanalizē vairāk nekā viens (respektīvi, divi) *STS* katrā Y hromosomas AZF reģionā.

Līdz ar to abas multipleksās *PCR* pavairo piecus fragmentus, t.i., trīs AZF reģionu apgabalus un divas kontroles secības (*ZFX/ZFY* un *SRY*). Tādējādi katra pacienta Y hromosomā tiek analizēti seši AZF lokusi: multipleksā A *PCR* pavairo AZFa rajona sY84 *STS*, AZFb rajona sY127 *STS* un AZFc rajona sY254 *STS*,

savukārt multipleksā B PCR pavairo AZFa rajona sY86 STS, AZFb rajona sY134 STS un AZFc rajona sY255 STS.

Lai pavairotu nepieciešamos Y hromosomas rajonus, izmantotas tabulā 2.2. apkopotās praimeru secības. ZFY un SRY praimeru pāri pavairo Y hromosomas un abu dzimumu specifiskās sekvenses, bet pārējie praimeru pāri pavairo attiecīgos Y hromosomas AZF rajonus. Tabulā apkopotās praimeru sekvenses sākotnēji ieviesa M.Simoni ar līdzstrādniekiem (Simoni et al., 2004), un tagad šo metodi Eiropas Androloģijas akadēmija ir atzinusi par "zelta standartu" Y mikrodelēciju diagnosticēšanā.

2.2. tabula. Y hromosomas mikrodelēciju analizē lietotie praimeru

Y hr. rajons	Praimera nosaukums	Nukleotīdu secība (bp)	T _m (°C)	Amplificētā produkta garums (bp)
ZFY	ZFY-F ZFY-R	ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC (25 bp) GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT (25 bp)	61,8	495
SRY	SRY-F SRY-R	GAATATTCCTCGCTCTCCGGA (20 bp) GCTGGTGCTCCATTCTTGAG (20 bp)	59,4	477
AZFa	sY86-F sY86-R	GTGACACACAGACTATGCTTC (21 bp) ACACACAGAGGGACAACCCT (20 bp)	58,6	320
AZFa	sY84-F sY84-R	AGAAGGGTCCTGAAAGCAGGT (21 bp) GCCTACTACCTGGAGGCTTC (20 bp)	60,6	326
AZFb	sY127-F sY127-R	GGCTCACAAACGAAAAGAAA (20 bp) CTGCAGGCAGTAATAAGGGA (20 bp)	55,3	274
AZFb	sY134-F sY134-R	GTCTGCCTCACCATAAAACG (20 bp) ACCACTGCCAAAACCTTCAA (20 bp)	55,3	301
AZFc	sY254-F sY254-R	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA (20 bp) GAACCGTATCTACCAAAGCAGC (22 bp)	58,8	400
AZFc	sY255-F sY255-R	GTTACAGGATTCGGCGTGAT (20 bp) CTCGTCATGTGCAGCCAC (18 bp)	57,8	126

Multipleksā PCR analīze

Multipleksās PCR tiek sagatavotas pēc šādas shēmas: tiek pagatavots PCR maisījums (25 µl vienam paraugam), pievienota pētāmā parauga DNS. Maisījuma sagatavošanu veic sterilā boksā, bet attiecīgo DNS (50ng) katram paraugam pievieno PCR boksā. Tad tiek veikta PCR noteiktos temperatūras parametros (skat. zemāk). Pēc PCR iegūtie produkti tiek analizēti 6% poliakrilamīda gēlā (PAAG) (skat. 2.8. nodaļu).

PCR maisījums vienam paraugam (kopā 25µl):

PCR maisījums multiplekss A reakcijai	µl	PCR maisījums multiplekss B reakcijai
Destilēts ūdens (H ₂ O)	3	Destilēts ūdens (H ₂ O)
10XPCR buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	10XPCR buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄
25mM MgCl ₂	6,5	25mM MgCl ₂
10mM dNTP	0,5	10mM dNTP
10µM ZFY-F praimeris	1,0	10µM ZFY-F praimeris
10µM ZFY-R praimeris	1,0	10µM ZFY-R praimeris
10µM SRY-F praimeris	1,0	10µM SRY-F praimeris
10µM SRY-R praimeris	1,0	10µM SRY-R praimeris
10µM sY86-F praimeris	1,0	10µM sY84-F praimeris
10µM sY86-R praimeris	1,0	10µM sY84-R praimeris
10µM sY127-F praimeris	1,0	10µM sY134-F praimeris
10µM sY127-R praimeris	1,0	10µM sY134-R praimeris
10µM sY254-F praimeris	1,0	10µM sY255-F praimeris
10µM sY254-R praimeris	1,0	10µM sY255-R praimeris
5U/µl Taq DNS polimerāze	0,5	5U/µl Taq DNS polimerāze
Ūdenī atšķaidīta DNS matrica (50ng)	2,0	Ūdenī atšķaidīta DNS matrica (50ng)

PCR parametri:

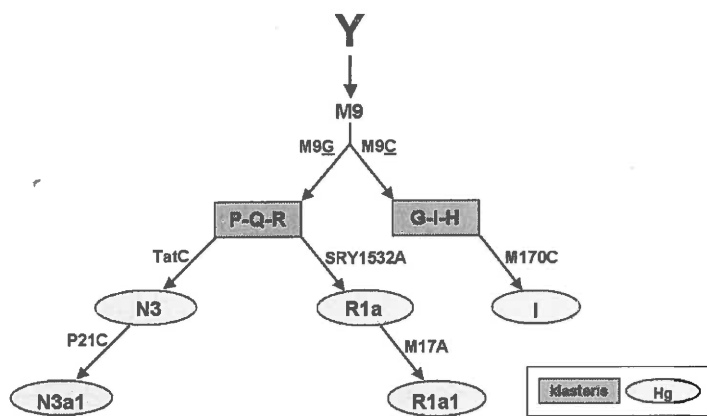
Pirmējā denaturācija	94°C, 5 minūtes	} 36 cikli
Otrējā denaturācija	94°C, 1 minūte	
Praimera piesaistīšanās (T _m ; tabulā)	62°C, 1 minūte	
DNS sintēze	72°C, 1 minūte	
Elongācija	72°C, 5 minūtes	

2.3. Y hromosomas haplogrupu analīze

(analīze veikta ar L.Pliss un I.Pelnēnas palīdzību)

Y hromosomas haplogrupu noteikšanai neauglīgu vīriešu DNS paraugos tika lietoti seši bialēliskie marķieri (2.1. attēls). Analīzē izmantotie bialēliskie marķieri (M9, SRY1532, M17, Tat, P21, M170) tika izvēlēti, pamatojoties uz literatūras datiem par Eiropas populācijās raksturīgajām Y hromosomas haplogrupām (*Y Chromosome Consortium 2002*; Karafet et al., 2008) un iepriekšējo pieredzi, veicot Y haplogrupu analīzi etniskajiem latviešiem (L.Timšas Maģistra darbs "Y hromosomas *NR1* rajona polimorfismu pētījumi latviešu populācijā").

Šajā pētījumā tika noteiktas neauglīgu vīriešu populācijai raksturīgās Y hromosomas haplogrupas, izmantojot *PCR*, restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (*RFLP*) un DNS sekvenēšanas metodi.



2.1. attēls. Y hromosomas haplogrupu (hg) noteikšanas shēma

2.3.1. Y hromosomas *NR1Y* rajona amplifikācija

PCR matrica bija neauglīgu vīriešu DNS. Bialēlisko marķieru analīzē izmantotie praimerī, to nukleotīdu secība un piesaistīšanās temperatūra apkopota 2.3. tabulā. *NR1Y* rajona sekvenca ir iegūta Gēnu bankā (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gide/human/Y un Karafet et al., 2008).

2.3. tabula. Y hromosomas *NR1Y* rajona analīzē lietotie praimerī

Marķieris (izmantotā metode)	Praimera nosaukums	Nukleotīdu secība (bp)	T _m (°C)	Amplificētā produkta garums (bp)
M9 (RFLP)	M9-F M9-R	GCAGCATATAAACTTTCAGGA (22) GTAAGACATTGAACGTTTGAACA (23)	58	127
SRY1532 (RFLP)	SRY1532-F SRY1532-R	TCCTTAGCAACCATTAATCTGG (22) AAATAGCAAAAAATGACACAAGGC (24)	59	167
M17 (sekvenēšana)	M17-F M17-R	CTGGTCATAACACTGGAAATC (21) TGACCTACAATTGAGAACTC (21)	58	335
Tat (RFLP)	Tat-F Tat-R	GACTCTGAGTGTAGACTTGTGA (22) GAAGGTGCCGTAAGTGTGAA (22)	59	112
P21 (sekvenēšana)	P21-F P21-R	TAGCCCTTGTCTTGATTACAG (22) GTGCTAGGTCCAAATATG (18)	58	819
M170 (RFLP)	M170-F M170-R	TGTTTTCATATTCTGTGCATT (21) GACACAACCCACACTGAAAAAGA (23)	58	84

PCR analīze

Tiek pagatavots PCR maisījums (25 μl vienam paraugam), pievienota pētāmā parauga DNS. Tad tiek veikta PCR noteiktos temperatūras parametros (skat. zemāk). Pēc PCR reakcijas iegūtie produkti tiek analizēti 6% PAAG.

PCR maisījums vienam paraugam (kopā 25µl):

PCR maisījums	µl
Destilēts ūdens (H ₂ O)	11
10XPCR buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
25mM MgCl ₂	6,5
10mM dNTP	0,5
10µM tiešais praimeris	1,0
10µM reversais praimeris	1,0
5U/µl Taq DNS polimerāze	0,5
Ūdenī atšķaidīta DNS matrica (50ng)	2,0

PCR parametri:

Pirmējā denaturācija	94°C, 5 minūtes	} 34 cikli
Otrējā denaturācija	94°C, 1 minūte	
Praimera piesaistīšanās (T _m ; tabulā)	59°C, 1 minūte	
DNS sintēze	72°C, 1 minūte	
Elongācija	72°C, 5 minūtes	

2.3.2. NRY rajona restrikcijas garuma polimorfisma (RFLP) analīze

RFLP metode tika izmantota tajos gadījumos, kad pētāmo paraugu analizēja attiecīgi ar M9, SRY1532, Tat, M170 marķieriem, atbilstoši izmantojot katram marķierim savu restrikcijas endonukleāzi (restriktāzi) (2.4. tabula).

2.4. tabula. NRY rajona RFLP analīzē izmantotās restrikcijas endonukleāzes

Marķieris	Mutācijas vieta	Restriktāze / buferis	RFLP produkta garums (bp)		Restrikcijas vieta
			ar mutāciju	bez mutācijas	
M9	68 C→G	<i>Hinf</i> I; R+	127	68+59	G↓ANTC
SRY1532	A35 A→G	<i>Adel</i> I; G+	167	112+55	CACNNN↓GTG
Tat	28 T→C	<i>Hin</i> III; G+	85+27	112	CATG↓
M170	327 A→C	<i>Mnl</i> I; G+	84	70+14	CCTC(N)7↓

Restrikcijas shēma vienam paraugam (kopējais tilpums 10µl):

7 µl PCR produkta

3 µl restrikcijas maisījuma, kas sastāv no:

0,3 µl restrikcijas buferis (skatīt 2.3. tabulu)

0,2 µl restriktāze (skatīt 2.3. tabulu)

2,5 µl sterils ūdens

Sagatavo restrikcijas maisījumu un pievieno parauga PCR produktu. Paraugus inkubē 2 stundas 37°C. Pēc restrikcijas iegūtie produkti tiek analizēti 12% PAAG.

2.3.3. Y hromosomas *NR1* rajona marķieru M17 un P21 sekvenēšana

PCR produkti, kas satur pavairotos M17 vai P21 rajonus, tika sekvenēti. Šo marķieru sekvenēšanai izmantoti atbilstošie reversie (sekvenēšanas) praimeru M17-R un P21-R. Sekvenēšanas metodes apraksts atspoguļots 2.9. nodaļā.

2.4. Y hromosomas haplotipu analīze

Lai noteiktu Y hromosomas haplotipus jeb mikrosatelītu (*Y-STR*, *DYS*) alēļu variantus tika analizēti 12 *K-STRs* (*Promega*, ASV).

Sagatavoti MSY rajona 12 Y-STRs produkti tiek analizēti ar ABI PRISM 310 ģenētisko analizatoru (*Applied Biosystems*, ASV), izmantojot praimeru pārus, kuros tieši praimera 5'gals ir iezīmēts ar vienu no četrām fluorescējošām iezīmēm. Fluorescējošās iezīmes un iekšējais garuma standarts 600 (Internal Lane Standard – ILS 600) tiek iezīmēts ar CXR fluorescējošo krāsu. ILS 600 satur 22 DNS fragmentus – 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 400, 425, 450, 475, 500, 550 un 600 bāzu pāru garus. Katrs ILS 600 fragments tiek iezīmēts ar karboksi-X-rodamīnu (CXR) un noamplificēts Y-STRs lokuss ar vienu no trijām fluorescējošām krāsām. ILS 600 kopā ar amplificēto paraugu tiek analizēts ar ABI PRISM 310 ģenētisko analizatoru. Iekšējais garuma standarts 600 paredzēts uznešanai katrā gēla bedrītē, lai palielinātu kapilārās elektroforēzes (CE) un veiktas analīzes precizitāti. Pirms Y-STRs detektēšanas paraugi tiek denaturēti, karsējot 3 min 95°C, tad strauji atdzesēti 3 min.

Iegūtie rezultāti tiek apskatīti un analizēti ar programmu Genotyper 3.7 (*Applied Biosystems*, ASV) un PowerTyper TM YMacro (*Promega*, ASV), nosakot katra mikrosatelīta alēles garumu.

Pacientu Y hromosomas mikrosatelītu dati tika izmantoti, lai noskaidrotu to piederību noteiktām Y hromosomas haplogrupām, izmantojot datorprogrammu (<http://www.hprg.com/hapest5>; Athey, 2005; Athey, 2006).

2.5. Gēna *CFTR* mutācijas delF508 noteikšana

(analīze veikta ar I.Pranes palīdzību)

Gēna *CFTR* 10. eksona mutācija delF508 noteikta ar heterodupleksu *PCR* analīzi (Rommens et al, 1990). Lai pavairātu nepieciešamo gēna *CFTR* fragmentu, izmantoti tabulā (2.5. tabula) apkopotie praimerī. Pēc *PCR* iegūtie produkti tiek analizēti 12% PAAG.

2.5. tabula. Gēna *CFTR* mutācijas delF508 noteikšanā izmantotie praimerī

Praimerā nošaukums	Nukleotīdu secība (bp)	T _m (°C)	Amplificētā produkta garums (bp)
CF1_for CF2_rev	TTTTCTGGATTATGCCTG TCTAGTTGGCATGCTTTGA	59,0	101

Heterodupleksu *PCR* analīze

Katru pacienta DNS paraugu amplifikācijai sagatavo pēc šādas shēmas:

- PCR* maisījumam pievieno tikai pacienta DNS (50 ng);
- PCR* maisījumam pievieno pacienta DNS (50 ng) un normālu homozigotisku kontroles DNS (50 ng) bez delF508 mutācijas;
- PCR* maisījumam pievieno pacienta DNS (50 ng) un mutantu homozigotisku kontroles DNS (50 ng) ar delF508 mutāciju.

***PCR* maisījums vienam paraugam (kopā 25µl):**

<i>PCR</i> maisījums	µl
Destilēts ūdens (H ₂ O)	a) 11 b) 9 c) 9
10X <i>PCR</i> buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
25mM MgCl ₂	6,5
10mM dNTP	0,5
10µM tiešais praimeris (CF1_for)	1,0
10µM reversais praimeris (CF2_rev)	1,0
5U/µl Taq DNS polimerāze	0,5
a) Ūdenī atšķaidīta pacienta DNS matrica (50ng)	a) 2
b) Ūdenī atšķaidīta pacienta DNS matrica (50ng) un normālā kontrole	b) 2+2
c) Ūdenī atšķaidīta pacienta DNS matrica (50ng) un mutantā kontrole	c) 2+2

PCR parametri:

Pirmējā denaturācija	94°C, 5 minūtes	} 25 cikli
Otrējā denaturācija	94°C, 1 minūte	
Praimera piesaistīšanās (T_m ; tabulā)	59°C, 1 minūte	
DNS sintēze	72°C, 1 minūte	
Elongācija	72°C, 5 minūtes	

2.6. Gēna *CFTR* mutācijas R117H noteikšana

Gēna *CFTR* 4. eksona mutācija R117H tika noteikta ar *PCR* un tai sekojošu RFLP (Boucher et al, 1999). Lai pavairotu nepieciešamo gēna *CFTR* fragmentu, izmantoti tabulā (2.6. tabulā) apkopotie praimeri.

2.6. tabula. Gēna *CFTR* mutācijas R117H noteikšanā izmantotie praimeri

Praimera nosaukums	Nukleotīdu secība (bp)	T_m (°C)	Amplificētā produkta garums (bp)
R117H_for	ACCCGGATAACAAGGAGGAG (20 bp)	59,0	248
R117H_rev	TTGTACCAGCTCACTACCTA (20 bp)		

PCR analīze

Tiek pagatavots *PCR* maisījums (25 μ l vienam paraugam), pievienota pētāmā parauga DNS. Tad tiek veikta *PCR* noteiktos temperatūras parametros. Pēc *PCR* iegūtie produkti tiek analizēti 6% PAAG.

PCR maisījums vienam paraugam (kopā 25 μ l):

<i>PCR</i> maisījums	μ l
Destilēts ūdens (H_2O)	11
10XPCR buferis ar $(NH_4)_2SO_4$	2,5
25mM $MgCl_2$	6,5
10mM dNTP	0,5
10 μ M tiešais praimeris (R117H_for)	1,0
10 μ M reversais praimeris (R117H_rev)	1,0
5U/ μ l Taq DNS polimerāze	0,5
Ūdenī atšķaidīta DNS matrica (50ng)	2,0

PCR parametri:

Pirmējā denaturācija	94°C, 5 minūtes	} 25 cikli
Otrējā denaturācija	94°C, 1 minūte	
Praimera piesaistīšanās (T _m ; tabulā)	59°C, 1 minūte	
DNS sintēze	72°C, 1 minūte	
Elongācija	72°C, 5 minūtes	

Restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma analīze (RFLP)

2.7. tabula. R117H mutācijas RFLP analīzē izmantotā restrikcijas endonukleāze

Mutācijas vieta	Restriktāze / buferis	RFLP produkta garums (bp)		Restrikcijas vieta
		ar mutāciju	bez mutācijas	
477 G→A	<i>Hae</i> II; NEB4	248	226+22	RGCGC↓Y Kur, R = A vai G Y = C vai T

Restrikcijas shēma vienam paraugam (kopējais tilpums 10µl):

- 7 µl PCR produkta
- 3 µl restrikcijas maisījuma, kas sastāv no:
 - 0,3 µl 10 X NEB 4 buferis
 - 0,2 µl *Hae* II restriktāze
 - 0,03 µl BSA
 - 2,5 µl sterils ūdens

Sagatavo restrikcijas maisījumu un pievieno parauga PCR produktu. Paraugus inkubē 2 stundas 37°C. Pēc restrikcijas iegūtie produkti tiek analizēti 12% PAAG.

2.7. Gēna *CFTR* poli-T un poli-TG polimorfismu analīze

Gēna *CFTR* 8. intronam raksturīgās timīna nukleotīdu poli-T sekvences un TG dinukleotīda atkārtojumu poli-TG polimorfismi tika analizēti ar PCR (Chillon et al., 1995) un tai sekojošu PCR produktu sekvenēšanu (sekvenēšanas pieeja izstrādāta šī darba ietvaros). Lai pavairotu nepieciešamos gēna *CFTR* rajonus un veiktu sekvenēšanu, izmantoti 2.8. tabulā apkopotie praimerī.

2.8. tabula. Gēna *CFTR* poli-T un poli-TG polimorfismu noteikšanā izmantotie praimeris

Praimera nosaukums	Nukleotīdu secība (bp)	T _m (°C)	Amplificētā produkta garums (bp)
9i5	TAATGGATCATGGGCCATGT (20 bp)	58,0	~558 (556-560)
9i3	ACAGTGTTGAATGTGGTGCA (20 bp)		
I9D9	CCGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTT (28 bp)	58,0	~202 (200-204)
E9R2	GGATCCAGCAACCGCCAACA (20 bp)		

PCR analīze

Tiek pagatavots *PCR* maisījums (25 µl vienam paraugam), pievienota pētāmā parauga DNS. Tad tiek veikta *PCR* noteiktos temperatūras parametros. Pēc *PCR* amplifikācijas iegūtie produkti tiek analizēti 6% poliakrilamīda gēlā.

***PCR* maisījums vienam paraugam (kopā 25µl):**

<i>PCR</i> maisījums	µl
Destilēts ūdens (H ₂ O)	11
10X <i>PCR</i> buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
25mM MgCl ₂	6,5
10mM dNTP	0,5
10µM tiešais praimeris (9i5)	1,0
10µM reversais praimeris (9i3)	1,0
5U/µl Taq DNS polimerāze	0,5
Ūdenī atšķaidīta DNS matrica (50ng)	2,0

***PCR* parametri:**

Pirmējā denaturācija	94°C, 5 minūtes	} 25 cikli
Otrējā denaturācija	94°C, 1 minūte	
Praimera piesaistīšanās (T _m ; tabulā)	58°C, 1 minūte	
DNS sintēze	72°C, 1 minūte	
Elongācija	72°C, 5 minūtes	

Gēna *CFTR* poli-T un poli-GT trakta sekvenēšana

PCR produkti (iegūti izmantojot 9i5 un 9i3 praimerus), kas satur pavairoto *CFTR* gēna 8. introna rajonu, tika sekvenēti. *CFTR* gēna poli-T un poli-GT trakta sekvenēšanai izmantots reversais praimeris E9R2 (sekvenēšanas praimeris).

2.8. Gēla elektroforēze

Lai veiktu PCR amplifikācijas produktu analīzi, izmantots agarozes vai poliakrilamīda gēls, kura koncentrācija ir atkarīga no analizējamā DNS fragmenta garuma. Tika izmantots 2% agarozes, kā arī 6% un 12% poliakrilamīda gēls (PAAG).

Elektroforēze agarozes gēlā

2% agarozes gēla pagatavošanai nepieciešams pagatavot agarozes (0,5 g) un 1xTBE bufera (25 ml) maisījumu. Iegūto maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī, līdz agaroze ir izšķīdusi un iegūts dzidrs šķīdums. Atdzesētai agarozei (60 °C) pievieno 1,5 µl etīdija bromīda šķīdumu (0,5 µg/ml) un pagatavo gēlu. Kad gēls sastindzis, to ievieto elektroforēzes aparātā un uzpilda ar 1xTBE buferi. Ar mikropipeti gēla bedrītē uznes garuma marķieri un pārējās bedrītēs iepilda analizējamos PCR produktus, kuri iepriekš samaisīti ar uznešanas krāsu. Elektroforēzes režīms: 100V, 70mA.

Elektroforēze poliagrīlamīda gēlā (PAAG)

PAAG pagatavošana (vienam gēlam; 15ml):

Reaģenti	6% PAAG	12% PAAG
30% AA-bisAA	3 ml	6 ml
5 x TBE buferis	3 ml	3 ml
Destilēts H ₂ O	9 ml	6 ml
10% amonija persulfāts	150 µl	150 µl
TEMED (tetrametilēndiamīds)	15 µl	15 µl

Gēls polimerizējas 20 – 30 minūtes istabas temperatūrā. Pēc tam gēlu ievieto elektroforēzes aparātā, uzpilda ar 1 x TBE buferi. Gēla bedrītēs ar mikropipeti ienes 5µl garuma marķieri un 10 µl PCR produkta, kam pievienoti 3 µl 6 x Loading Dye paraugu uznešanas krāsu. Elektroforēzes režīms: 100V, 50mA, 1 – 1,5 stundas. Pēc elektroforēzes gēlu krāso etīdija bromīda šķīdumā (0,5 µg/ml) 10 - 15 minūtes.

Analizēto DNS fragmentu vizualizācija

Gēlu apskata 590 nm UV apgaismojumā, fotografē ar „Kodak” digitālo kameru un analizē iegūto ainu.

2.9. DNS sekvenēšana

Paraugu sagatavošana

Pēc PCR produktu (iegūti izmantojot attiecīgus praimerus) elektroforēzes un paraugu aplūkošanas UV gaismā iegūtās joslas tiek izgrieztas no 6% PAAG ar žileti (katra josla ar savu žileti), un katrs gēla gabaliņš, kas satur attiecīgo joslu, tiek ievietots savā stobriņā. Pēc tam stobriņus ievieto -70°C , lai sasaldētu gēla joslas. Pēc sasaldēšanas katru gēla gabaliņu saberž ar atsevišķu plastmasas spieķīti un pievieno 20 μl destilēta H_2O . Stobriņus inkubē pa nakti istabas temperatūrā. Ja sekvenēšanu neveic nākamajā dienā, tad stobriņus atstāj $+4^{\circ}\text{C}$.

Paraugu sekvenēšana

PCR produkti, kas satur pavairoto DNS fragmentu, tika automātiski sekvenēti ar 16 kapilāru sekvenātoru ABI Prism 31 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ASV), izmantojot četrus fluorescējoši iezīmētus dezoksinukleozīdtrifosfātus jeb terminatorus.

Gatavs reakcijas terminācijas maisījums (Big Dye Terminator mix) sastāv no:

- ddATP ar dihlora-[R6G]
- ddCTP ar dihlora-[ROX]
- ddGTP ar dihlora-[R110]
- ddTTP ar dihlora-[TAMRA]
- dezoksinukleozīdtrifosfāti (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- AmriTaq DNS polimerāze, FS
- MgCl_2
- Tris-HCl buferis (pH=9)

Sekvenēšanas maisījums (vienam paraugam 10 μl):

Sekvenēšanas maisījums	μl
Big Dye	2
5 x sekvenēšanas buferis	2
Attiecīgais sekvenēšanas praimeris	1
Attiecīgā parauga PCR produkta DNS ekstrakts	5

Sekvenēšanas reakcijas parametri:

Pirmējā denaturācija	95°C, 2 minūtes	} 25 cikli
Otrējā denaturācija	95°C, 30 sekundes	
Praimera piesaistīšanās	50°C, 15 sekundes	
DNS sintēze	60°C, 4 minūtes	
Strauja atdzesēšana	4°C, 15 sekundes	

DNS attīrīšana pēc sekvenēšanas reakcijas ar amonija acetātu

1. Stobriņos, kuros ir sekvenēšanas reakcijas produkts, pievieno 35 μ l aukstu 96% etanolu un 2 μ l amonija acetātu, vorteksē, inkubē 30 minūtes pie $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. Centrifugē 15 minūtes, 13000 apgr/min. Noņem visu supernatantu;
3. Pieliek 100 μ l aukstu 70% etanolu, centrifugē 15 minūtes, 13000 apgr/min., noņem visu supernatantu.
4. Stobriņus žāvē 30 minūtes istabas temperatūrā ar atvērtiem vāciņiem.
5. Analizē ar ABI Prism 3100 analizatoru.

Iegūtie sekvenēšanas rezultāti tika analizēti, izmantojot datorprogrammu "Contig Express" (Applied Biosystems, ASV).

2.10. Datu statistiskā apstrāde

2.10.1. χ^2 statistikas metode

Lai noteiktu atšķirības Y hromosomas haplogrupu un gēna *CFTR* poli-T un poli-TG alēļu variantu sastopamības biežumā Latvijas populācijas neauglīgu vīriešu un kontroles grupās, tika izmantota χ^2 analīze.

Visi p lielumi balstīti uz divu paraugkopu salīdzinājumu, un $p < 0,05$ norāda statistiski ticamus rezultātus. Analīze tika veikta, izmantojot interaktīvo kalkulatoru (datorprogrammu), kas pieejama <http://www.quantpsy.org> (Preacher, 2001).

Multiplu salīdzinājumu (Y hromosomas haplogrupu analīze) korekcijai χ^2 analīzē, lai mazinātu statistiskās α kļūdas iespējamību, tika veikta korekcija ar Bonferoni (*Bonferoni*) testu (Bland & Altman, 1995). Šis tests bija jāpielieto, Y hromosomas haplogrupu – N3a1, R1a1 un I analīzē salīdzinot šo haplogrupu frekvenci analizēto paraugu grupās. Pēc Bonferoni korekcijas Hg N3a1, Hg R1a1 haplogrupu gadījumā p vērtība ir statistiski ticama, ja $p < 0,016$, bet Hg I gadījumā, ja $p < 0,025$.

2.10.2. Konfidences intervāla analīze (*Confidence Interval Analysis, CIA*)

Lai noteiktu atšķirības *CFTR* gēna polimorfisma variantu (poli-T, poli-TG un poli-T/TG) sastopamības biežumā neauglīgu vīriešu, kontroles grupās, tika izmantota konfidences intervāla analīzes (*CIA*) metode (Newcombe & Altman, 2000).

Konfidences intervāla analīze tika veikta, izmantojot statistiskās analīzes datorprogrammu *CIA* (*Confidence Interval Analysis; proportions and their differences, 95% confidence interval for the difference, Newcombe method*).

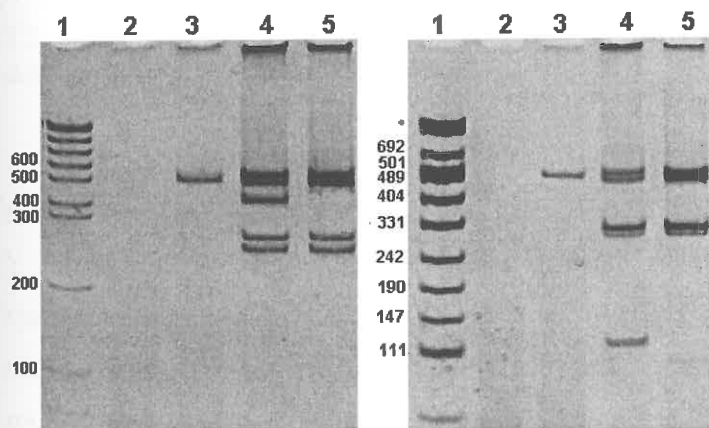
Visi p lielumi balstīti uz divu paraugkopu salīdzinājumu (neauglīgi vīrieši/kontroles grupa; neauglīgi vīrieši/CF pacienti; kontroles grupa/CF pacienti) un $p < 0,05$ norāda statistiski ticamus rezultātus.

3. Rezultāti

3.1. Y hromosomas mikrodelēcijas neauglīgiem vīriešiem

Darba ietvaros tika analizēti 115 (100 neauglīgu vīriešu un 15 cistiskās fibrozes slimnieku) DNS paraugi ar multiplekso PCR analīzi (multipleksā A un B reakcija). Lai veiktu metožu salīdzinājumu, neauglīgu vīriešu DNS paraugi, kuros novērotas mikrodelēcijas, tika analizēti ar "Promega 2.0" komerciālo komplektu.

Multipleksā PCR analīze, analizējot Y hromosomas mikrodelēcijas dotajos paraugos, visos gadījumos deva neapšaubāmus rezultātus – abās multipleksās A un B polimerāzes ķēdes reakcijās netika novērota negatīvo kontroļu kontaminācija un abas pozitīvās kontroles, gan ar sievietes DNS (PCR iekšējā kontrole), gan auglīga vīrieša DNS (vīrieša DNS pozitīvā kontrole), vienmēr deva pozitīvus signālus.



Multiplexs A

ZFY: 495 bp
SRY: 472 bp
sY254: 400 bp (AZFc)
sY86: 320 bp (AZFa)
sY127: 274 bp (AZFb)

Multiplexs B

ZFY: 495 bp
SRY: 472 bp
SY84: 326 bp (AZFc)
SY134: 301 bp (AZFa)
SY255: 126 bp (AZFb)

Multiplexs A:

1. sleja – garuma marķieris (GeneRuller100bp, Fermentas),
2. sleja – negatīvā kontrole,
3. sleja – sievietes DNS (iekšējā kontrole),
4. sleja – auglīga vīrieša DNS,
5. sleja – pacienta DNS, kas parāda AZFc delēciju.

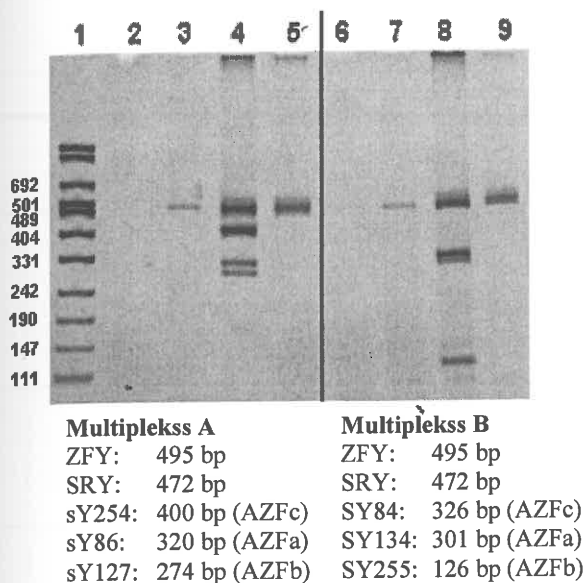
Multiplexs B:

1. sleja – garuma marķieris (pUC8, Fermentas),
2. sleja – negatīvā kontrole,
3. sleja – sievietes DNS (iekšējā kontrole),
4. sleja – auglīga vīrieša DNS,
5. sleja – pacienta DNS, kas parāda AZFc delēciju.

3.1. attēls. Neauglīga vīrieša Y hromosomas mikrodelēciju analīze, kas parāda delēciju AZFc rajonā

Y hromosomas mikrodelēciju biežums analizētajā Latvijas neauglīgo vīriešu populācijā ir 5% (5 paraugos no 100) (3.1. tabula, 3.3. attēls). Trīs gadījumos no pieciem delēcija novērota AZFc rajonā (3.1. attēls), savukārt divos gadījumos atklāta

visu AZF rajonu – AZFa, AZFb un AZFc delēcija (3.2. attēls). Dati par Y hromosomas mikrodelēciju veidiem apkopoti 3.3. attēlā.



Multiplekss A (2. – 5. sleja),
Multiplekss B (6. – 9. sleja):

1. sleja – garuma marķieris (pUC8, Fermentas),
2. un 6. sleja – negatīvā kontrole,
3. un 7. sleja – sievietes DNS (iekšējā kontrole),
4. un 8. sleja – auglīga vīrieša DNS (pozitīvā kontrole),
5. un 9. sleja – pacienta DNS, kas parāda AZFa, AZFb un AZFc delēciju.

3.2. attēls. Neauglīga vīrieša Y hromosomas mikrodelēciju analīze, kas parāda delēciju AZFa, AZFb un AZFc rajonos

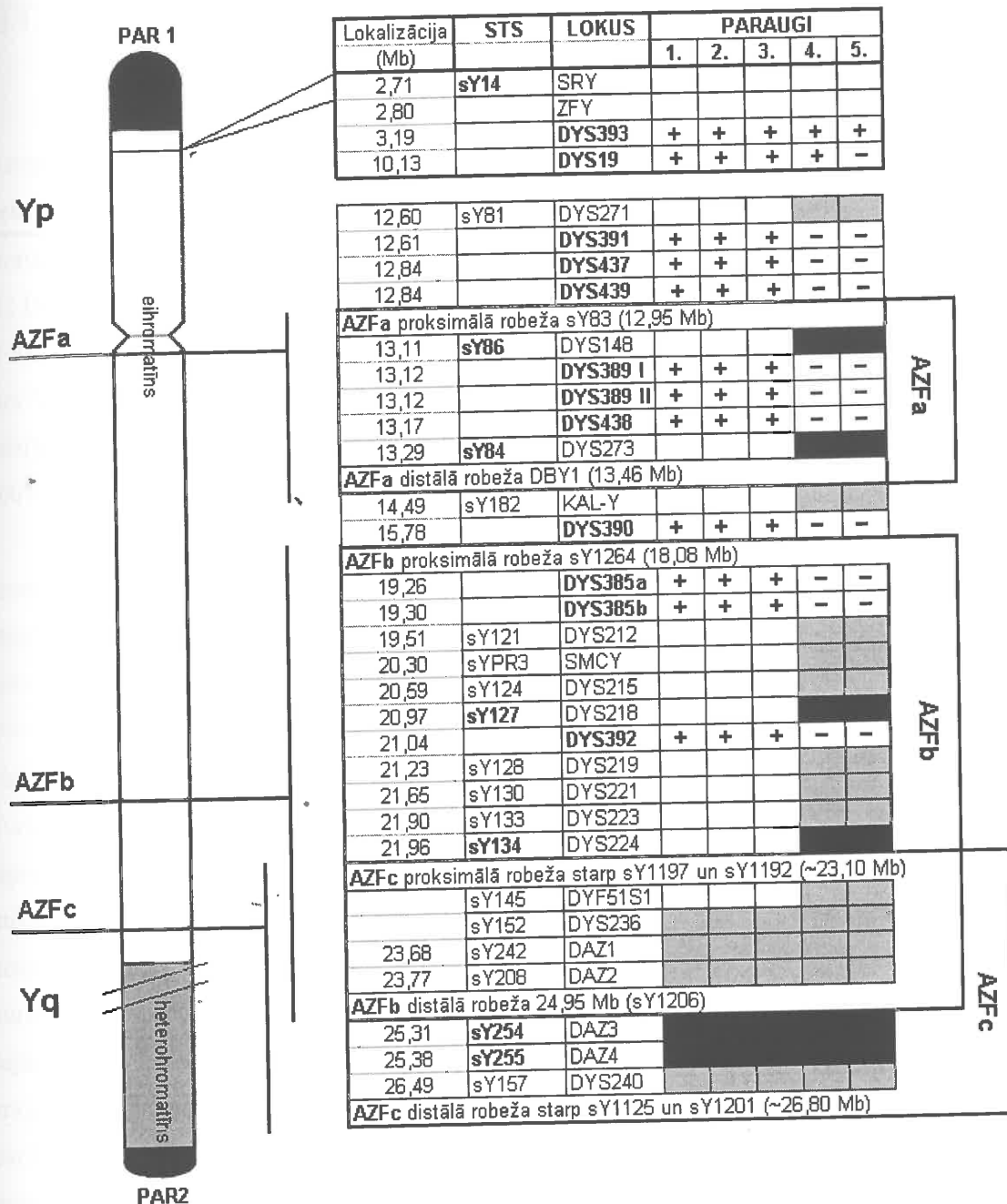
Visos gadījumos mikrodelēcijas tika atklātas neauglīgiem pacientiem ar smagu neauglības formu – azoospermiju vai oligozoospermiju. Neauglīgiem vīriešiem, kuru Y hromosomas garajā plecā atrasta delēcija AZFc rajonā (trīs gadījumi), spermatozoīdu skaits spermatogrammās ir atšķirīgs – vienā gadījumā spermatozoīdi netika novēroti (azoospermija), bet divos gadījumos atrada 1 – 5 nekustīgus spermatozoīdus (smaga oligozoospermija). Savukārt indivīdiem ar pilnu AZF rajonu (AZFa, AZFb, AZFc) delēciju (divi gadījumi) spermatogrammu dati parādīja azoospermijas fenotipu. Abām personām ar pilnu visu trīs rajonu delēciju citogēnētiskā analīze parādīja anomāliju kariotipā, respektīvi, Y hromosomas garā pleca delēciju – 46,X,del(Y)(q). Vienai personai ar visu AZF rajonu delēciju kariotipa analīzē tika novērots ļoti neliels Y hromosomas garais plecs ar aizdomām par īsā pleca izohromosomu, kas netika apstiprināta ar šajā pētījumā izmantotajām metodēm (Y hromosomas mikrodelēciju un Y hromosomas mikrosatelītu analīze). Šim indivīdam klīniskās izmeklēšanas gaitā atklāta centrālā tipa aptaukošanās un īss kakls. Neauglības ilgums trīs gadi (3.1. tabula).

3.1. tabula. Genotipu un fenotipu asociācija vīriešiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām

Nr.	Deletētais rajons	Spermatozoīdu skaits spermatogrammā	Klīniskā diagnoze	Kariotips	Fenotipiskie dati
1.	AZFc	0	azoospermija	46,XY	centrāla tipa aptaukošanās, ginekomastija, brahidaktīlija
2.	AZFc	5 mazkustīgi	smaga oligozoospermija	46,XY	epidēmiskais parotīts bērnībā, sēklinieku biopsijā atrod spermatīdas
3.	AZFc	1 – 2 nekustīgi	smaga oligozoospermija	46,XY	epidēmiskais parotīts bērnībā
4.	AZFa, AZFb, AZFc	0	azoospermija	46,X, del (Y)(q)	centrāla tipa aptaukošanās, ginekomastija, mazs labās puses sēklinieks
5.	AZFa, AZFb, AZFc	0	azoospermija	46,X, del (Y)(q)	datu nav

Analizējot 15 cistiskās fibrozes slimnieku DNS paraugus, Y hromosomas mikrodelēciju klātbūtne šajos paraugos netika apstiprināta.

Lai veiktu divu Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājumu pacientu DNS paraugi, kuros novērotas mikrodelēcijas, tika atkārtoti analizēti ar komerciālo kitu (Promega 2.0). Iegūtie rezultāti apkopoti 3.3. attēlā (pelēkās rūtīņas). Šī analīze apstiprina delēcijas analizētajos *STS* rajonos, kuri tika analizēti ar multiplekso A un B *PCR* metodi (3.3. attēls, *STS* iezīmēti trekniem burtiem) un parādīja delēcijas citos *STS*, kas izklidēti pa visiem trim AZF rajoniem. Komerciālā kita dati parāda to pašu, ko multipleksās *PCR* reakcijas – trim no pieciem paraugiem ar mikrodelēcijām Y hromosomā delēcijas lokalizētas AZFc rajonā, pārējiem diviem deletēts viss AZF reģions, respektīvi, mikrodelēcijas skārušas gan AZFa, gan AZFb, gan AZFc rajonus.



3.3. attēls. Y hromosomas mikrodelēciju analīzes dati pieciem pacientiem, kuros noteikta delēciju klātbūtne
 AZF rajoni parādīti attēla sānos, Y hromosomas specifisko marķieru (*sequence target sites* – STS; mikrosatelīti – Y-STR jeb DYS) lokalizācija atzīmēta attēla vidējā slejā. Melnās rūtiņas – attiecīgā AZF rajona/lokusa delēcija (Multipleksā A un B PCR rezultāti). Trekņiem burtiem atzīmēti tie STS, kas izmantoti multipleksajās PCR. Pelēkās rūtiņas – attiecīgā AZF rajona/lokusa delēcija (komerciālā kita rezultāti). Pluss (+): Y-STR ir paraugā; mīnuss (-): Y-STR nav paraugā. PAR1 un PAR2 – Y hromosomas pseudoautosomālie rajoni.

3.1.1. Y hromosomas mikrodelēciju biežums dažādos pētījumos

Latvijā Y hromosomas mikrodelēcijas vīriešiem ar idiopātisku neauglību sastop 5% gadījumu, kas atbilst literatūras datiem. Lai salīdzinātu Y mikrodelēciju frekvences atšķirības vai līdzību citās populācijās, veikta vairāku pētījumu analīze. Y hromosomas mikrodelēciju biežums variē dažādos pētījumos no 1% (van der Ven et al., 1997) līdz 55% (Foresta et al., 1998). Variācijas mikrodelēciju biežumā ir saistītas ar dažādiem pacientu atlases kritērijiem un ar metodoloģisko pieeju dažādībām. Bez tam Y hromosomas mikrodelēciju frekvenču atšķirības dažādos pētījumos lielā mērā saistītas ar precīzas un efektīvas šo mikrodelēciju noteikšanas metodes (Simoni et al., 2001) izveidi.

Vairāki zinātnieki apskatrakstos ir apkopjuši publicēto informāciju par Y hromosomas mikrodelēciju frekvenci no 1992. līdz 2000. gadam, tādējādi atspoguļojot periodu, kad nebija izstrādāta laba mikrodelēciju noteikšanas metode un apkopotas indikācijas pacientu atlasei (Krausz & McElreavey, 1999; Foresta et al., 2001). No 1992. gada līdz 2000. gadam bija publicēti dati par 4868 neauglīgiem vīriešiem, un Y hromosomas mikrodelēciju vidējais biežums attiecīgi bija 8,2%. Turklāt dažādos pētījumos novēroja lielas mikrodelēciju frekvences atšķirības. Kā jau iepriekš minēts, tās variēja no 1% līdz 55% un precīzais klīniski nozīmīgu mikrodelēciju biežums nebija zināms. Lai veiktu šo dažādo pētījumu salīdzināšanu, autori (Krausz & McElreavey, 1999; Foresta et al., 2001) atlasīja 3640 pacientus, kurus varēja sagrupēt vairākās grupās un tādējādi secināt par mikrodelēciju biežumu šajās grupās. Lielākā daļā analizēto pētījumu kā objektus izmantoja azoospermijas un smagas oligozoospermijas pacientus (spermatozoīdu skaits $<5 \times 10^6/\text{ml}$), kopā 1491 pacientu, un mikrodelēcijas šajā grupā novēroja 10,5%. Citos pētījumos analizēja mikrodelēciju biežumu neauglīgiem vīriešiem pirms *ICSI (intracytoplasmic sperm injection)* procedūras, kur šo delēciju frekvence bija 3,8% (32 no 850 *ICSI* kandidātiem). Bez tam, analizējot šo dažādo pētījumu datus, redzams, ka ir svarīgi definēt neauglības klīnisko formu: ir jāizšķir īsta azoospermija un smaga oligozoospermija, idiopātiska neauglība un neauglība ar zināmu spermatogēnēzes traucējumu iemeslu, obstruktīvas azoospermijas un neatlasītu pacientu grupa. Līdz ar to uzskatāmi parādīts, ka delēciju biežums korelē ar neauglības smaguma pakāpi. Neatlasītā (nav ņemts vērā oligozoospermijas cēlonis) oligozoospermijas grupā mikrodelēciju biežums ir 2,9%, idiopātiskas oligozoospermijas gadījumā

mikrodelēciju frekvence palielinās līdz 11,6% un 14,3% idiopātiskas smagas oligozoospermijas gadījumā. Līdzīgu ainu novēro neatlasītas azoospermijas pacientiem, kur mikrodelēciju biežums ir 7,3%, savukārt, izslēdzot obstruktīvas azoospermijas pacientus no pētījumiem, mikrodelēciju frekvence idiopātiskas azoospermijas gadījumā palielinās līdz 10,5 - 18%. Turklāt, ja pacienti atlasīti pēc sēklinieku histoloģiskās ainas, tad idiopātiskas smagas oligozoospermijas gadījumā, kas klīniski raksturojas ar smagu hipospermatogēnēzi, mikrodelēciju biežums ir 24,7%. Savukārt idiopātiskas azoospermijas gadījumā, kas klīniski manifestējas kā sertoli šūnu sindroms (*Sertoli cell only syndrome, SCOS*), Y mikrodelēciju frekvence ir 34,5%. Bez tam neauglīgiem vīriešiem ar spermatozoīdu skaitu $>5 \times 10^6/\text{ml}$, Y hromosomas mikrodelēcijas analizētajos pētījumos novērotas ļoti reti (0,7%) (Foresta et al., 2001). Galvenie skaidrojumi, kāpēc dažādos pētījumos ir tik atšķirīga Y hromosomas mikrodelēciju frekvence, pirmkārt, ir nedefinēti pacientu atlasē kritēriji, kā arī atšķirīgu protokolu izmantošana mikrodelēciju noteikšanai.

Vēlākās publikācijās uzskatāmi parādīts, ka sākotnējā lielā Y hromosomas mikrodelēciju frekvences variabilitāte, kas atspoguļota apskatrakstos pirms 2000. gada, visbiežāk bija mikrodelēciju noteikšanas metožu tehnisko risinājumu problēmas un neatbilstošu marķieru (*STS, sequence target sites*) izmantošana. Bez tam tika kļūdaini interpretēti gadījumi, kad novēroja viena *STS* delēciju. Tika apgalvots, ka šie gadījumi parāda mikrodelēciju mozaīkas formas, nepārbaudot šos rezultātus ar citām metodēm, kas pierāda mozaīcismu, piem., gēnu kopiju skaita vai molekulārās citoģenētikas analīzēm (Krausz & Degl Innocenti., 2006). Līdz ar precīzas Y mikrodelēciju analīzes metodes ieviešanu (Simoni et al., 2001) Y mikrodelēciju biežums dažādos pētījumos, kas izmantoja šo optimizēto metodi un ieteikto pacientu atlasē, bija līdzīgs. Tā, piemēram, sākotnēji publicētais secinājums, ka mikrodelēcijas novēro 55% *SCOS* pacientiem (Foresta et al, 1998), nav apstiprināts vēlākajos pētījumos (Simoni et al., 2004). Lielā pētījumā, kas atspoguļo Y mikrodelēciju noteikšanas 10 gadu pieredzi Itālijā, ir secināts, ka Y hromosomas mikrodelēciju biežums ir 3,2% (99 no 3073 pacientiem), bet ja Y mikrodelēciju frekvenci aprēķina, iekļaujot tikai azoospermijas un oligozoospermijas pacientus, tad Y mikrodelēciju biežums ir 5% (99 no 1997 pacientiem). Sākot no 2000. gada, šajā laboratorijā novēroja Y mikrodelēciju incidences strauju samazināšanos, kas saistīts gan ar piemērotu *STS* marķieru izmantošanu delēciju noteikšanas procedūrā, kā arī ar precīzāku pacientu atlasē. Taču delēciju biežums pacientu grupā, kuru spermatozoīdu

skaitis ir $<5 \times 10^6/\text{ml}$, saglabājas relatīvi konstants 10 gadu laikā. Šajā pētījumā vidējais mikrodelēciju biežums ir 8,3% azoospermijas gadījumā un 3,4% ($<5 \times 10^6/\text{ml}$) - 6,7% ($<2 \times 10^6/\text{ml}$) pacientiem ar smagu oligozoospermiju (Ferlin et al., 2006). Citā starptautiskā pētījumā analizētas četras dažādas populācijas (trīs Eiropas un viena Āzijas populācija). Analīzēs izmantots līdzīgs *STS* marķieru (attiecīgi arī praimeru) komplekts, un objekti atlasīti pēc neauglības formas, kas skaidri definēta kā idiopātiska vai neidiopātiska. Delēciju biežums šajās grupās variēja no 1,5 līdz 10,8%. Augstākā frekvence tika atrasta divās populācijās, kur bija vislielākais azoospermijas pacientu skaits. Aprēķinot mikrodelēciju biežumu vienādi definētiem idiopātiskiem azoospermijas un smagas oligozoospermijas pacientiem, novēroja līdzīgu delēciju frekvenci. Šajā grupā mikrodelēciju biežums bija 10 – 18%, kas liecina, ka etniskas vai ģeogrāfiskas atšķirības acīmredzami neietekmē delēciju biežumu. Apkopojot biežāk Y mikrodelēcijas atrod idiopātiskas azoospermijas pacientiem – 15%, savukārt smagas oligozoospermijas gadījumos Y mikrodelēciju biežums ir 5 – 7% (Krausz & Forti, 2006).

3.2. Y hromosomas haplogrupas un vīriešu neauglība

Lai noteiktu Y hromosomas neauglību predisponējošās haplogrupu, tika analizēti 79 neauglīgu vīriešu DNS paraugi. No 79 izanalizētajiem DNS paraugiem 56 saturēja makrohaplogrupas (skatīt pielikumu nr.1.) M9 G alēles variantu, un, izmantojot attiecīgos bialēliskos marķierus, šī Y hromosomas līnija tika sīkāk grupēta K klasterī (K*), kas attiecīgi sadalījās N3a1 haplogrupā (Hg N3a1; marķieri Tat un P21) un R1a1 haplogrupā (Hg R1a1; marķieri SRY1532 un M17). M9 C alēles variants tika noteikts 23 (Hg I un citas M9-C) gadījumos no 79 analizētiem pacientu DNS paraugiem. Dotie paraugi atbilda F klasterim (F*). Šajā paraugu grupā haplogrupa tika atrasta tikai diviem paraugiem, kas attiecīgi atbilda I haplogrupai (Hg I; marķieris M170). Diemžēl 21 paraugs neiekļāvās nevienā no analizētajām haplogrupām, līdz ar to šie paraugi pārstāv citas haplogrupas (M9-C; DE* un F*: G, J) (3.2 tabula). Līdz ar to būtu nepieciešami tālāki pētījumi, taču tas netraucēs saprast galvenās tendences, kas vērojamas “neauglības haplogrupu” pētījumos.

Lai būtu iespējams spriest par Y Hg saistību ar vīrieša neauglību, salīdzinājumam izmantoti dati, kas iegūti, veicot Y Hg analīzi etniskiem latviešiem (vīrieši, trīs paaudzēs latvieši, kontroles grupa).

Četras galvenās haplogrupas: N3a1 (K* klastera N apakšklastera N3 haplogrupas apakšhaplogrupa), R1a1 (K* klastera R apakšklastera R1 haplogrupas apakšhaplogrupa), K* (K* klasteris bez Hg N3a un Hg R1a) un I (F* klastera IJ apakšklastera haplogrupa) gan neauglīgo vīriešu, gan kontroles grupā veido ~ 90% no visa latviešu Y hromosomas genofonda un ir dominējošās haplogrupas Eiropas ziemeļaustrumu daļā. Šo haplogrupu sadalījums dažādās Eiropas populācijās un arī abās analizētajās grupās norāda uz to kopīgo pirmsvēsturi un izcelšanos.

3.2. tabula. Y hromosomas haplogrupu sastopamība neauglīgu vīriešu un kontroles grupā

Haplogrupas (Hg)	Haplogrupu sastopamība (%)		p
	Neauglīgi vīrieši n = 79	Kontroles grupa n = 153	
N3a1	24 (30,4%)	65 (42,5%)	0,223
R1a1	12 (15,2%)	60 (39,2%)	0,005
I	2 (2,5%)	13 (8,5%)	0,097
K* (bez N3 un R1a)	20 (25,3%)	10 (6,5%)	< 0,001
Citas (M9-C; DE* un F*: G, J)	21 (26,6%)	5 (3,3%)	< 0,001

Biežāk sastopamā haplogrupa analizēto neauglīgo vīriešu grupā ir N3a1, kas pārstāv 30,4% no visiem analizētajiem paraugiem (24 paraugi no 79). Savukārt tās biežums kontrolgrupas pārstāvjiem ir 42,5%. Šī haplogrupa ir pārstāvēta abās analizētajās grupās, un, veicot datu statistisko analīzi (χ^2 analīze), netika parādīta Hg N3a1 saistība ar vīriešu neauglību ($p=0,223$).

Otra biežāk sastopamā Y hromosomas haplogrupa gan kontroles, gan neauglīgu vīriešu grupā ir Hg R1a1. Salīdzinot R1a1 haplogrupas biežumu abās grupās, tika noskaidrots, ka Hg R1a1 ir mazāk atrodama neauglīgu vīriešu DNS paraugos (15,2%, jeb 12 paraugi no 79), taču kontroles grupā tās biežums ir 39,2%. Veicot χ^2 analīzi, tika noteikta ticamības p vērtība, kas bija 0,005 (statistiski ticamas atšķirības pēc χ^2 , ja $p<0,05$; pēc Bonferoni korekcijas, ja $p=0,016$) un tā parāda, ka

Hg R1a1 varētu būt vairāk raksturīga vīriešiem bez spermatogēzes traucējumiem nekā analizētajiem neauglīgiem vīriešiem.

Hg I tika pārstāvēta 2,5% (2 paraugi no 79) neauglīgu vīriešu vidū, savukārt kontroles grupā 8,5% (13 gadījumi no 153). Arī šīs abas grupas tika salīdzinātas savā starpā, veicot χ^2 analīzi, un tika noskaidrots, ka $p = 0,097$. Tātad Hg I neparāda saistību ar vīriešu neauglību.

Pētījumā tika noteikts, ka K* klasteris sastopams 25,3% neauglīgu vīriešu Y hromosomās (20 paraugi no 79). Taču kontroles grupā šīs haplogrupas sastopamība ir daudz mazāka, attiecīgi tikai 6,5%. Veicot χ^2 analīzi, tika noteikta ticamības p vērtība, kas bija $<0,001$, un tā parāda, ka K* klasteris vairāk raksturīgs analizēto neauglīgu vīriešu Y hromosomas līnijām.

3.2.1. Y hromosomas haplotipi neauglīgiem vīriešiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām

Y hromosomas mikrosatelītu (*Y-STR*) genotipēšanas metode tika izmantota šajā pētījumā, lai noteiktu Y hromosomas haplotipus pacientiem, kuriem novērotas Y mikrodelēcijas. Bez tam šī metode atkārtoti apstiprināja Y hromosomas mikrodelēcijas, jo pacientiem ar šīm mikrodelēcijām attiecīgajos Y hromosomas rajonos netika konstatēti noteikti Y hromosomas mikrosatelīti (*Y-STR* jeb *DYS*).

3.3. tabula. Mikrosatelītu dati pacientiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām

Nr.	Mikrodelēcijas veids	Y hromosomas haplotips (<i>Y-STR</i> haplotips)											Y Hg	
		DYS 393	DYS 19	DYS 391	DYS 437	DYS 439	DYS 389I	DYS 389II	DYS 438	DYS 390	DYS 385a	DYS 385b		DYS 392
1.	AZFc	14	15	11	13	9	13	29	10	23	11	14	13	N3a1
2.	AZFc	14	15	11	13	10	13	29	10	23	11	14	13	N3a1
3.	AZFc	14	15	10	13	10	14	30	10	23	11	14	13	K* (N)
4.	AZFa,b,c	14	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M9-C (F*)
5.	AZFa,b,c	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K* (R1b)

AZFc, AZFa,b,c – mikrodelēcijas AZF rajonos

DYS – mikrosatelītu apzīmējums (*Y-STR*)

Skaitļi – mikrosatelītu atkārtojumu skaits

Mīnuss (-) – mikrosatelīts nav atrasts

Y-STR genotipēšanas rezultāti ir apkopoti 3.3. attēlā un 3.3. tabulā. DNS paraugi ar AZFc mikrodelēcijām (nr. 1. – 3.) parāda dažādu *Y-STR* ainu un dažādu attiecīgo mikrosatelītu atkārtojumu skaitu.

Tā kā visi komerciālajā komplektā pieejamie *Y-STR* lokalizēti pa visu Y hromosomu, izņemot AZFc rajonu, tad iegūtie rezultāti nedod papildu informāciju par indivīdiem, kuru Y hromosomās atrasts tieši šis mikrodelēciju veids. Savukārt abu neauglīgo vīriešu paraugos (paraugi nr.4 un nr.5) ar visu trīs AZF rajonu delēciju *Y-STR* genotipēšanas dati parāda tikai divu mikrosatelītu DYS393 un DYS19 klātbūtni. Abi mikrosatelīti atrodas Y hromosomas īsajā plecā (3.3. attēls). Taču paraugs nr.5. atšķiras no parauga nr.4, jo tam trūkst DYS19 mikrosatelīta. Iegūtie dati parāda, ka, nosakot mikrosatelītu iztrūkumu Y hromosomas garajā plecā, tiek apstiprināts, ka analizēto paraugu DNS ir notikušas delēcijas attiecīgos AZF rajonos un ārpus tiem.

Bez tam *Y-STR* datus var izmantot, lai uzzinātu Y hromosomas haplotipu (alēļu/gēnu vai polimorfismu grupa, kas iedzimst pilnīgi saistīti; haplotipi veido haplogrupas) pacientiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām. Tabulā 3.3. parādīti neauglīgo vīriešu DNS paraugu Y hromosomas haplotipi ar tiem raksturīgo mikrosatelītu kombinācijas un atkārtojumu variantu. *Y-STR* analīzes dati papildina un dažos gadījumos precīzē neauglīgo vīriešu DNS paraugu piederību noteiktai Y hromosomas haplogrupai. Pacientu Y hromosomas mikrosatelītu dati tika izmantoti, lai noskaidrotu to piederību noteiktām Y hromosomas haplogrupām, izmantojot datorprogrammu (<http://www.hprg.com/hapest5/>), kuras zinātniskais pamatojums un ticamība aprakstīta divās publikācijās (Athey, 2005 un Athey, 2006).

3.4. tabula. Parauga nr.1 un nr.2 *Y-STR* haplotips:

DYS 393	DYS 19	DYS 391	DYS 437	DYS 439	DYS 389I	DYS 389II	DYS 438	DYS 390	DYS 385a	DYS 385b	DYS 392
14	15	11	13	9/10	13	29	10	23	11	14	13

Neauglīgu vīriešu DNS paraugi nr.1 un nr.2 ir ļoti līdzīgi pēc *Y-STR* haplotipa ainas (skatīt 3.4. tabulu). Atšķiras tikai DYS439 mikrosatelīta atkārtojumu reižu skaits: paraugam nr.1 DYS439 atkārtots 9, bet paraugam nr.2 – 10 reizes. Abi paraugi pēc Y haplogrupas analīzes ar bialēliskiem marķieriem atbilda N3a1 haplogrupai. Analizējot *Y-STR* genotipēšanas datus, arī tika noskaidrots, ka šie paraugi pieder N

haplogrupai (datorprogramma parādīja 99,8% ticamību). Šo paraugu piederību N haplogrupai vispārliciecinotāk raksturoja DYS437, DYS438 un DYS439 mikrosatelīti (tabulā atzīmēti treknrakstā) ar tiem raksturīgajiem īso tandēmisko atkārtojumu alēļu variantiem, respektīvi: 13, 10 un 9/10.

3.5. tabula. Parauga nr.3 Y-STR haplotips:

DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS
393	19	391	437	439	389I	389II	438	390	385a	385b	392
14	15	10	13	10	14	30	10	23	11	14	13

Paraugam nr.3 ar bialēlisko marķieru palīdzību tika noskaidrota tā piederība M9-G Y hromosomas līnijai, bet tālāk atrast tā piederību noteiktai haplogrupai nebija iespējams – ar SRY1532 marķieri netika pierādīta piederība Hg R1a, un pēc analīzes ar Tat marķieri šis paraugs neparādīja piederību Hg N3. Līdz ar to šajā gadījumā mikrosatelītu analīze deva precizējumu par parauga nr.3 piederību noteiktai Y Hg. Tā kā šī parauga Y-STR haplotipā ir 13 mikrosatelīta DYS437, 10 mikrosatelīta DYS439 un 10 mikrosatelīta DYS438 atkārtojumi (tabulā atzīmēti treknrakstā) un šie alēļu varianti raksturīgi Y hromosomas N haplogrupai (N*), tad tika noskaidrota parauga nr.3 haplogrupa (datorprogramma uzrādīja 99,9% ticamību). Apvienojot iegūtos datus par šo paraugu gan no bialēlisko marķieru analīzes, gan mikrosatelītu analīzes, izdevās noteikt, ka paraugs pieder N* haplogrupai (K klasteris), bet nav N3 haplogrupas pārstāvis.

3.6. tabula. Parauga nr.4 Y-STR haplotips:

DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS
393	19	391	437	439	389I	389II	438	390	385a	385b	392
14	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Paraugš nr.4 pēc bialēlisko marķieru analīzes atbilst M9-C alēles variantam, un arī šī parauga tālākajā analīzē ar atbilstošajiem marķieriem (M170) nevarēja noskaidrot Y hromosomas haplogrupu un paraugu klasificēja kā M9-C (F* klasteris). Šī parauga mikrosatelītu dati parāda tikai divu DYS klātbūtni (DYS393 un DYS19; tabulā atzīmēti treknrakstā), un to raksturīgo atkārtojumu variants pēc

datorprogrammas parādīja iespējamo piederību I2b1 (36% ticamība) vai G2a (34% ticamība) haplogrupām. Abas minētās haplogrupas ir F* klastera apakšgrupas. Līdz ar to arī pēc *Y-STR* datiem var pieņemt, ka paraugs nr.4 atbilst kādai no F* klastera haplogrupām. Iespējams, ka haplogrupas noteikšanu apgrūtināja tas, ka paraugam nr.4 raksturīga AZFa+b+c delēcija.

3.7. tabula. Parauga nr.5 *Y-STR* haplotips:

DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS	DYS
393	19	391	437	439	389I	389II	438	390	385a	385b	392
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pēc bialēlisko marķieru analīzes datiem, paraugs nr.5 pieder M9-G Y hromosomas līnijai. Arī šim paraugam, veicot tālākās analīzes ar attiecīgajiem bialēliskajiem marķieriem (SRY1532 un Tat), neizdevās noskaidrot tā piederību noteiktai haplogrupai. Ļoti iespējams, ka haplogrupas noteikšanu arī šim paraugam apgrūtināja paraugam nr.5 raksturīga AZFa+b+c delēcija. Veicot mikrosatelītu analīzi, paraugam tika noteikts tikai viens *Y-STR* variants, respektīvi, Y hromosomas īsā pleca *DYS393* ar tam raksturīgiem 13 atkārtojumiem (tabulā atzīmēti treknrakstā). *DYS393* ar 13 atkārtojumiem ir bieži izplatīts Rietumeiropā (~82%), šim mikrosatelītam ir zems mutāciju biežums, un tas ir pazīstams arī kā atlantiskais modālais haplotips (*Atlantic Modal Haplotype, AMH*). Bez tam tieši šim mikrosatelītam ir spēcīga korelācija ar R1b Y hromosomas haplogrupu. Līdz ar to, neskatoties uz to, ka paraugs nr.5 parādīja tikai šī viena unikālā mikrosatelīta alēles varianta (*DYS 393=13*) klātbūtni, ir iespējams noteikt parauga piederību noteiktai Y hromosomas haplogrupai, respektīvi, R1b. Datorprogramma parādīja 75% ticamību. Tas skaidrojams ar to, ka tikai viens mikrosatelīts veidoja *Y-STR* haplotipu. Savukārt ir skaidri zināms, ka *DYS393* mikrosatelīts ar atkārtojumu skaitu 12 vai 14 liecina par daudz zemāku atbilstību šai haplogrupai (pēc datorprogrammas; Athey, 2005; Athey, 2006).

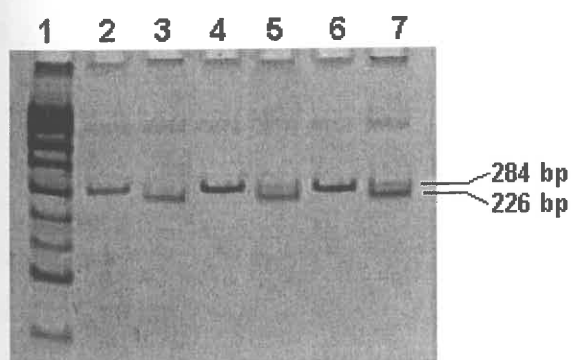
3.3. Gēna *CFTR* molekulārā izpēte

Darba ietvaros tika analizēti 82 neauglīgu vīriešu DNS paraugi. Lai būtu iespējams spriest par analizēto gēna *CFTR* mutāciju spektru neauglīgu vīriešu grupā, pētījumā tika analizēti 75 DNS paraugi: 60 vīrieši, trīs paaudzēs latvieši (tekstā kontrolgrupa) un 15 cistiskās fibrozes slimnieki (tekstā CF pacienti). Katrā *CFTR* mutācija noteikta ar standartmetodēm, ko lieto mutāciju noteikšanai, izņēmums 8. introna polimorfie rajoni (poli-T un poli-GT trakts) analizēti ar DNS sekvenēšanas palīdzību.

3.3.1. Gēna *CFTR* mutāciju delF508 un R117H analīze

Nosakot gēna *CFTR* delF508 mutācijas klātbūtni 82 neauglīgu vīriešu DNS paraugos, šī mutācija netika atklāta.

Analizējot 82 neauglīgu vīriešu DNS paraugus ar restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (RFLP) metodi, R117H mutācija tika sākotnēji noteikta 13 paraugos. Šajos paraugos mutācija atradās tikai vienā *CFTR* gēnā, līdz ar to attiecīgie neauglīgie vīrieši ir heterozigotiski pēc šīs mutācijas (3.4. attēls).

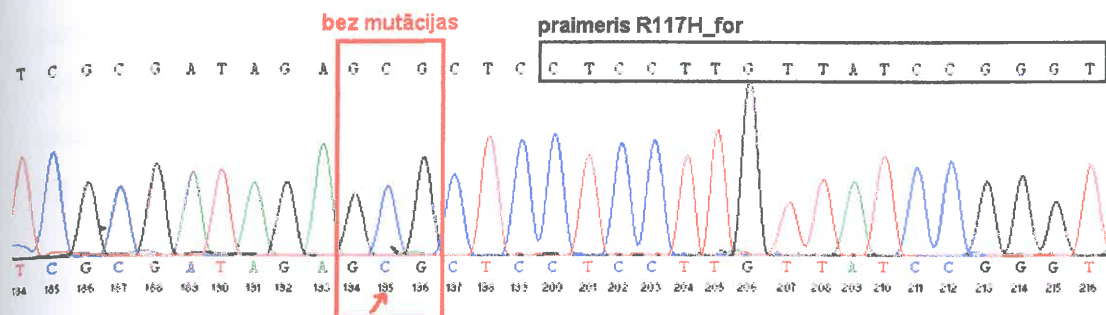


1. sleja – garuma marķieris (pUC19, Fermentas),
- 2., 4. un 6. sleja – paraugi, kas nav šķelti ar *HaeII* restriktāzi, kontrole, pēc kuras salīdzina RFLP ainas
3. sleja – paraugs, kas šķelti ar restriktāzi, mutācijas nav (226 bp josla)
5. un 7. sleja – paraugi, kas šķelti ar restriktāzi, heterozigotiski pēc mutācijas R117H (284 bp un 226 bp joslas)

3.4. attēls. R117H mutācijas analīze neauglīgu vīriešu DNS paraugos (pēc RFLP metodes)

Tā kā R117H mutācijas biežums nepārsniedz 0,8% Eiropas populācijās, tad augstais šīs mutācijas biežums dotajā pētījumā izraisīja šaubas par RFLP metodes jutību. Arī atkārtotas šo 13 paraugu RFLP analīzes parādīja tādus pašus rezultātus. Lai

pierādītu vai izslēgtu varbūtību, ka minētie paraugi satur R117H mutāciju (ir heterozigotiski pēc šīs mutācijas), šie paraugi tika analizēti ar DNS sekvenēšanas metodi. Sekvenēšanas rezultāti neapšaubāmi parādīja (3.5. attēls), ka analizētie paraugi R117H mutāciju nesatur.



3.5. attēls. R117H mutācijas sekvenču analīze neauglīgu vīriešu DNS paraugos
 Sekvence iegūta, sekvenējot neauglīga vīrieša DNS paraugu (pēc RFLP metodes aizdomas par mutāciju) ar reverso praimeru R117H_rev (ierāmēts ar melnu). Ar sarkanu ierāmēta secība, kurā novēro nukleotīdu nomainību (atzīmēts ar bultiņu) jeb R117H mutāciju (GCG normālais kodons, GTG būtu kodons ar mutāciju)

3.3.2. Gēna *CFTR* 8. introna poli-T un poli-GT polimorfismu analīze

3.3.2.1. Gēna *CFTR* poli-T polimorfisms

Gēna *CFTR* poli-T secības (poli-T trakts) 5T variants neauglīgu vīriešu grupā bija satopams 3 gadījumos no analizētajām 164 alēlēm, kas atbilst 2%, 9T variants bija novērojams 19 alēlēs jeb 12% gadījumu. Neauglīgu vīriešu DNS paraugos visbiežāk pārstāvētais poli-T variants bija 7T alēle, kas atbilst 87% no analizētām alēlēm (3.4. tabula, 3.8. attēls).

Bez tam homozigotiskā formā 7T alēle (7T/7T) atrodama 62 no analizētajiem 82 neauglīgu vīriešu DNS paraugiem. Heterozigotiskā formā kopā ar 9T alēli 7T variants (7T/9T) sastopams 15 paraugos, bet tikai trīs no analizētajiem paraugiem ir heterozigotisko genotipu 7T/5T. Pēc 9T alēles homozigotiski (9T/9T) ir divi paraugi (3.5. tabula).

Analizējot gēna *CFTR* poli-T polimorfismu kontroles grupas (vīrieši, trīs paaudzēs latvieši) DNS paraugos, 5T variants bija satopams 10 gadījumos no

analizētajām 120 alēlēm, kas atbilst 8%, 9T variants bija novērojams 18 alēlēs jeb 15% gadījumu. Līdzīgi kā neauglīgu vīriešu DNS paraugos, arī kontroles grupā visbiežāk atrodama 7T alēle, kas aptver 77% no analizētajām alēlēm (3.8. tabula, 3.8. attēls). Šī alēle homozigotiskā formā (7T/7T) tika novērota 37 no analizētajiem 60 neauglīgu vīriešu DNS paraugiem (3.9. tabula). Heterozigotiskā formā kopā ar 9T alēli 7T variants (7T/9T) sastopams 14 paraugos, un četros no analizētajiem paraugiem 7T alēle veido heterozigotisko genotipu 7T/5T. Līdzīgi kā neauglīgo vīriešu grupā, pēc 9T alēles homozigotiski (9T/9T) ir divi paraugi, turklāt atšķirīgi kā neauglīgu vīriešu DNS paraugos, kur genotips 5T/5T netika novērots, kontroles grupā trīs paraugi bija homozigotiski pēc 5T alēles (5T/5T).

3.8. tabula. Poli-T trakta alēļu polimorfisms

Poli-T trakta alēle	Neauglīgi vīrieši n=164 (%)	Kontroles grupa n=120 (%)	CF pacienti n=30 (%)
9T	19 (12%) ^a	18 (15%) ^a	21 (70%) ^{a b}
7T	142 (87%) ^c	92 (77%) ^d	8 (27%) ^{c d}
5T	3 (2%)	10 (8%) ^e	1 (3%) ^e

^a statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T alēles biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% ticamības intervāls CI=0.396-0.723; $\chi^2=24.559$, $p<0.001$)

^b statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T alēles biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.356-0.693; $\chi^2=16.320$, $p<0.001$)

^c statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T alēles biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacientu paraugos (95% CI=0.411-0.732; $\chi^2=7.834$, $p=0.005$)

^d statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T alēles biežumu kontroles grupas un CF pacientu paraugos (95% CI=0.304-0.642; $\chi^2=5.804$, $p=0.016$)

^e statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 5T alēles biežumu kontroles grupas un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.014-0.129; $\chi^2=4.744$, $p=0.029$)

70% gadījumu (21 no 30 alēlēm) cistiskās fibrozes vīrišķā dzimuma pacientu paraugos gēna *CFTR* 8. intronā lokalizēta 9T alēle, kas atbilst literatūras datiem (Chu et al., 1993). Pretēji neauglīgo vīriešu un kontroles grupas datiem, 7T alēle CF slimnieku paraugos atrodama 27% gadījumu (8 no 30 alēlēm), un tikai viens paraugs *CFTR* gēnā saturēja 5T alēli, kas savukārt biežāk bija sastopama divās pārējās grupās (3.8. tabula, 3.8. attēls). Līdz ar to, ka 9T alēle ir visvairāk pārstāvētais poli-T trakta variants CF pacientu paraugos, tad homozigotiskā formā (9T/9T) to atrod deviņos paraugos no 15 analizētajiem, heterozigotisko genotipu 9T/7T var novērot trijos

paraugos. Homozigotiski pēc 7T alēles (7T/7T) bija divi paraugi, un heterozigotiskā formā 7T alēle bija kopā ar 5T (7T/5T) tikai vienā paraugā (3.9. tabula).

3.9. tabula. Poli-T trakta genotipu polimorfisms analizētajos paraugos

Poli-T trakta genotips	Neauglīgi vīrieši n=82 (%)	Kontroles grupa n=60 (%)	CF pacienti n=15 (%)
9T/9T	2 (2%) ^a	2 (3%) ^b	9 (60%) ^{a,b}
7T/7T	62 (76%) ^c	37 (62%) ^d	2 (13%) ^{c,d}
5T/5T	nav	3 (5%)	nav
9T/7T	15 (18%)	14 (23%)	3 (20%)
5T/7T	3 (4%)	4 (7%)	1 (7%)

^a statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9T genotipa biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.326-0.778; $\chi^2=21.475$, $p<0.001$)

^b statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9T genotipa biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.311-0.770; $\chi^2=15.278$, $p<0.001$)

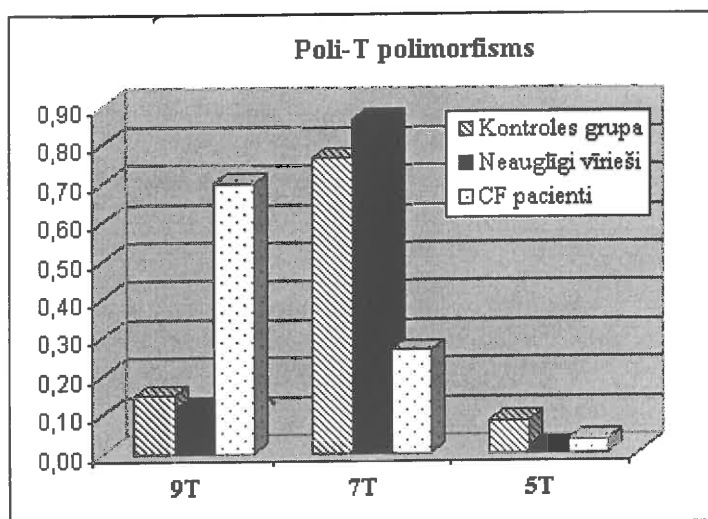
^c statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/7T genotipa biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacientu paraugos (95% CI=0.357-0.748; $\chi^2=4.978$, $p=0.026$)

^d statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/7T genotipa biežumu kontroles grupas un CF pacientu paraugos (95% CI=0.052-0.462; $\chi^2=4.472$, $p=0.034$)

Salīdzinot poli-T trakta alēļu un genotipu sastopamību analizētajos paraugos, tika noskaidrots, kuri alēļu un genotipu varianti parāda statistiski ticamas atšķirības analizētajās paraugu grupās (3.8. un 3.9. tabulas, 3.6. attēls).

Poli-T trakta 9 T alēle ir biežāk sastopama CF pacientiem, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.396-0.723; $\chi^2=24.559$, $p<0,001$) un kontroles grupas (95% CI=0.356-0.693; $\chi^2=16.320$, $p<0.001$) paraugiem. Savukārt 7T alēle, kas ir visbiežākais poli-T variants neauglīgu vīriešu DNS paraugos, neparāda statistiski ticamas atšķirības (95% CI=0.009-0.193; $\chi^2=0.344$, $p=0.558$), salīdzinot šīs alēles biežumu ar kontroles grupu, taču 7T alēle mazāk sastopama CF pacientu grupā, salīdzinot ar neauglīgu (95% CI=0.411-0.732; $\chi^2=7.834$, $p=0.005$) un kontroles grupas (95% CI=0.304-0.642; $\chi^2=5.804$, $p=0.016$) DNS paraugiem. Poli-T trakta 5T alēle, kas, pēc literatūras datiem (Chillon et al., 1995), biežāk sastopama *CBAVD* (iedzimts *vas deferens* trūkums, *congenital bilateral absence of the vas deferens*) gadījumā, šajā pētījumā vairāk pārstāvēta kontroles grupas paraugos, salīdzinot ar šīs alēles biežumu neauglīgiem vīriešiem (95% CI=0.014-0.129; $\chi^2=4.744$, $p=0.029$).

Salīdzinot 5T alēles frekvenci kontroles grupas un CF slimnieku paraugos, statistiski ticamas atšķirības netika novērotas (95% CI= -0.089-0.119; $\chi^2=0.240$, $p=0.624$).



3.6. attēls. Gēnā *CFRT* poli-T alēļu polimorfisms neauglīgu vīriešu, kontroles grupas un cistiskās fibrozes pacientu DNS paraugos

Tā kā 9T alēle, kā iepriekš minēts, ir biežāk satopama CF pacientiem, tad attiecīgi 9T/9T genotips ir visbiežāk pārstāvēts tieši CF slimnieku paraugos, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.326-0.778; $\chi^2= 21.475$, $p<0.001$) un kontroles grupas (95% CI=0.311-0.770; $\chi^2= 15.278$, $p<0.001$) paraugiem. Līdzīgi dati iegūti arī 7T/7T genotipa gadījumā, jo, pateicoties 7T alēles augstajai izplatībai neauglīgu vīriešu un kontroles grupas hromosomās, 7T/7T genotips vismazāk pārstāvēts CF pacientu grupā, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.357-0.748; $\chi^2= 4.978$, $p=0.026$) un kontroles grupas (95% CI=0.052-0.462; $\chi^2= 4.472$, $p=0.034$) paraugiem. Pārējie genotipi (5T/5T, 9T/7T, 5T/7T), kas tika novēroti analizētajos paraugos, neuzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp parauggrupām.

3.3.2.2. Gēna *CFTR* poli-TG polimorfisms

Neauglīgu vīriešu DNS paraugos gēna *CFTR* 8. introna poli-TG secību (poli-TG trakts) var veidot šādas alēles: 12TG, 11TG, 10TG un 9TG. Biežāk sastopamais TG dinukleotīdu atkārtojumu variants ir 11TG, kas veido 52% no analizētām alēlēm (86 no 164 alēlēm). Otrs biežāk sastopamais TG polimorfisms ir 10TG, kas atrodams 59 alēlēs un kas atbilst 36% no analizētajiem paraugiem. Dinukleotīdu atkārtojumi

12TG un 9TG sastopami daudz retāk, respektīvi, 15 alēlēm raksturīgs 12TG variants (9%), bet tikai 4 alēles ir satopamas 9TG formā (2%) (3.10. tabula, 3.7. attēls).

3.10. tabula. Poli-TG trakta alēļu polimorfisms

Poli-TG trakta alēle	Neauglīgi vīrieši n=164 (%)	Kontroles grupa n=120 (%)	CF pacienti n=30 (%)
12TG	15 (9%)	18 (15%)	1 (3%)
11TG	86 (52%) ^a	52 (43%) ^b	4 (13%) ^{a b}
10TG	59 (36%)	48 (40%)	15 (50%)
9TG	4 (2%) ^c	2 (2%) ^d	8 (27%) ^{c d}
8TG	nav	nav	1 (3%)
7TG	nav	nav	1 (3%)

^a statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 11TG alēles biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacientu paraugos (CI=0.211-0.501; $\chi^2=6.077$, p=0.014)

^b statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 11TG alēles biežumu kontroles grupas un CF pacientu paraugos (95% CI=0.116-0.420; $\chi^2=4.003$, p=0.045)

^c statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9TG alēles biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.112-0.421; $\chi^2=16.438$, p<0.001)

^d statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9TG alēles biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.118-0.428; $\chi^2=15.471$, p<0.001)

Turklāt 18 no 82 neauglīgu vīriešu paraugiem ir homozigotiski pēc 11TG alēles (11TG/11TG), bet 8 paraugi veido 10TG/10TG genotipu. Tikai divi paraugi CFTR gēnā nes 12TG alēli homozigotiskā stāvoklī (12TG/12TG), taču četras iepriekš pieminētās 9TG alēles nav sastopamas homozigotiskā formā, bet kopā ar 11TG alēli veido 11TG/9TG heterozigotisko genotipu (3 paraugi no 82) un 10TG/9TG genotipu. Vēl ir sastopamas citas poli-TG trakta alēļu heterozigotiskās formas. Tā, piemēram, visbiežākais variants ir 11TG/10TG genotips, kas atrodams 39 paraugos, tam seko 12TG/11TG (8 paraugi), un tikpat reti kā 11TG/9TG genotips, respektīvi, trīs paraugi pārstāv 12TG/10TG genotipu (3.11. tabula).

Līdzīgi kā neauglīgu vīriešu DNS paraugos, arī kontroles grupas paraugos CFTR gēna 8. introna poli-TG traktā var atrast šādas alēles: 12TG, 11TG, 10TG un 9TG. Poli-TG traktā vienlīdz bieži pārstāvētas ir 11TG un 10TG alēles, respektīvi, 43% (52 11TG alēlēs no visām 120 analizētajām) un 40% (48 TG10 alēles). Otrs biežākais alēļu variants šajā grupā ir 12TG (15% jeb 18 alēles), kas ir vairāk nekā neauglīgu vīriešu paraugos konstatētais (9%) (3.10. tabula, 3.9. attēls). Tikai divas

alēles pārstāv 9TG variantu, un abas šīs alēles izveido attiecīgi 10TG/9TG un 11TG/9TG genotipu. Abi minētie genotipi pārstāv katrs vienu paraugu. Homozigotiskais 11TG/11TG genotips ir viens no biežāk pārstāvētajām alēļu kombinācijām, un atrodams 12 no 60 analizētajiem kontroles grupas paraugiem (3.11. tabula). Šim genotipam seko 10TG/10TG variants, kas atrodams septiņos paraugos. Savukārt abas bieži sastopamās alēles 11TG un 10TG izveido vēl 11TG/10TG heterozigotisko genotipu, kas pārstāvēts 21 paraugā. 12TG alēle nav sastopama homozigotiskā formā, taču kopā ar 10TG veido 11TG/10TG kombināciju (12 paraugi) un 12TG/11TG genotipu (6 paraugi).

3.11. tabula. Poli-TG trakta genotipu polimorfisms

Poli-TG trakta genotips	Neauglīgi vīrieši n=82 (%)	Kontroles grupa n=60 (%)	CF pacienti n=15 (%)
12TG/12TG	2 (2%)	nav	nav
11TG/11TG	18 (22%)	12 (20%)	0
10TG/10TG	8 (10%) ^a	7 (12%) ^b	6 (40%) ^{a b}
9TG/9TG	nav	nav	3 (20%)
12TG/11TG	8 (10%)	6 (10%)	1 (7%)
12TG/10TG	3 (4%) ^c	12 (20%) ^c	0
11TG/10TG	39 (48%)	21 (35%)	2 (13%)
11TG/9TG	3 (4%)	1 (2%)	1 (7%)
10TG/9TG	1 (1%)	1 (2%)	1 (7%)
8TG/7TG	nav	nav	1 (7%)

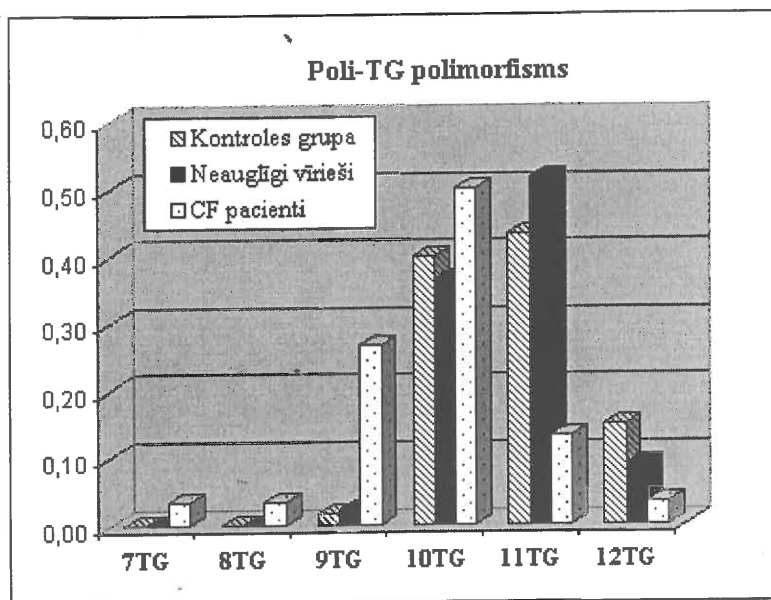
^a statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 10TG/10TG genotipa biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.084-0.550; $\chi^2=4.332$, p=0.037)

^b statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 10TG/10TG genotipa biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.056-0.533; $\chi^2=4.171$, p=0.041)

^c statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 12TG/10TG genotipa biežumu kontroles grupas un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.059-0.284; $\chi^2=6.339$, p=0.012)

Cistiskās fibrozes slimnieku DNS paraugos gēna *CFTR* poli-TG traktu var veidot šādas alēles: 12TG, 11TG, 10TG, 9TG, 8TG un 7TG. Biežāk sastopamais TG dinukleotīdu atkārtojumu variants ir 10TG, kas sastāda 50% no analizētajām alēlēm (15 no 30 alēlēm). Otra biežāk sastopamā alēle CF vīriešu poli-TG sekvencē ir 9TG, kas sastāda 27% (8 alēles no 30). Četros *CFTR* gēnos atrod 11TG alēli (13%), un pa

vienai alēlei 12TG, 8TG un 7TG poli-TG secībā (3.6. tabula, 3.9. attēls). Kopumā šajā paraugu grupā vairāk atrod īsākus poliTG variantus, kas arī atbilst literatūras datiem (Chillon et al., 1995; Cuppens & Cassiman, 2004). 8TG/7TG genotips sastopams tikai vienā paraugā no 15 analizētajiem un veido unikālu literatūrā līdz šim neminētu alēļu kombināciju (3.11. tabula), kas netika atrasta arī abās pārējas pētījumā analizētajās grupās. CF pacientu *CFRT* hromosomās neatrod arī 12TG un 11TG alēļu homozigotiskās formas, turklāt sastop 10TG/10TG (6 paraugi) un 9TG/9TG (3 paraugi) genotipus. Vēl sastopami šādi genotipi: 11TG/10TG (divi paraugi), 12TG/11TG, 11TG/9TG un 10TG/9TG (katrs genotips pa vienam).



3.7. attēls. Gēna *CFRT* poli-TG alēļu polimorfisms neaūglīgu vīriešu, kontroles grupas un cistiskās fibrozes pacientu DNS paraugos

Salīdzinot poli-TG trakta alēļu un genotipu sastopamību analizētajos paraugos, tika noskaidrots, kuri alēļu un genotipu varianti parāda statistiski ticamas atšķirības analizētajās paraugu grupās (3.10. un 3.11. tabulas, 3.7. attēls).

Poli-TG trakta alēle 11 TG vairāk sastopama neaūglīgu vīriešu (CI=0.211-0.501; $\chi^2=6.077$, $p=0.014$) un kontroles grupas (95% CI=0.116-0.420; $\chi^2=4.003$, $p=0.045$) paraugos, salīdzinot ar CF pacientu paraugkopu. Bez tam, salīdzinot neaūglīgu un kontroles grupas gēna *CFTR* poli-TG polimorfisma 11TG variantu, statistiski ticamas atšķirības netika novērotas (95% CI= -0.026-0.205; $\chi^2=0.434$ $p=0.510$). Savukārt 9TG alēle, kas atbilst vienam no īsākajiem TG dinukleotīda

atkārtojumiem, vairāk pārstāvēta CF pacientu paraugos, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.112-0.421; $\chi^2=16.438$, $p<0.001$) un kontroles grupas (95% CI=0.118-0.428; $\chi^2=15.471$, $p<0.001$) paraugiem. Pārējām TG alēlēm (12TG, 10TG), kuras novēro visās analizētajās parauggrupās, statistiski ticamas atšķirības starp analizētajiem paraugiem netika novērotas.

Salīdzinot poli-TG trakta TG genotipus analizētajās paraugu grupās, statistiski ticamas atšķirības tika novērotas 10TG/10TG un 12TG/10TG genotipu variantiem. Genotips 10TG/10TG vairāk sastopams CF pacientiem, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.084-0.550; $\chi^2= 4.332$, $p=0.037$) un kontroles grupas (95% CI=0.056-0.533; $\chi^2= 4.171$, $p=0.041$) paraugiem. Turklāt 12TG/10TG genotips ir dominējošais variants kontroles grupas hromosomās, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu grupu (95% CI=0.059-0.284; $\chi^2= 6.339$, $p=0.012$). Savukārt 12TG/10TG genotipa klātbūtne CF pacientu paraugos nav novērota. Analizējot 11TG/10TG genotipu biežumu visās trijās paraugu grupās ar statistiskās analīzes datorprogrammu CIA (ticamības intervāla analīze, *Confidence Interval Analysis, CIA; proportions and their differences 95% confidence interval for the difference, Newcombe method*), tika apstiprināts, ka 11TG/10TG genotips ir biežāk sastopams neauglīgiem vīriešiem, salīdzinot ar kontroles grupu (95% CI=0.075-0.489). Taču, veicot χ^2 analīzi, statistiski ticami dati, salīdzinot šī genotipa varianta izplatību abās minētajās paraugu grupās, netika iegūti ($\chi^2= 0.647$, $p=0.421$). Iegūtie rezultāti liecina par to, ka 11TG/10TG genotips ir biežāk sastopams neauglīgiem vīriešiem nekā kontroles grupā, taču nevar apgalvot, ka šie dati ir neapšaubāmi statistiski ticami, jo viena metode parāda statistiski ticamas atšķirības, bet otra ne. Pārējie TG genotipi, kas pārstāvēti visās paraugkopās, sastopami vienlīdz bieži vai arī ir unikāli kādai no grupām (aprakstīts iepriekš, vai skatīt 3.10 un 3.11. tabulu) un statistiski ticamas atšķirības neparādīja.

3.3.2.3. *Gēna CFTR poli-T un poli-TG trakta polimorfisms (T/TG haplotipi)*

Nosakot poli-T un poli-TG polimorfismu gēna *CFTR* 8. intronā 82 neauglīgu vīriešu hromosomās, tika iegūti šādi rezultāti: analizētie DNS paraugi izveido astoņus dažādus poli-TG dinukleotīda atkārtojumu un poli-T trakta haplotipus (poli-T alēles un poli-TG alēles apkopojums), respektīvi, 9T/11TG, 9T/10TG, 9T/9TG, 7T/12TG, 7T/11TG, 7T/10TG, 5T/12TG, un 5T/11TG (3.12. tabula; 3.8. attēls).

3.12. tabula. Poli-T un poli-TG trakta alēlu (T/TG haplotipu) polimorfisms

Poli-T un poli-TG trakta alēles	Neauglīgi vīrieši n=164 (%)	Kontroles grupa n=120 (%)	CF pacienti n=30 (%)
9T/11TG	3 (2%)	1 (1%)	1 (3%)
9T/10TG	12 (7%) ^a	15 (13%) ^b	12 (40%) ^{a b}
9T/9TG	4 (2%) ^c	2 (2%) ^d	8 (27%) ^{c d}
7T/12TG	14 (9%)	14 (12%)	1 (3%)
7T/11TG	81 (49%) ^e	45 (38%) ^f	3 (10%) ^{e f}
7T/10TG	47 (29%)	33 (28%)	3 (10%)
7T/7TG	nav	nav	1 (3%)
5T/12TG	1 (1%) ^g	6 (5%) ^g	0
5T/11TG	2 (1%)	4 (3%)	0
5T/8TG	nav	nav	1 (3%)

^a statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/10TG alēles biežumu CF pacienti un neauglīgu vīriešu paraugos (CI=0.396-0.723; $\chi^2=14.233$, $p<0.001$)

^b statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/10TG alēles biežumu CF pacienti un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.356-0.693; $\chi^2=6.264$, $p=0.012$)

^c statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9TG alēles biežumu CF pacienti un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.112-0.421; $\chi^2=16.438$, $p<0.001$)

^d statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9TG alēles biežumu CF pacienti un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.118-0.428; $\chi^2=15.471$, $p<0.001$)

^e statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/11TG alēles biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacienti paraugos (95% CI=0.220-0.494; $\chi^2=6.829$, $p=0.009$)

^f statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/11TG alēles biežumu kontroles grupas un CF pacienti paraugos (95% CI=0.099-0.386; $\chi^2=4.01$, $p=0.045$)

^g statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 5T/12TG alēles biežumu kontroles grupas un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.005-0.099; $\chi^2=3.635$, $p=0.022$)

Biežāk pārstāvētais haplotips ir 7T/11TG, kas pārstāv 49% no analizētajiem paraugiem (81 no 164 alēlēm), savukārt otrs biežākais ir 7T/10TG gēna *CFTR* haplotips, kas sastopams 47 alēlēs (29%). 7T/12TG un 9T/10TG haplotipi satopami apmēram 10% katrs. Pārējie poli-T un poli-TG trakta polimorfismi pārstāvēti samērā reti ($\leq 2\%$ katrs).

Interesanti, ka 17 paraugi (no 82 neauglīgu vīriešu paraugiem) ir homozigotiski pēc 7T/11TG haplotipa, otrs biežāk pārstāvētais homozigotiskais genotips ir 7T/10TG (8 paraugi), turklāt abu haplotipu heterozigotiskā kombinācija 7T/11TG-7T/10TG sastopama 27 paraugos (3.13. tabula).

3.13. tabula. Poli-T un poli-TG trakta genotipu (T/TG haplotipu) polimorfisms

Poli-T un poli-TG trakta genotipi *	Neauglīgi vīrieši n=82 (%)	Kontroles grupa n=60 (%)	CF pacienti n=15 (%)
9T/11TG; 9T/11TG	1 (1%)	nav	nav
9T/10TG; 9T/10TG	nav	nav	5 (33%)
9T/9TG; 9T/9TG	nav	nav	3 (20%)
7T/12TG; 7T/12TG	2 (2%)	nav	nav
7T/11TG; 7T/11TG	17 (21%)	10 (17%)	0
7T/10TG; 7T/10TG	8 (10%)	7 (12%)	1 (7%)
5T/11TG; 5T/11TG	nav	2 (3%)	nav
9T/11TG; 9T/10TG	1 (1%)	1 (2%)	0
9T/10TG; 9T/9TG	nav	1 (2%)	1 (7%)
9T/11TG; 7T/12TG	nav	nav	1 (7%)
9T/10TG; 7T/12TG	2 (2%)	6 (10%)	0
9T/10TG; 7T/11TG	9 (11%)	7 (12%)	1 (7%)
9T/9TG; 7T/11TG	3 (4%)	1 (2%)	1 (7%)
9T/9TG; 7T/10TG	1 (1%)	nav	nav
7T/12TG; 7T/11TG	8 (10%)	5 (8%)	0
7T/12TG; 7T/10TG	nav	3 (5%)	nav
7T/11TG; 7T/10TG	27 (33%)	12 (20%)	1 (7%)
5T/12TG; 7T/10TG	1 (1%)	3 (5%)	0
5T/11TG; 7T/10TG	2 (2%)	1 (2%)	0
5T/8TG; 7T/7TG	nav	nav	1 (7%)
5T/12TG; 5T/11TG	nav	1 (2%)	nav

* statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot poli-T un poli-TG genotipu variantus analizētajās parauggrupās netika novērotas

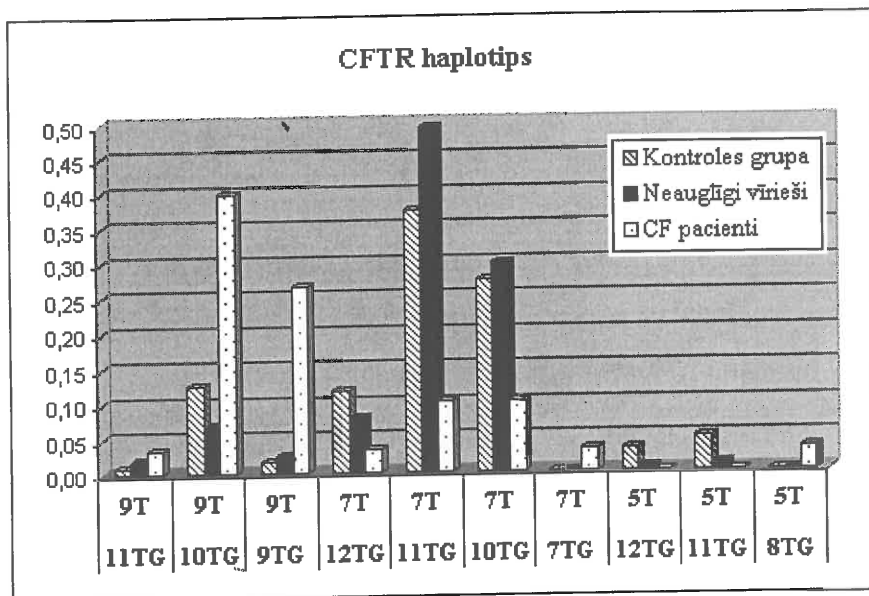
Pētot kontroles grupas pārstāvju (60 paraugi) poli-T un poli-TG polimorfismu gēnā *CFTR*, tika iegūti šādi poli-TG dinukleotīda atkārtojumu un poli-T trakta haplotipi: 9T/11TG, 9T/10TG, 9T/9TG, 7T/12TG, 7T/11TG, 7T/10TG, 5T/12TG, un 5T/11TG (3.12. tabula; 3.8. attēls). Šie haplotipi ir tādi paši kā neauglīgu vīriešu parauggrupā, un arī to biežums ir ļoti līdzīgs. Tāpat kā neauglīgu vīriešu *CFTR* gēnos, arī kontroles grupas hromosomās biežāk pārstāvētais haplotips ir 7T/11TG, kas

sastāda 38% no analizētajiem paraugiem (45 no 120 alēlēm), un otrs biežākais ir 7T/10TG gēna *CFTR* haplotips, kas sastopams 33 alēlēs (28%). 13% gadījumu sastop 9T/10TG un 12% – 7T/12TG, līdzīgi dati iegūti arī neauglīgu vīriešu paraugos, kur minētie haplotipi sastopami apmēram 10% katrs. Pārējie poli-T un poli-TG trakta polimorfismi pārstāvēti samērā reti ($\leq 5\%$ katrs). Homozigotiski pēc 7T/11TG haplotipa ir 10 paraugi (no 60), 7T/10TG homozigotiskais variants pārstāvēts septiņos paraugos, un abu haplotipu heterozigotiskā kombinācija 7T/11TG-7T/10TG sastopama 12 paraugos (3.13. tabula).

Cistiskās fibrozes slimniekiem poli-T un poli-TG traktos atrod šādus gēna *CFTR* haplotipus: 9T/11TG, 9T/10TG, 9T/9TG, 7T/12TG, 7T/11TG, 7T/10TG, 7T/7TG, 5T/8TG (3.12. tabula; 3.10. attēls). Šajā paraugu grupā parādās 7T/7TG un 5T/8TG haplotips, kas iepriekš minētajās abās paraugu grupās nebija sastopams, savukārt CF pacientiem neatrod 5T/12TG un 5T/11TG haplotipus, kas pārstāvēti desmit kontroles grupās un trīs neauglīgu vīriešu paraugos. 40% no visiem CF pacientu paraugiem veido 9T/10TG haplotips (12 alēles no 30 analizētajām). Šis variants sastopams arī piecos paraugos homozigotiskā formā. Otrs biežāk sastopamais haplotips CF grupā ir 9T/9TG, kuru sastop astoņās alēlēs (27%), un attiecīgi sešas no alēlēm izveido trīs paraugos lokalizēto 9T/9TG homozigotisko formu (3.13. tabula).

CFTR alēļu proporcijas katrā specifiskā poli-TG un poli-T haplotipā atšķirās starp neauglīgu vīriešu gēna *CFTR* alēlēm un cistiskās fibrozes pacientu alēlēm. Salīdzinot poli-T un poli-TG trakta alēļu un genotipu sastopamību analizētajos paraugos, tika noskaidrots, kuri alēļu un genotipu varianti parāda statistiski ticamas atšķirības analizētajās paraugu grupās (3.12. un 3.13. tabulas, 3.8. attēls). Biežākais haplotips starp neauglīgu vīriešu *CFTR* alēlēm ir 7T/11TG. Šis haplotips visretāk sastopams CF slimnieku paraugos, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.220-0.494; $\chi^2=6.829$, $p=0.009$) un kontroles grupas (95% CI=0.099-0.386; $\chi^2=4.01$, $p=0.045$) paraugiem. Savukārt, salīdzinot 7T/11TG haplotipu neauglīgu vīriešu un kontroles grupas paraugos, statistiski ticamas atšķirības novēroja, tikai veicot analīzi ar statistiskās analīzes datorprogrammu *CIA* (95% CI=0.002-0.230). Veicot χ^2 analīzi, statistiski ticami dati, salīdzinot šī haplotipa varianta izplatību abās minētajās paraugu grupās, netika iegūti ($\chi^2=1.292$, $p=0.256$). Iegūtie rezultāti liecina par to, ka 7T/11TG haplotips ir biežāk sastopams neauglīgiem vīriešiem nekā kontroles grupā, taču nav iespējams apgalvot, ka šie dati ir neapšaubāmi statistiski ticami, jo viena metode

parāda statistiski ticamas atšķirības, bet otra ne. Līdzīga situācija novērojama arī 7T/10TG haplotipa gadījumā, kad salīdzina neauglīgu vīriešu paraugus ar CF pacientu grupu (pēc CIA statistiski ticamas atšķirības, 95% CI=0.018-0.285; pēc χ^2 analīzes dati neparāda statistiski ticamas atšķirības $\chi^2=2.289$, $p=0.130$), kā arī salīdzinot kontroles grupu (pēc CIA statistiski ticamas atšķirības, 95% CI=0.003-0.283; pēc χ^2 analīzes dati neparāda statistiski ticamas atšķirības $\chi^2=1.967$ $p=0.161$) ar CF pacientu 7T/10TG haplotipa rezultātiem.



3.8. attēls. Gēna *CFTR* poli-T un poli-TG alēļu polimorfisms neauglīgu vīriešu, kontroles grupas un cistiskās fibrozes pacientu DNS paraugos

Savukārt 9T/10TG (40%) un 9T/9TG (27%) ir biežākie haplotipi starp cistiskās fibrozes pacientu alēlēm. 9T/10TG haplotips ir biežāk sastopams CF slimniekiem, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.396-0.723; $\chi^2=24.559$, $p<0,001$) un kontroles grupas (95% CI=0.356-0.693; $\chi^2=16.320$, $p<0,001$) paraugiem. Līdzīgi 9T/9TG haplotips ir biežāk sastopams CF pacientiem, salīdzinot ar neauglīgu vīriešu (95% CI=0.112-0.421; $\chi^2=16.438$, $p<0,001$) un kontroles grupas (95% CI=0.118-0.428; $\chi^2=15.471$, $p<0,001$) paraugiem. Savukārt neauglīgo vīriešu gēna *CFTR* haplotipu varianti īpaši neatšķiras no kontroles grupas *CFTR* haplotipiem, un statistiski ticamas atšķirības abās paraugu grupās nenovēroja, izņemot 5T/12TG haplotipu, kas biežāk sastopams kontroles grupā (95% CI=0.005-0.099; $\chi^2=3.635$, $p=0.022$). Pārējie T/TG haplotipi, kas pārstāvēti visās paraugkopās, sastopami

vienlīdz bieži vai arī ir unikāli kādai no grupām (aprakstīts iepriekš, vai skatīt 3.12 un 3.13. tabulu) un statistiski ticamas atšķirības neparādīja. Tāpat, analizējot poli-T un poli-TG trakta genotipus, statistiski ticamas atšķirības starp pētījumā aplūkotām paraugu grupām netika novērotas (3.13. tabula).

Turklāt literatūrā (Chillon et al., 1995; Cuppens & Cassiman, 2004; Gallati et al., 2009) pieminētās, neauglīgu vīriešu hromosomās atrodamās CFTR alēles, kas veido 9T/13TG, 7T/13TG, 5T/13TG, 9T/12TG, 5T/10TG, 7T/9TG, 5T/9TG haplotipu variantus, netika atrastas starp 164 neauglīgu vīriešu CFTR alēlēm.

3.3.3. Gēna *CFRT* poli-T un poli-TG polimorfismu analīze vīriešiem ar smagu neauglības formu

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem par gēna *CFRT* poli-T un poli-TG trakta alēļu un genotipu variantu savstarpējo līdzību (aprakstīts 3.2.2. punktā), tika veikta atsevišķu neauglīgu vīriešu DNS paraugu gēna *CFTR* polimorfisma datu analīze, un meklēta saistība ar noteiktām neauglības formām (3.14. tabula).

3.14 tabula. Gēna *CFRT* poli-T un poli-TG alēļu polimorfisms vīriešiem ar smagu neauglības formu

Alēles variants		Azoospermija n=24	Oligozoospermija n=74	<i>p</i>
Poli-T	9T	4	8	0,754
	7T	19	66	0,869
	5T	1	0	0,567
Poli-TG	12GT	5	6	0,258
	11GT	11	38	0,944
	10GT	6	29	0,511
	9GT	2	1	0,329
Poli-T/TG	9T/11GT	0	3	0,769
	9T/10GT	2	4	0,627
	9T/9GT	2	1	0,329
	7T/12GT	4	6	0,492
	7T/11GT	11	35	0,893
	7T/10GT	4	25	0,334
	5T/12GT	1	0	0,567

Lai veiktu šo uzdevumu, tika izvēlētas divas paraugkopas – azoospermijas (12 no 100 neauglīgu vīriešu paraugiem) un oligozoospermijas (26 no 100 neauglīgu vīriešu paraugiem) pacientu paraugi. Salīdzinot abu grupu gēna *CFTR* polimorfo alēļu

T un TG biežumu, būtu iespējams novērtēt, vai pastāv kāda saistība gēna *CFTR* polimorfismam un vīriešu neauglībai Latvijas neauglīgo vīriešu paraugos. Diemžēl, apkopojot datus un veicot statistisko datu apstrādi (χ^2 analīze; *Yates'* korelācija), neizdevās atrast stātistiski ticamas atšķirības pēc poli-T un poli TG variantu izplatības azoospermijas un oligozoospermijas gadījumā (3.14. tabula).

3.3.4. Gēna *CFTR* 8. introna poli-T un poli-TG traktu polimorfismu variācijas dažādos pētījumos

Vairāk kā 20 gadus ir zināms, ka noteiktas mutācijas (delF508, R117H, poli-T trakta 5T alēle) un polimorfismi (poli-T un poli-TG traktu 5T/12TG, 5T/13TG alēles) gēnā *CFTR* ir iemesls *CBAVD* (*congenital bilateral absence of vas deferens*) attīstībai. Taču pastiprināta uzmanība šo mutāciju un polimorfismu izpētē atsākusies, pieaugot pieprasījumam pēc mākslīgās apaugļošanas (*in vitro fertilization, IVF*) procedūrām. Tā kā tieši neobstruktīvas azoospermijas pacienti ir galvenie *IVF* kandidāti, līdz ar to gēna *CFTR* mutāciju apzināšana ir nozīmīga.

Lai salīdzinātu gēna *CFTR* poli-T un poli-TG trakta polimorfismu pētījumu rezultātus veikta vairāku, pēc analizēto objektu atlases, līdzīgu pētījumu analīze (3.15. tabula). Šajos pētījumos poli-T un poli-TG varianti noteikti neauglīgiem vīriešiem ar neobstruktīvu azoospermiju un oligozoospermiju un kontroles grupai, kas pārstāv vispārīgo populāciju. Pētījumos salīdzināto paraugkopu statistiskā analīze nav veikta, jo interesējošās mutācijas un polimorfismi paraugkopās pārstāvēti nelielā skaitā.

Zināms, ka gēna *CFTR* 8. introna 5T alēle ir biežākā mutācija *CBAVD* gadījumā un tās biežums šajā obstruktīvas azoospermijas pacientu grupā ir 21% (Cuppens & Cassian, 2004). Bez tam vairākos pētījumos, kur analizēta 5T mutācija neobstruktīvas azoospermijas vai smagas oligozoospermijas gadījumos, arī novēro 5T alēles pārsvaru neauglīgiem vīriešiem, salīdzinot ar kontroles grupu. Pēc vairāku pētījumu datiem, 5T mutācijas biežums dažādās populācijās variē no 2% (Latvija) līdz 15% (Portugāle). Lielākajā daļā analizēto pētījumu neauglīgu vīriešu populācijā 5T alēle sastopama ~ 5% gadījumu. Vislielākā šīs alēles frekvence tika novērota jau pieminētajā portugāļu pētījumā – 15%, un Itālijas neauglīgajiem vīriešiem 5T mutācija sastopama 9% gadījumu. Savukārt 5T alēles izplatība vispārīgā populācijā lielākajā daļā pētījumu ir ~ 4%, izņemums Vācijas populācija, kur 5T variants

vispārīgā populācijā sastopams reti (1%), un, pretēji, Latvijas populācijā 5T alēle kontroles populācijā sastopama biežāk (8%) nekā citviet. Portugāles, Itālijas un Vācijas pētījumos ir izdevies parādīt 5T alēles saistību ar izmainītu spermatogēnēzi, kuras iemesls nav sēklas vada obstrukcija (Granglia et al., 2004; Tamburino et al., 2008; Gallati et al., 2009).

3.15. tabula. Gēna *CFTR* poli-T polimorfismu pētījumu rezultāti

Objekti	Analizētā populācija	Poli-T alēles		
		9T	7T	5T
Neauglīgi vīrieši	Latvija (promocijas darbs; n=164)	12% (19/164)	87% (142/164)	2% (3/164)
	Grieķija (Kanavakis et al., 1998; n=20)	10% (2/20)	85% (17/20)	5% (1/20)
	ASV (Mak et al., 2000; n=90)	8% (7/90)	87% (78/90)	5% (5/90)
	Portugāle (Granglia et al., 2004; n= 44)	5% (2/44)	80% (35/44)	15% (7/44)
	Itālija (Tamburino et al., 2008; n=226)	8% (18/226)	83% (187/226)	9% (21/226)
	Vācija (Gallati et al., 2009; n=604)	14% (88/604)	80% (486/604)	6% (33/604)
Vīrieši no vispārīgās populācijas (kontroles grupa)	Latvija (promocijas darbs; n=120)	15% (18/120)	77% (92/120)	8% (10/120)
	Eiropa (vairākas Eiropas populācijas pēc Chilon et al., 1995; n=498)	12% (57/498)	83% (415/498)	5% (26/498)
	Portugāle (Granglia et al., 2004; n= 228)	15% (35/228)	81% (185/264)	4% (8/264)
	Ķīna (Huang et al., 2008; n=264)	1% (3/264)	95% (251/264)	4% (10/264)
	Itālija (Tamburino et al., 2008; n=480)	10% (46/480)	86% (413/480)	4% (21/480)
	Vācija (Gallati et al., 2009; n=94)	15% (14/94)	84% (78/94)	1% (1/94)

Gēna *CFTR* poli-T trakta 7T alēle ir biežākais šī gēna 8. introna polimorfisma variants, kas analizētajos pētījumos sastopams līdzīgā frekvencē neauglīgu vīriešu grupā (80 – 87%) un kontroles grupā (77% - 84%), izņemot Ķīnas populāciju, kur 7T alēles biežums ir 95%.

Samērā līdzīga aina novērojama, salīdzinot 9T alēles izplatību analizētajās populācijās un parauggrupās, tā, piemēram, neauglīgiem vīriešiem 9T alēles biežums

3% – 14,5% (izņēmums Portugālē – 5%), un kontroles grupā 10 – 15% (izņēmums Kīnā – 1%).

Variācijas poli-T trakta alēļu izplatībā skaidrojamas ar atšķirīgu paraugu skaitu analizētajās grupās, kā arī ar indivīdu etnisko izcelsmi (Ķīna). Bez tam pētītās obstruktīvas azoospermijas un oligozoospermijas pacientu grupas ir heterogēnas, un minētajos pētījumos pacientu atlasē kritēriji ir atšķirīgi. Iespējams, ka pastāv arī populācijai specifisks poli-T atkārtojumu spektrs, līdzīgi kā to novēro citu gēna *CFTR* mutāciju gadījumā (*Consortium for CF Genetic Analysis*; 2009). Bez tam arī nav veikti lieli pētījumi citās Eiropas populācijās, kas analizētu līdzīgu idiopātiskas neauglības gadījumus, kas, savukārt ļautu izvērtēt dažādu poli-T alēļu variantu saistību ar spermatogēnēzes traucējumiem.

Otrs gēna *CFTR* polimorfisms, kas kopā ar 5T alēli korelē ar vīriešu neauglību ir poli-TG trakta 12TG un 13TG alēļu varianti (Cuppens & Cassian, 2004). Lielākā daļa pētījumu TG polimorfisms analizēts tikai saistībā ar 5T mutāciju, kā arī pārsvarā šī polimorfisma analīze veikta *CBAVD* pacientiem, tādēļ ir grūti veikt korektu mūsu pētījuma salīdzinājumu ar citās laboratorijās iegūtiem datiem. Mūsu pētījumam līdzīga metodiskā pieeja un datu interpretācija parādīta vācu pētījumā (Gallati et al., 2009), bez tam šis pētījums uzskatāmi parāda 5T/12TG un 5T/13TG alēļu saistību ar izmaiņu spermatogēnēzi, kuras iemesls nav sēklas vada obstrukcija. Vācu pētījumā 5T/12TG un 5T/13TG haplotipus atrod tikai neauglīgu vīriešu DNS paraugos, savukārt mūsu iegūtie rezultāti šādu saistību neparāda (3.16.tabula). Turklāt novēro atšķirības arī citu *CFTR* haplotipu (7T/(TG)_n, 9T/(TG)_n) izplatībā analizētajās paraugu grupās un pētījumos. 7T/11TG haplotips sastopams abās analizētajās grupās gandrīz vienlīdz bieži abos pētījumos (~ 55% pēc Vācijas pētījuma un 38 – 49% Latvijas pētījumā). Otrs biežākais haplotips, kas sastopams abos pētījumos ir 7T/10TG alēļu variants, turklāt Vācijas vispārējā vīriešu populācijā haplotips 7T/10TG sastopams biežāk (21,3%) kā neauglīgu vīriešu grupā (14,8%). Latvijas populācijā šis haplotips abās parauggrupās izplatīts vienlīdz bieži (28,7% un 27,5%). 9T/11TG haplotips biežāk sastopams Vācijas populācijas kontroles grupā (5,3%) salīdzinot ar Latvijas populācijas kontroles grupu (0,8%), taču neauglīgu vīriešu grupā abos pētījumos atšķirības nenovēro. Savukārt 9T/10TG haplotips tieši pretēji biežāk sastopams Latvijas populācijas kontroles grupā (12,5%) salīdzinot ar Vācijas populāciju (9,6%), turklāt Vācijas neauglīgu vīriešu grupā (11,6%) šo haplotipu sastop biežāk kā Latvijas neauglīgu vīriešu grupā (7,3%).

3.16. tabula. Gēna *CFTR* poli-T un poli-TG haplotipu pētījumu rezultāti

Poli-T un poli-TG haplotips (poli-T, poli-TG trakta alēles)	Promocijas darbs		Gallati et al., 2009	
	Neauglīgi vīrieši (n=164)	Kontroles grupa (n=120)	Neauglīgi vīrieši (n=604)	Kontroles grupa (n=94)
9T/11TG	1,8%	0,8%	2,8%	5,3%
9T/10TG	7,3%	12,5%	11,6%	9,6%
9T/9TG	2,4%	1,7%	0,2%	-
7T/12TG	8,5%	11,7%	11,2%	5,3%
7T/11TG	49,4%	37,5%	53,8%	56,4%
7T/10TG	28,7%	27,5%	14,8%	21,3%
5T/13TG	-	-	0,7%	-
5T/12TG	0,6%	5,0%	2,2%	-
5T/11TG	1,2%	3,3%	2,6%	1,0%

Iespējams, ka variācijas poli-T un poli-TG haplotipu izplatībā arī skaidrojamas ar atšķirīgu analizēto paraugu skaitu un heterogēno neobstruktīvas azoospermijas un oligozoospermijas pacientu grupu, kas analizēta abos pētījumos.

Līdz ar to vēl jo projām ir aktuāli paplašināt analizēto paraugu skaitu, it īpaši pacientu ar neobstruktīvu azoospermiju un smagu oligozoospermiju, lai būtu iespējams izdarīt secinājumus par gēna *CFTR* mutāciju un polimorfismu lomu vīriešu reproduktīvās patoloģijas attīstībā.

4. Diskusija

4.1. Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodes ieviešanas nepieciešamība Latvijā

Y hromosomas mikrodelēcijas ir otrs biežākais ģenētiskais spermatogēnes traucējumu iemesls vīriešu neauglībai pēc Klainfeltera sindroma (Simoni et al., 2004). Y hromosomas mikrodelēciju noteikšana ir rutīnas diagnostikas metode daudzās pasaules un Eiropas molekulārās ģenētikas vai androloģijas laboratorijās. Eiropas andrologu akadēmija (*European Academy of Andrology, EAA*) un Eiropas Molekulārās ģenētikas kvalitātes kontroles apvienība (*European Molecular Genetics Quality Network, EMQN*) atbalsta un sekmē Y hromosomas mikrodelēciju analīzes ieviešanu laboratorijās, publicējot rekomendācijas šīs analīzes veikšanai un organizējot ārējās kvalitātes pārbaudes. Tā kā Latvijā līdz šim Y hromosomu noteikšana netika piedāvāta kā diagnostikas metode, tad šī darba viens no galvenajiem uzdevumiem bija apbērt un ieviest Latvijā šo precīzo un jutīgo analīzes metodi.

Pilnveidojoties izpratnei par Y hromosomas molekulāro organizāciju un Y hromosomas mikrodelēciju rašanās mehānismiem un izstrādāta šo delēciju molekulārā diagnostikas metode. Analīzes pamatā ir Y hromosomai specifisku secību klātbūtnes vai tās trūkuma (delēcijas) noteikšana ar multiplekso polimerāzes ķēdes reakciju (*PCR*), kas arī padara šo metodi par labi piemērotu akurātai diagnostikai.

Kāpēc nepieciešams ieviest Y hromosomas mikrodelēciju analīzes metodi Latvijā? Pirmkārt, Y hromosomas mikrodelēcijas nav iespējams noteikt, balstoties uz citoģenētiskām (hromosomu krāsošanas un mikroskopiskas analīzes) metodēm, klīnisko anamnēzi vai spermas analīzi. Līdz ar to nepieciešamas molekulārās diagnostikas metodes, tādas kā polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*). Otrs aspekts nepieciešamībai ieviest šo metodi ir parādīt Eiropas kontekstā, ka arī Latvijā iespējams precīzi un kvalitatīvi veikt Y hromosomas mikrodelēciju analīzi. *EMQN* organizētās kvalitātes anonīmās pārbaudes rāda, ka vēl joprojām ir laboratorijas, kurās kļūdaini tiek noteikta mikrodelēciju klātbūtne analizētajos paraugos (pacienta genotips) vai arī dati tiek nepareizi interpretēti (pacienta fenotips). Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikas precizitāte tika pārbaudīta 2009. gadā (A.Puzukas

promocijas darba ietvaros), piedaloties *EMQN* organizētajā laboratoriju kvalitātes kontroles testēšanā. Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas laboratorijā anonīmiem *EMQN* atsūtītiem paraugiem ar nezināmu mikrodelēciju ainu tika pareizi noteikti genotipi – konkrētu AZF rajonu mikrodelēciju klātbūtne vai to trūkums, kā arī izveidota kvalitatīva atskaites forma pacientam, kurā precīzi atspoguļotas rekomendācijas attiecīgo mikrodelēciju gadījumā. Pēc *EMQN* speciālistu izvērtējuma RSU Molekulārās bioloģijas laboratorijā realizētā Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikas un interpretācijas precizitāte tika novērtēta ar 2 punktiem (maksimālais punktu skaits par genotipa precīzu noteikšanu) un 1,67 punktiem par interpretāciju (apstiprinājums pielikumā).

* Kāpēc vajag atklāt Y hromosomas mikrodelēcijas? Tā kā līdz šim Y mikrodelēcijas Latvijā netika noteiktas, tad metodes ieviešana ļāva apzināt Y hromosomas mikrodelēciju biežumu vīriešiem ar idiopātisku neauglību. Darba ietvaros tika noteikts, ka mikrodelēciju biežums ir 5%. Bez tam aprobēto metodi iespējams piedāvāt kā rutīnas skrīninga metodi idiopātiskas vīriešu neauglības gadījumā, tādejādi daļai no šo pacientu, ja mikrodelēciju klātbūtne tiktu apstiprināta, varētu palīdzēt uzstādīt diagnozi, izvērtēt mākslīgās apaugļošanas iespēju un potenciālos riskus, kā arī atvieglot pāra ģenētisko konsultēšanu.

4.1.1. Ieteiktais algoritms Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas shēmā

Kādos gadījumos jāveic Y hromosomas mikrodelēciju analīze? Pēc citu autoru datiem un darbā iegūtiem rezultātiem, Y hromosomas mikrodelēciju analīze jāveic neauglīgiem vīriešiem, kuriem novēro samazinātu spermatozoīdu skaitu ($<5 \times 10^6/\text{mL}$) – smagu oligozoospermiju vai spermatozoīdu trūkumu ejakulātā – azoospermiju, kuras pamatā nav obstrukcijas, neauglība nav ārējās vides izraisīta un tās cēlonis nav hormonāli traucējumi vai citoģenētiska patoloģija (skatīt algoritmu).

Algoritmā izmantoto saīsinājumu skaidrojums:

LH – lutenizējošais hormons;

FSH – folikulu stimulējošais hormons;

T – testosterons;

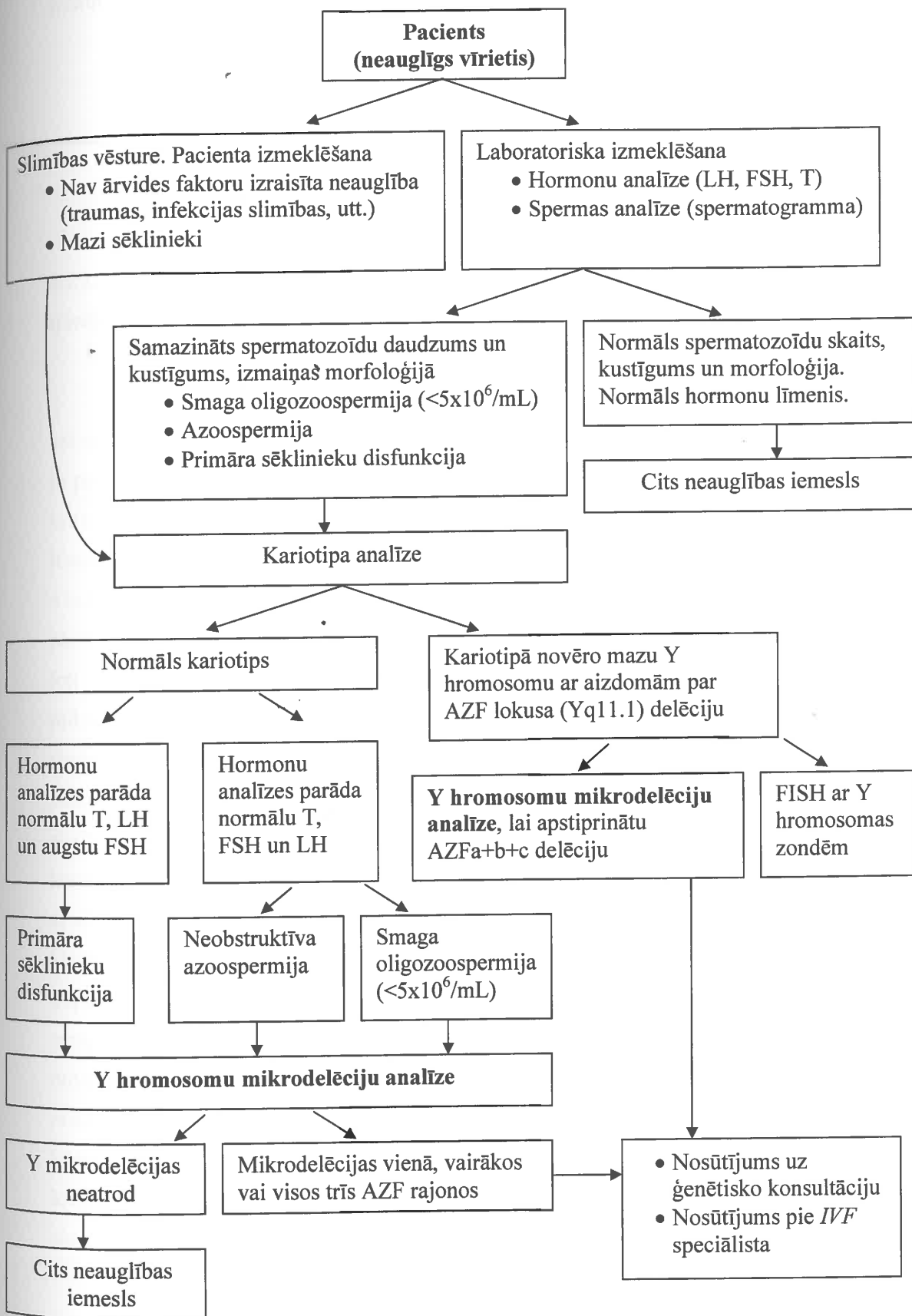
Azoospermija – nav spermatozoīdu ejakulātā

Oligozoospermija – samazināts spermatozoīdu skaits ejakulātā

FISH – fluorescentā hibridizācija (*fluorescent in situ hybridization*);

IVF – mākslīgā apaugļošana (*in vitro fertilization*)

Algoritms Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanai vīriešu neauglības gadījumā



Izvērtējot šajā pētījumā iegūtos datus un literatūrā aprakstīto, ir iespējams izdalīt trīs gadījumus, kad vajadzētu veikt Y hromosomas mikrodelēciju analīzi:

- 1) lai noteiktu neauglības etioloģiju un precizētu neauglības diagnozi;
- 2) lai izlemtu par sēklinieku biopsijas nepieciešamību/lietderīgumu azoospermijas gadījumos, un spermatozoīdu ekstrakciju no sēkliniekiem;
- 3) lai veiktu pāra ģenētisko konsultēšanu pirms tiek veikta mākslīgā apaugļošana.

4.1.1.1. Y hromosomas mikrodelēciju analīze neauglības diagnozes precizēšanai un slimības etioloģijas noteikšanai

Y hromosomas analīze būtu jāveic vīriešiem ar neobstruktīvu azoospermiju vai smagu oligozoospermiju. Jautājums, ko uzskatīt par smagu oligozoospermiju, vēl jo prožām ir atklāts tāpēc, ka nav skaidri definēts, kādi ir smagas oligozoospermijas kritēriji. Piemēram, *EMQN* Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas rekomendācijās iesaka šo analīzi veikt pacientiem, kuru spermatogrammas spermatozoīdu skaits ir $<1 \times 10^6/\text{mL}$, pamatojot, ka tieši šajā grupā biežāk novēro mikrodelēcijas. Savukārt pacientiem ar spermatozoīdu skaitu $>1 \times 10^6/\text{mL} - 5 \times 10^6/\text{mL}$ mikrodelēcijas novēro ļoti reti. Visbiežāk mikrodelēcijas novēro azoospermijas pacientiem, kuriem mikrodelēciju analīzi veic pirms sēklinieku biopsijas, piemēram, Sertoli šūnu sindroma gadījumā (*SCOS*) (Simoni et al., 2004). Savukārt P. Vogt (2005), apkopojot vairāku autoru datus, parāda, ka mikrodelēcijas atrod arī pacientiem ar spermatozoīdu skaitu $<10 \times 10^6/\text{mL}$. Vēl citi autori apgalvo, ka mikrodelēcijas jānosaka pacientiem, kuru spermatozoīdu skaits ir $<5 \times 10^6/\text{mL}$ (Krausz & McElreavey, 1999; Reyes-Vallejo et al., 2006; Bhasin, 2007). Izvērtējot šajā darbā iegūtos rezultātus par mikrodelēciju klātbūtni un spermatozoīdu skaitu, var secināt, ka Latvijas neauglīgo vīriešu populācijā mikrodelēcijas novēro gadījumos, kad spermatogrammās dati liecina par smagu neauglības formu, respektīvi, spermatozoīdi nav atrodami ejakulātā vai arī novēro tikai pāris spermatozoīdus mikroskopijas redzes laukā. Tādējādi varētu ieteikt mikrodelēciju analīzi veikt līdzīgi, kā iesaka Simoni et al, tomēr, lai atstātu neievērotu kādu mikrodelēciju un līdz ar to netiktu noteikta nepareiza diagnoze, ieteicamais kritērijs varētu būt analizēt visus atbilstošos neauglības gadījumus, ja spermatozoīdu skaits ir $<5 \times 10^6/\text{mL}$. Mikrodelēciju analīze vīriešiem ar vieglākām neauglības formām

nebūtu rekomendējama, jo Y hromosomas mikrodelēciju biežums šajā grupā ir ļoti zems.

Lai precizētu, vai mikrodelēcijām pastāv vēl kāda korelācija ar jau iepriekš minēto spermatozoīdu skaita samazināšanos ejakulātā, ir veikti dažādi pētījumi un meklētas iespējamās korelācijas. Oates ar kolēģiem, analizējot 42 oligozoospermijas un azoospermijas pacientus ar AZFc mikrodelēcijām, noteica, ka šiem vīriešiem nenovēro kādas noteiktas nozīmīgas veselības problēmas (Oates et al., 2002). Arī par reproduktīvo funkciju atbildīgo hormonu – folikulu stimulizējošā hormona (FSH), lutinizējošā hormona (LH) un testosterona (T) līmenis gan šo pacientu grupā, gan arī neauglīgo vīriešu grupā, kuriem ir neobstruktīva azoospermija, bet Y mikrodelēcijas nav nōvērotas to Y hromosomās, neparādīja nozīmīgas atšķirības (Reyes-Vallejo et al., 2006). Arī analizējot šajā pētījumā atlasīto neauglīgo pacientu datus, nebija iespējams atrast kādu saistību ar mikrodelēciju klātbūtni un hormonālām izmaiņām. Daudzi autori mēģinājuši atrast saistību Y hromosomas mikrodelēciju klātbūtni ar vīriešu reproduktīvās sistēmas anomālijām. Arī šajos pētījumos netika novērota nekāda asociācija ar reproduktīvā trakta anatomiskām izmaiņām vai saistība ar hipospādiju un kriptorhismu azoospermijas gadījumos (Reyes-Vallejo et al., 2006). Tas norāda, ka vīriešiem, kuriem identificē mikrodelēcijas Y hromosomā, nav citas veselības problēmas, kā vienīgi neauglība. Turklāt var secināt, ka vīriešiem ar zināmu neauglības iemeslu, tādu kā kriptorhisms vai pārslimota epidēmiskā parotīta radīts orhīts, nav nepieciešams veikt Y hromosomas mikrodelēciju analīzi, jo minētie notikumi nav saistīti ar mikrodelēcijām. Tāpat Y hromosomas mikrodelēcijas nav nepieciešams noteikt pacientiem ar obstruktīvu azoospermiju, jo šajos gadījumos jāmeklē citi cēloņi – anatomiski defekti vai citi ģenētiski determinēti iemesli, piemēram, mutācijas CFTR gēnā.

4.1.1.2. Y hromosomas mikrodelēciju analīze azoospermijas pacientiem pirms sēklinieku biopsijas veikšanas

Idiopātiskas azoospermijas (neobstruktīvas) gadījumā molekulāro Y hromosomas mikrodelēciju analīzi iespējams izmantot kā alternatīvu – pacientam “draudzīgu” metodi, lai noskaidrotu nobriedušu spermatozoīdu klātbūtni vai to trūkumu sēkliniekos pirms sēklinieku biopsijas veikšanas. Ja neizmanto Y mikrodelēciju noteikšanas metodi, tad, lai noteiktu spermatozoīdu klātbūtni, jāveic

sēklinieku biopsija ar tai sekojošu biopsijas parauga gēnu ekspresijas analīzi, kas parādītu, vai sēklinieka audos var atrast marķiera gēnu, kas tiek ekspresēts pēcmeiotiskajās vīrišķajās dzimumšūnās, respektīvi, spermatīdās vai nobriedušos spermatozoīdos. Ja šo ekspresiju novēro, tas liecina, ka sēkliniekos ir nobrieduši spermatozoīdi. Gadījumos, kad neauglīgs vīrietis izvēlas veikt mākslīgās apaugļošanas procedūru (*intracytoplasmic sperm injection, ICSI*), nepieciešams veikt sēklinieku biopsiju jeb spermatozoīdu ekstrakciju no sēkliniekiem (*testicular sperm extraction, TESE*). Pirmkārt, sēklinieku biopsija pacientam ir nepatīkama procedūra, otrkārt, iespējams, ka tā tiks veikta veltīgi, jo netiks atrasti nobrieduši spermatozoīdi pēc ekspresijas analīzes. Visbeidzot iespējams, ka pacients būs jāpakļauj atkārtotai sēklinieku biopsijai, lai iegūtu nobriedušus spermatozoīdus tālākām mākslīgās apaugļošanas manipulācijām. Tādējādi izmantojot Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodi un noskaidrojot AZF delēciju variantu pirms sēklinieku biopsijas, tiek aiztaupīta pacientam nevajadzīga/nelieterīga procedūra, kā arī dārgas un laikietilpīgas gēnu ekspresijas analīzes.

Y hromosomas mikrodelēciju molekulārie pētījumi atklāj šo delēciju rašanās mehānismus un parāda, kuri spermatogēnēzē iesaistītie gēni ir zaudēti, kas savukārt ļauj saprast katra Y hromosomas mikrodelēcijas varianta fenotipisko izpausmi un līdz ar to netieši, bet precīzi demonstrē, kuros gadījumos sēklinieku biopsija dos vēlamo efektu – tiks iegūti nobrieduši spermatozoīdi. Pacienti ar pilnu AZF rajona delēciju parasti sēkliniekos nav dzimumšūnu (Sertoli šūnu sindroms), savukārt pacientiem ar pilnu AZFb rajona delēciju sēkliniekos neatrod pēcmeiotiskās dzimumšūnas (spermatīdas un spermatozoīdi). Pacientu grupai ar AZFa un AZFb mikrodelēcijām nav ieteicams veikt sēklinieku biopsiju, lai ekstrahētu spermatozoīdus un veiktu turpmāku *ICSI*, jo parasti šīs procedūras nav veiksmīgas un nesniedz vēlamo rezultātu (Vogt, 2005). Mikrodelēcijas, kas skar vairāk nekā vienu AZF rajonu (AZFa+c un AZFa+b+c), arī ir saistītas ar situāciju, kad ar sēklinieku biopsijas palīdzību nav iespējams iegūt spermatozoīdus (Brandel et al., 1998).

Turklāt, ja pacienta Y hromosomā atklātas daļējas AZFb, AZFc vai arī pilna AZFc rajona delēcijas, tad šādos gadījumos bieži (50% gadījumu) nobriedušus spermatozoīdus atrod vismaz dažos izlocītajos sēklinieku kanāliņos. Minētajai pacientu grupai parasti dažos sēklinieku kanāliņos novēro pilnu spermatogēnēzes procesu, kā rezultātā dažreiz pat iespējams novērot dažus nobriedušus spermatozoīdus

pacienta ejakulātā (piemēram, kriptozoospermijas gadījumā, spermatozoīdu skaits < 1milj/ml) (Vogt, 2005).

Jāatzīmē, ka Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metode ir balstīta uz divu katram Y hromosomas AZF rajonam specifisku marķieru (*sequence target sites, STS*) klātbūtnes vai to trūkuma noteikšanu katrā no AZF rajoniem. Ja analīze uzrāda tikai vienu *STS* trūkumu AZFa vai AZFb rajonā, tad tā ir jāatkārto vai arī, atkārtoti iegūstot tādu pašu rezultātu, jānoskaidro šo mikrodelēciju izmērs un robežpunkti, izmantojot citus marķierus (nav iekļauti rutīnas diagnostikā) (Simoni et al., 2004; Vogt, 2005). Jo tikai pilna AZFa un/vai AZFb rajona delēcijas pacienta Y hromosomā liecinās par spermatoģenēzes traucējumiem un nobriedušu spermatozoīdu trūkumu izlocītājos sēklinieku kanāliņos.

4.1.1.3. Y hromosomas mikrodelēciju analīze un pāra ģenētiskā konsultēšana, pirms tiek veikta mākslīgā apaugļošana

Neauglīgiem vīriešiem, kuri atbilst iepriekš aprakstītajiem kritērijiem, Y hromosomas mikrodelēciju analīze ir nozīmīga ne tikai diagnozes uzstādīšanai, bet arī ģenētiskajai konsultēšanai pirms mākslīgās apaugļošanas procedūras. Y hromosomas izmaiņas, kas ir konstatētas pacienta Y hromosomā ar *ICSI* metodes palīdzību, tiks nodotas 100% visiem vīrišķā dzimuma pēcnācējiem. Ir zināms, ka vīrišķā dzimuma pēcnācējiem, kuru tēvu Y hromosomā novēro mikrodelēcijas (biežāk AFZc), būs tāds pats Y hromosomas ģenotips (Silber et al., 1998; Mau-Kai et al., 2008; Poongathai et al., 2009). Zināmi arī tādi gadījumi, kad AZFc rajona delēcijas, kas tiek pārmantotas mākslīgās apaugļošanas rezultātā, vīrišķā dzimuma pēcnācēju Y hromosomā izmainās – kļūst lielākas, jo AZF rajoni ir pakļauti *de novo* mutāciju rašanās iespējai, kam pamatā ir homologās rekombinācijas notikumi (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Chan et al., 2002).

Apkopojot iepriekš aprakstīto, ģenētiskajā konsultēšanā pāri vajadzētu informēt, ka, izmantojot neauglīga vīrieša (tēva), kurš ir pozitīvs pēc Y hromosomas mikrodelēcijām, spermatozoīdus *ICSI* procedūrā, visi vīrišķā dzimuma pēcnācēji saņems šo ģenētisko defektu un arī būs neauglīgi. Taču pozitīvi ir tas, ka Y hromosomas mikrodelēcijas nav saistītas ar citām veselības problēmām kā tikai neauglību. Savukārt visi sievišķā dzimuma pēcnācēji būs veseli un auglīgi, jo Y hromosomu no tēva nemantos.

4.2. Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājums

Citoģenētisko metožu attīstība pagājušā gadsimta 50. gados ļāva noteikt daudzu slimību hromosomālo dabu, un pēc tam, attīstoties hromosomu krāsošanas tehnikām, radās iespēja noteikt slimības, kuru cēlonis ir hromosomu fragmentu delēcijas. Vēlāk, 80. un 90. gados, parādoties molekulārām mutāciju diagnostikas metodēm, bija iespējams izprast un analizēt slimības molekulārajā līmenī. Līdz ar to kļuva zināms, ka nav vairs skaidri nodalāms slimību hromosomālais un molekulārais līmenis, jo izmaiņas molekulārajā līmenī noved pie izmaiņām hromosomālajā līmenī (Pena, 1998).

Mikrodelēcijas pēc definīcijas ir delēcijas, kuru izmēri ir mazāki par gaismas mikroskopa izšķirtspēju (Shaffer, 1997). Analizējot haploīdu kariotipu ar rutīnas citoģenētiskās analīzes palīdzību, iespējams izšķirt 400 – 500 joslas metafāzes hromosomā. Šajā līmenī var atklāt 5 – 10 Mb lielas delēcijas. Delēcijas, kas mazākas par 5 – 10Mb, var noteikt ar molekulārām metodēm – izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (PCR), fluorescento *in situ* hibridizāciju (FISH), PRINS (Primed *IN Situ* labeling), un citas metodes.

Ir vairākas uz PCR balstītas molekulārās metodes, ar kuru palīdzību var noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas. Šo metožu pamatā ir viens princips, un tiek izmantota multipleksā PCR tehnika. Metodes princips ir noteikt Y hromosomas AZF rajonos lokalizētu, šiem rajoniem specifisku DNS secību (marķieru, *STS – sequence target sites*) klātbūtni vai trūkumu. Metodes atšķiras ar to, cik vienkārši, ātri, nepieļaujot kļūdas iespējams realizēt attiecīgo analīzi (4.1. tabula). Mēs salīdzinājam divas metodes – komerciāli pieejamo Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas komplektu (Promega 2.0) un EMQN (Eiropas Molekulārās ģenētikas kvalitātes kontroles apvienība; *The European Molecular Genetics Quality Network*) izveidoto rekomendāciju ieteikto multiplekso PCR Y hromosomas mikrodelēciju analīzei (Simoni et al., 2004). Komerciālais komplekts aptver 21 Y hromosomas lokusu (marķieri), no kuriem divi kalpo kā reakciju kontroles, bet pārējie 19 atrodas noteiktos AZF rajonos. Tādējādi, ja kāds no lokusiem ir zaudēts, tas netiks amplificēts PCR laikā un apstiprinās noteiktā AZF rajona delēciju. Savukārt EMQN mikrodelēciju noteikšanas rekomendācijas iesaka analīzē izmantot astoņus marķierus, no kuriem divi marķieri tiek izmantoti kā metodes kontroles, bet pārējie seši atrodas AZF rajonos

(katrā AZF rajonā divi marķieri). Varētu domāt, ka komerciālais komplekts ir labāks, jo tiek izmantoti vairāki marķieri un tāpēc analīze ir specifiskāka, bet tomēr tā nav, jo *EMQN* rekomendāciju autoriem izdevies pierādīt, ka analīzei izvēlētie seši marķieri ir unikāli AZF rajoniem un ar tiem nekļūdīgi var noteikt pilnas AZFa, AZFb un AZFc rajonu delēcijas. Būtiskākais šo abu metožu salīdzinājumā ir pierādīt, kura no metodēm ir labāk pielāgota ātrai un kvalitatīvai Y hromosomas mikrodēlciju noteikšanai molekulārās ģenētikas laboratorijā. Manuprāt, komerciāli piedāvātajai metodei ir vairāki trūkumi – tādi kā laikiētilpīgums, sarežģītā analīzes izpildes gaita – jāveic piecas multipleksās *PCR* reakcijas ar vienu paraugu, lai varētu noteikt mikrodēlciju klātbūtni, un katrā no šīm piecām multipleksajām reakcijām vēl jāpievieno pozitīvās un negatīvās kontroles. Tāpēc, lai pagatavotu vienu paraugu, ir nepieciešams izlietot vairāk reaģentu (vienam paraugam pieci stobriņi un vēl trīs kontroles stobriņi) un materiālu. Pastāv arī sajaukšanas risks, tā kā vienlaikus jāgatavo pieci atšķirīgi multipleksie maisījumi un trīs kontroles vienam paraugam. Savukārt *EMQN* rekomendētās metodes pamatā ir divu multiplekso *PCR* (iekļauti interesējošie AZF, rajoniem specifiskie marķieri divos multipleksos) atbilstošu negatīvo un pozitīvo kontroļu sagatavošana vienam paraugam. Divas multipleksās *PCR* tiek izvēlētas, lai izslēgtu diagnostikas kļūdas. *EMQN* rekomendētā metode ir daudz lētāka, ātrāk un tehniski vieglāk izpildāma, turklāt pastāv mazāks risks kļūdu iespējai. Līdz ar to var secināt, ka molekulārās ģenētikas laboratorijā kā ātra un kvalitatīva (95% jutība; Simoni et al., 2004) Y hromosomas mikrodēlciju diagnostikas tehnika atzīstama *EMQN* rekomendētā un citās Eiropas laboratorijās atzītā metode.

Izvērtējot abas metodes no molekulārā viedokļa, arī var atrast faktus, kas nāk par labu *EMQN* ieteiktajai pieejai (4.1. tabula). Komerciālajā Promega noteikšanas sistēmā kā iekšējā kontrole tiek lietots *SMCX/SMCY* marķieris. Marķiera lietošanas būtība ir parādīt, ka *PCR* reakcijā tiek amplificēta DNS, kas ļauj izvērtēt negatīvu joslu iemeslus, tā, piemēram, ja gēlā nebūtu redzama neviena josla, tai skaitā arī *SMCX/SMCY* fragments, tas liecinātu par to, ka nav iegūta pietiekami kvalitatīva vai pietiekami koncentrēta DNS. Problēma ar šo *SMCX/SMCY* marķieri ir tāda, ka pavairotais fragments ir neliels (83 bp), tādēļ pastāv risks, ka šis marķieris *PCR* metodes īpatnību dēļ var tikt pavairots vairāk nekā garākiem fragmentiem (tiek spēcīgāk pavairots) (Aknin-Seifer et al., 2003). Interesanti, ka mūsu pētījumā, veicot paraugu analīzi, komerciālās metodes A multipleksā analīze uzrādīja negatīvu

SMCX/SMCY marķieri, kam vajadzētu liecināt par apšaubāmu rezultātu iegūšanu, taču citos multipleksos (B, C, D) tie paši paraugi kontroles marķieri uzrādīja. Lai izslēgtu iepriekšminētās problēmas, *EMQN* ieteiktajā metodē izmanto citu iekšējo kontroli – *ZFX/ZFY*, kura tiek amplificēta pēc līdzīga principa, taču pavairotā fragmenta garums atbilst 495 bp. Tā kā *ZFX/ZFY* ir garākais no fragmentiem, ko novēro *EMQN* mikrodelēciju shēmā, līdz ar to tas *PCR* gaitā nekonkurē ar īsākiem fragmentiem, kas parāda specifisko AZF rajonu klātbūtni vai trūkumu.

4.1. tabula. Komerčiāli pieejamās un *EMQN* rekomendētās Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājums

Parametri, pēc kā salīdzina	Komerčiāli pieejamā Y mikrodelēciju noteikšanas metode	<i>EMQN</i> rekomendētā mikrodelēciju noteikšanas metode
Izpildījums	Sarežģīta procedūru virkne izmeklējamā parauga sagatavošanai un analizēšanai.	Viegli izpildāma, vienkārša parauga sagatavošanas un analīzes shēma.
Laiks	Laikietilpīga	Ātra
Multiplekso <i>PCR</i> skaits	Katrs paraugs jāanalizē ar pieciem multipleksiem <i>PCR</i> ; pastāv pievienojamo reaģentu un paraugu sajaukšanas risks.	Katrs paraugs jāanalizē tikai ar diviem multipleksiem <i>PCR</i> ; mazs pievienojamo reaģentu un paraugu sajaukšanas risks.
<i>STS</i> marķieri	Izmanto 19 <i>STS</i> , lielais marķieru skaits nedod labākus rezultātus, jo daudzi marķieri ir neinformatīvi.	Izmanto sešus <i>STS</i> , visi marķieri ir informatīvi.
Iekšējās kontroles marķieris	<i>SMCX/SMCY</i> , kas nav labi piemērota iekšējā <i>PCR</i> kontrole.	<i>ZFX/ZFY</i> , kas ir piemērotāka iekšējā <i>PCR</i> kontrole.
Rezultātu interpretācija	Sarežģīta analizēto paraugu gēla ainu interpretācija.	Viegli saprotama/izsekojama paraugu gēla ainu interpretācija.
Izmaksas	Dārga (~88 EUR par paraugu, neiekļaujot samaksu par analīzes veikšanu).	~ 10 X lētāka (~6 EUR par paraugu, neiekļaujot samaksu par analīzes veikšanu).

Cita komerciālās Promega noteikšanas metodes neprecizitāte ir tas, ka analīzē ir iekļauts tā saucamais ceturtais AZF rajons jeb AZFd rajons. AZFd rajonu pirmoreiz aprakstījis Kent-First ar kolēģiem 1999. gadā, un šis rajons atrodas starp AZFb un AZFc rajoniem un fenotipiski saistīts ar smagu teratozoospermiju (Kent-First et al., 1999). Taču, noskaidrojot AZF rajona sekvenci (Skaletsky et al., 2003), šobrīd akceptētais AZF rajonu iedalījums ir AZFa, AZFb un AZFc. Turklāt AZFb un AZFc rajoni pārklājas, bet šo pārklājuma rajonu nav nepieciešams izdalīt kā ceturto rajonu, jo nepastāv no pārējiem AZF rajoniem klīniski atšķirīgas (piemēram,

teratozoospermijas) pacientus grupas (Simoni et al., 2004). Līdz ar to vēl joprojām komerciālais komplekts analizē ģenētiski neakceptētu AZF rajonu un lieto marķierus, kas lokalizēti šajā rajonā, bet nav informatīvi neauglīgiem vīriešiem. Visi *STS* marķieri, kurus izmanto komerciālajā komplektā AZFd rajona analīzei (Promega 2.0: sY145, sY152, sY242, sY208; iepriekšējā kita versijā Promega 1.1 izmantotie *STS*: sY153, sY 220, sY 150, sY 232, sY 262, sY 221), kā zināms pēc Y hromosomas AZF rajonu sekvenču datiem, atrodas AZFc rajonā (6C – 6E delēciju intervālā) (Reijo et al., 1995; Vogt et al., 1997; Skaletsky et al., 2003), un sY152 un sY153 lokalizēti AZFc proksimālajā daļā (Kuruda-Kawaguchi et al., 2001). Turpretim *EMQN* rekomendācijas Y hromosomas analīzei rekomendē lētāku, ērtāku, ātrāku, pēc Y hromosomas AZF rajonu strukturālām īpatnībām un pacientam nozīmīga klīniskā raksturojuma standartizētu Y mikrodelēciju noteikšanas metodi. Lai panāktu šīs ērtās, informatīvās metodes izveidi, ir veiktas daudzas optimizācijas un starplaboratoriju testēšanas, kā rezultātā optimizēti vairāki parametri. Pirmkārt, pētījumi ļāva atsijāt neinformatīvos *STS* (sY55, sY75, sY138, sY143, sY231, sY272 un sY167) un izslēgt no analīzes (Simoni et al., 2001; Aknin-Seifer et al., 2003; Simoni et al., 2004). Otrkārt, tika parādīts, ka daži *STS* uzrāda atšķirīgus rezultātus starplaboratoriju pētījumos (sY152, sY153, sY236, sY166, sY147) un tādējādi kļuva skaidrs, ka šie marķieri ir polimorfi vai atkārtoti vairākās kopijās Y hromosomā (Vogt et al., 1997). Treškārt, tika precīzi parādīts, ka pārāk daudzu *STS* analīze AZFc rajonā var būt par iemeslu viltus pozitīviem rezultātiem. Piemēram, marķieris sY153 atrodas AZFc rajonā un iepriekš tika izmantots komerciālajā analīzes sistēmā, bet, pēc *EMQN* datiem, tiek atzīts par polimorfu marķieri. Zinot, ka šis marķieris ir nepiemērots AZFc rajona delēciju noteikšanai, pacientiem nevar apstiprināt šīs delēcijas klātbūtni Y hromosomā. Visbeidzot tika apstiprināts, kādas kontroles lietot Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikā. Šobrīd atzīts, ka katrā analīzē jālieto divas negatīvas kontroles – sievietes DNS un paraugs, kur DNS vietā izmanto ūdeni, kā arī pozitīvā kontrole – auglīga vīrieša DNS paraugs. *EMQN* metodē izmantoto *STS* marķieru analīze ir pietiekama, lai noteiktu vairāk nekā 95% klīniski nozīmīgu Y hromosomas delēciju variantus (Simoni et al., 2004) un analīzē neuzrādītu viltus pozitīvus rezultātus.

Pastāv arī citas Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodes, tādas kā molekulārā citoģenētikas metode *PRINS* (Primed *IN Situ* labeling) (Kadandele et al., 2002), DNS čipu tehnoloģija (Lee et al., 2004) vai genotipēšana (Yeom et al., 2008).

Šie protokoli ir interesanti, pārsvarā balstīti uz *EMQN* izveidotās shēmas principu, taču ir laikietilpīgi, sarežģīti izpildāmi vai prasa jaunāko tehnoloģiju – dārgu analizatoru iegādi analīzes veikšanai rutīnas diagnostikā.

Apkopojot šī darba ietvaros veikto, kā arī abu iepriekš aprakstīto molekulāro metožu salīdzinājumu, var secināt, ka molekulārās ģenētikas laboratorijā rutīnas Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikai piemērotāka un precīzus rezultātus atspoguļojoša metode ir *EMQN* ieteiktā analīzes pieeja. Līdz ar to Latvijā ir aprobēts vienkāršs Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas *PCR* protokols, kura pamatā ir *EMQN* ieteiktā shēma, taču veiktas dažas modifikācijas, lai piemērotu analīzi konkrētas laboratorijas apstākļiem. Šīs modifikācijas ir *PCR* reakcijas režīma – hibridizācijas temperatūras paaugstināšana no ieteiktajiem 57°C uz 62°C, kas pamatojams ar *PCR* analīzei izmantotā aparāta tehnisko parametru atšķirībām (izmantota citas firmas iekārta). Otra modifikācija ir paraugu analīze 8% poliakrilamīda gēlā, kas atšķiras no *EMQN* ieteiktās analīzes 2% agarozes gēlā. Šī modifikācija balstīta uz izpildītāja personīgo pieredzi, kuru gēla materiālu izvēlēties ērtākai analīzei.

4.2.1. Pilnu AZFa+b+c Y hromosomas delēciju noteikšanas metodes – citogēnētiskās pret molekulārajām

Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas molekulārās, *PCR* balstītās metodes, kā iepriekš aprakstītā *EMQN* rekomendētā, ir ļoti labas, lai noteiktu intersticiālās mikrodelēcijas Y hromosomā. Tomēr šīm metodēm ir ierobežojumi, jo nav iespējams noteikt, cik gēnu no vienas gēnu saimes (daudzkopiju gēni) mikrodelēcijas dēļ ir zaudēti. Izmantotie *STS* nosaka konkrētā gēna trūkumu vai klātbūtni, bet ne to kopiju skaitu. Līdz ar to ar šīs metodes palīdzību nav iespējams noteikt daļējas delēcijas, kas skar daudzkopiju gēnus (*DAZ* gēni AZFc rajonā). Tomēr literatūrā lielākā daļa autoru uzsver, ka daļējās AZFc rajona mikrodelēcijas ir ļoti variabla grupa un asociācija ar vīriešu neauglību ir neskaidra (McElreavey et al., 2007). Otrkārt, pastāv varbūtība, ka kāds pacients ir mozaīķis pēc Y hromosoma mikrodelēcijām, līdz ar to arī pastāv risks neprecīzi interpretēt šo pacientu neauglības statusu. Arī šī situācija satopama ļoti reti un nav jāņem vērā rutīnas diagnostikā, taču individuālos gadījumos ir jāizvērtē Y hromosomas mikrodelēciju mozaīcisma noteikšanas nepieciešamība (LeBourhis et al., 2000). Lai atrisinātu abas

iepriekšminētās situācijas, nepieciešamas citas metodes – molekulārās citoģenētikas metodes – tādas kā *FISH* (*fluorescent in situ hybridisation*) vai *PRINS* (*Primed IN Situ labeling*).

Dažreiz iespējams sastapties ar situāciju, kad ir svarīgi noteikt delēcijas/mikrodelēcijas izmērus, lai precizētu ģenētiskā materiāla pārkārtojumus Y hromosomā. Šajā pētījumā diviem no pieciem pacientiem (3.3. attēls, paraugi 4 un 5), kuriem Y hromosomā atklātas mikrodelēcijas, bija zaudēti visi trīs AZF rajoni (AZFa+b+c delēcija). Citoģenētiskās analīzes parādīja nelielu Y hromosomu, ko varētu skaidrot kā gandrīz visa Y hromosomas garā pleca delēciju vai tā varētu būt Y hromosomas īso plecu izohromosoma. Abi minētie Y hromosomas aberāciju varianti bieži sastopami azoospermijas pacientiem, jo tie parasti izveidojas pēc pārrāvuma Y hromosomas garā pleca q11 rajonā, tādējādi zaudējot visus AZF rajonus lokalizētos, par spermatogēnēzi atbildīgos gēnus (Vogt et al., 2005).

Lai precizētu Y hromosomas mikrodelēciju robežas, *EMQN* rekomendācijas iesaka izmantot papildus *STS*, lai noskaidrotu delēcijas lūzuma punktus. Šajā darbā tika izmantota alternatīva pieeja – AZFa+b+c delēciju paraugi tika analizēti ar Y hromosomas mikrosatelītu noteikšanas kitu, kas paredzēts Y hromosomas haplotipu noteikšanai. Šajā metodē izmantotie mikrosatelīti ir informatīvi, to klātbūtne varētu liecināt par noteiktu Y hromosomas fragmentu eksistenci interesējošajos AZFa+b+c delēciju paraugos. Diemžēl šo mikrosatelītu analīze nedeva gaidāmo rezultātu – neapstiprinājās garajā plecā lokalizēto mikrosatelītu klātbūtne un līdz ar to nebija iespējams pierādīt, ka šo pacientu Y hromosoma nav īso plecu izohromosoma. Arī šajā gadījumā ne multipleksā *PCR*, ne Y mikrosatelītu analīze nespēj noteikt šo ģenētisko izmaiņu. Šajā gadījumā priekšroka ir molekulārajām citoģenētikas metodēm, kur ar specifisku fluorescento iezīmju (zondes) palīdzību iespējams noteikt, vai šo neauglīgo vīriešu Y hromosomai ir divi īsie pleci (izohromosoma).

Neskatoties uz to, ka multipleksās *PCR* un Y hromosomas mikrosatelītu analīzes AZFa+b+c delēciju gadījumā (3.3. attēls, paraugi 4. un 5.) mūsu pētījumā neizslēdza izohromosomas iespējamību, iegūtie dati ļauj izdarīt citus secinājumus par AZFa+b+c delēcijām. Skaidri zināms, ka abu AZFa+b+c delēcijas pacientu Y hromosomām ir īsais plecs, par ko liecina *SRY* un *ZFY* gēniem atbilstošo *STS* klātbūtne (multipleksās *PCR* rezultāti), kā arī mikrosatelīta *DYS393* un 4. paraugam arī mikrosatelīta *DYS19* klātbūtne. Tomēr te parādās abu metožu trūkums, ka nav iespējams precīzi zināt, cik īso plecu ir attiecīgajai Y hromosomai. Lai gan varētu

nedaudz spekulēt ar faktu, ka abiem paraugiem mikrosatelīts DYS393 un vienam paraugam mikrosatelīts DYS19 ir sastopami to klasiskajā formā: DYS393 mikrosatelīts atkārtots 14 reizes (tetranukleotīds [AGAT]₁₄) un DYS19 mikrosatelīts atkārtots 15 reizes (tetranukleotīds [TAGA]₁₅). Ja šo mikrosatelītu tripletu atkārtojumu skaits būtu dubultots, tad droši varētu apgalvot, ka noteiktās ir Y īso plecu izohromosomas. Savukārt AZFa+b+c delēcijas paraugu Y hromosomas garajā plecā neizdevās noteikt nevienu no marķieriem (visas metodes pierādīja delēciju notikumu). Marķieri, kas atrodas tuvu Y hromosomas centromērai un varētu pierādīt Y hromosomas garā pleca klātbūtni, Yq makrodelēciju gadījumā varētu būt DYS391 mikrosatelīts (Y mikrosatelītu analīzes kits) un arī DYS271 mikrosatelīts (Promega 2.0 mikrodelēciju noteikšanas kits). Mūsu pētījumā abi mikrosatelīti netika novēroti abu pacientu (nr. 5. un nr. 4.) Y hromosomās, taču, neskatoties uz to, šo mikrosatelītu klātbūtne citos gadījumos varētu pierādīt Y hromosomas garā pleca klātbūtni. Līdz ar to var izteikt vēl vienu hipotēzi, ka DYS391 vai DYS271 mikrosatelīti, tā kā atrodas tuvu Y hromosomas centromērai, arī var norādīt uz Y hromosomas garā pleca klātbūtni gadījumos, kur būtu notikusi Y hromosomas garā pleca delēcija. Tātad, lai precizētu Y hromosomas ģenētiskā materiāla izmaiņas abiem pacientiem, vajadzētu veikt kādu no molekulārās citoloģijas analīzēm. Šo situāciju varētu atrisināt *FISH* analīze ar specifiskām *SRY* fluorescentām zondēm, taču pacienti šo analīzi nevēlējās veikt. *FISH* tikai pierādītu Y hromosomas aberācijas veidu, bet tai nebūtu terapeitiskas nozīmes, jo visu trīs AZF rajonu delēcijas, kā zināms, tika noteiktas jau ar multipleksās *PCR* metodes palīdzību, un tādējādi zināms, kāpēc pacientiem ir šī neārstējamā neauglības forma – azoospermija.

4.3. Y hromosomas haplogrupas un to saistība ar vīriešu neauglību

Tiek uzskatīts, ka Y hromosomas haplogrupu izplatība pasaulē atspoguļo nejaušus notikumus, tādus kā gēnu dreifs, populāciju ekspansija un migrācija. Dabiskās izlases ietekme šajos procesos nav zināma, un tiek izteiktas hipotēzes, ka tā ir nenozīmīga. Tomēr neņemt vērā dabisko izlasi būtu nepareizi, jo Y hromosomā ir gēni, kuri atbild par spermatogēnēzi, un līdz ar to pret tiem izlase var darboties (Carvalho et al., 2003). Ja kāds gēns ir funkcionāli nozīmīgs, tad tiek sagaidīts, ka šim gēnam jābūt evolucionāri konservatīvam un sastopamam arī radniecīgu sugu īpatņos. Līdz ar to reproduktīvi veiksmīgu gēnu vai ģenētisko variāciju biežumam cilvēka

populācijās ir jāpieaug evolūcijas gaitā, un, balstoties uz šo faktu, pretēji jānotiek ar to gēnu vai ģenētisko variantu biežumu, kas samazina auglību – tam būtu jāsamazinās populācijā. Iepriekš izskaidrotā hipotēze tiešā veidā skar Y hromosomu vai pat visu Y hromosomas haplotipu (Y hromosoma ir pārstāvēta vienā kopijā, haploīds genoms). Tādējādi neizdevīga mutācija (piem., auglību samazinoša) var tikt saglabāta pēc citiem faktoriem (piem., piemērota konkrētiem vides apstākļiem) izdevīgā Y hromosomā (haplogrupā) un pat tās biežums pieaugt populācijā vai palikt konstants. Turpretim izdevīga mutācija neizdevīgā Y hromosomas variantā var tikt zaudēta (negatīvā selekcija). Derīgo Y hromosomas variantu biežums pieaugs, jo notiks pozitīva šo variantu selekcija. Visekstremālākais gadījums būtu, piemēram, variants, kas novēd pie pilnīga spermatogēneses zuduma, tāds netiks pārmantots nākamajā paaudzē, un to populācijā novēros ļoti zemā frekvencē – sastaps tikai neauglīgo personu genotipos (Tyler-Smith, 2008). Vairāki pētījumi ir norādījuši uz Y hromosomas variantu jeb haplogrupu saistību ar samazinātu spermatozoīdu skaitu (Krausz et al., 2001a; Arredi et al., 2007; Yang et al., 2008). Šie pētījumi demonstrē selektīvus procesus, kuros ir iesaistīti Y hromosomas gēni.

Latviešu Y hromosomas genofondu veido četras galvenās Y hromosomas haplogrupas – N3a1 (K* klasterā N apakšklastera N3 haplogrupas apakšhaplogrupa), R1a1 (K* klastera R apakšklastera R1 haplogrupas apakšhaplogrupa), K* (K* klasteris bez Hg N3a un Hg R1a) un I (F* klastera IJ apakšklastera haplogrupa). Tās pārstāvētas gan neauglīgo vīriešu, gan kontroles (latvieši trīs paaudzēs) grupās, kā arī ir dominējošās haplogrupas Eiropas ziemeļaustrumu daļā, kas savukārt norāda uz minēto haplogrupu kopīgo izcelšanos un pirmsvēsturi.

Biežāk sastopamā haplogrupa Latvijā gan neauglīgo vīriešu (30,4%), gan kontroles (42,5%) populācijā ir N3a1 haplogrupa. Haplogrupa N3a1 neparāda statistiski ticamas atšķirības abās analizētajās grupās ($p=0,223$), un līdz ar to Hg N3a1 nav saistīta ar vīriešu neauglību. Izskaidrojums, kāpēc N3a1 haplogrupa sastopama gan auglīgu, gan neauglīgu vīriešu populācijās, varētu būt tāds, ka Hg N3a1 ir reproduktīvi veiksmīga un vīriešu neauglības iemesls ir kāds cits, nevis Y hromosomā lokalizētie gēni, kas atbild par spermatogēzi. Tomēr, sīkāk izpētot Hg N3 (haplogrupa, kurai pieder N3a1 apakšhaplogrupa) raksturīgo Y hromosomas variantu, ir noskaidrots, ka šai haplogrupai pieder visas Y hromosomas, kurās novēro arī divu *DAZ* gēnu – *DAZ3* un *DAZ4* – delēciju (Fernandes et al., 2004; Machev et al., 2004, Yang et al., 2008). Tas skaidrojams ar daļējām AZFc rajona delēcijām, kuras var tikt

pārmantotas un ne vienmēr izpaužas kā neauglība. Pilnas AZFc delēcijas gadījumā tiek zaudēti deviņi gēni, kas pārstāv trīs gēnu saimes – *BPY2*, *DAZ* un *CDY1*, un attiecīgi fenotipā tas izpaužas kā spermatogēnēzes traucējumi jeb neauglība. Pretēji tam, ja tiek zaudēti pieci gēni un AZFc rajonā paliek viens *BPY2*, viens *CDY1* un divi *DAZ* (*DAZ1* un *DAZ2*) gēni, vīriešiem ir normāla spermatogēnēze, un šāds Y hromosomas N3 haplogrupai piederošs variants tiek pārmantots no paaudzes paaudze (Tyler-Smith, 2008). Tomēr jāpiemin labi zināms fakts, ka Y hromosomas mikrodelēcijām ir tendence rasties no jauna homologās rekombinācijas ceļā, un līdz ar to nekaitīgi daļēji deletētie AZFc Y hromosomas varianti (*DAZ3/DAZ4* deletētie N3 haplogrupas varianti) var tikt izmainīti – *de novo* delēcijas dēļ var tikt zaudēti vēl kādi AZFc rajona gēni un rasties pilna AZFc rajona delēcija. Tādējādi šādi daļēji deletētie AZFc varianti tiek pārmantoti izmainīti nākamajās paaudzēs un vīrišķā dzimuma pēcnācējiem izpausties kā neauglība. Līdz ar to kāda daļa šo *DAZ3/DAZ4* deletēto N3 haplogrupas variantu varētu tikt zaudēti gēnu dreifa dēļ. Tā kā zināms, ka *DAZ3/DAZ4* delēcija raksturīga N3 haplogrupai, tad, izmantojot zināmo Hg N3 izplatību pasaulē, iespējams izsekot arī šī varianta sastopamībai. N3 haplogrupa, kā jau iepriekš pieminēts, izplatīta Ziemeļeiropā un Āzijā, kur veido 12% no visām sastopamajām Y haplogrupām. Dažās populācijās tā ir viena no biežākajām haplogrupām, tā, piemēram, somu populācijā tās biežums ir 52%, jakutu populācijā 86% (Zerjal et al., 1997) un Latvijas populācijā 42,5%. Iespējamais N3 haplogrupas kopīgais sencis eksistējis pirms 8800 – 3200 gadiem (Hammer un Zegura, 2002). Tādējādi N3 haplogrupā ir sena un veiksmīga Y hromosomas līnija un *DAZ3/DAZ4* delēcijām nav kaitīgs efekts attiecībā uz šo Y hromosomu nesēju auglību. Pastāv uzskats, ka Y hromosomas strukturālās izmaiņas, kas raksturīgas N3 haplogrupas variantiem, kā parāda arī mūsu pētījums (Hg N3a1), spēj pasargāt pret neauglību, tāpēc šī haplogrupa ir reproduktīvi veiksmīga. Par to liecina arī citi pētījumi, kuros novērots tā saucamais daļējo AZFc rajonu delēciju kompensējošais mehānisms, t.i., pēc noteiktu vienas gēnu saimes gēnu delēcijas ir notikusi citu šīs gēnu saimes gēnu duplikācija (Repping et al., 2003; Lin et al., 2007; Giachini et al., 2008; Navarro-Costa et al., 2010). Tā, piemēram, Lin ar kolēģiem, pētot 580 Ķīnas vīriešus ar nezināmu auglības statusu un 30 vīriešus ar delēciju Y hromosomā, kas pieder N klasterim, 33% novēroja četras *DAZ* gēnu kopijas, kas liecina par to, ka N klastera Y hromosomas variantam raksturīga b3/b4 amplikonu rajonu (*DAZ1* un *DAZ2* gēnu)

duplikācija pēc b2/b3 amplikonu (*DAZ3* un *DAZ4* gēnu) delēcijas Y hromosomas AZFc lokusā (Lin et al., 2007).

Otra biežāk sastopamā Y hromosomas haplogrupa abās analizētajās paraugkopās ir Hg R1a1. Turklāt Hg R1a1 ir mazāk sastopama ($p=0,005$) neauglīgu vīriešu DNS paraugos (15,2%), salīdzinot ar kontroles grupu (39,2%). R1a1 haplogrupu var uzskatīt par vienu no reproduktīvi veiksmīgajām Y hromosomas līnijām, jo tā vairāk raksturīga auglīgiem nekā neauglīgiem vīriešiem ($p=0,005$). Līdzīgi N3a1 haplogrupai arī R1a1 haplogrupa, kā liecina mūsu pētījuma rezultāti, saglabājas pozitīvās selekcijas dēļ. Hg R un Hg N nav tuvi radnieciskas, un to kopīgais sencis, iespējams, eksistēja pirms 36000 – 6000 gadiem (Hammer & Zegura., 2002). Par R haplogrupu ir minēti dažādi fakti, ir mēģināts pierādīt, ka Y hromosomās, kas pieder šai haplogrupai, arī novēro kādu gēnu delēcijas (daļējās AZFc rajona delēcijas), bet šo gēnu zudums neietekmē fertilitāti (Fernandes et al., 2004; Vogt, 2005). Iespējamais molekulārais skaidrojums tam ir notikusi inversija pre-N Y hromosomā (Vogt, 2005), kuras dēļ ir izcēlušies R haplogrupa, kas savukārt pasargā šo haplogrupu no delēcijām, kuras fenotipā izpaustos kā neauglība, jo invertētā secība AZFb un AZFc reģionā neļauj tik bieži notikt AZF rajonu delēcijām. Latvijas datiem līdzīgi rezultāti, ka R haplogrupa biežāk sastopama auglīgiem vīriešiem, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu grupu, pieminēti arī citu zinātnieku darbos. Tā, piemēram, Gomes et al (2008) arī apgalvo, ka Hg R, kura vairāk pārstāvēta auglīgo vīriešu grupā, varētu būt pozitīvās selekcijas piemērs par labu auglības haplogrupas izplatībai populācijās.

Savukārt haplogrupa K* (makrohaplogrupas M9 G alēles variants bez Hg N3a un Hg R1a) sastopama 25,3% neauglīgu vīriešu Y hromosomās, taču kontroles grupā šīs haplogrupas sastopamība ir daudz mazāka (6,5%). Līdz ar to K* haplogrupa varētu būt vairāk raksturīga neauglīgu vīriešu Y hromosomas līnijām ($p<0,001$) un K* haplogrupu varētu nosaukt par “neauglības haplogrupu”. Haplogrupa K* tika atrasta arī Y hromosomās dāņu populācijas pārstāvjiem (4,6%), un tās biežums, līdzīgi kā mūsu pētījumā, bija daudz lielāks neauglīgo dāņu vīriešu (28%) vidū salīdzinājumā ar kontroles grupu (Krausz et al., 2001a). Eiropā K* klastera haplogrupas (L,N,O,P,R) ir pārstāvētas ļoti bieži. Īpaši bieži tās ir pārstāvētas Ziemeļeiropā, tā, piemēram, sāmu populācijā tās izplatība ir 46%, somu populācijā 63%, Baltijas valstīs > 70% (Latvijā 80%). Savukārt klastera augstā izplatība ziemeļu un austrumu Baltijas reģionos kontrastē ar pārējo Eiropas daļu. Ģermāņu valodās runājošās Ziemeļeiropas

populācijās K klasteris sastopams retāk: Vācijas populācijā 6%, Ziemeļzviedrijas – 8%, Gotlandes – 8%, Dānijas – 4,6%, Norvēģijas – 4%. Tas, ka šis klasteris ir izplatīts gan somugru, gan baltu, gan ģermāņu valodās runājošajās populācijās, liecina par labu faktam, ka atrastā asociācija varētu būt primāri ģeogrāfiska. Pēc Krausz et al (2001) domām, K* haplogrupas augsto sastopamību Dānijas neauglīgo vīriešu vidū (28%) var skaidrot divējādi. Pirmkārt, varbūt šī Y hromosomas līnija patiešām ir saistīta ar samazinātu spermatozoīdu skaitu, otrkārt, atšķirības analizēto paraugu kopās varbūt ir saistītas ar lokālām ģeogrāfiskām K* Y hromosomas līnijas izplatības īpatnībām. Par ģeogrāfisko faktoru ietekmi šīs asociācijas gadījumā jādomā un jāpierāda, ka to var izslēgt, jo iepriekš literatūrā ir aprakstīti gadījumi par kļūdaini interpretētu Y haplogrupu saistību ar vīriešu neauglību, lai gan patiesais cēlonis bija Y hromosomas ģeogrāfiska izplatība (Kuroki et al., 1999; Previdere et al., 1999). Lai parādītu, ka Latvijas neauglīgo vīriešu populācijā asociācija ar K* haplogrupu ir saistīta ar neauglību un etnoģeogrāfiskie faktori ir izslēgti mūsu pētījumā, jāaplūko iepriekš minētais kļūdainais eksperiments. Jau 1999. gadā tika publicēti dati par Itālijas populācijas pētījumiem un iespējamo haplogrupas P (Hg-P; K* apakšgrupas haplogrupa) asociāciju ar neauglību. Statistiski ticamus rezultātus izdevās parādīt, pētot P haplogrupas izplatību. Hg-P sastopamība kontroles populācijas paraugos bija 42%, savukārt neauglīgu vīriešu paraugos šīs haplogrupas biežums bija 24% (Previdere et al., 1999). Taču šajā pētījumā neauglīgu vīriešu paraugi galvenokārt tika iegūti no Centrālās Itālijas, bet kontroles paraugi pārstāvēja dažādus Itālijas reģionus. Vēlāk tika veikts pētījums, kurā kontrolgrupas paraugi tika izvēlēti no Centrālās Itālijas. Tad P haplogrupas izplatība abās paraugkopās – gan neauglīgu vīriešu (26%), gan kontroles grupā (27%) bija ļoti līdzīga un statistiski ticamas atšķirības neparādīja (Tyler-Smith, 2008). Savukārt Latvijas neauglīgo vīriešu un arī Dānijas populācijā (Krausz et al., 2001a) novērotais atšķīrās no minētās situācijas, jo tieši auglīgo vīriešu grupā K* haplogrupu sastop daudz retāk nekā neauglīgo pacientu grupā. Tā kā Latvijas pētījumā neauglīgie vīriešu paraugi pārstāv visu Latvijas populāciju un salīdzinājumā izmantotie kontroles grupas paraugi arī pārstāv visu Latvijas populāciju, un starp Latvijas reģioniem nepastāv atšķirības K* haplogrupas izplatībā, tad iegūtie rezultāti liecina par labu Y haplogrupas K* asociācijai ar vīriešu neauglību. K* haplogrupas saistību ar vīriešu neauglību ir noteikuši arī citi zinātnieki, tā, piemēram, Lu ar kolēģiem, pētot Ķīnas populāciju, atklāja, ka K* haplogrupa biežāk izplatīta neauglīgo vīriešu (2,8%) grupā, salīdzinot ar auglīgo vīriešu (0,78%) grupu,

un, veicot statistisko salīdzinājumu, tika noteiktas nozīmīgas un statistiski ticamas atšķirības (0,028) (Lu et al., 2007). Dāņu pētījumā tikai pierādīts, ka lielākajai daļai neauglīgo vīriešu, kuri piederēja K* haplogrupai, novēro samazinātu spermatozoīdu skaitu (azoospermija, oligozoospermija). Līdz ar to var secināt, ka K* līnijām ir zema reproduktīvā veiksmē, un, ja netiktu pielietota mākslīgās apaugļošanas procedūra, tad šādas Y hromosomas samērā ātri izzustu no populācijas negatīvas selekcijas dēļ. Krausz et al. (2001) izsaka hipotēzi par Dānijas populāciju, ja Hg K biežums auglīgo vīriešu vidū ir 5%, un pieņemot, ka šīs Y hromosomas līnijas vidējā selektīvā pielāgotība ir 0,5, tad iespējams, ka K* līnija izzustu no dāņu populācijas 12 paaudžu laikā. Līdzīgi varētu spriest par Latvijas populācijā sastopamo Hg K* (6.5%), un negatīvo šelekciju pret šo haplogrupu. Tomēr K* haplogrupas reproduktīvo veiksmi ir grūti konstatēt, veicot vienkāršotus aprēķinus, jo to ierobežo vairāki faktori – tādi kā Hg K* hromosomas migrācijas trūkums no apkārtējām populācijām, un ne visas K* apakšhaplogrupas ir vienlīdz jutīgas pret šo efektu. Jau iepriekš pieminēts, ka K* ietver vairākas apakšhaplogrupas, no kurām N3 un R1 ir ar labu reproduktīvu veiksmi, bet, kā pierādīts mūsu pētījumā, tieši citas Y hromosomas K* klastera apakšhaplogrupas ir raksturīgas pacientiem ar spermatogēzes traucējumiem, kas padara K* par iespējamo neauglības riska haplogrupu.

Mūsu pētījumā statistiski ticamas atšķirības ($p < 0,001$) novēro M9-C alēli saturošiem Y hromosomas variantiem, salīdzinot kontroles grupas un neauglīgo vīriešu DNS paraugus. M9-C alēles varianti raksturīgi diviem Y hromosomas klasteriem – DE* un F* (G, H, I, J). Izņēmums ir Hg I, kas pieder F* M9-C, ir retāk sastopama neauglīgiem pacientiem, bet neparāda statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot ar kontroles grupu. M9-C alēles neauglīgo vīriešu DNS paraugu grupa ir ļoti heterogēna, un ir nepieciešami papildu pētījumi, taču, pamatojoties uz literatūras datiem, var spriest, ka arī DE* un F* klasteriem ir noteikta saistība ar vīrieša auglību.

Lai novērtētu, kura Y hromosomas haplogrupa predisponē neauglībai vai pasargā pret neauglību, Arredi et al veica Y hromosomas haplogrupu analīzi neradnieciskiem Ziemeļtālijas neauglīgajiem vīriešiem (31 DNS paraugs), kuru Y hromosomā novēro AZFc rajona mikrodelēcijas. Iegūtie dati tika salīdzināti ar kontroles grupu, kas pārstāvēja auglīgus Ziemeļtālijas vīriešus (93 paraugi). Šajā pētījumā biežāk novērotais Y hromosomas variants neauglīgo vīriešu DNS paraugos (32%), salīdzinot ar kontroles grupu (10%), bija E haplogrupa ($p < 0,01$). E haplogrupas sastopamība auglīgo Ziemeļtālijas vīriešu populācijā (10%) atbilst arī

Hg E izplatībai vairākās paaudzēs šajā reģionā dzīvojošajiem vīriešiem. Arī citos Itālijas reģionos šī haplogrupa sastopama retāk nekā analizēto neauglīgo vīriešu DNS paraugos (Dienviditālijā <25%). Šie novērojumi pamato, ka DE* klastera E haplogrupa ir saistīta ar neauglību. Hg E Y hromosomas struktūras molekulārā analīze liecina par to, ka šī Y hromosomas līnija ir vairāk pakļauta b2/b4 (pilna AZFc rajona) mikrodelēcijām nekā citas Y haplogrupas (Arredi et al., 2007). Varētu domāt, ka jānotiek izlasei pret šo haplogrupu, tomēr šo negatīvo selekciju nenovēro. E haplogrupa ir plaši izplatīta Austrum- un Ziemeļāfrikā, Tuvajos Austrumos un Eiropā (Cruciani et al., 2004). Spermatoģenēzes traucējumus izraisošo Y hromosomas AZFc rajona mikrodelēciju biežums deletētās Y hromosomās ir mazāks par 0,03%, kas apmēram atbilst *de novo* delēciju rašanās frekvencei, bet tomēr ir nepietiekami augsts, lai selekcija dominētu pār gēnu dreifu (Repping et al., 2003). Turklāt selekcijas efektu izvērtēšanu apgrūtina dažādu neauglības variantu eksistēšana, kas visi ir saistīti ar AZFc delēcijām (no oligozoospermijas līdz azoospermijai un daļēju AZFc delēciju gadījumā pat līdz normospermijai).

Pretēji tam, ka E haplogrupas biežums ir palielināts Y hromosomas mikrodelēciju gadījumā, J haplogrupa ir mazāk sastopama šo pacientu grupā (3%, Arredi et al., 2007). Savukārt kontroles populācijā J haplogrupas biežums ir 15%. Lai gan minētā atšķirība nav statistiski ticama, tomēr molekulārā Hg J varianta struktūra norāda, ka Y hromosomas, kuŗas pieder Hg J, aizsargā pret Y mikrodelēcijām. Hg J līnijas nesatur L1PA4. L1PA4 ir *LINE* elements (*long interspersed nuclear element*), kas insertēts Y hromosomās cilvēka endogēnā retrovīrusa HERV (human endogenous retroviral DNA sequences) sekvencē, kas savukārt atrodas AZFa lokusā. Tā kā evolūcijas gaitā Hg J Y hromosomas variants radies pateicoties L1PA4 delēcijai (pierāda bialēliskā Y hromosomas marķiera 12f2 delēcija), līdz ar to šajās līnijās nevar notikt intrahromosomālās homologās rekombinācijas, kuru rezultātā tiktu zaudēts AZFa rajons (Jobling et al., 1998; Kamp et al., 2000).

Ziemeļitālijas pētījumam līdzīgu analīzi veikusi arī cita zinātnieku grupa Yang vadībā (Yang et al., 2008). Šajā gadījumā tika veikta Ķīnas neauglīgo vīriešu un vispārējā populācijā sastopamo Y hromosomas haplogrupu analīze. Pētījumā novērotas nozīmīgas atšķirības Y haplogrupu izplatībā auglīgo vīriešu un neauglīgo (azoospermija, oligozoospermija) vīriešu grupās. Lai izslēgtu gadījumu, kad pētījumā iekļautā auglīgo vīriešu kontroles grupa neatpoguļo vispārīgo populāciju, tika salīdzināta haplogrupu izplatība gan auglīgiem kontroles paraugiem, gan DNS

paraugiem, kas pārstāv vispārīgo populāciju un kuru auglības statuss nav zināms. Atšķirības starp minētajām grupām netika novērotas, kas liecina par to, ka kontroles grupa atspoguļo pētīto populāciju. Pētījumā tika noteikts, ka haplogrupas C un DE* ir vairāk pakļautas AZFc rajona deļējām delēcijām, bet turpretim O3* pasargā no šīm delēcijām. Šo haplogrupu pārstāvēto Y hromosomu molekulārie pētījumi liecina par noteiktu daļēju AZFc rajonu variantu klātbūtni šajās Y līnijās. Tā, piemēram, Hg DE* varētu būt uzņēmīgāka pret *DAZ1/DAZ2/CDY1a* gēnu delēciju AZFc rajonā, savukārt O3* haplogrupa pasargā pret šo gēnu delēciju. Savukārt Hg C līnijas vairāk pakļautas *DAZ1/DAZ2/CDY1b* delēcijām (Yang et al., 2008). Y hromosomai piemītošā patrilokalitāte ir galvenais faktors, kas nosaka tās piederību konkrētam ģeogrāfiskam reģionam – populācijai. Tādejādi veicot plašu Y haplogrupu un daļējo AZFc rajona delēciju variantu analīzi dažādās populācijās, būtu iespējams precizēt un atrast noteiktu Y haplogrupu variantu saistību ar spermatogēnēzes traucējumiem (Novaro-Costa et al., 2010). Līdz ar to var secināt – ļoti iespējams, ka eksistē noteiktas Y hromosomas strukturālās izmaiņas, kas pārstāv noteiktas Y haplogrupas un ir saistītas ar vīriešu neauglību.

Negatīvo selekciju pret retiem haplotipiem, kas ir saistīti ar samazinātu reproduktīvo veiksmi, iespējams papildus skaidrot ar šobrīd vēl nenoskaidrotiem apkārtējās vides faktoriem. Līdz ar to negatīvā selekcija varētu darboties uz Y hromosomas līnijām, kas varētu radīt strukturālus pārkārtojumus vai polimorfismus Y hromosomai specifisko gēnu kodējošajās secībās vai gēnu kopiju skaita izmaiņas Y hromosomas gēnu saimēs, kas savukārt izmainītu normālu spermatogēnēzi (Krausz et al., 2001a). Tādēļ turpmāki Y hromosomas pētījumi ir nepieciešami, lai noskaidrotu molekulāros mehānismus, kas varētu būt atbildīgi par šo negatīvo selekciju.

5. Secinājumi

1. Lai noteiktu vīriešu reproduktīvās patoloģijas molekulāri ģenētiskos cēloņus tika veikta Y hromosomas mikrodēlēciju, Y hromosomas haplogrupu, un gēna *CFTR* fragmentu sekvenču analīze.
2. Latvijā Y hromosomas AZF rajona mikrodēlēciju biežums vīriešiem ar idiopātisku neauglību ir 5%, un AZF mikrodēlēcijas novēro smagu neauglības formu – azoospermijas vai oligozoospermijas gadījumā.
3. Izveidots algoritms, kas var palīdzēt ārstiem, kuru redzeslokā ir pacienti ar neauglības problēmu, atlasīt tos neauglības gadījumus, kad ir svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodēlēcijas.
4. Aprobēta un ieviesta spermatogēnēzes traucējumu molekulārā analīzes metode, ar kuras palīdzību Latvijā būs iespējams diagnosticēt mikrodēlēcijas Y hromosomas AZF rajonos.
5. Atrastas statistiski ticamas atšķirības neauglīgu vīriešu un kontroles grupas Y hromosomas haplogrupu izplatībā, kas liecina par noteiktu Y hromosomas variantu – “neauglības” haplogrupu iespējamību.
6. Analizētās gēna *CFTR* mutācija delF508, mutācija R117H, kā arī 8. introna poli-T un poli-TG polimorfismi neparāda saistību ar vīriešu neauglību, kas norāda uz to, ka šīm mutācijām un polimorfismiem nav tieša ietekme uz spermatogēnēzes procesu.
7. Izstrādāti ieteikumi pacientu ar neauglību ģenētiskajai konsultēšanai.

6. Literatūras saraksts

1. Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM (2000) The effect of a null mutation in the folliclestimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141: 1795-1803.
2. Achermann JC, Weiss J, Lee EJ, Jameson JL (2001) Inherited disorders of the gonadotropin hormones. *Mol Cell Endocrinol* 179: 89-96.
3. Aittomaki K (1998) FSH receptor defects and reproduction. In *Fertility and Reproductive Medicine*; Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB Eds, Elsevier Science BV: Amsterdam pp 761-788.
4. Akgun E, Zahn J, Baumes S, Brown G, Liang F, Romanienko PJ (1997) Palindrome resolution and recombination in the mammalian germ line. *Mol Cell Biol* 17: 5559-5570.
5. Akin-Seifer IE, Touraine RL, Lejeune H (2005) Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multi-centre French study. *Hum Reprod* 20: 736-740.
6. Arredi B, Ferlin A, Speltrà E, Bedin C, Zuccarello D, Ganz F, Marchina E, Stuppia L, Krausz C, Foresta C (2007) Y-chromosome haplogroups and susceptibility to azoospermia factor c microdeletion in an Italian population. *J Med Genet* 44: 205-208.
7. Athey TW (2005) Haplogroup Prediction using an allele frequency approach. *J Genetic Genealogy* 1: 1-7.
8. Athey TW (2006) Haplogroup Prediction from Y-STR Values Using a Bayesian-Allele-Frequency Approach. *J Genetic Genealogy*, 2:34-39.
9. Bachtrog D, Charlesworth B (2001) Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biol* 2: 1116.
10. Baker HWG (2008) *Endocrinology of male reproduction*; McLachlan R. *Clinical Management of Male Infertility*, Chapter 7.
11. Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S (1991) A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 11: 443-451.
12. Berthelsen JG, Skakkebaek NE, Perboll O (1981) Electron microscopic demonstration of the extra Y chromosome in spermatocytes from human XYY males. In *Development and function of reproductive organs*. Byskov AG, Peters H, Eds, Excerpta Medica: Amsterdam, 328-337.
13. Bhasin S (2007) Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1995-2004.
14. Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J (1992) Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med* 326: 1752-1755.
15. Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurles ME (2000) Divergent outcomes of intra-chromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet* 37: 752-758.
16. Bland JM, Altman DG (1995) Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 346: 1085-1087.
17. Blouin JL, Meeks M, Radhakrishna U, Sainsbury A, Gehring C, Sail GD (2000) Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 8: 109-118.
18. Boucekine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M (1994) Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients Relationship to the presence of Y specific DNA sequences. *Clin Endocrinol* 40: 733-742.
19. Boucher D, Creveaux I, Grizard G, Jimenez C, Hermabessiere J, Dastugue B (1999) Screening for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in men included in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Mol Hum Reprod* 5: 587-593.
20. Le Bourhis C, Siffroi JP, McElreavey K, Dadoune JP (2000) Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males. *Mol Hum Reprod* 6: 688-693.

21. Brandel RA, Mielnik A, Liotta D (1998) AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 13: 2812–2815.
22. Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Croke HJ, Affara NA (1998) Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet* 7: 97-107.
23. Bulow HE, Berry KL, Topper LH, Peles E, Hobert O (2002) Heparan sulfate proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene kal-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6346-6351.
24. Buratti E, Dork T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle F E (2001) Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *The EMBO Journal* 20: 1774-1784.
25. Burgoyne PS (1996) Fruit (less) flies provide a clue. *Nature* 381: 740–741.
26. Carrell D T (2007) *The Genetics of Male infertility*. Humana press, Totowa, New Jersey, 1-337.
27. Carrell DT, Liu L (2001) Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility but common among men with poor fertilizing capacity and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 22: 604-610.
28. Carvalho CM, Fujisawa M, Shirakawa T, Gotoh A, Kamidono S, Freitas Paulo T, Santos SE, Rocha J, Pena SD, Santos FR (2003) Lack of association between Y chromosome haplogroups and male infertility in Japanese men. *Am J Med Genet* 15: 152-158.
29. C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek, Jr., J.J. Cassiman, E. Kerem, P. Durie, E. Tullis, B.M. Assael, C. Bombieri, A. Brown, T. Casals, M. Claustres, G.R. Cutting, E. Dequeker, J. Dodge, I. Doull, P. Farrell, C. Ferec, E. Girodon, M. Johannesson, B. Kerem, M. Knowles, A. Munck, P.F. Pignatti, D. Radojkovic, P. Rizzotti, M. Schwarz, M. Stuhmann, M. Tzetis, J. Zielenski, and J.S. Elborn (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7: 179-196.
30. Chan P T K (2002) Genetic risks associated with advanced assisted reproductive technology. *J Sex Reprod Med* 2: 161-164.
31. Chang Chan H, Ruan YC, He Q, Chen MH, Chen H, Xu WM, Chen WY, Xie C, Zhang XH, Zhou Z (2009) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J Physiol* 587: 2187-2195.
32. Chandley AC, Gosden JR, Hargreave TB, Spowart G, Speed RM, McBeath S (1989) Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome. *J Med Gen* 26: 145-153.
33. Chang PL, Sauer MV, Brown S (1999) Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Human Reproduction* 14: 2689–2694.
34. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *The New England Journal of Medicine* 332: 1475–1480.
35. Chu C S, Trapnell B C, Curristin S, Cutting G R, and Crystal R G. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genetics* 3: 151-156.
36. Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C (2000) Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Human Mutation* 16: 143-156.
37. Consortium for CF Genetic Analysis (2009) Website. Available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/> accessed 31/09/09.
38. Cooke HJ, Saunders PT (2002) Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 3: 790-801.
39. Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC, Goossens M (1995)

- Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 3: 285-293.
40. Cruciani F, La Fratta R, Santolamazza P, Sellitto D, Pascone R, Moral P, Watson E, Guida V, Colomb EB, Zaharova B, Lavinha J, Vona G, Aman R, Cali F, Akar N, Richards M, Torroni A, Novelletto A, Scozzari R. Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) Y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa. *Am J Hum Genet* 2004;74:1014-22.
 41. Cuppens H, Cassiman JJ (2004) CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int J Androl* 27: 251-256
 42. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A (1998) Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes – The polymorphic (TG)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 101: 487-496.
 43. Del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C (1992) Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2: 305-310.
 44. Denning CR, Sommers SC, Quigley HJ (1968) Infertility in male patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 41: 7-17.
 45. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E (2008) Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17: 51-65.
 46. Dode C, Levilliers J, Dupont JM (2003) Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genet* 33: 463-465.
 47. Dubé E, Hermo L, Chan PT, Cyr DG (2008) Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. *Biol Reprod* 78: 342-351.
 48. Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA (1996) Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature* 381: 783-785.
 49. Ewis AA, Lee J, Shinka T and Nakahori Y (2002) Microdeletions of a Y-specific marker, Yfm1, and implications for a role in spermatogenesis. *J Hum Genet* 47: 257-261.
 50. Ferlin A, Moro E, Garola A and Foresta C (1999) Human male infertility and Y chromosomal deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 14: 1710-1716.
 51. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Engl B, Foresta C (2005) Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 42: 209-213.
 52. Ferlin A, Arredi B, Foresta C (2006) Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 22: 133-141.
 53. Ferlin A, Arredi A, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A and Foresta C (2007) Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 762-770.
 54. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH (2002) High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 8: 286-298.
 55. Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH (2004) A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet* 75: 514-517.
 56. Foresta C, Ferlin A, Garolla A (1998) High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 13: 302-307.
 57. Foresta C, Ferlin A, Moro E (2000) Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Gen* 9: 1161-1169.

58. Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletion and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 226-239.
59. Foss GL, Lewis FJ (1971) A study of four cases with Klinefelter's syndrome showing motile spermatozoa in their ejaculates. *J Reprod Fertil* 25: 401-408.
60. Gallati S, Hess S, Galié-Wunder D, Berger-Menz E, Böhlen D (2009) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations in azoospermic and oligospermic men and their partners. *Reprod Biomed Online* 19: 685-694.
61. Gervais R, Dumur V, Rigot JM, Lafitte JJ, Roussel P, Claustres M, Demaille J. (1993) High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 328: 446-447.
62. Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C (2008) Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 124: 399-410.
63. Gomes S.C, Fernandes S, Goncalves R, Fernandes A.T, Barros A, Geada H, Brehm A (2008) Male infertility induced by mtDNA/Y unfavorable combination? An association study on human mitochondrial DNA. *EHG Presentation Number: P07.084*
64. Gottlieb C, Plöen L, Kvist U, Strandvik B (1991) The fertility potential of male cystic fibrosis patients. *Int J Androl* 14: 437-440.
65. Groenen P, Wieringa B (1998) Expanding complexity in myotonic dystrophy. *BioEssay* 20: 901-912.
66. Groman J D, Hefferon T W, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M (2004) Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am. J. Hum. Gen.* 74: 176-179.
67. Hackstein JH, Hochstenbach R, Pearson PL (2000) Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Trends Genet* 16: 565-572.
68. Hammer MF, Zegura SL (2002) The human Y chromosome haplogroup tree: Nomenclature and phylogeography of its major divisions. *Annu. Rev. Anthropol.* 31: 303-321.
69. Harris A (1992) Cystic fibrosis gene. *BmM Medical Bulletin* 48: 738-753.
70. Heinlein AA, Chang C (2002) Androgen receptor. (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23: 175-200.
71. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M (2003) Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction* 18: 1660-1665.
72. Hortas ML, Castilla JA, Gil MT (2000) Decreased sperm function of patients with myotonic muscular dystrophy. *Hum Reprod* 15: 445-448.
73. Huang Q, Ding W, Wei MX (2008) Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population. *World J Gastroenterol* 14(12): 1925-1930.
74. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M (2005) Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod* 20: 191-197.
75. Huynh T, Mollard R, Trounson A (2002) Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod* 8: 183-198.
76. Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M, Durie P, Buckspan M, Tullis E, Markiewicz D and Tsui LC (1995) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *The Lancet* 345: 1578.
77. Jobling MA, Bouzekri N and Taylor PG (1998) Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (DYF155S1). *Hum Mol Genet* 7: 643-653.
78. Jobling MA, Tyler-Smith C (2003) The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4: 598-612.

79. Kadandale JS, Wachtel SS, Tunca Y, Martens PR, Wilroy RS, Tharapel AT (2002) Deletion of RBM and DAZ in azoospermia: evaluation by PRINS. *Am J Med Genet.* 107: 105-108.
80. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH (2000) Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Human Molecular Genetics* 9: 2563-2572.
81. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Kupker W (2001) High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* 7: 987-994
82. Kao SH, Chao HT, Wei YH (1998) Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4: 657-666.
83. Kent-First M, Muallem A, Shultz J (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular Reproduction and Development* 53: 27-41.
84. Kiesewetter S, Macek M J, Davis C, Curristin S M, Chu C S, Graham C (1993) A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature Genetics* 5: 274-278.
85. Kleiman SE, Lagziel A, Yogev L (2001) Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis. *Fertility and Sterility* 75: 166-173.
86. Krausz C, McElreavey K (1999) Y chromosome and male infertility. *Am J Hum Gen* 64: 928-933.
87. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, McElreavey K, Scarselli G, Forti G (1999) Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 14: 1717-1721.
88. Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K (2000) Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human Reproduction* 15: 1431-1434.
89. Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Larsen LF, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek N (2001) Double blind screening for microdeletions of Y chromosome genes in infertile and fertile/ normospermic Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2638-2642.
90. Krausz C, Quintana-Murci L, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Jobling MA, Rosser ZH, Skakkebaek NE, McElreavey K (2001a) Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts. *Hum Mol Genet* 10: 1873-1877.
91. Krausz C, Degl'Innocenti S (2006) Y chromosome and male infertility: update. *Front Biosci* 11: 3049-3061.
92. Krausz C, Forti G (2006) Sperm cryopreservation in male infertility due to genetic disorders. *Cell and Tissue Banking* 7: 105-112.
93. Krausz C (2007) Polymorphisms an male infertility. *The Genetics of Male infertility.* Edited by Carrell DT, Humana press, Totowa, New Jersey, Chapter 18: 239 - 249.
94. Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E, Oliva R, Akinin-Seifer I, Erdei E, Jorgensen N, Simoni M, Ballescà JL, Levy R, Balercia G, Piomboni P, Nieschlag E, Forti G, McLachlan R, Tyler-Smith C (2009) Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet* 46: 21-31.
95. Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD (2002) INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent *J Biol Chem* 277: 31283-31286.
96. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown L G, Minx P J, Cordum H S, Waterston RH (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics* 29: 279-286.

97. Kuroki Y, Iwamoto T, Lee J, Yoshiike M, Nozawa S, Nishida T, Ewis AA, Nakamura H, Toda T, Tokunaga K, Kotliarova SE, Kondoh N, Koh E, Namiki M, Shinka T, Nakahori Y (1999) Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. *J Hum Genet* 44: 289-292.
98. Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675-680.
99. Larriba S, Bassas L, Gimenez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V, Estivill X, Casals T (1998) Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet* 7: 1739-1743.
100. Lee S, Joo HS, Lee SH, Park JE, Kim JM, Hwang JH, Cho KS, Hwang SY (2004) Application of DNA chip techniques for Yq microdeletion analysis in infertile males. *Exp Mol Med*. 36: 179-184.
101. Lin YW, Hsu LC, Kuo PL, Huang WJ, Chiang HS, Yeh SD, Hsu TY, Yu YH, Hsiao KN, Cantor RM (2007) Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Hum Mutat* 28: 486-494.
102. Lissens W, Mercier B, Tournaye H, Bonduelle M, Ferec C, Seneca S, Devroey P, Silber S, Van Steirteghem A, Liebaers I (1996) Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum Reprod* 11: 55-80.
103. Lu C, Zhang F, Xia Y, Wu B, Gu A, Lu N, Wang S, Shen H, Jin L, Wang X. (2007) The association of Y chromosome haplogroups with spermatogenic failure in the Han Chinese. *J Hum Genet* 52: 659-63.
104. Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P (2009) Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N Engl J Med* 360: 881-885.
105. Luetjens CM, Gromoll J, Engelhardt M (2002) Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Human Reproduction* 17: 2258-2266.
106. Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K (1993) A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 75: 1287-1295.
107. Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, Guichaoua M, Metzler-Guillemain C, Collignon P, Frances AM, Belougne J, Clemente E, Chiaroni J, Chevillard C, Durand C, Ducourneau A, Pech N, McElreavey K, Mattei MG, Mitchell MJ (2004) Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet* 41: 814-825.
108. Mak V, Jarvi K A, Zielenski J, Durie P, Tsui LC (1997) Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens. *Hum Mol Gen* 6: 2099-2107.
109. Mak V, Zielenski J, Tsui LC, Durie P, Zini A, Martin S, Longley TB, Jarvi KA (2000) Cystic Fibrosis gene mutations and infertile men with primary testicular failure. *Hum Reprod* 15: 436-439.
110. Makalowski W, Boguski MS (1998) Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2820 orthologous rodent and human sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9407-9412.
111. Matzuk MM, Lamb DJ (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol Suppl* s41-49.
112. Mau Kai C, Juul A, McElreavey K, Ottesen AM, Garn ID, Main KM, Loft A, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Andersen AN, Rajpert-De Meyts E (2008) Sons conceived by assisted reproduction techniques inherit deletions in the azoospermia factor (AZF) region of the Y chromosome and the DAZ gene copy number. *Hum Reprod* 23:1669-1678.
113. McElreavey K, Ravel C, Houate BE, Mandelbaum J, Chantot-Bastaraud S, Siffroi JP (2007) Y chromosome microdeletions in haplogroups. *The Genetics of Male infertility*. Edited by Carrell DT, Humana press, Totowa, New Jersey, Chapter 15: 239-249.

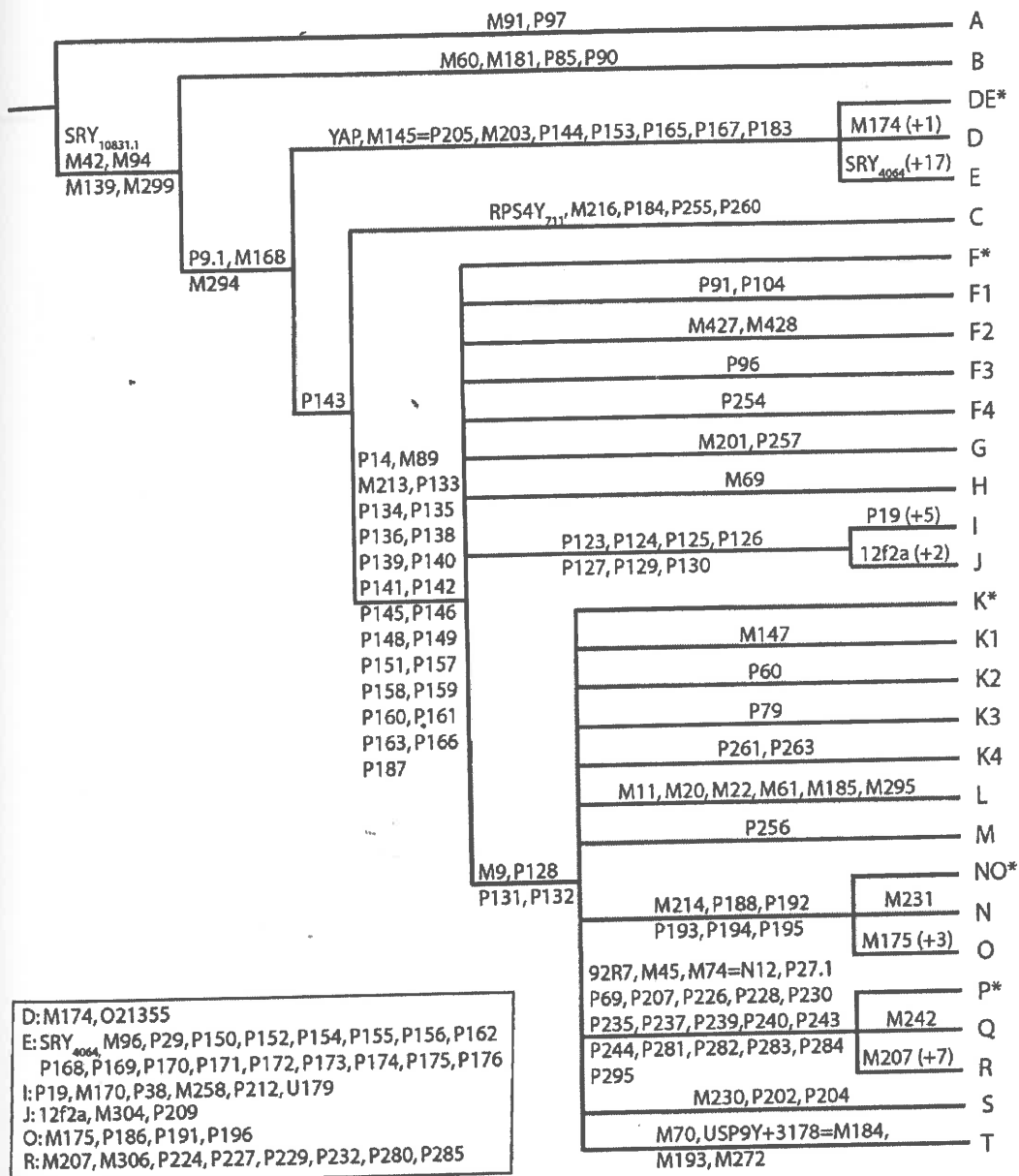
114. McPhaul MJ (1999) Molecular defects of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 315-322.
115. Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA (1999) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases in incidence meiotic errors. *Hum Reprod* 14: 1151-1156.
116. Nef S, Parada LF (1999) Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *NatGenet* 22: 295-299.
117. Newcombe RG, Altman DG (2000) Proportions and their differences. *Statistics with confidence* (2nd edn). London: BMJ Books. 46-48
118. Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE (2010) The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update* 1-18.
119. O'Connell M, McClure N, Lewis SE (2002) A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 17: 1571-1577.
120. Oates RD, Amos JA (1994) The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 15: 1-8.
121. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC (2002) Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod* 17: 2813-2824.
122. Oehninger S (2001) Strategies for the infertile man. *Semin Reprod Med* 19: 231-237.
123. Olsen C, Hansen C, Bendtsen E (2004) Identification of human candidate gene for male infertility by digital differential display. *Mol Hum Reprod* 7: 11-20.
124. Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D and Baralle F E (2000) Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 21041-21047.
125. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, Veeck LL, Zaninovic N, Menendez S, Rosenwaks Z (1998) Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 338: 588-590.
126. Paracchini S, Stuppia L, Gatta V, Palka G, Moro E, Foresta C, Mengua L, Oliva R, Ballesca JL, Kremer JA (2000) Y-chromosomal DNA haplotypes in infertile European males carrying Y-microdeletions. *J Endocrinol Invest* 23: 671-676.
127. Paracchini S, Arredi B, Chalk R, Tyler-Smith C (2002) Hierarchical high-throughput SNP genotyping of the human Y chromosome using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 30:e27.
128. Pena SDJ (1998) *Molecular Cytogenetics II: PCR-based diagnosis of chromosomal deletions and microdeletion syndromes*. *Genet Mol Biol* 21.
129. Phillipson GT, Petrucco OM, Matthews CD (2000) Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15: 431-435.
130. Pitteloud N, Hayes FJ, Boepple PA (2002) The role of prior pubertal development, biochemical markers of testicular maturation, and genetics in elucidating the phenotypic heterogeneity of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 152-160.
131. Pont-Kingdon G, Jama M, Miller C, Millson A, Lyon E (2004) Long-Range (17.7 kb) Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Method for Direct Haplotyping of R117H and IVS-8 Mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene. *J of Mol Diagnostics* 3: 264-270.
132. Poonthai J, Gopenath TS, Manonayaki S (2009) Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 50: 336-347.
133. Preacher KJ (2001) Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence [Computer software]. Available from <http://www.quantpsy.org>.

134. Previderé C, Stuppia L, Gatta V, Fattorini P, Palka G, Tyler-Smith C (1999) Y-chromosomal DNA haplotype differences in control and infertile Italian subpopulations. *Eur J Hum Genet* 7: 733-736.
135. Quintana-Murci L, Krausz C, McElreavey K (2001) The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci Int* 118: 169-181
136. Raicu F, Popa L, Apostol P, Cimponeriu D, Dan L, Ilinca E, Dracea LL, Marinescu B, Gavrilă L (2003) Screening for microdeletions in human Y chromosome - AZF candidate genes and male infertility. *J Cell Mol Med* 7:43-48.
137. Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Petersen JH, Andersen AG, Carlsen Jorgensen N, Skakkebaek NE (2002) CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet* 5: 44-46.
138. Rapley EA, Crockford GP, Tear D, Biggs P, Seal S, Barfoot R (2002) Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nat Genet* 24: 197-200.
139. Ravel C, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Mandelbaum J, Siffroi JP, McElreavey K (2006) GR/GR deletions within the azoospermia factor c region on the Y chromosome might not be associated with spermatogenic failure. *Fertil Steril* 85: 229-231.
140. Reijo R, Lee TY, Salo P (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *National Genetics* 10: 383-393.
141. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC (1996) Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347: 1290-1293.
142. 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. *American Journal of Human Genetics* 71: 906-922.
143. Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen S K, Korver C M, Pyntikova T (2003) Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics* 35: 247-251.
144. Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszałek JD, Gianotten J, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (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.
145. Reyes-Vallejo L, Lazarou S, Morgentaler A (2006) Y chromosome microdeletions and male infertility: who should be tested and why? *BJU International* 441- 443
146. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.
147. Rodvalho RG, Arruda JT, Moura KK (2008) Tracking microdeletions of the AZF region in a patrilineal line of infertile men. *Genet Mol Res* 7: 614-622.
148. Rommens JM, Lannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065.
149. Rommens J, Kerem B, Greer W, Chang P, Tsul L, Ray P (1990) Rapid Nonradioactive Detection of the Major Cystic Fibrosis Mutation. *Am J Hum Genet* 46: 395-396.
150. Rovio AT, Marchington DR, Donat S (2001) Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet* 29: 261-262.
151. Ruiz-Pesini E, Lapena A, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Enriquez J, Diaz M (2000) Human mitochondrial DNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67: 682-696.
152. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F (2006) Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urol J* 4: 192-206.

153. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, Burgoyne P, Saut N, Durand C, Levy N, Terriou P, Hargreave T, Cooke H, Mitchell M, Rappold GA, Affara NA (1999) The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *J Med Genet* 36: 670-677.
154. Schwarz M, Gardner A, Jenkins L, Norbury G, Renwick P, Robinson D (2009) Testing Guidelines for molecular diagnosis of Cystic Fibrosis. CMGS
155. Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF (2000) Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest* 23: 560-565.
156. Shaffer LG, Ledbetter DH, Lupski JR (2001) Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: mechanisms and consequences of gene dosage imbalance. In *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Edited by: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. New York: McGraw Hill, 1291-1324.
157. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1993) Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 362: 160-164.
158. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC (1998) Y Chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum. Reprod* 13: 3332-3337.
159. Simoni M (2001) Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. *Human Reproduction* 16: 402-409.
160. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J (2002) Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 8: 413-421.
161. Simoni M, Bakker E, Krausz C (2004) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 27: 240-249.
162. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
163. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-837.
164. Sultan C, Lumbroso S (1998) LH receptor defects. In *Fertility and Reproductive Medicine* Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB Eds, Elsevier Science BV: Amsterdam, 769-782.
165. Sun C, Skaletsky H, Rezen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC (2000) Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet* 9: 2291-2296
166. Swanson WJ, Vacquier VD (2002) The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet* 3: 137-144.
167. Tamburino L, Guglielmino A, Venti E, Chamayou S (2008) Molecular analysis of mutations and polymorphisms in the CFTR gene in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 17: 27-35.
168. Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Gupta NJ, Chakravarty B, Sing L (2002) CAG repeat expansion in the androgen receptor gene is not associated with male infertility in Indian populations. *J Androl* 23: 815-818.
169. Teng H, Jorissen M, Van Poppel H, Legius E, Cassiman JJ and Cuppens H (1997) Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Human Molecular Genetics* 6: 85-90.
170. Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localisation of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34: 119-124.
171. Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M (2001) A physical map of the human Y chromosome. *Nature* 409: 943-945.

172. Tizzano EF, Chitayat D, Buchwald M (1993) Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues. *Hum Mol Genet* 2: 219-224.
173. Tomboc M, Lee PA, Mitwally MF, Schneck FX, Bellinger M, Witchel SF (2000) Insulin-like 3/relaxin-like factor gene mutations are associated with cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4013-4018.
174. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M (1996) Testicular sperm recovery in nine 47XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod* 11: 1644-1649.
175. Traystman MD, Schulte NA, MacDonald M, Anderson JR, Sanger WG (1994) Mutation analysis for cystic fibrosis to determine carrier status in 167 sperm donors from the Nebraska Genetic Semen Bank. *Hum Mutat* 4: 271-275.
176. Trezise A, Linder C, Grieger D, Thompson E, Meunier H, Griswold M, Buchwald M (1993) CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. *Nature Genetics* 3: 157-164.
177. Tuerlings JHAM, Mol B, Kremer JAM, Looman M, Meuleman EJH, Te Meerman GJ, Buys CHCM, Merkus HJWM, Scheffer H (1998) Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 69: 899-903.
178. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL (1997) Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation impaired sperm production and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3777-3782
179. Tyler-Smith C, McVean G (2003) The comings and goings of a Y polymorphism. *Nat Genet.* 35: 201-202.
180. Tyler-Smith C (2008) An evolutionary perspective on Y-chromosomal variation and male infertility. *Int J Androl* 31: 376-382.
181. Tyler-Smith C, Krausz C (2009) The will-o'-the-wisp of genetics--hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med* 360: 925-927.
182. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H (1996) Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 11: 1-24.
183. Van der Ven K, Messer L, van der Ven H, Jeyendran RS, Ober C (1996) Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Reprod* 11: 513-517.
184. Van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, Krebs D, der Ven H (1997) Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Hum. Reprod* 3: 699-704.
185. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
186. Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE (2002) Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 17: 2128-2133.
187. Vogel F, Motulsky AG (1986) Mutation. In *Human genetics* Springer-Verlag: Berlin, 334-432.
188. Vogt PH (1995) Genetic aspects of artificial fertilization. *Hum Reprod* 10: 128-137.
189. Vogt PH (1996) Human Y chromosome function in male germ cell development. *Advances in Developmental Biology* 4: 191-257.
190. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G (1996) Human Y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933-943.
191. Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lau YFC (1997) Report on the third international workshop on Y chromosome mapping 1997. *Cytogenetics and Cell Genetics* 79: 1-20.

192. Vogt PH (1998) Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction* 4: 739-744.
193. Vogt MHJ, de Paus RA, Voogt PJ, Willemze R, Falkenburg JHF (2000) DFFRY codes for a new human male-specific minor transplantation antigen involved in bone marrow graft rejection. *Blood* 95: 1100-1105.
194. Vogt PH (2004) Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Mol Cell Endocrinol* 224: 1-9.
195. Vogt PH (2005) Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 10: 81-93.
196. Vogt PH (2005a) AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Hum Reprod Update* 11: 319-336.
197. World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
198. Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Xiao C, Li S, Ma Y, Tao D, Liu Y, Lin L (2008) Evidence for the association of Y chromosome haplogroups with the susceptibility to spermatogenic failure from a Chinese Han population. *J Med Genet* 45: 210-215.
199. Yen P (2001) The fragility of fertility. *Nat Genet* 29: 279-286.
200. Yeom HJ, Her YS, Oh MJ, Paul S, Park MS, Yeoun JP, Jung JW, Lee S, Hwang SY (2008) Application of multiplex bead array assay for Yq microdeletion analysis in infertile males. *Mol Cell Probes* 22: 76-82.
201. The Y Chromosome Consortium (2002) A Nomenclature System for the Tree of Human Y-Chromosomal Binary Haplogroups. *Genome Res* 12: 339-348.
202. Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF (2008) New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res* 18: 830-838.
203. Zerjal T, Dashnyam B, Pandya A, Kayser M, Roewer L, Santos FR, Schiefenhövel W, Fretwell N, Jobling MA, Harihara S, Shimizu K, Semjidmaa D, Sajantila A, Salo P, Crawford MH, Ginter EK, Evgrafov OV, Tyler-Smith C (1997) Genetic relationships of Asians and Northern-Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am J Hum Genet* 60: 1174-1183.
204. Zielenski J (2000) Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis *Respiration* 67: 117-133.
205. Zullo SJ, Butler L, Zahorchak RJ, Macville M, Wilkes C, Merrill CR (1997) Localization by fluorescence in situ hybridisation (FISH) of human mitochondrial polymerase gamma. (POLG) to human chromosome band 15q24-->q26 and of mouse mitochondrial polymerase gamma. (Polg) to mouse chromosome band 7E with confirmation by direct sequence analysis of bacterial artificial chromosomes. (BACs) *Cytogenet Cell Genet* 78: 281-284.



1. attēls. Vienkāršots Y hromosomas haplogrupu filoģenētiskais koks. Haplogrupas nosakošo polimorfismu/markieru nosaukumi parādīti uz līnijām; dažām haplogrupām papildus arī attēla apakšējā kreisajā stūrī. Y hromosomas haplogrupu nosaukumi norādīti filoģenētiskā koka atzarojumu galos. Atzarojuma garums nav proporcionāls markieru skaitam vai to izcelšanās vecumam (pēc Karafet et al., 2008).



The European Molecular Genetics Quality Network

EMQN Administrator
Simon Patton
National Genetics Reference Laboratory
St Mary's Hospital, Hathersage Road,
Manchester M13 0JH, United Kingdom.
Tel: +44 161 276 6741
Fax: +44 161 276 6606
Email: simon.patton@emqn.nhs.uk

EMQN Co-ordinator
Rob Ellis
National Genetics Reference Laboratory
St Mary's Hospital, Hathersage Road,
Manchester M13 0JH, United Kingdom.
Tel: +44 161 276 6129
Fax: +44 161 276 6606
Email: rob.ellis@emqn.nhs.uk

EMQN EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME

Lab Reference Number: 0468

Disease: AZF

Year: 2009

Case 1: Lorenzo MALPIGHI (dob 08/12/1973)		
Category	Score	Reasons that points were given/deducted
Genotyping	2.00	
Interpretation	1.50	Either state that in the majority of cases the deletion is complete or perform/advice the extended analysis. Cause-effect relationship should be clearly stated (AZFb deletion is explanation for azoospermia in this case). Genetic counselling not recommended (-0.2).
Comments:	Misspelling in patient first name: Lorenzo instead of Lorenzo.	

Case 2: Christofer LEE (dob 05/05/1968)		
Category	Score	Reasons that points were given/deducted
Genotyping	2.00	
Interpretation	1.70	Sensitivity of the method (>95%) not given (-0.3).
Comments:	Karyotyping should be recommended in this case.	

Case 3: Laszlo FEKETE (dob 03/03/1977)		
Category	Score	Reasons that points were given/deducted
Genotyping	2.00	
Interpretation	1.50	AZFc deletion will definitely transmitted to sons and not "could be". Genetic counselling not recommended (-0.5).
Comments:		

Average Overall Scores		
Category	Score	
Mean genotyping score	2.00	
Mean interpretation score	1.67	
Comments:	Thank you for participating in the 2009 scheme - registration for the 2010 schemes will be open from 01/05/10 until 20/07/10. You will need to be logged in on the website to access the registration facility.	

2. attēls. Apstiprinājums par piedalīšanos EMQN organizētajā laboratoriju kvalitātes kontroles testēšanā. RSU Molekulārās ģenētikas laboratorijā (Nr. 0468) anonīmiem EMQN atsūtītiem paraugiem, tika pareizi noteikti genotipi – konkrētu AZF rajonu mikrodelēciju klātbūtne vai to trūkums, kā arī izveidota kvalitatīva atskaites forma pacientiem (pielikumi 2a-2c), kurā precīzi atspoguļotas rekomendācijas attiecīgo mikrodelēciju gadījumā. Pēc EMQN speciālistu izvērtējuma RSU Molekulārās ģenētikas laboratorijā realizētā Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikas un interpretācijas precizitāte tika novērtēta ar 2 punktiem (maksimālais punktu skaits par genotipa precīzu noteikšanu un 1,67 punktiem par interpretāciju.

Laboratory
Nr. 0468

Report of molecular genetics investigation

11/01/2010

Patient(s): **Luoreno MALPIGHI (8/12/1973; # 09006024)**

Indications: **Azoospermia. Analysis requested in preparation of TESE/ICSI.**

Analyses:	Diagnosis of microdeletions of the Y chromosome, by two multiplex PCR amplifications of Y chromosome AZF region.	Material tested: lyophilised DNA
		Sample received: 29/10/2009

Result:

Deletion of AZFb region

Results of Y chromosome microdeletion analysis in tabular form:

Analysed STS loci	internal PCR control	control for testis-determining factor	AZFa		AZFb		AZFc	
	ZFX/ZFY	SRY	sY84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255
present/absent	present	present	present	present	absent	absent	present	present

Interpretation: Deletions of both Y chromosome STS markers sY127 and sY134 indicated complete deletion of AZFb region on Y chromosome. AZFb deletions are associated with no sperm retrieval. TESE/ICSI is not recommended in this case.



Laboratory director



Analyses performed by: A.P.

Analysis requested by: EQMN

Laboratory
Nr. 0468

Report of molecular genetics investigation

11/01/2010

Patient(s): **Christofer LEE (05/05/1968; # 09006023)**

Indications: Severe azoospermia. Analysis requested as part of the diagnostic work-up for couple's infertility.

Analyses:	Diagnosis of microdeletions of the Y chromosome, by two multiplex PCR amplifications of Y chromosome AZF region.	Material tested: lyophilised DNA
		Sample received: 29/10/2009

Result:

No microdeletions of the Y chromosome detected

Results of Y chromosome microdeletion analysis in tabular form:

Analysed STS loci	Internal PCR control	Control for testis-determining factor	AZFa		AZFb		AZFc	
	ZFX/ZFY	SRY	sY84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255
present/absent	present	present	present	present	present	present	present	present

Interpretation: There could be another reason of couple infertility in this case, since microdeletions of the Y chromosome were not found in analysis of patients DNA sample (incidence of Y chromosome microdeletions is in infertile patients is low ~ 2-10 %).



Laboratory director



Analyses performed by: A.P.

Analysis requested by: EQMN

Laboratory
Nr. 0468

Report of molecular genetics investigation

11/01/2010

Patient(s): **Laszlo FEKETE (03/03/1977; # 084274)**

Indications: **Azoospermia. Analysis requested in preparation of TESE/ICSI.**

Analyses:	Diagnosis of microdeletions of the Y chromosome, by two multiplex PCR amplifications of Y chromosome AZF region.	Material tested: lyophilised DNA
		Sample received: 29/10/2009

Result:

Deletion of AZFc region

Results of Y chromosome microdeletion analysis in tabular form:

Analysed STS loci	internal PCR control	control for testis-determining factor	AZFa		AZFb		AZFc	
	ZFX/ZFY	SRY	sY84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255
present/absent	present	present	present	present	present	present	absent	absent

Interpretation: Absence of both Y chromosome STS markers sY254 and sY255 indicates deletion of entire AZFc region. Histological picture of the testis is variable in such cases and sperm can be found in the testis and/or in the ejaculate. TESE/ICSI can be attempted in this case. However AZFc deletions could be transmitted to the male offspring if assisted reproduction is performed (the sons of patient will be also infertile).



Laboratory director



Analyses performed by: A.P.

Analysis requested by: EQMN

Publikāciju kopijas:

1. L.Timsa, A. Puzuka, L. Pliss, A. Krumina et al. *Human Y chromosome and its role in human pathology and population phylogenetic studies*. - Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, 2005, vol.59, p. 93-108.
2. A.Puzuka, A.Krumina, N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, J.Bars, I.Grinfelde, V.Baumanis. *Analysis of Y-chromosomal microdeletions and polymorphism of CFTR gene in infertile males – a study from Latvian population*. - Proceedings of the Ukrainian Academy of Sciences; Genetics, Selection and Biotechnology, 2007, Logos, Kiev, p.575-578.
3. A.Puzuka, A.Krumina N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, J.Bars, I.Grinfelde, V.Baumanis. *Molecular analysis of male infertility in Latvia*. - RSU Collection of Scientific Papers, Research Articles in Medicine and Pharmacy, 2007, p. 90-93.
4. A.Puzuka, I.Prane, J.Erenpreiss, A.Krumina. *CFTR gene and male infertility*. - RSU Collection of Scientific Papers, Research Articles in Medicine and Pharmacy, 2008, p. 97-100.
5. A.Puzuka, N.Pronina, I.Grinfelde, J.Erenpreiss, V.Lejins, J.Bars, L.Pliss, I.Pelnena, V.Baumanis, A.Krumina. *Y chromosome – a tool in infertility studies of Latvian population*. - in press Russian Journal of Genetics (Genetica), 2011, p. 1-7.

УДК 576.316:599.9

Y chromosome – a tool in infertility studies of Latvian population

© 2011 A. Puzuka¹, N. Pronina², I. Grinfelde², Ju. Erenpreiss³, V. Lejins⁴, Ja. Bars², L. Pliss⁵, I. Pelneņa⁵, V. Baumanis⁵, A. Krumina¹¹Riga Stradins University, Department of Medical Biology and Genetics, Riga LV-1007, Latvia; e-mail: agrita.puzuka@gmail.com²Children University Hospital, Medical Genetics Clinic, Riga, Latvia³Riga Stradins University, Laboratory of Andrology, Riga, Latvia⁴EGV Clinics, Riga, Latvia⁵Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia

Received April 14, 2010

Human Y chromosome is used as a tool in male infertility and population genetic studies. The aims of this research were to analyse the prevalence of Y chromosome microdeletions among infertile Latvian men, and to identify possible lineages of Y chromosome that may be at increased risk of developing infertility. A study encompassed 105 infertile men with different spermatogenic disturbances. Deletions on Y chromosome were detected in 5 out of 105 (~5%) cases analysed in this study. Three of them carried deletion in AZFc region and two individuals had AZFa + b + c deletion. Study of Y chromosome haplogroups showed that N3a1 and R1a1 lineages were found less frequently in the infertile male group compared to ethnic Latvian group, however K* cluster was predominantly found in infertile male Y chromosomes. Conclusions: 1) Our study advocates running Y chromosome microdeletion analyses only in cases of severe form of infertility; 2) Y chromosome haplogroup analysis showed statistically significant tendencies that some haplogroups are more common in ethnic male group, but others are more common in infertile males.

Infertility is a serious health problem affecting 10–15% of couples trying to achieve pregnancy; and male factor is estimated as a contributing factor in about half of these cases [1].

Early cytogenetic studies showed that deletions in the long arm of Y chromosome are responsible for azoospermia [2]. With the advancement of molecular biology, three regions named “azoospermia factors” (AZFa, AZFb and AZFc regions; Yq11 locus) have been defined as spermatogenesis loci [3]. It is now widely accepted that deletions within those regions severely diminish the sperm production [4, 5]. The power of polymerase chain reaction (PCR) and the availability of sequence-tagged site (STS) maps made possible the detection of interstitial microdeletions in Yq11 region that is invisible by karyotyping [6–8].

Y chromosomal microdeletions have been reported with varied prevalence in different populations considerably depending on the selection criteria of the patients. Azoospermic men have a higher incidence of microdeletions than oligozoospermic men and, consequently, deletion frequency of azoospermic and oligozoospermic men found in different laboratories may vary from 2 to 10% (or even higher) reflecting the selection of population for investigation [9]. Y chromosome deletions of the AZFc region are the most common (79% of all deletions) among three mentioned AZF regions. Other sub-groups are considerably less frequent – AZFb (9%), AZFbc (6%), AZFa (3%) and AZFabc (3%) [5].

The vast majority (57 of 60 Mb) of Y chromosome does not recombine with the X chromosome and is transmitted from father to son with all functional variants and neutral polymorphisms being linked. This quality of Y chromosome makes it a good tool in population genetics studies. A Y chromosome lineage or haplogroup is a monophyletic group of Y-chromosomes defined by stable binary markers such as single nucleotide variants or insertions/deletions. Distribution of Y chromosome variation among population indicates that most lineages are largely confined to particular human population, which has important implications for association studies [10]. The distinct population affinities displayed by many Y chromosome haplotypes and their high degree of geographical specificity means that an association between the Y chromosome background and phenotype in one population or country may not be relevant for another. Conversely, the absence of an association in one population does not imply its absence in other population. However, those studies are useful because they may identify classes or lineages of the Y chromosome that may be at increased risk of developing infertility [11–13].

Until now frequency and characteristic data on Y-chromosomal microdeletions among Latvian population were absent. To fulfil this gap the aim of this research was to analyse Y chromosome microdeletions in Latvian infertile males, and to study microdeletions at molecular level using analysis of Y-STRs. Y chro-

1

ПРОВЕРЕНО КОМПЬЮТОРОМ.
Материал отправлен на согласование

mosome haplogroup analysis was performed in this study to identify possible classes or lineages of Y chromosome that may be at increased risk of developing infertility.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Subjects for Y-chromosomal microdeletion analysis were 105 men from infertile couples (failure to achieve pregnancy during at least one year). Inclusion criteria were azoospermia (lack of sperm in ejaculate), oligozoospermia (defined as sperm concentration $<5 \times 10^6/\text{mL}$) or oligo-astheno-teratozoospermia (sperm structural defects). All cases of spermatogenic failure resulting from endocrine or proved cytogenetic abnormality (except two cases) were excluded from our study. The average age of infertile men was 35 ± 11 years (ranged from 24 to 46 years). The average duration of infertility was 4, 5 years (ranged from 1 to 20 years). Each patient was asked and examined for potential gonadal anomalies, testis volumes, varicoceles, potential epididymal or prostata abnormalities, levels of hormones determined: follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testosterone.

Semen analyses. Sperm and its ejaculates were analysed for their motility, number and morphology according to the guidelines of World Health Organization (WHO).

Y chromosome microdeletions. Microdeletion screening procedure was performed for infertile males with normal karyotype, except two samples with cytogenetically visible deletion of Y chromosome long arm (46,X, del(Y)(q)). Peripheral blood samples were collected, and DNA was isolated using Nucleon BACC1 kit (Amersham, USA). Microdeletions of AZF regions were detected by two multiplex PCR reactions – multiplex A and multiplex B. The following primer sets were used – sY14, ZFX/ZFY as male and both gender controls, but sY84, sY86 for AZFa, sY127, sY134 for AZFb and sY254, sY255 for AZFc deletions which are recommended to be used in multiplex PCR as the best choice for the diagnosis of Y chromosome microdeletions of the AZF region. Those primer sets were initially used by Simoni et al. and are recommended by European Academy of Andrology [5]. PCR amplifications were performed in a final volume 25 μl , containing 50 ng of DNA, including 10 mM reaction buffer, 25 mM MgCl_2 , 10 mM dNTP mix, 10 μM primers and 100U *Taq* polymerase. For both multiplex PCR, the PCR conditions were 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 62°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, and final extension time of 5 minutes at 72°C. The products were separated on 6% polyacrilamide gel by electrophoresis, stained with 10 mg/ml ethidium bromide, and visualized using UV transillumination. A deletion was confirmed when two consecutive PCR amplifications yielded positive results.

Y chromosomal haplogroup analysis. Simultaneously, DNA samples (78 samples) from infertile patients were typed with 6 Y chromosomal binary markers to establish their haplogroup (hg). 58 of 78 infertile males were Latvians (ethnicity was based on the patients' family names) and 20 patients were non-ethnic Latvians. Since frequencies of the most common Y chromosome haplogroups do not have statistically significant differences between Latvian and Russian populations, we studied infertile male samples of Latvian population (58 of 78 infertile males, Latvian origin; 20 of 78 infertile males, Russian origin) together. Binary markers were chosen corresponding to those haplogroups that were found in ethnogenetic studies of Latvians (M9, SRY-1532, M17, Tat, P21, M170; unpublished data). All samples were typed with each binary marker. Typing conditions were similar for all of the markers, changing only the cycling programme, and were previously described by Zerjal and colleagues [14]. Results are given according to the haplogroup nomenclature of the Y Chromosome Consortium (YChromosome Consortium, 2002).

Statistical analysis. Differences in Y chromosome haplogroup frequencies between infertile Latvian males and men that are Latvians in three generations were compared by the chi-square statistic. All *P* values were based on 2-sided comparisons and *P* < .05 indicates statistical significance.

Our study was approved by the Latvian Central Committee of Medical Ethics, and informed consent was obtained from each patient.

RESULTS

Multiplex PCR analysis of AZF region in all cases gave the correct amplification results – performed twofold PCR never gave positive signals in negative control lines and positive signals were always seen after amplification of control female and normal male DNA.

In total the frequency of Y chromosome microdeletions in our study population was found to be ~5% (5 cases of 105). All cases of microdeletions were found among severe form of infertility – azoospermia (3 cases) and severe oligozoospermia (2 cases), respectively (Table 1).

Types of Y-chromosomal microdeletions are represented in Fig. 1. Deletions in the AZFc region were found in 3 cases of 5 and deletions of AZFa + b + c region were detected in 2 cases of 5. Both persons (samples Nr. 4 and Nr. 5 in Tables 1 and 2) with deleted all three AZF regions – AZFa, AZFb and AZFc respectively, showed abnormality in karyotype – 46,X, del(Y)(q).

In men with the AZFc deletion (3 cases) sperm concentration varied from 0 (azoospermia) (1 case of 3) to 1–5 immotile (severe oligozoospermia) spermatozoa shown in spermogram (2 cases of 3), however

Table 1. Genotype – phenotype associations in patients with Y chromosomal microdeletions

Case	Microdeletion	Spermatozoa in spermogramm	Clinical diagnosis	Karyotype	Phenotypic data
1	AZFc	0	Azoospermia	46,XY	Android adiposity, gynecomastia, brachydactyly
2	AZFc	5 motiofless spermatozoa in spermogramm	Severe oligozoospermia	46,XY	Mumps in childhood, in testis biopsy there are only spermatids found
3	AZFc	1–2 immobile spermatozoa in spermogramm	Severe oligozoospermia	46,XY	Mumps in childhood
4	AZFa, AZFb, AZFc	0	Azoospermia	46,X, del (Y)(q)	Android adiposity, gynecomastia, microtestis in right side
5	AZFa, AZFb, AZFc	0	Azoospermia	46,X, del (Y)(q)	No data

Table 2. Y chromosome haplogroups in infertile Latvian males and Latvians in tree generations

Haplogroup	Infertile males (n = 78)	Latvians in three generations (n = 153)	P
R1a1	12 (15.4%)	60 (39.2%)	0.006
N1c1	24 (30.8%)	65 (42.5%)	0.242
I	2 (2.6%)	13 (8.5%)	0.102
K*	19 (24.4%)	10 (6.5%)	0.002
Others (M9 C)	21 (26.9%)	5 (3.3%)	0.001

men with AZFa + b + c deletions (2 cases) showed azoospermia.

Y chromosome haplogroup analysis in Latvian infertile male population gave the following results that are summarized in Table 2. From analyzed 78 DNA samples 55 contained M9 G allelic variant and using appropriate markers this lineage was subdivided in K cluster (K*) and further into R1a1 and N1c1 haplogroups. M9 C allelic variant was found in 23 cases, and these samples belong to F cluster (F*). In this sample group haplogroup was identified only in 2 samples (haplogroup I) but for rest of samples further analysis with other markers is necessary. One of prevalent haplogroups found in Latvian population is N1c1 (results from study of 153 unrelated male DNA samples, that are Latvians in three generations; unpublished data) and its frequency is 42.5%. Prevalence of this haplogroup among infertile male Y-chromosomes is 30.8% (24 cases of 78). Frequencies of N1c1 haplogroup in both sample groups show that this Y chromosome lineage has no correlation with male infertility ($p = 0.242$). Second common haplogroup in Latvian population is R1a1 that is found in 39.2% ethnic Latvians, but rarely in DNA samples of infertile patients (12 cases of 78; 15.4%). Comparison of R1a1 hg frequencies in both groups revealed significant differ-

ences ($p = 0.006$) and suggests that this haplogroup is manifested in healthy fertile males. Also I haplogroup is rarely found in infertile male DNA samples, but it gave no significant differences ($p = 0.102$) comparing to the control group. Y chromosome variants that belong to K cluster are often found among infertile patients (19 cases of 78; 24.4%; $p = 0.002$). Further studies of haplogroup analysis in infertile patients are necessary, to fully understand the relationship of Y chromosome haplogroups with fertility.

DISCUSSION

Spermatogenesis is regulated by a number of genes on the Y chromosome and autosomes. Y chromosome deletions are emerging as a prevalent genetic cause of male factor infertility and the frequency of Y chromosome deletions increases with the severity of spermatogenic defect [15]. About 15% of azoospermic and 5–10% of oligozoospermic men show Y chromosome deletions [3, 9, 16–19]. In general, the frequency of Y-chromosomal microdeletions is an average of 8.2% in azoospermic and oligozoospermic men.

In the present study, we report on the first analysis of Y microdeletions in infertile men in the Latvian population. The frequency of Y chromosome mi-

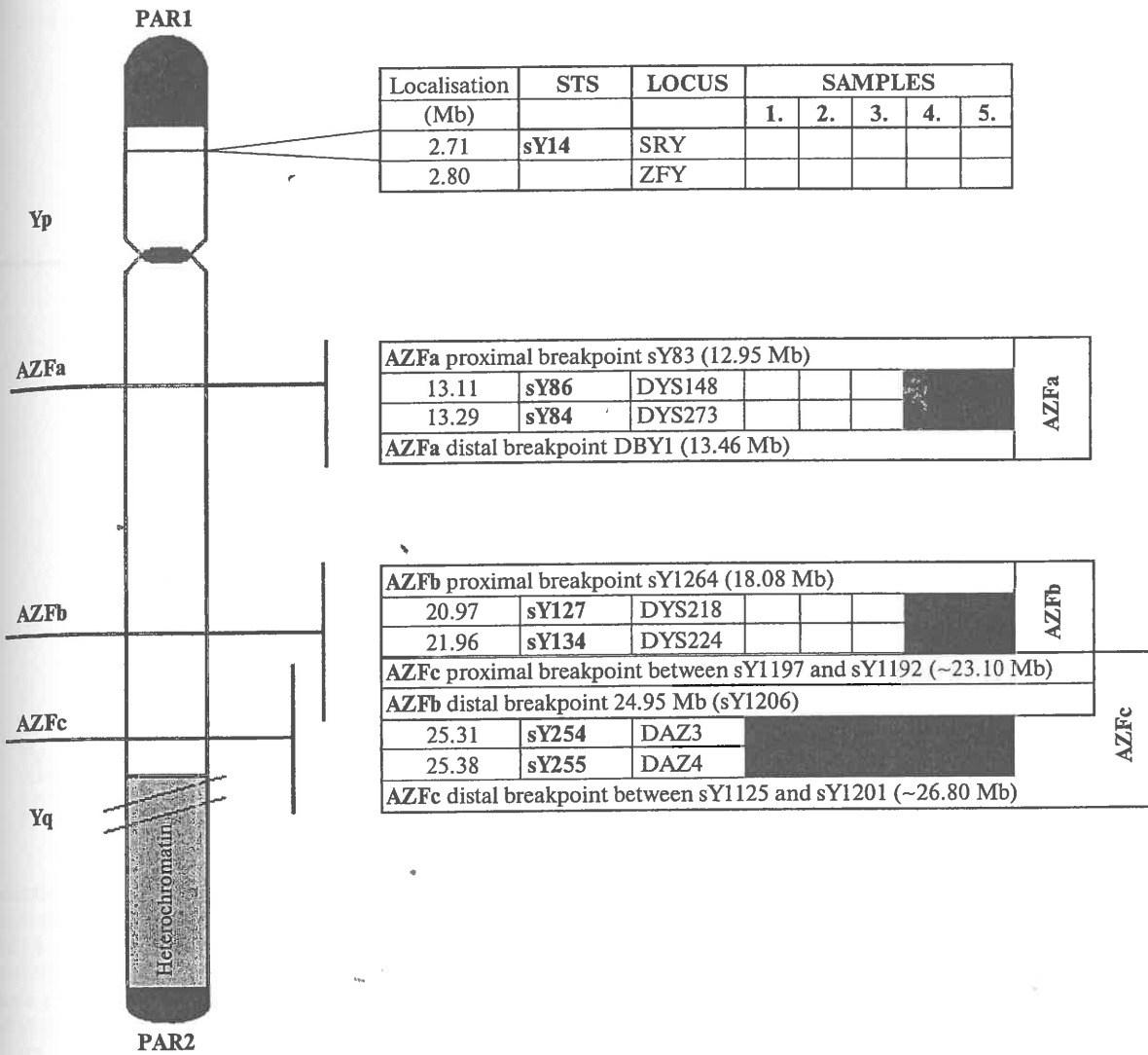


Fig. 1. Data of Y chromosome microdeletion analysis in five patients. AZF regions, Y-chromosomal STS are listed above. Black boxes, STS absent – microdeletion of corresponding AZF region (Multiplex A and B PCR results). PAR1 and PAR2 – pseudoautosomal regions.

crodeletions in our selected infertile male population was ~5% (5 cases of infertile 105 men).

In our study three of five infertile Latvian men with Y chromosome microdeletions had deletions in AZFc region (Fig. 2), and two had deletion of all three AZF regions (Fig. 3). In the case of AZFc microdeletions, two STS sites (SY254 and SY255) were deleted. These STS markers are specific for the DAZ gene, which is present in four copies arranged in two complexes of two genes each in head-to-head orientation located in the palindromes P1 and P2, respectively [20]. Two patients had deletions in all three AZF regions (deletion was visible in karyotype analysis). This type of deletion –

AZFa + b + c deletion of AZF region is rare Y chromosome deletion, and is rarely reported in literature, because patients with abnormal karyotype frequently are not included in microdeletion screening [5].

In addition, it is interesting, that we never found microdeletions in AZFa and AZFb regions. Krausz & Forti in four population studies reveal that AZFa region deletions are found in ~5% of Y-microdeletion patients and 35% compose microdeletions where AZFb region is involved (AZFb, AZFb + c, AZFa + b + c) [21]. Other large study of infertile men detected, that Y chromosome deletions of the AZFc region are the most common (79% of all deletions) among three

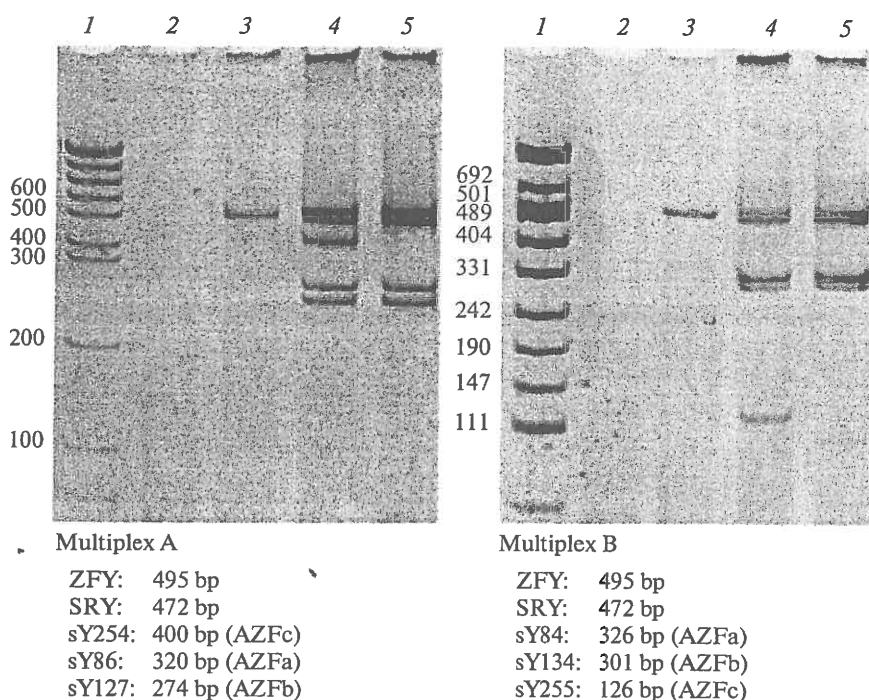


Fig. 2. Y-chromosome microdeletion analysis, showing the deletion of AZFc region. Multiplex A: line 1 – Size marker (GeneRuler100bp, “Fermentas”), line 2 – negative control, line 3 – female DNA (internal control), line 4 – DNA of normal male, line 5 – DNA of AZFc deleted patient. Multiplex B: line 1 – Size marker (pUC8, “Fermentas”), line 2 – negative control, line 3 – female DNA (internal control), line 4 – DNA of normal male, line 5 – DNA of AZFc deleted patient.

mentioned AZF regions. Other sub-groups are considerably less frequent – AZFb (9%), AZFc (6%), AZFa (3%) and AZFabc (3%) [5]. In general Y chromosome microdeletion frequency in Latvian infertile male population is similar to those that are represented in other infertile male populations.

The infertility phenotype of the analysed patients with Y chromosome microdeletions was azoospermia (3 cases) and severe oligozoospermia (2 cases). It also corresponds to the literature data, because most of publications mention that AZFc deletions can be found in men with azoospermia or severe oligozoospermia. But cases of all three AZF region deletions are rarely found among infertile men and have the most severe spermatogenic damage, resulting in Sertoli cell only syndrome [22].

The frequencies of the most common Y chromosome haplogroups in Latvian population (unpublished data) are very similar to frequencies of other European populations, and also to those that are found in Russian (Europe part) population [23–25]. Since haplogroup frequencies do not have statistically significant differences we can study infertile male samples of Latvian and Russian origin together, and they will represent more “infertility haplogroups” rather than ethno-geographic origin of samples. Two more common

haplogroups N1c1 and R1a1 that are predominantly distributed in Latvian population (unpublished data) are found also among infertile Latvian males. Our data showed that N1c1 haplogroup was found in similar frequency in infertile and ethnic sample groups. It is known that N haplogroup is one of the oldest and frequently distributed haplogroups in Europe and this leads to explanation that this haplogroup is also reproductively successful [12]. Data on R1a1 haplogroup in our study revealed significant differences among the analysed groups, and were mostly found in the group of ethnic Latvians (60 cases of 153; 39.2%; $p = 0.006$). In our study we detected that there is significant differences in K cluster ($p = 0.002$) distribution in analysed samples – 24.4% (19 cases of 78) of infertile male Y chromosomes belong to K cluster, but in the group of ethnic Latvians K* is found only in 6.5% (10 cases of 153). Literature data show that K* cluster was associated with reduced fertility in Danish population [11]. Y haplogroup analysis in this study shows that there exist some tendencies that might explain possibility that some of Y chromosomal variants are likely to be found among infertile patients, but to conclusions on specific infertility Y-lineage it is necessary to take further investigations.

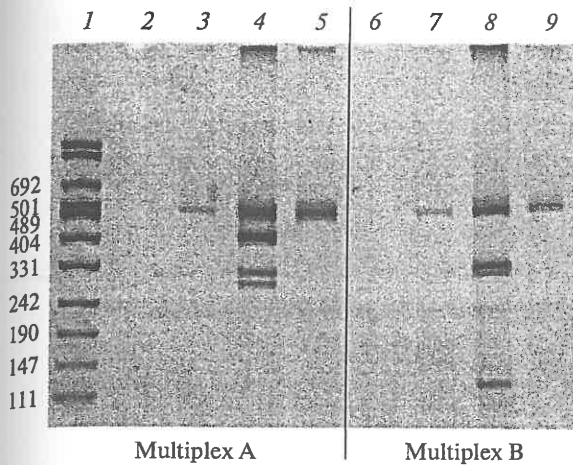


Fig. 3. Y-chromosome microdeletion analysis, showing the deletion of all three AZF regions. Multiplex A (lines 2–5) and Multiplex B (lines 6–9): line 1 – pUC8 size marker, lines 2 and 6 – negative control, lines 3 and 7 – female DNA (internal control), lines 4 and 8 – DNA of normal male, lines 5 and 9 – DNA of AZFa, AZFb and AZFc deleted patient.

Conclusions: 1) our study advocates running Ychromosome microdeletion analyses for Latvian males only in cases of severe form of infertility; 2) Ychromosome haplogroup analysis showed statistically significant tendencies that some haplogroups are more common in ethnic male group, but other are more common in infertile males.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by European Social Fund (ESF) support for doctoral programme Nr.2009/0147/1DP/1.1.2.1.2./09/IPIA/VIAA/009 and by Latvian Council of Science programme Nr.08.41198.

REFERENCES

- Hellani, A., Al-Hassan, S., Iqbal, M.A., et al., Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia, *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.*, 2006, vol. 3, pp. 1–6.
- Tiepolo, L., Zuffardi, O., Localisation of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm, *Hum. Genet.*, 1976, vol. 34, pp. 119–124.
- Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., et al., Human Ychromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11, *Hum. Mol. Genet.*, 1996, vol. 5, pp. 933–943.
- Krausz, C., McElreavey, K., Y chromosome and male infertility, *Front Biosci.*, 1999, vol. 15, pp. 1–8.
- Simoni, M., Bakker, E., Krausz, C., et al., EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions, State of the art 2004, *Int. J. Androl.*, 2004, vol. 27, pp. 240–249.
- Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., et al., The human Ychromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions, *Science*, 1992, vol. 258, pp. 52–59.
- Vogt, P.H., Chandley, A.C., Hargreave, T.B., et al., Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene, *Hum. Genet.*, 1992, vol. 89, pp. 491–496.
- Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., et al., Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene, *Nat. Genet.*, 1995, vol. 10, pp. 383–393.
- Krausz, C., Rajpert-De Meyts, E., Larsen, L.F., et al., Double blind screening for microdeletions of Y chromosome genes in infertile and fertile/normospermic Danish men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, vol. 86, pp. 2638–2642.
- Jobling, M.A., Tyler-Smith, C., The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age, *Nat. Rev. Genet.*, 2003, vol. 4, pp. 598–612.
- Krausz, C., Quintana-Murci, L., Rajpert-De Meyts, E., et al., Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts, *Hum. Mol. Genet.*, 2001, vol. 10, pp. 1873–1877.
- Fernandes, S., Paracchini, S., Meyer, L.H., et al., A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from Men in Y haplogroup N, *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, vol. 74, pp. 180–187.
- Tyler-Smith, C., An evolutionary perspective on Y-chromosomal variation and male infertility, *Int. J. Androl.*, 2008, vol. 31, pp. 1–7.
- Zerjal, T., Dashnyam, B., Pandya, A., et al., Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis, *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, vol. 60, pp. 174–183.
- Reijo, R., Alagappan, R.K., Patrizio, P., et al., Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome, *Lancet*, 1996, vol. 347, pp. 1290–1293.
- Foote, S., Vollrath, D., Hilton, A., et al., The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region, *Science*, 1992, vol. 258, pp. 60–66.
- Nakahori, Y., Kuroki, Y., Komaki, R., et al., The Y chromosome region essential for spermatogenesis, *Horm. Res.*, 1996, vol. 46, pp. 20–23.
- Selva, J., Kanafani, S., Prigent, Y., et al., Incidence of AZF (Azoospermia Factor) deletions and familial forms of infertility among patients requiring intracytoplasmic spermatozoa injection (ICSI), *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1997, vol. 14, pp. 593–595.
- Maurer, B., Gromoll, J., Simoni, M., et al., Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Munster experience, *Andrologia*, 2001, vol. 33, pp. 27–33.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., et al., The male-specific region of the human Y chromosome

- is a mosaic of discrete sequence classes, *Nature*, 2003, vol. 423, pp. 825–837.
21. Krausz, C., Forti, G. Sperm cryopreservation in male infertility due to genetic disorders, *Cell and Tissue Banking*, 2006, vol. 7, pp. 105–112.
 22. Foresta, C., Moro, E., Ferlin, A., et al., Y chromosome microdeletion and alterations of spermatogenesis, *Endocr. Rev.*, 2001, vol. 22, pp. 226–239.
 23. Rosser, Z.H., Zerjal, T., Hurles, M.E., et al., Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language, *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, vol. 67, pp. 1526–1543.
 24. Balanovsky, O., Rootsi, S., Pshenichnov, A., et al., Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context, *Am. J. Hum. Genet.*, 2008, vol. 82, pp. 236–250.
 25. Mirabal, S., Regueiro, M., Cadenas, A.M., et al., Y-chromosome distribution within the geo-linguistic landscape of northwestern Russia, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2009, vol. 17, pp. 1260–1273.

Y chromosome – a tool in infertility studies of Latvian population

© 2011 A. Puzuka¹, N. Pronina², I. Grinfeldē², Ju. Erenpreiss³, V. Lejins⁴, Ja. Bars², L. Pliss⁵, I. Pelna⁵, V. Baumanis⁵, A. Krumina¹

¹ Riga Stradins University, Department of Medical Biology and Genetics, Riga LV-1007, Latvia; e-mail: agrita.puzuka@gmail.com

² Children University Hospital, Medical Genetics Clinic, Riga, Latvia.

³ Riga Stradins University, Laboratory of Andrology, Riga, Latvia

⁴ EGV Clinics, Riga, Latvia

⁵ Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia

Received April 14, 2010

Human Y chromosome is used as a tool in male infertility and population genetic studies. The aims of this research were to analyse the prevalence of Y chromosome microdeletions among infertile Latvian men, and to identify possible lineages of Y chromosome that may be at increased risk of developing infertility. A study encompassed 105 infertile men with different spermatogenic disturbances. Deletions on Y chromosome were detected in 5 out of 105 (~5%) cases analysed in this study. Three of them carried deletion in AZFc region and two individuals had AZFa + b + c deletion. Study of Y chromosome haplogroups showed that N3a1 and R1a1 lineages were found less frequently in the infertile male group compared to ethnic Latvian group, however K* cluster was predominantly found in infertile male Y chromosomes. Conclusions: 1) Our study advocates running Y chromosome microdeletion analyses only in cases of severe form of infertility; 2) Y chromosome haplogroup analysis showed statistically significant tendencies that some haplogroups are more common in ethnic male group, but others are more common in infertile males.

S
P

Rīga Stradiņš University

Collection of
Scientific Papers

2008

**Research articles in
medicine & pharmacy**

CFTR Gene and Male Infertility

Agrita Puzuka, Inga Prane, Juris Erēnpreiss¹, Astrida Krumina

Rīga Stradins University, Department of Medical Biology and Genetics, Latvia

¹ Rīga Stradins University, Laboratory of Andrology, Latvia

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common autosomal recessive diseases in Latvians, with a reported incidence of 1 in 3300 (Krumina et al., 2001). It is caused by defects in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which encodes a protein that functions as a chloride channel and is located in the apical membrane of epithelial cells in the respiratory tubes, pancreas, intestine, sweat glands and vas deferens. Defects in the CFTR gene cause abnormal chloride concentrations along the apical membrane of epithelial cells resulting in progressive lung disease, pancreatic dysfunction, and elevated sweat chloride and male infertility (Welsh et al., 1995). Infertility in CF males results from congenital bilateral absence or atrophy of the vas deferens (CBAVD). Semen analysis reveals azoospermia (Dodge et al., 1995). Mutation analysis of the CFTR gene in CBAVD cases has shown that a large proportion of these sterile men carry a mutation in at least one of their CFTR genes (Kanavakis et al., 1998).

The most common CFTR gene mutation, delF508 that is found in patients with cystic fibrosis is involved also in male infertility. In case of male infertility, mutation delF508 is associated with other CFTR gene mutation or polymorphism, and this leads to milder diseases form than cystic fibrosis, to male infertility respectively (Kiesewetter et al., 1993).

Besides, there is a positive correlation between the poly-T and poly-GT genotype in CFTR genes 8th intron and the proportion of normal full-length CFTR mRNA transcripts containing exon 9. The poly-T 5T allele and poly-GT 12 results in reduced levels of normal CFTR mRNA due to the deletion of exon 9, and are considered to be disease mutations in CBAVD (Chillon et al., 1995; Cuppens and Cassiman, 2004). Patients homozygous for the 5T allele have non-functional CFTR mRNA accounting for up to 90% of the total mRNA. The protein product of the CFTR transcript lacking exon 9, is devoid of cAMP-activated chloride conductance (Chu et al., 1993).

There are reports that CFTR gene is also involved in other forms of infertility than CBAVD (Cuppens and Cassiman et al., 2004). In one study 14 out of 80 (17.5%) men with a variety of diagnoses varying from oligozoospermia to oligoasthenoteratozoospermia carried a CFTR mutation (Van der Ven et al., 1996). However, in another report 75 patients with oligoasthenoteratozoospermia were studied; the frequency of CFTR mutations was not significantly different from the control population (Tuerlings et al., 1998).

The involvement of CFTR gene in other forms of male infertility than CBAVD is thus not clear and needs to be further investigated.

Aims

The aims of our research were to detect presence of CFTR gene mutation delF508 and polymorphism of poly-T and poly-GT variants in CFTR gene in infertile male DNA samples.

Material and methods

Objects for analysis were 80 individuals (DNA isolated from the blood cells) with different spermatogenic arrest and normal karyotype. As controls 60 healthy (fertile) males and 13 males affected with cystic fibrosis were included in this study.

CFTR gene mutation delF508 and poly-T and poly-GT polymorphisms were determined by appropriate PCR approach using designed primers (Cui et al., 1995; Chillon et al., 1995). PCR products were analysed in 6% polyacrilamide gel. Besides CFTR gene polymorphisms poly-T and poly-GT were detected by sequencing (Applied Biosystems) of corresponding PCR products.

Results and discussion

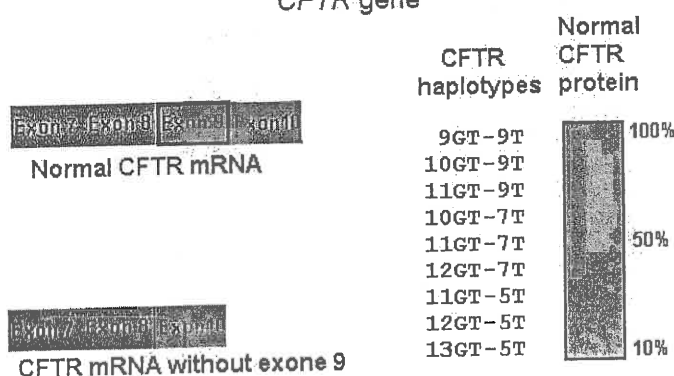
CF-related infertility in men is primarily due to obstruction or absence of the vas deferens (Welsh et al., 1995), although a defect in spermatogenesis may be a contributing factor, as decreased numbers of mature spermatids and the presence of many malformed late spermatids is also found in CF (Trezise et al., 1993).

Reduced levels of normal CFTR mRNA due to the deletion of exon 9 depend on the presence of the 5T allele sequence in intron 8. This non-functional CFTR mRNA accounts for up to 90% of the total mRNA when both CFTR alleles have the 5T allele (Chu et al., 1993). The 5T allele is the most common CFTR defect in patients with obstructive azoospermia due to CBAVD (Chillon et al., 1995).

However, not all male individuals that have CFTR gene mutation and T5 develop CBAVD. The T5 polymorphism was therefore classified as a disease mutation with partial penetrance. Cuppens H. and colleagues (2004) found that the partial penetrance could be explained by another genetic factor, namely the poly-GT locus. The higher the number of GT repeats, the less efficient exon 9 splicing will occur (Fig. 1). The T5 polymorphism can be either found in combination with an 11GT, 12GT or 13GT allele (respectively 11, 12 or 13 GT repeats). In CBAVD patients, the TG11-T5 haplotype is hardly found, while the TG12-T5 is most frequently found. The TG13-T5 is rarely found (Cuppens and Cassiman et al., 2004).

Figure 1. Poly-GT and poly-T polymorphism in intron 8 of the CFTR gene and their effects at the mRNA level.

9GT-9T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
10GT-9T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
11GT-9T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
10GT-7T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
11GT-7T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
12GT-7T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
11GT-5T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
12GT-5T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG
13GT-5T	GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTTTTTAAACAG



Legend to Figure 1

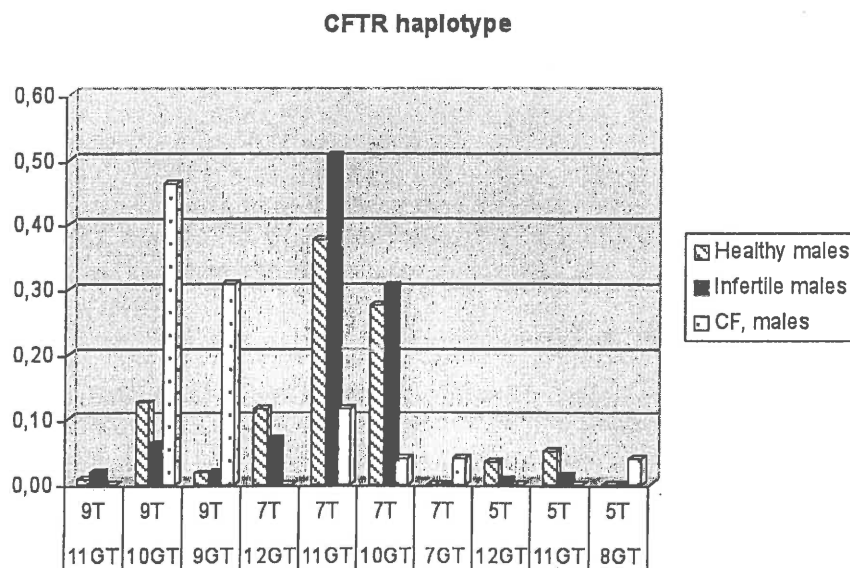
The region of the CFTR gene that includes exons 7 to 10 is shown at the top. During processing, the sequences not involved with protein synthesis (introns) are eliminated, and the remaining sequences (exons) are spliced to form mature mRNA (center left). The processing of CFTR is not completely efficient depending on the person's genotype (bottom left). When CFTR genes bear the 5T allele and 13 GT allele (the 13GT-5T haplotype), the proportion of normal CFTR mRNA is reduced, indicating that the shorter the sequence of thymines and the longer the sequence of GT dinucleotide in intron 8, the higher the proportion of CFTR mRNA in which exon 9 is lacking. (Modified shema from Chillon et al., 1995.)

Increased frequency of CF mutations in healthy men with reduced sperm quality and also in men with obstructive azoospermia with the presence of the vas deferens has also been reported (Van der Ven et al., 1996).

In our study CFTR gene mutation $\Delta F508$ was not found in analysed 80 infertile male DNA samples. Our data suggests that in Latvian infertile male population other CFTR gene mutations may be associated with infertility phenotype.

Analysis of poly-T and poly-GT polymorphisms in CFTR gene's 8th introne of infertile male chromosomes showed following results. In total, 8 different haplotypes of the poly-GT dinucleotide repeats and poly-T tract (11GT-9T, 10GT-9T, 9GT-9T, 12GT-7T, 11GT-7T, 10GT-7T, 12GT-5T, and 11GT-5T) were observed in 160 alleles from 80 infertile male individuals (Fig. 2). The proportion of CFTR alleles with each specific haplotype of the poly-GT dinucleotide repeats and poly-T tract varied between the infertile male CFTR genes and cystic fibrosis patient alleles. The most common haplotype among infertile male CFTR gene alleles was 11GT-7T. In contrast 10TG-9T was the most common haplotype among cystic fibrosis alleles. However, results obtained from healthy male CFTR gene alleles did not differ from infertile male CF alleles. Among also healthy male CFTR chromosomes most common haplotype variant was 11GT-7T. No CFTR alleles with 13GT-9T, 13GT-7T, 13GT-5T 12GT-9T, 10GT-5T, 9GT-7T, 9GT-5T were found in 160 infertile male CFTR alleles examined, probably due to rarity of CFTR alleles containing 13GT and 5T and strong linkage of 10GT and 9T. Besides, our data contrast to the literature data about poly-T 5T variant and poly-GT 13GT variant in infertile male chromosomes (Cuppens and Cassiman et al., 2004).

Figure 2. Schematic representation of poly-GT and poly-Y polymorphism in CFTR gene in infertile, healthy and cystic fibrosis males.



These results obtained from CFTR gene analysis are relevant in case of genetic counseling for infertile patients treated by in-vitro fertilization (IVF). An increasing number of couples with infertility choose to be treated by assisted-fertilization methods such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI); partners of CF-positive CBAVD or males with obstructive azoospermia should also be tested for the most common CF mutations in the population, so that prenatal diagnosis can be offered if both are carriers (Cuppens et al., 1998).

Conclusions

1. Analysis of mutation delF508 and polymorphisms poly-T and poly-GT does not show association with male infertility.
2. However, CFTR gene analysis is important in case of genetic counselling of male infertility.

Acknowledgements

This work was funded by ESF programme for doctoral programme and by LZP programme Nr. 00041198. We thank Dr. Ieva Grinfelde, Dr. Natalija Pronina, Dr. Voldemars Lejins, and Dr. Janis Bars for blood samples from infertile male patients.

References

1. Chillon M., Casals T., Mercier B. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens // *New England Journal of Medicine*, 1995; 332: 1475-1480.
2. Chu C. S., Trapnell B. C., Curristin S. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA // *Nature Genetics*, 1993; 3: 151-156.
3. Cuppens H. and Cassiman J.J. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility // *International Journal of Andrology*, 2004; 27: 251-256.
4. Cuppens H., Lin W., Jaspers M., et al. Polyvariant Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Genes // *Journal of Clinical Investigation*, 1998; 101: 487-496.
5. Dodge J. A. Male fertility in cystic fibrosis // *Lancet*, 1995; 346: 587-588.
6. Kanavakis E., Tzetzis M., Antoniadis T., et al. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligozoospermia // *Molecular Human Reproduction*, 1998; 4: 333-337.
7. Krumina A., Kroskina V., Krumina L., Krumina Z., Tamane I., Baumanis V. Cystic fibrosis mutation dF508 in the Latvian population // *RSU zinātniskie raksti*, 2001, 161.-166. lpp.
8. Kiesewetter S., Macek M. Jr, Davis C., et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background // *Nature Genetics*, 1993; 5: 274-278.
9. Trezise A., Linder C., Grieger D., et al. CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents // *Nature Genetics*, 1993; 3: 157-164.
10. Tuerlings J. H. A. M., Mol B., Kremer J. A. et al. Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection // *Fertility and Sterility*, 1998; 69: 899-903.
11. Van der Ven K., Messer L., van der Ven H., et al. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality // *Human Reproduction*, 1996; 11: 513-517.
12. Welsh M. J., Tsui L. C., Boat T. F., Beaudet A. Cystic fibrosis // *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. - 7th ed. - 1995; Pp. 3799-3876.

Національна академія наук України
Українська академія аграрних наук
Академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Збірник наукових праць

ТОМ 1

Присвячено:

120-літтю
від дня народження
академіка НАН України
М.І. Вавилова

40-літтю від часу заснування
Українського товариства генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

Київ
ЛОГОС
2007

PUZUKA A.¹, KRUMINA A.¹, PRONINA N.², LEJINS V.³, ERENPREISS J.⁴, BARS J.⁵, GRINFELDE I.², BAUMANIS V.⁶

¹ Riga Stradins University, Department of Medical Biology and Genetics, Latvia

² Childrens University Hospital, Medical Genetics Clinic, Latvia

³ EGV Clinics, Latvia

⁴ Riga Stradins University, Laboratory of Andrology, Latvia

⁵ Clinics of Medical Genetic, Department of Prenatal Diagnostics, Latvia

⁶ Latvian Biomedical Research Centre, Latvia

e-mail: Astrida.Krumina@rsu.lv

ANALYSIS OF Y-CHROMOSOMAL MICRODELETIONS AND POLYMORPHISM OF CFRT GENE IN INFERTILE MALES — A STUDY FROM LATVIAN POPULATION

Male factor infertility accounts for about half the cases of couple infertility. In more than 60% of cases the origin of reduced testicular function is unknown but they may have an unidentified genetic anomaly. It is known that a great part of observed chromosomal anomalies is related to the infertility. However, there are several cases when chromosomal defects can not be predicted cytogenetically, meanwhile, small changes on Y chromosome so called microdeletions have occurred. Microdeletions of the long arm of the human Y chromosome are associated with spermatogenic failure and have been used to define AZF region that are recurrently deleted in infertile males. AZF (azoospermia factor) regions are designates as AZFa, AZFb, and AZFc. AZFa locus is located on proximal Yq11 (Yq11.21), while AZFb and AZFc are located on distal Yq11 (Yq11.23). Deletions in the AZFa region are mainly associated with Sertoli cell only syndrome (SCOS), however, deletions in the AZFb region are mostly associated with spermatogenic arrest and the range of phenotypes from azoospermia to oligozoospermia is connected with absence of the AZFc region (Briton-Jones et al, 2000; Foresta et al, 2001; Krausz et al, 2003; Raicu et al, 2003).

CFTR gene that is located on human chromosome 7 also is related to male infertility. Classically mutations in CFTR gene are the cause of autosomal recessive disorder — cystic fibrosis. CFTR gene encodes for transmembranal protein, which is responsible for Cl ions transport in or off the cell. Mutations in CFTR gene are reason for development of defective Cl ions channel that leads to the alterations in secretion of the mucus, and defects in different organs. In males mutations in CFTR gene phenotypically looks like obstructive azoospermy, with results CBAVD — lack of *vas deferens*. The most common mutations in CFTR gene that correlate with male infertility are delF508, poly-T 7/7, T5/5 variants and R117H (Kanavakis et al, 1998; Philipson et al, 2000).

The aims of our research were: a — to introduce the molecular screening method of Y-chromosomal microdeletions in Latvia, b — to detect microdeletions in AZFa, AZFb, and AZFc gene families, c — to detect polymorphism of CFRT gene in infertile male, respectively, the presence of delF508 mutation.

Material and methods

Material of the research was DNA isolated from the blood cells. Objects for Y-chromosomal microdeletions and male infertility association study were 56 individuals with different spermatogenic arrest such as azoospermia, severe oligozoospermia, oligo-astheno-terato-zoospermia. All cases of azoospermia

or oligozoospermia resulting from endocrine or obstructive causes or with a constitutional cytogenetic abnormality were excluded from our study.

Microdeletions in AZF region were determined by two multiplex PCR amplifications using ten primer pairs. Two non-polymorphic STS loci were analyzed in each AZF region (in AZFa — sY84 and sY86, in AZFb — sY127 and sY134, in AZFc — sY254 and sY255).

It was sufficient enough in order to confirm the occurrence of microdeletions. Internal PCR control (ZFX/ZFY) was used as well as DNA sample from a fertile male and from a female, and blank control was run in parallel with each multiplex. PCR products were analysed in 6% polyacrilamide gel (Simoni et al, 2001; Simoni et al, 2004).

Mutations in CFTR gene, respectively, mutation in CFTR gene exon 10 — delF508 was determined by PCR reaction using designed primers. PCR products were analysed in 6% polyacrilamide gel (Cui et al, 1995).

Results and discussion

Y chromosome microdeletions have been in the increasing interests of clinicians and scientists after ICSI (intracytoplasmic sperm injection) was introduced as the main treatment option for severe male factor infertility. Earlier studies showed high incidence of Y chromosome microdeletions in idiopathic oligo- or azoospermia, which prompted many researchers to screen their populations. The frequency of deletions was reported to be in the range of 0.7–34.5 % with an average of 8.2%. The results shown in our study, 3 samples out of 56 analysed infertile male DNA or 5%, is in the lower part of this range. The wide range of the deletions in different publications was suggested to be due to the ethnic composition of populations under the study. In addition, the inclusion criteria could have also played an important role in this variable frequency of deletion.

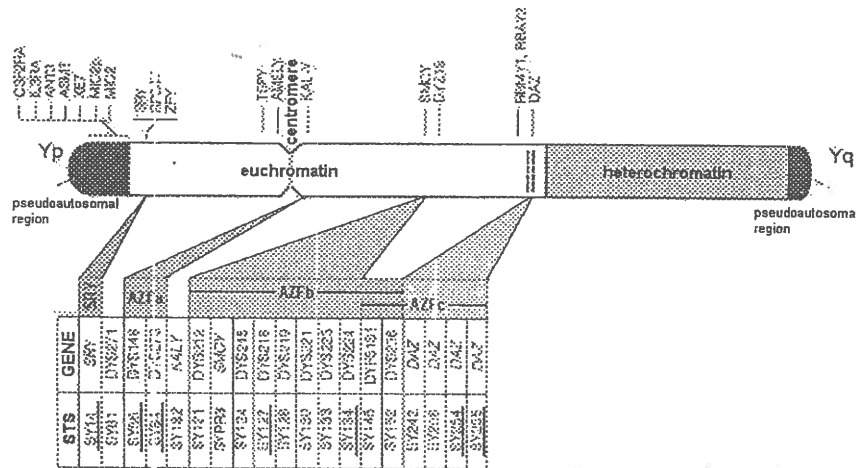


Fig. 1. Schematic representation of Y chromosome (modified drawing from Promega technical manual). Localisation of AZF regions — AZFa, AZFb and AZFc and their corresponding STS loci. Underlined STS were analysed by our research

All three patients with Y chromosome microdeletions have deletions in AZFc region. Respectively they were screened with two STS — SY254 and SY255. The two markers sY254 and sY255 are specific for the DAZ gene, which is present in four copies arranged in two complexes of two genes each in head-to-head orientation located in the palindromes P2 and P1 respectively in the reference MSY sequence. The absence of both markers indicates deletion of the entire AZFc region, which removes all copies of DAZ. Deletions of the AZFc region are the leading group of all Y chromosomal microdeletions.

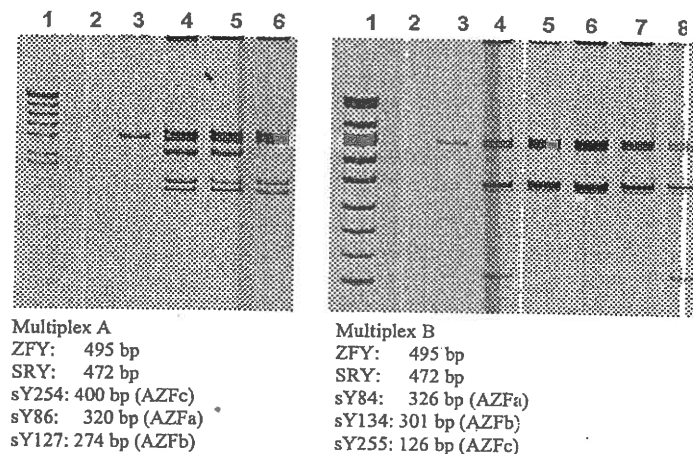


Fig. 2. Analysis of Y-chromosomal microdeletions in 6% polyacrilamide gel. Multiplex A: line 1 pUC8 size marker, line 2 negative control, lane 3 female DNA (internal control), lane 4 and 5 DNA of normal male, line 6 DNA of AZFc deleted patient. Multiplex B: line 1 pUC8 size marker, line 2 negative control, lane 3 female DNA (internal control), lane 4 and 8 DNA of normal male, line 5 — 7 DNA of AZFc deleted patients

The infertility phenotype of analysed patients with AZFc deletions was azoospermia. It also corresponds to the literature data, because most of publications mention that AZFc deletions can be found in men with azoospermia or severe oligozoospermia and, in rare cases, can even be transmitted naturally to the male. In men with azoospermia and AZFc deletion there is a fairly good chance of retrieving sperm from TESE and children can be conceived by ICSI. The sons of these patients will be AZFc-deleted. Therefore Y chromosomal microdeletion analysis before ICSI procedures is so important.

It has been described that of the 25% or so of infertile patients exhibiting azoospermia, 30% possess an obstructive process (obstructive azoospermia) whilst the remainder exhibit primary testicular malfunction (non-obstructive azoospermia). Of those diagnosed with obstructive azoospermia, 25% present CBAVD. The prevalence of this condition is 2% of all infertile males. CBAVD is a disorder characterized by bilateral regression of variable section of the epididymis, vas deferens and deficiency of seminal vesicles. Because of the remarkable similarities between these anatomical properties and that observed in

men with cystic fibrosis, it was proposed that these seemingly discrete disorders were in fact derived from the same genetic origin. The validity of hypothesis was supported when mutations in the CF transmembrane (CFTR) gene were detected in both patients with CF as well as infertile men with CBAVD. Therefore, the first step in our research was to detect most common mutation in CFTR gene — delF508. However, delF508 mutation was not found in analysed 56 DNA samples of infertile males. It is not so surprising because data of other scientific groups suggest that for the greatest part other polymorphisms in CFTR gene were associated with spermatogenic arrest, namely R117H and poly T variants.

Conclusions

The frequency of Y-chromosomal microdeletions is low in Latvian population, however, Y chromosome microdeletion screening is important not only to define the aetiology of spermatogenic failure but also because it gives precious information for more appropriate clinical management of both the infertile male and his future male child.

Out of 56 analysed DNA samples of infertile males mutation delF508 in CFTR gene was not observed. It suggests that during ICSI procedure future male offspring of those infertile males will not receive a recessive gene that could cause cystic fibrosis.

References

1. Briton-Jones C., Hainnes C.J. (2000). Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *Hong Kong Med. J.* Vol. 6, P. 184–189.
2. Foresta C., Moro E., Ferlin A. (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr. Rev.* Vol. 22, 226–239.
3. Krausz C., Forti G., McEleavey K. (2003). The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int. J. Androl.* Vol.26, P. 70–75.
4. Raicu F., Popa L., Apostol P., et al. (2003). Screening for microdeletions in human Y chromosome — AZF candidate genes and male infertility. *J. Cell. Mol. Med.* Vol. 7, P. 43–48.
5. Kanavakis E., Tzetis M., Antoniadis Th., et al. (1998). Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction.* Vol.4, P. 333–337.
6. Philipson G.T.M., Petrucco O.M., Matthews C.D. (2000). Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction.* Vol. 15, P. 431–435.
7. Simoni M., Bakker E., Eurlings M.C.M., et al. (2001). Laboratory guidelines for the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. *European molecular Genetics Quality Network.*
8. Simoni M., Bakker E., Krausz C. (2004). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. *State of the art 2004. International journal of andrology.* Vol. 27, P. 240–249.
9. Cui K., Haan E.A., Wang L.J., Matthews C.D. (1995). Optimal polymerase chain reaction amplification for preimplantation diagnosis in cystic fibrosis (delta F508). *BMJ.* Vol. 311, P. 536–540.

Summary

Out of 56 analyzed infertile male DNA samples we have found three cases (5%) with microdeletions that were observed only in AZFc region at SY254 and SY255 STS loci. The mentioned microdeletions were detected in DAZ gene, which is more frequently associated with azoospermia phenotype. Analysis of CFTR gene mutation delF508 showed that all 56 DNA samples of infertile males do not have mentioned mutation.

Проведен анализ микроделетий в Y-хромосоме у 56 бесплодных мужчин. Частота микроделетий 5% (3 из 56 исследуемых образцов) в Латвийской популяции. У всей выборке микроделетии локализованы в AZFc регионе, который соответствует фенотипу азооспермии. Анализ мутации delF508 в CFTR гене не показал ассоциацию с мужским бесплодием в исследуемой выборке.

**S
P**

Riga Stradiņi University

Collection of
Scientific Papers
2007

**Research articles in
medicine & pharmacy**

Molecular Analysis of Male Infertility in Latvia

*Agrita Puzuka, Natalija Pronina¹, Voldemars Lejins², Juris Erenpreiss³, Janis Bars⁴,
Ieva Grinfelde¹, Viesturs Baumanis⁵, Astrida Krumina*

Rīga Stradiņš University, Department of Medical Biology and Genetics, Latvia

¹ Children's University Hospital, Medical Genetics Clinic, Latvia

² EGV Clinics, Latvia

³ Rīga Stradiņš University, Laboratory of Andrology, Latvia

*⁴ Children's University Hospital, Clinics of Medical Genetic,
Department of Prenatal Diagnostics, Latvia*

⁵ Latvian Biomedical Research Centre, Latvia

Introduction

Approximately 10–15% of couples in Europe and in Latvia are affected by infertility. Male factor infertility accounts in about half of them and about 30–40% of male infertility is due to unknown origin. Spermatogenic failure has been associated with several non-genetic and genetic conditions (Dohle et al., 2002). Genetic background of male infertility is cytogenetic abnormalities and mutations in human autosomes and in sex chromosomes.

However, there are several cases when chromosomal defects can not be detected cytogenetically, meanwhile, small changes on Y chromosome so called microdeletions have occurred (Hellani et al., 2006). Microdeletions of the long arm of the human Y chromosome are associated with spermatogenic failure and have been used to define AZF region that are recurrently deleted in infertile males. AZF (azoospermia factor) regions are designated as AZFa, AZFb, and AZFc. AZFa locus is located on proximal Yq11 (Yq11.21), while AZFb and AZFc are located on distal Yq11 (Yq11.23) (Fig. 1). Deletions in the AZFa region are mainly associated with Sertoli cell only syndrome (SCOS), however, deletions in the AZFb region are mostly associated with spermatogenic arrest, and the range of phenotypes from azoospermia to oligozoospermia is connected with absence of the AZFc region (Briton-Jones et al., 2000; Foresta et al., 2001; Krausz et al., 2003; Raicu et al., 2003).

At the autosomal gene level reproductive failure often has been linked with CFTR gene. CFTR gene is located on chromosome 7 and encodes for CFTR transmembrane protein, which is responsible for chlorine (Cl) ions transport. Classically mutations in CFTR gene cause cystic fibrosis (CF). Mutations in CFTR gene are reason for development of defective chlorine ions channel that leads to the alterations in secretion of the mucus, and defects in different organs. Infertility in CF males results from congenital bilateral absence or atrophy of the vas deferens (CBAVD). Some male patients present with isolated CBAVD with none of the clinical symptoms characteristic of CF. Mutation analysis of the CFTR gene has shown that a large proportion of these sterile man carry mutations in at least one of these CFTR gene (Kanavakis et al., 1998; Philipson et al., 2000). The most common mutations in CFTR gene that correlate with male infertility are delF508, poly-T 7/7, T5/5 variants and R117H (Huynh et al., 2002; Pont-Kingdon et al., 2004).

The aims

The aims of our research were: a – to introduce the molecular screening method of Y-chromosomal microdeletions in Latvia, b – to detect microdeletions in AZFa, AZFb, and AZFc gene families, c – to detect the presence of delF508 mutation in CFTR gene in infertile males.

Material and methods

Material of the research was DNA isolated from the blood cells. Objects for Y-chromosomal microdeletions and male infertility association study were 66 individuals with different spermatogenic arrest such as azoospermia,

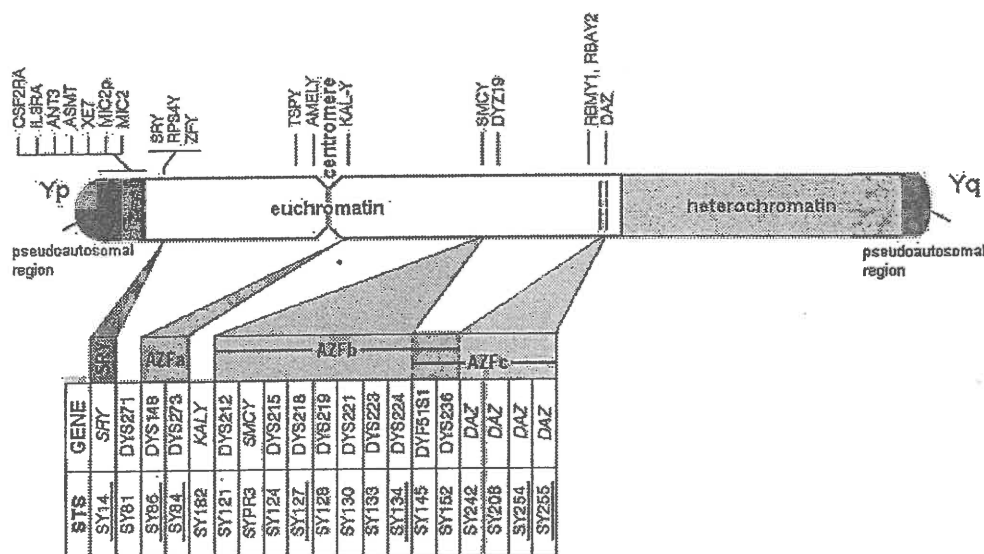
severe oligozoospermia, oligo-astheno-terato-zoospermia, and 16 males who are affected with cystic fibrosis. All cases of spermatogenic failure resulting from endocrine or other non-genetic causes or with a cytogenetic abnormality were excluded from our study. Objects for mutation delF508 analysis in CFTR gene were 58 individuals with different spermatogenic failure and known absence or presence of Y-chromosomal microdeletions.

Microdeletions in AZF region were determined by two multiplex PCR (polymerase chain reaction) amplifications using ten primer pairs. Two non-polymorphic STS loci (Fig. 1) were analysed in each AZF region (in AZFa – sY84 and sY86, in AZFb – sY127 and sY134, in AZFc – sY254 and sY255).

Internal PCR control (ZFX/ZFY) was used as well as DNA sample from a fertile male and from a female, and blank control was run in parallel with each multiplex. PCR products were analysed in 6% polyacrilamide gel (Simoni et al., 2001; Simoni et al., 2004).

Mutations in CFTR gene, respectively, mutation in CFTR gene exon 10 – delF508 was determined by PCR reaction using designed primers. PCR products were analysed in 6% polyacrilamide gel (Cui et al., 1995).

Figure 1. Schematic representation of Y chromosome (modified drawing from Promega technical manual). Localisation of AZF regions – AZFa, AZFb and AZFc and their corresponding STS loci. Underlined STS were analysed in our research



Results and discussion

Analysis of 66 DNA samples of individuals with different spermatogenic arrest showed four cases (6%) with microdeletions. In three cases microdeletions were located in AZFc region. However one sample showed deletions of all three AZF regions.

The frequency of Y-chromosomal microdeletions was reported to be in the range of 0.7–34.5% with an average of 8.2% (Simoni et al., 2004). The results shown in our study, four samples out of 66 analysed infertile male DNA or 6%, is in the lower part of this range. The wide range of the deletions in different publications was suggested to be due to the various inclusion criteria under the study and in addition the ethnic composition of populations could have also played an important role in this variable frequency of deletion.

Three of four patients with Y chromosome microdeletions have deletions in AZFc region (Fig. 2), and one has deletion of all three AZF regions (Fig. 3). In the case of AZFc microdeletions, two STS sites (sY254 and sY255) were deleted. Those STS markers are specific for the DAZ gene, which is present in four copies arranged in two complexes of two genes each in head-to-head orientation located in the palindromes P1 and P2 respectively in the reference MSY (male specific region of the Y chromosome) sequence. Deletions of the AZFc region are the leading group of all Y chromosomal microdeletions. Besides, one patient has had a unique combination of deletions in all three AZF regions. However, deletions of six STS sites – two STS in each AZF region, are really found among different Y-chromosomal genotypes.

Figure 2. Y-chromosome microdeletion analysis, showing the deletion of AZFc region

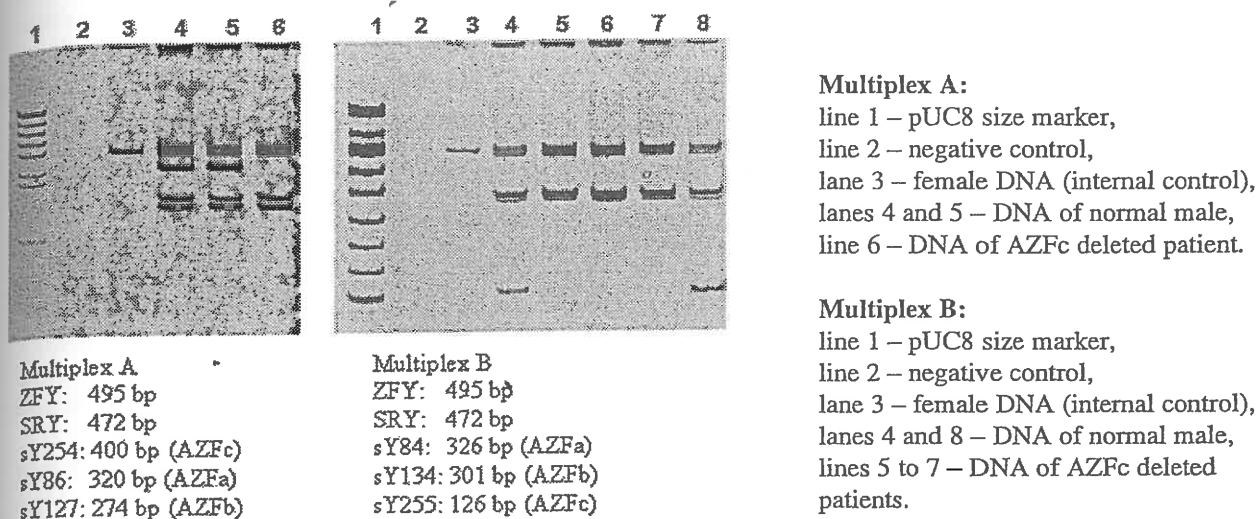
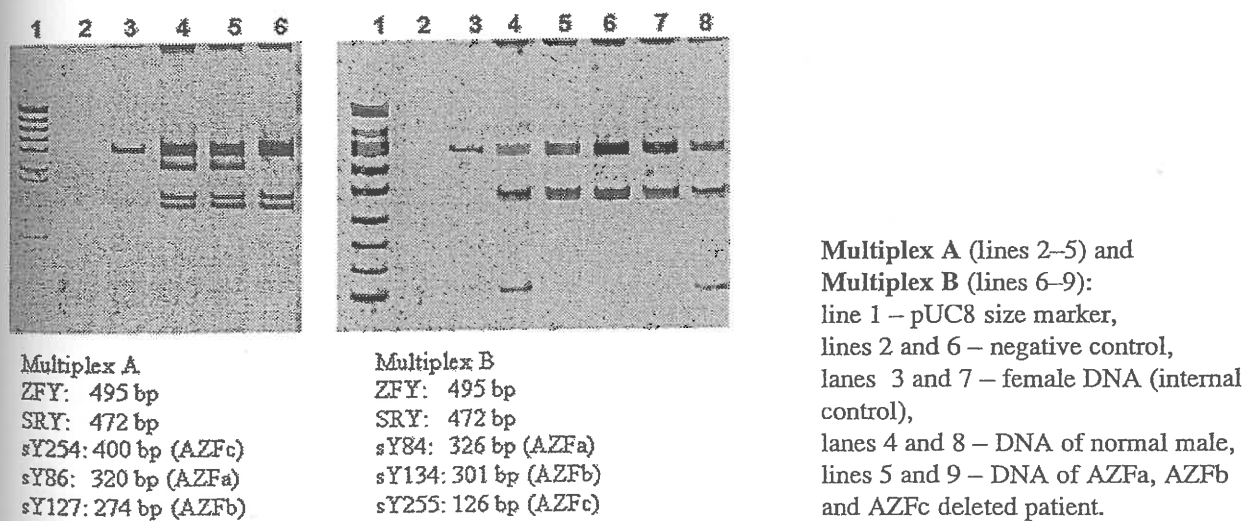


Figure 3. Y-chromosome microdeletion analysis, showing the deletion of all three AZF regions



The infertility phenotype of analysed patients was azoospermia. It also corresponds to the literature data, because most of publications mention that AZFc deletions can be found in men with azoospermia or severe oligozoospermia and, in rare cases, can even be transmitted naturally to the male. In men with azoospermia and AZFc deletion there is a fairly good chance of retrieving sperm from TESE (testicular extraction of sperm) and children can be conceived by ICSI (intracytoplasmic sperm injection). The sons of these patients will be AZFc-deleted. Therefore Y chromosomal microdeletion analysis before ICSI procedures is so important.

Of 16 males affected with cystic fibrosis microdeletions on their Y-chromosomes were not found (data not shown). It means that these results confirm that Y-chromosomal microdeletions are not infertility cause in these 16 patients.

It has been described that of the 25% or so of infertile patients exhibiting azoospermia, 30% possess an obstructive process (obstructive azoospermia) whilst the remainder exhibit primary testicular malfunction (non-obstructive azoospermia). Of those diagnosed with obstructive azoospermia, 25% present CBAVD. The prevalence of this condition is 2% of all infertile males. CBAVD is a disorder characterized by bilateral regression of variable section of the

epididymis, vas deferens and deficiency of seminal vesicles. Because of the remarkable similarities between these anatomical properties and that observed in men with cystic fibrosis, it was proposed that these seemingly discrete disorders were in fact derived from the same genetic origin. The validity of hypothesis was supported when mutations in the CF transmembrane (CFTR) gene were detected in both patients with CF as well as infertile men with CBAVD. Therefore, the first step in our research was to detect most common mutation in CFTR gene – delF508. However, delF508 mutation was not found in analysed 58 DNA samples of infertile males (data not shown). It is not so surprising because data of other scientific groups suggest that for the greatest part other polymorphisms in CFTR gene were associated with spermatogenic arrest, namely R117H and poly T variants.

Conclusions

The frequency of Y-chromosomal microdeletions is low (6%) in Latvian infertile male population, however, Y chromosome microdeletion screening is important not only to define the aetiology of spermatogenic failure but also because it gives precious information for more appropriate clinical management of both the infertile male and his future male child.

Of 58 analysed DNA samples of infertile males mutation delF508 in CFTR gene was not observed. It suggests that during ICSI procedure future male offspring of those infertile males will not receive a recessive gene that could cause cystic fibrosis.

Acknowledgements

This work was funded by ESF programme for doctoral programme and by LZP programme nr. 00041198.

We thank dr. Ieva Grinfelde, dr. Natalija Pronina, dr. Voldemars Lejins, dr. Juris Erenpreiss, and dr. Janis Bars for blood samples from infertile male patients.

References

1. Briton-Jones C., Hainnes C.J. Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility // *Hong Kong Med. J.*, 2000; 6: 184-189.
2. Cui K., Haan E.A., Wang L.J., Matthews C.D. Optimal polymerase chain reaction amplification for preimplantation diagnosis in cystic fibrosis (delta F508) // *BMJ*, 1995; 311: 536-540.
3. Dohle G.R., Halley d.J.J., van Hemel J.O. et al. Genetic risk factors in infertile man with severe oligozoospermia or azoospermia // *Human Reproduction*, 2002; 17: 13-16.
4. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis // *Endocr. Rev.*, 2001; 22: 226-239.
5. Helani A., Al-Hassan S., Iqbal M.A., Coscun S. Y chromosoma microdeletions in infertile man with idiopathic oligo- or azoospermia // *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction*, 2006; 3: 1-6.
6. Huynh T., Mollard R., Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility // *Human Reproduction*, 2002; 8: 183-198.
7. Kanavakis E., Tzetzis M., Antoniadis Th. et al. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligozoospermia // *Molecular Human Reproduction*, 1998; 4: 333-337.
8. Krausz C., Forti G., McEavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility // *Int. J. Androl.*, 2003; 26: 70-75.
9. Philipson G.T.M., Petrucco O.M., Matthews C.D. Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection // *Human Reproduction*, 2000; 15: 431-435.
10. Pont-Kingdon G., Jama N., Miller C., Millson A., Lyon E. Long-Range (117.7 kb) Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Method for direct Haplotyping of R117H and IVS-8 Mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane regulator Gene // *Journal of Molecular Diagnostics*, 2004; 3: 264-270.
11. Raicu F., Popa L., Apostol P., et al. Screening for microdeletions in human Y-chromosome – AZF candidate genes and male infertility // *J. Cell. Mol. Med.*, 2003; 7: 43-48.
12. Simoni M., Bakker E., Eurlings M.C.M., et al. Laboratory guidelines for the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions // *European Molecular Genetics Quality Network*, 2001; 1: 1-7.
13. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004 // *International Journal of Andrology*, 2004; 27: 240-249.



PROCEEDINGS OF THE LATVIAN ACADEMY OF SCIENCES

VOLUME 59 2005 NUMBER 3/4

SECTION B: NATURAL, EXACT, AND APPLIED SCIENCES

THIS ISSUE:

REVIEWS

Human Y chromosome and its role in human pathology and population phylogenetic studies
Ilga Timša, Agrita Pūzuka, Liāna Pliss, Māris Lazdiņš, Juris Baumanis, and Astrīda Krūmiņa

93

Human parvovirus B19 and the spectrum of diseases caused by this virus
Ilga Bratslavska and Ingrida Rumba

108

ORIGINAL PAPERS

Outcome of recombinant tissue-type plasminogen activator (alteplase) use in treatment of different subtypes of ischemic stroke

Gertrūde Eniņa, Evija Miglāne, Biruta Tilgale, and Evita Šlosberga

123

Correlation of cerebral infarction recurrence, risk factors, subtypes and outcome with periventricular leukoaraiosis and silent lacunar infarctions

Evija Miglāne, Gertrūde Eniņa, Biruta Tilgale, Olga Krišbajeva, Juris Novožilovs, and Ženija Kovaldina

130

Novel perfusion bioreactor with longitudinal stretch of tissue-engineered vascular graft

Vladimirs Kasjanovs, Iveta Ozolanta, and Vladimir Mironov

138

Long-term changes of acidification indicators in atmospheric precipitation and surface waters of Latvia
Māris Kļaviņš and Valērijs Rodinovs

145

Pathotypes of barley powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) in the Latgale region of Latvia in 1996–2000

Inese Kokina and Isaak Rashal

151

Plant responses to imbalance of copper in substrate
Anita Osvalde and Gunārs Paegle

156

SCIENCE LIFE

Activities of the Latvian Academy of Sciences (LAS) in 2005 (January–February)

163

LATVIJAS ZINĀTŅU AKADĒMIJAS VĒSTIS • B DAĻA: DABASZINĀTNES

ISSN 1407-009X

THE LATVIAN ACADEMY OF SCIENCES

Review

HUMAN Y CHROMOSOME AND ITS ROLE IN HUMAN PATHOLOGY AND POPULATION PHYLOGENETIC STUDIES

Līga Timša, Agrita Puzuka*, Liāna Pliss, Māris Lazdiņš**, Viesturs Baumanis#, and Astrīda Krūmiņa*

Biomedical Research and Study Centre, University of Latvia, Rātsupītes ielā 1, Rīgā, LV-1067, LATVIA

* Rīga Stradiņš University, Dzirciema ielā 16, Rīgā, LV-1007, LATVIA

** Faculty of Biology, University of Latvia, Kronvalda bulv. 4, Rīgā, LV-1586, LATVIA

Corresponding author, E-mail: viesturs@biomed.lu.lv

Contributed by Viesturs Baumanis

The genetic variation between different populations allows to understand human history and geographical structure at a continental level. The paternally inherited Y chromosome is particularly sensitive to the influences of genetic drift and founder effect. Therefore, the Y chromosome loci are ideal for assessing the origins of contemporary population diversity, and migration patterns. In the current article the global patterns of DNA sequence variation on the Y chromosome are presented, as well as data on the role of Y chromosome microdeletions in human reproductive pathology. Understanding of the genetic heterogeneity of the Y chromosome within the Latvian population requires more detailed studies of Y chromosomal binary polymorphisms, short tandem repeats, as well as analysis of Y chromosomal microdeletions in azoospermia factor region.

Key words: Y chromosome, phylogenetic studies, male infertility.

INTRODUCTION

The Y chromosome is one of the smallest chromosomes in the human genome and represents around 3% of a haploid genome. It consists of a male-specific region (MSY), which makes up 95% of its length and is flanked by pseudoautosomal regions, does not undergo meiotic recombination, and is transmitted from the father to the son unchanged unless mutation events take place.

The mode of inheritance and particular features of the Y chromosome make its DNA sequence variation an invaluable tool for the study of modern human evolution and permits the reconstruction of an unequivocal haplotype phylogeny, which can be related to the geographical distribution of the Y haplogroups.

The attempt to discuss observed phylogeographic patterns of the Y chromosomal variation in the context of global population diversifications, and particularly to trace lineages in Europe and the Baltic States, including Latvia, is one of the goals of this review. Another one is to depict medical aspects of the Y chromosome.

Generally, this review designates trends in future important annual phylogenetical, evolutionary, and functional studies of the Y chromosome in the Latvian population.

ORGANISATION OF THE HUMAN Y CHROMOSOME

The existence of a male specific chromosome in humans was first confirmed by Painter in 1921 (see Skaletsky *et al.*, 2003). In 1959, Jacobs' and Ford's studies revealed that the Y chromosome carries an essential gene for sex determination in human males called the sex determining region of Y (SRY) (for a review, see Skaletsky *et al.*, 2003).

The Y chromosome is 63 Mb in length. Nowadays, it is known that besides MSY there are two short regions (accounting of 5% of the Y) on both ends of the Y chromosome called pseudoautosomal regions: PAR1, 2.6 Mb, and PAR2, 0.32 Mb (Figure 1), which are still identical to the corresponding regions of the X chromosome. The MSY is a mosaic of 23 Mb of euchromatin and a variable amount of heterochromatin (roughly, 37 Mb), which is composed of highly repetitive DNA and often dismissed as non-functional. 8 Mb of euchromatin are located on the short arm (Yp) and roughly 15 Mb—on the long arm (Yq). There remain two unknown gaps in the MSY (each of them 50 kb long). The MSY is shaped from three classes of euchromatic sequences: X-transposed, X-degenerated, and ampliconic (Skaletsky *et al.*, 2003). All these classes together consist of 156 known transcription units including 78 protein-coding genes of 27 different proteins, but the remaining 78 transcription units are probably non-coding.

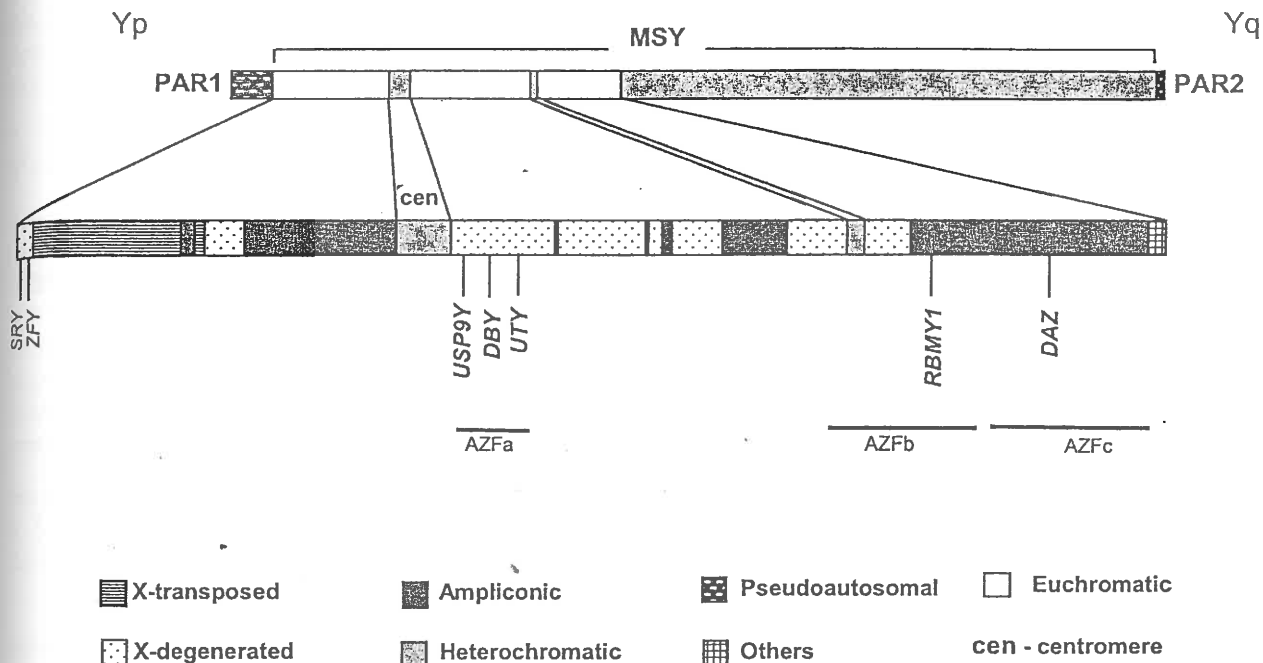


Fig. 1. Organisation of the Y chromosome. A short arm of the Y is labelled as Yp and the long arm as Yq. Roughly 95% of the Y chromosome is "a male specific region of the Y" (the MSY) and this region consists of three classes of euchromatic sequences: X-transposed, X-degenerated, and ampliconic. The MSY region is enveloped by two pseudoautosomal regions: PAR1 and PAR2. Genes are marked in italics. All ampliconic genes are expressed exclusively only in testes. X-transposed and X-degenerated genes occur in one copy in the Y, but all ampliconic genes are found in several copies (2–35). Three AZF regions represent the segments of the Y, in which occurring deletions may cause infertility. All main candidate genes of spermatogenesis are labelled in bold (Foresta *et al.*, 2001; Jobling and Tyler-Smith, 2003; Skaletsky *et al.*, 2003).

protein-coding genes are divided into two large functional classes: genes expressed throughout the body and genes expressed predominantly or exclusively in testes (Lahn and Page, 1997).

The **X-transposed** sequences comprise 3.4 Mb of DNA and are placed in two blocks on the short arm of the Y (Yp). Sequences of this class show 99% identity to the chromosome 21 region (Skaletsky *et al.*, 2003). It seems that a massive single X-to-Y transposition occurred about 3–4 million years ago (Mumm *et al.*, 1997). There are only two protein-coding genes detected in this class (expressed in testes and in brain). The X-transposed sequences show the lowest density of genes among all three MSY euchromatic classes, but have the highest frequency of interspersed repeat elements. The non-coding transcription units have not been detected in the X-transposed sequences.

The **X-degenerated** sequences are distributed on both arms of the Y chromosome in eight blocks forming 8.6 Mb of DNA. They are supposed to be the remnants of ancient autosomes from which X and Y chromosomes evolved. The sequences of this class are composed of single-copy gene or pseudogene homologues of different X-linked genes. The X-degenerated sequences encode 16 of the MSY's 27 distinct proteins and all 12 ubiquitously expressed MSY genes are found in this region. Conversely, only one gene of all 11 predominantly in testes expressed MSY genes (the sex-determining *SRY* gene) and four non-coding transcription units are detected in the X-degenerated segments.

The **ampliconic** class contains approximately 30% of the MSY euchromatin scattered in seven blocks on both arms of the Y. Altogether nine distinct protein-coding gene families (about 60 transcription units) are detected there, with copy numbers ranging from two to 35, and predominantly expressed in testes. Ampliconic sequences include 74 other transcription units known as non-protein coding ones.

The structural features of the amplicons are eight large palindromes located on the Yq and five sets of widely spaced inverted repeats on both arms. Palindromes are long with arms ranging from 9 kb to 1.45 Mb in length, collectively encompassing 5.7 Mb. The length of the inverted repeats is in range of 62 to 298 kb (Skaletsky *et al.*, 2003).

Gene conversion, the non-reciprocal recombination of sequence information, often takes place between duplicated sequences of ampliconic palindromes (Rozen *et al.*, 2003). This process provides a mechanism for conserving gene functions across evolutionary time in the absence of crossing over (reciprocal recombination).

The **heterochromatic** sequences of the Y chromosome encompass three separated blocks; all of them consist of massively amplified tandem repeats of low sequence complexity. The first block (roughly 1 Mb) is placed in the centromeric region. A much larger block (40 Mb) encompasses the greatest part of the Yq. The shortest heterochromatic block spans only 400 kb, including 3000 tandem repeats of 125 bp, and interrupts the euchromatic sequence of

the Yq. There is no evidence of the existence of transcription units in the heterochromatic part of the MSY (Skaletsky *et al.*, 2003).

Y chromosome-specific short tandem repeats (Y-STRs)

A number of polymorphic STR loci on the Y chromosome have been discovered recently. In 1997, the European forensic community settled on an informative core set of nine Y-STR markers or "minimal haplotype" for appropriate needs. These loci are highly variable and the most used also in population genetics. This core minimal haplotype can be extended by other hypervariable Y-STR loci to further increase the power of discrimination*.

No significant differences were found between the average Y-STRs and autosomal STRs mutation rates (Kayser and Sajantila, 2001).*

Special features of the Y chromosome that make it suitable in population studies

The Y chromosome has several specific features that enable its use as a tool for population and forensic studies:

(1) the human Y chromosome is constitutively haploid (excluding PARs) and therefore the largest part of the Y (the MSY region) does not undergo reciprocal recombination during meiosis;

(2) it can be only paternally inherited;

(3) different polymorphic markers are on the Y chromosome. The Y chromosome's binary (biallelic) polymorphisms are characterised by lower mutation rates than STRs ($\approx 10^{-8}$ versus $\approx 10^{-3}$ mutations per generation); therefore, a unique and deep-rooting phylogeny can be constructed based on both marker analyses (Kayser and Sajantila, 2001);

(4) mutations are the only force that acts on Y haplogroups and haplotypes, and so the Y chromosome diversity reflects simpler records on its history than other chromosomes;

(5) the effective population size of the Y chromosome is 1/4 of that of any autosome, 1/3 of that of the X chromosome and is similar to that of the haploid mitochondrial DNA;

(6) mutation processes act on all chromosomes, but the Y chromosome has lower sequence diversity and it is more susceptible to genetic drift;

(7) patrilocality, in which children are born closer to their father's birthplace than their mother's, is more common than matrilocality. This has often led to greater geographic clustering of the Y chromosome's variant at a local scale and may contribute to larger scale patterns as well (for a review, see Jobling and Tyler-Smith, 2003).

* See <http://www.ystr.org>

MEDICAL ASPECTS OF THE Y CHROMOSOME

The long arm of the Y chromosome contains genes and gene families involved in spermatogenesis and are crucial for germ cell development and differentiation (Dada *et al.*, 2004). Despite the fact that deletions in the long arm of the Y chromosome associated with spermatogenic failure were discovered in 1976 (Tiepolo and Zuffardi, 1976), only recently this part of the Y chromosome was described at the molecular level (Raicu *et al.*, 2003). Vogt *et al.* (1996) observed that Y chromosome microdeletions follow a certain deletion pattern, with three recurrently deleted non-overlapping subregions in proximal, middle, and distal parts of the long arm of the Y chromosome (Yq11) (Krausz *et al.*, 2003). This region is referred to as the AZF (azoospermia factor), because the most severe phenotype of male infertility is associated with its deletion. Three non-overlapping loci of the AZF region are designated as AZFa, AZFb, and AZFc. AZFa locus is located on the proximal Yq11 (Yq11.21), while AZFb and AZFc are located on the distal Yq11 (Yq11.23). Deletion of these loci results in spermatogenic arrest and is associated with azoospermia (the complete absence of spermatozoa), oligozoospermia (concentration of the spermatozoa is less than normal—5–20 millions per ml), and also with variations of the testis histological profile: Sertoli cell only syndrome (SCOS) (the absence of germ cells in each (type I) or in most (type II) testis tubules), hypospermatogenesis, and sperm cell maturation arrest (Dada *et al.*, 2004). Deletions in the AZFa region are mainly associated with SCOS, however deletions in the AZFb region are mainly associated with spermatogenic arrest, and the range of phenotypes from azoospermia to oligozoospermia is associated with the absence of the AZFc region (Raicu *et al.*, 2003).

Genes that are located in these three AZF regions encode RNA binding proteins and may be involved in the regulation of gene expression, RNA metabolism, RNA packing and transport to cytoplasm, and RNA splicing (Dada *et al.*, 2004).

Several genes located in AZF regions are expressed in the testes and could therefore be viewed as "AZF candidate genes." However, based on studies of infertile patients, only a few genes can actually be considered responsible for the AZF phenotype.

RBMY (RNA-binding motif, Y chromosome) was the first among the AZF candidate genes to be identified (Ma *et al.*, 1993). Subsequently, it was shown that, in fact, there is a group of 20–50 genes and pseudogenes spread over both arms of the Y chromosome, including a cluster within the AZFb region; therefore, it was named the "RBMY gene family." Such copies belong to at least six subfamilies, but RBMY-1 is the only actively transcribed gene. The actual function of RBMY in male germ cell development is still unclear. RBMY is considered to be the major AZFb candidate gene, because it is testis-specific, it is absent in a fraction of infertile patients, and has homology with the mouse *Rbm*

gene, the deletion of which causes male sterility (Briton-Jones and Haines, 2000; Foresta *et al.*, 2001).

Two years later, the next AZF-candidate gene was identified from the AZFc region (Reijo *et al.*, 1995). This gene was named *DAZ* (deleted in azoospermia) and was originally thought to be single copy, whereas it is now clear that it is a member of a multigene family with more than one copy on the Y chromosome, clustered in the AZFc region. Therefore, *DAZ* was renamed the "DAZ gene family." *DAZ* like *RBMY* is transcribed and translated into proteins only in male germ cells. *DAZ* is found on the Y chromosome only in humans, in all other mammals it is represented as an autosomally located, single copy gene. Although *DAZ* is not the only gene present in the distal Yq part, the high prevalence of deletions in this gene in infertile men makes it the major AZFc candidate. This possibility is further strengthened by the high homology of *DAZ* with a *Drosophila* male infertility gene, *boule*, the mutation of which causes spermatogenic arrest (Burgoyne, 1996; Eberhart *et al.*, 1996). Furthermore, more recent proof of the spermatogenic role of the *DAZ* gene product arises from the observation that a human *DAZ* transgene is capable of partially rescuing the sterile phenotype of a mouse knockout for the homologous gene *Dazl* (Briton-Jones and Haines, 2000). However, besides *DAZ*, several other genes have been mapped in the AZFc region: *CDY1* (chromodomain Y 1), *BPY2* (basic protein Y 2), *PRY* (PTA-BL related Y), and *TTY2* (testis transcript Y 2). The function of these genes is unknown, but they share similar characteristics: they are in multiple copies on the Y chromosome; they are expressed in the testes only, and they are Y specific (Foresta *et al.*, 2001).

The structure of *AZF α* and its gene content have only recently been described, and analyses of this region in infertile males suggested that three genes might be considered *AZF α* -candidates (Lahn and Page, 1997; Brown *et al.*, 1998). The first gene identified in *AZF α* and subsequently shown to be absent in infertile patients was *DFFRY* (*Drosophila* fat facets related, Y chromosome), recently renamed *USP9Y* (ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome). This gene differs substantially from the other AZF candidate genes: it does not encode for an RNA-binding protein, but seems to function as a C-terminal ubiquitin hydrolase; it is a single-copy gene, it has an X-homologous gene that escapes X-inactivation, and it is ubiquitously expressed in a wide range of tissues, rather than being testis specific. *USP9Y* occupies less than half of the *AZF α* space, while the majority of infertile males carrying *AZF α* deletions show the absence of this entire region. These findings suggested that other gene(s) in this region might be responsible, either singly or in combination with *USP9Y*, for the spermatogenic disruption observed in *AZF α* -deleted patients (Foresta *et al.*, 2000). Deletion of this locus was found to be associated with the SCOS type I and with small testes volumes (Vogt *et al.*, 1996). In fact, comparative mapping studies showed that two further X-Y homologous genes are both located within the *AZF α* region, suggesting a possible role in spermatogenesis: *DBY* (dead box polypeptide, Y chromosome)

and *UTY* (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome). All genes located in this region appear to be ubiquitously expressed, therefore, differing from their mouse homologues. Initial studies on patients with deletions clearly limited to *AZF α* suggested that deficiency of *USP9Y* cause male infertility and that the additional loss of *DBY* might make the phenotype more severe. An extensive deletion and expression analysis of a deleted region in highly selected infertile patients allowed to assemble a refined map of *AZF α* and to demonstrate that *DBY* may represent the major spermatogenesis gene of this region. The role for this gene in human spermatogenesis is further supported by the significant homology of *DBY* with the mouse protein PL10, which is testis-specific and expressed only in germ cells (Foresta *et al.*, 2001).

The relatively high frequency of *de novo* Y chromosome deletions may be related to the high frequency of repetitive elements clustered along the length of the chromosome, and deletions may occur through aberrant recombination events or by slippage during DNA replication. There may exist also a particular Y chromosome haplotype that promotes deletions of the AZF regions. Thus, some individuals may be more susceptible to *de novo* deletions than others. Advanced paternal age also might promote the loss of a Y chromosome sequence (Raicu *et al.*, 2003).

Presently, data from more than 3,000 infertile men and 1,300 proven fathers have been published. Summarising these published results, microdeletions were found in about 7.3% of the infertile men, but with a range of 1% (van der Ven *et al.*, 1997) to 55.5% (Foresta *et al.*, 1998) in the individual studies. Wide variations in deletion frequency reported in the previously published work could be caused mainly by different patient selection criteria and partly by methodological aspects (Raicu *et al.*, 2003). The vast majority of the deletions were found in azoospermic men (66%), less in men with sperm cell concentration 5 million per ml (28%) and sporadically in men with sperm cell concentration 5 million per ml (6%) (Foresta *et al.*, 1998).

Y chromosome microdeletions cannot be predicted cytogenetically, on the basis of clinical findings, or by semen analysis. Thus, polymerase chain reaction (PCR) based AZF screening for Yq microdeletions in infertile men is necessary. Today, with the advent of assisted reproductive technology diagnosing the presence of these deletions has become very important (Dada *et al.*, 2004).

The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique is rapidly becoming the accepted procedure to human-assisted reproduction in the case of male infertility. ICSI has revolutionised the treatment of males with spermatogenic defects, allowing men, who previously would have been unable to have children, to achieve biological paternity. When this technique is applied, AZF-deleted spermatozoa are capable of fertilising oocytes and eliciting full developmental potential of new embryo. Vertical transmission of the AZF region defect to male offspring by ICSI has been reported as Y status, because the infertility problem is transmitted to sons

and leads to familiar infertility (Raicu *et al.*, 2003). Therefore, patients should be offered Y chromosome microdeletion screening prior to ISCI.

MOLECULAR TYPING OF THE MSY REGION

Nomenclatures

As the number of the known Y chromosomal markers has been increasing, different systems have been used to classify Y chromosomal markers and their corresponding haplogroups and subhaplogroups. Hammer and Underhill (2002) constructed a haplogroup tree for the human MSY known as the Y's Chromosome Consortium 2002 (YCC 2002). Jobling and Tyler-Smith (2003) improved this nomenclature and this system is cited as YCC 2003. In this nomenclature, major 18 haplogroups or clades are identified with single capital letters from A to R, representing the main divisions of the human MSY. To assign division of these clades to subhaplogroups, small letters and numbers are used (for example, subhaplogroup R1a1). Markers (for example, M89, SRY-1532) are used to determine specific haplogroups or subhaplogroups (Figure 2).

Each Y-STR has its nomenclature defined by its repeat motifs, which can be determined using the guidelines provided by the DNA Commission of International Society for Forensic Genetics (Gill *et al.*, 2001). The number of Y-STR's

alleles and their combination define the haplotypes of the Y chromosomal haplogroups.

Genetic markers

Many markers that can be used in molecular typing of the MSY region are now known. These markers can be divided into two large groups: about 250 biallelic markers (single nucleotide polymorphisms (SNPs), and the *Alu* insertion polymorphism) and 200 short tandem repeats (STRs). The allelic status of several SNP loci has to be determined to identify the frequency and distribution of Y chromosomal haplogroups. STRs of the Y chromosome can be used for analysis on a short evolutionary time scale or at the microgeographic level.

Biallelic polymorphisms' typing

Biallelic markers have only two alleles; therefore, they provide less information per marker than Y-STRs that can have numerous alleles. Biallelic markers present a low-resolution view of the Y lineages. A number of different technologies and approaches have been used for examining Y-SNP markers:

(1) To investigate the allelic status of a particular biallelic marker of the Y, restriction fragment length polymorphism method and sequencing analyses can be used.

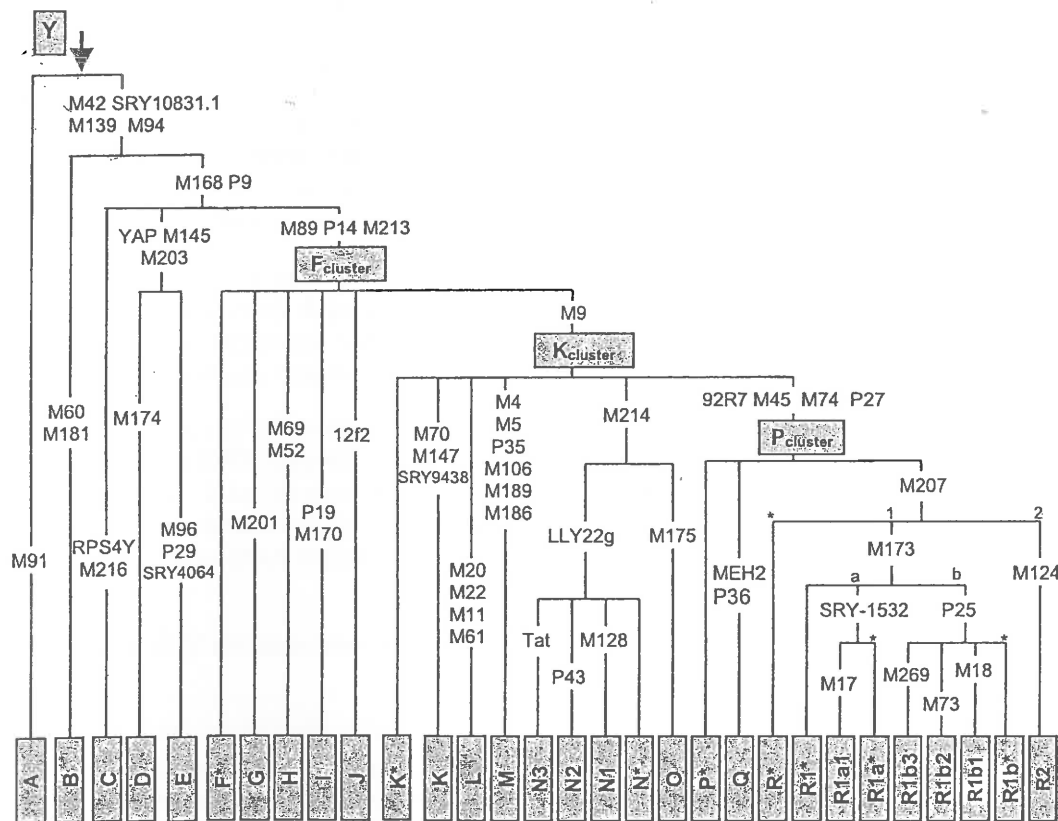


Fig. 2. The phylogenetic tree of Y-chromosomal haplogroups and subhaplogroups. It is based on the Y Chromosomal Consortium (Jobling and Tyler-Smith, 2003) with some modifications. Major haplogroups, subhaplogroups, and their clusters (K, P, and F) are shown in grey squares. In a cluster several corresponding haplogroups and sub-haplogroups are enclosed. This phylogenetic tree contains haplogroups A–R and markers defining them (for example, M170, P19). Haplogroups that are not defined by biallelic marker are indicated by an asterisk (for example, F*). Subhaplogroups present the deeper rooting of the certain haplogroup and are marked with a capital letter (like its haplogroup, for example, R) and a number and small letter.

(2) The most comprehensive approach to type Y-SNPs is time-of-flight mass spectrometry multiplexes, developed by Tyler-Smith and his colleagues (Paracchini *et al.*, 2002).

(3) Denaturing high-performance liquid chromatography can detect heteroduplexes and is efficiently used to identify new polymorphisms as well as genotype samples (Underhill *et al.*, 1997).

(4) The Luminex Assay method is based on the Luminex platform with allele-specific hybridisation, which allows to examine up to 50 biallelic markers simultaneously (Armstrong *et al.*, 2000).

Y-STRs' typing

Y-STRs are very widely used Y chromosomal markers due to their typing simplicity and high level of diversity. STR typing involves simple and reliable PCR techniques. For each additional nucleotide unit added to a DNA molecule, the charge is increased proportionally to the addition in mass.

(1) Each DNA sample can be typed in small multiplex sets containing three to five STR loci. Megaplex PCR assay is capable of simultaneously amplifying up to 20 different Y STR markers (Butler *et al.*, 2002).

(2) Capillary electrophoresis (CE) permits more rapid DNA separations. Another important advantage is a full automation of the electrophoresis process.

(3) The recently introduced capillary array electrophoresis provides much higher sample throughput, using multiple capillaries in parallel. Up to 96 samples can be analysed simultaneously (Mansfield *et al.*, 1996).

(4) PCR and CE have been integrated on a microchip-microchip CE (Woolley and Mathies, 1994). Schmalzing *et al.* (1999) demonstrated rapid STR separations using a dual-wavelength laser-induced fluorescence detection system.

(5) MALDI-TOF Mass spectrometry offers high speed for Y-STRs analysis. The mass of a DNA fragment can be obtained in a fraction of a second. Many improvements have been made recently to overcome the difficulties of fragmentation and poor ionisation of large DNA fragments.

Method used for detection of Y chromosome microdeletions

The diagnostic testing of deletions is performed by PCR amplification of selected regions of the Y chromosome and is often used for infertility analysis (Simoni *et al.*, 1999).

Such PCR markers are known as STSs (sequence targeted sites), and today more than 300 have been physically mapped. Each STS detects known sequences of genomic DNA, and its amplification by PCR indicates the presence of this DNA sequence in the Y chromosome, while its ab-

sence may indicate a deletion. The STS may be specific for a gene or a gene family, or may detect anonymous sequences. Most of the problems associated with the STS-PCR technique in screening for microdeletions derive from the intrinsic nature of the Y chromosome, which largely consists of repetitive elements and gene families widely dispersed along the chromosome (Foresta *et al.*, 2001). However, careful precaution should be introduced to avoid technical failure (Simoni *et al.*, 1999).

STATISTICAL AND PHYLOGENETICAL ANALYSIS OF THE Y CHROMOSOMAL VARIATION

Several features of the Y chromosome and its specific markers—both SNPs and STRs—make them very useful tools for (1) intrapopulation analysis; (2) investigation of the interrelationships of different populations; and (3) the statistical and phylogenetical analysis of the Y chromosomal markers, allowing to clarify the structural and geographical patterns, migrations and admixtures of populations.

Intrapopulation statistical analysis

Several statistical indices are applied to investigate population genetical structure: standard diversity, nucleotide diversity, haplogroup/haplotype diversity, the mean number of pairwise differences among SNP/STR, and Nei's heterozygosity. The correlation among genetical, geographical, and linguistic structure of different populations or subpopulations can be evaluated by analysis of the population structure:

(1) The Mantel test determines the presence of isolation-by-distance.

(2) The analysis of molecular variance (AMOVA) is a testing procedure that measures the genetic structure of the particular population. It is based on permutational analysis and involves few assumptions about the statistical properties of the data. Both the Mantel test and AMOVA are included in the Arlequin 2.000 package.

(3) To estimate the statistical reliability for SNP/STR allelic frequency, the Bayesian credible region can be calculated by the computer program SAMPLING.

(4) Discriminatory capacity can be determined by dividing the number of different haplotypes found in given population by the total number of samples in that population (Redd *et al.*, 2002).

(5) To provide insight into the relative roles of historical events and ongoing processes in generating patterns of genetic variation, Nested Cladistic Analysis (NCA) included in the GeoDis version 2.0, can be performed (Templeton *et al.*, 1995). NCA is applied to disentangle the effects of population history (contiguous range expansion, long-distance colonisation, fragmentation) from population struc-

ture (recurrent gene flow restricted by identity-by-descent (IBD), and long-distance dispersal). It helps to clarify statistically significant associations between haplogroups (or haplotypes) and geography in terms of population history and population structure factors (Hammer *et al.*, 2001).

Interpopulation statistical analysis

(1) To reduce the dimensionality of the data set and to identify new meaningful underlying variables, principal component analysis (PCA) can be undertaken using the POPSTR program (Richards *et al.*, 2002). PCA is based on SNP/STR frequencies. Only haplogroups/haplotypes which have a noticeable impact on the scatterplot are used for PCA.

(2) Nonmetric multidimensional scaling analysis is an ordination technique performed on the Φ_{ST} distances between populations for representing the dissimilarity among populations.

(3) Spatial autocorrelation analysis can be performed using the autocorrelation index for DNA analysis (Bertorelle and Barbujani, 1995), which summarises genetic variation among individuals as a function of their distance in space (Hammer *et al.*, 2001).

(4) Discriminative haplogroups can be determined by comparing the 95% confidence intervals of the frequency portions of the source and outgroup (the closest known sister population with minimal impact from source) populations. This method expands upon the method of Shriver *et al.* (1997), by revealing population-specific alleles distinguishing the source populations.

(5) Genetic differentiation under an IBD model can be tested by the regression of genetic distance estimates for pairs of populations on geographic distances (Slatkin and Maddison, 1990).

Phylogenetic analysis

The Median Join network can be constructed using the Network 4.0 programme with default settings. For these calculations, Y-STR loci are weighed according to their variances such that higher weights are assigned to the least variable loci. The reduced median output can be used as input for the median join network analysis. In this way the ability of median join algorithm to produce large reticulations within network is reduced (Hurles *et al.*, 2002).

Haplogroup/haplotype ages can be estimated using two approaches: the phylogenetical one (via the statistic of ρ , the average distance to a specified founder haplogroup) and a population genetical statistic (via a Bayesian-based coalescence analysis). In both cases, the estimate refers to the more recent common ancestor, ρ compares a set of selected haplogroups/haplotypes to an ancestral node, as measured by single differences (Forster *et al.*, 1996).

To determine the relative time of the divergence of populations on the STRs, the estimator T_D and Y-STR variation in two groups of individuals that diverged from a common ancestor evolving via both mutation and genetic drift can be used (Zhitovovsky, 2001).

WORLDWIDE DIVERSITY OF THE Y CHROMOSOME'S HAPLOGROUPS

The first studies of human molecular diversity suggested that the first anatomically modern human evolved from a small African population 50,000 years ago and subsequently colonised the whole world (Thomson *et al.*, 2000). This replacement model, called "out-of-Africa" model has since been widely adopted by the human population genetics community (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991). Archeological evidence shows that there have been at least two distinctive migrations: an early southern migration about 50,000 years ago (around the northern edge of the Indian Ocean), and slightly later, a northern migration into Eurasia. There have been several subsequent migrations and changes, but traces of overall differences remain (for a review, see Jobling and Tyler-Smith, 2003).

It is important to compare the linguistic affiliation of the populations, because a common language or related languages usually indicate a common origin further back in time. As a result, a language difference may be a barrier for free gene flow. However, there does not always exist a strong correlation between linguistic and genetic patterns of the populations.

Africa

Six main haplogroups (hgs) have been observed among the African populations: A, B, E, G, J, and R. Most of these lineages show a strict regional distribution within the African continent (Cruciani *et al.*, 2002). The majority of Y hgs show a non-uniform distribution across the Africa continent. Analysis of SNPs revealed that three main clusters of populations can be identified: Northern, Eastern, and sub-Saharan Africans. The observed pattern of the MSY variation shows a distinct geographical structuring in Africa. The haplogroup (hg) sharing among these three population groups is limited, several hgs are common in one area, but rare or absent in other regions. The only notable exception is sub-hg E3b, which is common in East, North, and South Africans.

Hgs A and B are specific only to Africa, diverse, and suggest a stronger genealogical heritage than other hgs (Underhill *et al.*, 2000; 2001). The pattern of hg A and hg B distributions, their phylogenetical position and accumulated variation indicate the early diversification and dispersal of human populations through Africa. Their patchy distribution and high frequencies in isolated hunter-gatherer groups, in Ethiopia Jews and in South Africa populations, may be interpreted as survivorship of some of these ancient lineages (Underhill *et al.*, 2000).

Hg E is the main lineage and accounts for 73% of the chromosomes, and is widespread across the Africa continent. The distribution of distinctive hg E sub-lineages is not homogenous in Africa. Network analysis of the STRs associated with E sub-hgs showed a low degree of geographical differentiation, suggesting that their present day distribution is the result of a relatively recent range expansion (Cruciani *et al.*, 2002).

Hgs G and J are frequently found in Europe and the Middle East (Rosser *et al.*, 2000). Both these hgs are almost absent in Africa, but have been rarely detected in some North African populations, varying from 1 to 12% (Scozzari *et al.*, 2001). Their presence in Africa may be associated with Neolithic expansion from the Middle East (Semino *et al.*, 2000).

Sub-hg R1 (except R1b3 and R1a) is restricted to populations of the Central-Western region of Africa—it is 26% (Scozzari *et al.*, 1997; 1999), and is supposed to reveal a back migration into Africa from Europe.

Asia

There are thought to be two major “out-of-Africa” migrations (Southern and Northern) into Asia: the first one reached China about 40,000 years ago, but the next one extended through Western Asia at about the same time. There are several hgs that arose after the initial colonisation of Asia; therefore, their presence reflects post-Palaeolithic migration events (Zerjal *et al.*, 2002). Wells *et al.* (2001) considered that the Central Asia (CA) was settled first and that subsequent migrations followed into Europe, Siberia, and India.

There are important differences between North East Asian (NEA) and South East Asian (SEA) populations, but at the same time, there are closer genetical relationships between NEA and CA (Karafet *et al.*, 2001).

The most common hg in Asia, with a frequency of 80%, is O, which is predominately recognised in SEA samples as the only or major hg. In NEA, hg O is not detected as often, and is rarely found in CA. The most frequent sublineages are O3 and O2, accordingly at 49% and 23%. In NEA there are populations (Siberian Evenks, Buryats, and Oroqen) in which O is not characteristic, while hg C dominates (Karafet *et al.*, 2001).

Hg C is widespread in Central and Eastern Asia, but absent in Western Asia (Bergen *et al.*, 1999). About 2300 years ago there was a nomadic expansion of Altaic-speaking people into CA. As a result of these events, a high level of C lineage is detected in all Altaic-speaking populations (Zerjal *et al.*, 2002). Altogether, C accounts for 37% of hg in CA, NEA, and SEA populations. In Siberia, C is observed at the level of 23% of hg (Karafet *et al.*, 2001; 2002). In common with Western Asians, most Indian populations possess C at a very low frequency (Kivisild *et al.*, 2003).

Hg R is thought to have originated about 30,000 years ago (Semino *et al.*, 2000). In CA populations it occurs at a high frequency (38%), but in NEA regions this lineage is found at a low frequency (7%). On the other hand, in SEA populations this hg is not detected or it is observed at low frequencies; however, among Indians, hg R contributes more than one-third of all samples. R forms 12% of all Siberian Y chromosomes (Karafet *et al.*, 2001; 2002; Kivisild *et al.*, 2003).

Hg N is predominately found in Siberian populations and altogether accounts for 43% of hg (Karafet *et al.*, 2002). Zerjal *et al.* (1997) suggested that it may be ~7000 years old and may have entered Siberia (here the highest level is found) from Mongolia and Northern China. Overall, Y chromosomal N representatives are detected at a frequency of 13% hg in all Asian populations. It is irregularly dispersed in SEA regions (7%): in some populations its frequency is high or rather high, but in some populations its representatives are not found. Among NEA peoples, hg N is observed at a frequency of 2% to 6%. The highest level of N3 has been found in Yakuts (94%). Zerjal *et al.* (1997; 2002) found that the sub-hg N3 is frequent in Buryats, but is infrequent in Mongolians and Siberian Evenks. N3 is not found further to the South in China and Korea and in CA areas N3 is detected at a lower frequency (Karafet *et al.*, 2001). The second most abundant sub-hg in Siberia, with a mean frequency of 20%, is N2. This lineage is prevalent (41%) almost in all North Siberian Uralic-speaking populations (Karafet *et al.*, 2002).

Hg L occurs at low frequency only among CA inhabiting Uzbeks and NEA populations (Karafet *et al.*, 2001). It is more frequent (13%) among Pakistans (Qamar *et al.*, 2002) and all Indian populations (Kivisild *et al.*, 2003).

Hg D is widespread only in the Tibetan population (50%) and it is also detected at a moderate level in Chinese populations. Hg E is restricted to the Caucasus area at a relatively high frequency of 14% (Zerjal *et al.*, 2002) and it is not detected among other Asian populations (Karafet *et al.*, 2001).

In total, hg J accounts for 4% of all Asians and 12% of all Indian Y chromosomes (Kivisild *et al.*, 2003). It is not detected in SEA populations and is found only in some populations of NEA and in 10% of CA samples (Karafet *et al.*, 2001). Hg J is very frequent also in the Middle East populations and in Caucasus populations (Hammer *et al.*, 2001). The frequency of J decreases eastwards, and in Mongolians the frequency of this lineage reaches only 3% (Zerjal *et al.*, 2002).

Hg H is observed in CA populations—Kazakhs (13%) and Uzbeks (6%) (Karafet *et al.*, 2001) and it is widespread in Indians (Kivisild *et al.*, 2003).

Hg Q quite often occurs in Siberia with an average frequency of 19%. This hg is mainly detected in the Northwest and Northeast area of Siberia, but in Central Siberia it has

not been observed. The archaeological and Y-SNP analyses suggest that the Altai mountain area was the first region of Siberia to be settled by anatomically modern people, carrying cluster P (including hgs Q and R) and then these first Siberians moved eastwards and later into the Americas (Karafet *et al.*, 2002).

In summary, there has been a major admixture from Middle East populations, with high level of admixture in the Caucasus and in westernmost CA populations, with decreasing levels to the east. Overall, in CA an east-west clinal pattern of variation is observed (Zerjal *et al.*, 2002). Comparing Indians with Europeans and Middle East populations (Semino *et al.*, 2000), all of these populations share J2, R1b, and R1a. The exact area of origin of these sub-hgs is still uncertain (Kivisild *et al.*, 2003).

Americas

Until recently, it was only known that America was first settled from Asia by people who migrated across Beringia; there was no clear evidence about the pattern of migration, its timing, and the place of origin in Asia of these people (Zegura *et al.*, 2004). In 1986, Greenberg with colleagues divided all Native American populations into three large groups: Amerind (in Central America), the Na-Dene (in the North-western part of the North America), and Aleut-Eskimo (in circum-Arctic region) (cit. Karafet *et al.*, 1999). Karafet *et al.* (1999) and Lell *et al.* (2002) proposed that the settlement of the American continent occurred in two major waves of migration from Northern Asia. The first migration supposedly introduced sub-hg Q3 from Central Siberia into the Americas, expanding southwards to South America. The second migration wave is supposed to have originated in Eastern Siberia and reached only North and Central America, carrying hg C.

A more feasible and well-grounded opinion was raised by Zegura *et al.* (2004): Americas were settled in a single-migration about 20,000 years ago, the primary process was by an interaction of genetic drift and gene flow on Beringia. The three major hgs in 18 Native American populations are Q (76%), R (13%), and C (6%). The diversity of hgs differs in various populations ranging from one in monomorphic Amerind populations (sub-hg C) to 11 lineages in polymorphic Amerind population.

Hg R (13%) is the second most frequent lineage among all Native American population groups (R1b 13% and R1a 0.4%). Among several Amerind populations, hg R is found in approximately 44–50% of all Y chromosomes. The combination of SNP and STR data of hg R1b with phylogeographical information exhibit extensive sharing of STRs haplotypes between Europeans and Native Americans (Bosch *et al.*, 2003). It is suggested that R is a result of "the post-1492" European admixture. Therefore, it is proposed that there are only two specific founder haplogroups in Americas—Q3 and C3.

The most frequent sub-hg Q3 has been observed throughout all Native American populations and it is predominant with a mean frequency of 76%. In several Amerind populations this lineage is the only detected one. The ancestral STR haplotype of the Native American lineage Q3 is also detected in Asian Y chromosomes.

After Zegura *et al.* (2004), sub-hg C3 occurs at a low frequency (6%) in Native Americans and its distribution is patchy, but is not detected in Aleut-Eskimo populations.

C3 and Q3 are present at moderate high frequencies in samples from the Southern Altai region (accordingly, 17% and 22%). The Altai Mountain area is the principle geographical source of founding Native American Y chromosome lineages. This initial population has borne both lineages with unequal frequencies, and these differences have been increased during the time by intra- and inter-generational genetic drift (Zegura *et al.*, 2004). These conclusions are in agreement with mtDNA studies concerning a migration source from Asia to Americas (Templeton, 2002).

Europe

Europe is one of the most studied regions in the world, where strong geographical differentiation and a clear clinal pattern of paternal lineage is observed. Relatively short genetic distances between individual populations are characteristic for Europe. Populations of Europe are related primarily on the basis of geography, rather than on the basis of linguistic affinity (Rosser *et al.*, 2000).

Anatomically modern humans from the Near East settled in this part of the world about 35,000 to 40,000 years ago during the Palaeolithic period (Mellars, 1992). Another group of hunters-gatherers came from North Africa, but occupied only a small part of south-western part of Europe (Otte, 2000). The second large migration was due to the development of agriculture in the Near East about 10,000 years ago and the expansion of these societies into Europe during the Neolithic period. Both Palaeolithic and Neolithic migrations expanded approximately along the same routes and contributed to the modern European gene pool (Ammerman and Cavalli-Sforza, 1984). Hg I and sub-hg R1 are thought to be present in Europe since Palaeolithic times, but other lineages entered later during independent migrations from the Middle East and the Ural region (Hammer *et al.*, 1997; Zerjal *et al.*, 1997; Underhill *et al.*, 2000).

Hg R is characteristic for approximately 50% of all Europeans, but in Western, Southern and Central Europe it accounts for more than of 50% of all Y chromosomes.

The sub-hg R1b frequency decreases from west to east, and is the most frequent in Western (65%), Southern Europe (39%), and Central Europe (34%) (Table 1). Indo-European-speaking populations of the Scandinavia region possess R1b as the second most frequently detected lineage after I (Passarino *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2003; Tambets *et al.*, 2004). However, in Scandinavian Finno-Ugric-

Table 1

FREQUENCIES (%) OF SELECTED Y CHROMOSOMAL HAPLOGROUPS/SUBHAPLOGROUPS IN EUROPEAN POPULATIONS

Region. Population	Language family	Sample size	Frequency of haplogroup, %								REFERENCES
			I	R1b	R1a	N3	N2	E	J	others	
Scandinavia:											
Finns	U-FU	38	28.2	0.0	7.6	64.1	0.0	0.0	0.0	0.1	Zerjal <i>et al.</i> , 2001
Swedes	IE-G	141	48.2	22.0	18.4	2.8	0.0	?	?	8.6	Tambets <i>et al.</i> , 2004
Norwegians	IE-G	72	40.3	27.8	23.6	6.9	0.0	0.0	0.0	1.4	Passarino <i>et al.</i> , 2002
Volga-Uralic:											
Maris	U-FU	111	8.1	2.7	47.7	31.5	9.9	?	?	0.1	Semino <i>et al.</i> , 2000; Tambets <i>et al.</i> , 2004
Udmurts	U-FU	87	1.1	2.3	10.3	56.3	28.7	?	?	1.3	Tambets <i>et al.</i> , 2004
Chuvashes	A-T	79	11.4	3.8	31.6	17.7	10.1	?	?	25.4	Tambets <i>et al.</i> , 2004
Baltic States:											
Estonians	U-FU	209	18.2	9.1	33.5	30.6	0.0	?	?	8.6	Tambets <i>et al.</i> , 2004
Lithuanians	IE-B	196	10.2	5.1	44.9	36.7	0.0	2.6	0.0	0.5	Kasperaviciute <i>et al.</i> , 2004
Latvians	IE-B	34	12.0	15.0	41.0	32.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Zerjal <i>et al.</i> , 1997
		114	7.9	9.6	39.5	42.1	0.0	0.9	0.0	0.0	Laitinen <i>et al.</i> , 2002
		86	7.0	9.3	38.4	41.9	0.0	?	?	3.4	Tambets <i>et al.</i> , 2004
East Europe:											
Poles	IE-S	55	23.6	16.4	56.4	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	Semino <i>et al.</i> , 2000
East-Russians	IE-S	61	13.1	21.3	42.6	8.2	8.2	?	?	6.6	Karafet <i>et al.</i> , 2002
Central Europe:											
Germans	IE-G	46	37.5	50.0	6.2	0.0	0.0	6.2	0.0	0.1	Semino <i>et al.</i> , 2000; Rosser <i>et al.</i> , 2000
Czechs	IE-S	53	18.9	18.9	37.7	0.0	5.7	7.5	11.3	0.0	Rosser <i>et al.</i> , 2000
West Europe:											
French	IE-R	23	17.4	52.2	0.0	0.0	0.0	8.7	13.0	8.7	Semino <i>et al.</i> , 2000
Belgians	IE-G	92	23.0	63.0	4.0	0.0	0.0	2.0	5.0	3.0	Rosser <i>et al.</i> , 2000
South Europe:											
Greeks	IE-H	76	7.9	27.6	11.8	0.0	0.0	23.7	21.0	8.0	Semino <i>et al.</i> , 2000
Spanish	IE-R	126	13.0	68.0	2.0	0.0	0.0	10.0	3.0	4.0	Rosser <i>et al.</i> , 2000

U-FU, Uralic Finno-Ugric; IE-G, Indo-European Germanic; IE-B, Indo-European Baltic; IE-S, Indo-European Slavic; IE-R, Indo-European Romanic; IE-H, Indo-European Hellenic; A-T, Altaic-Turkic; ? this marker has not been investigated.

speaking populations, R1b has not been observed or has been found in a very low density (Raitio *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2001; Zerjal *et al.*, 2001), as well as in the Volga-Uralic region (6%) and in the Baltic States (8%).

Sub-hg R1a has a contrasting distribution as R1b; it is rather frequently distributed in central and eastern populations, where R1b is rarely detected (Rosser *et al.*, 2000; Semino *et al.*, 2000). R1a in Scandinavian Indo-European-speaking populations occurs at an average frequency of 19% (Passarino *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2003; Tambets *et al.*, 2004). In Finno-Ugric-speaking Saami and Finns R1a is relatively rare, in 8% (Wells *et al.*, 2001; Zerjal *et al.*, 2001). R1a occurs only at an average frequency of 2% in Western Europe.

Hg N in Europe is present at a frequency of 26%. This lineage is virtually absent or found at an insignificantly low frequency among Central, Western, and Southern European populations, which all are mainly Indo-European-speaking nations. The N derivative lineage N3 is found at a high den-

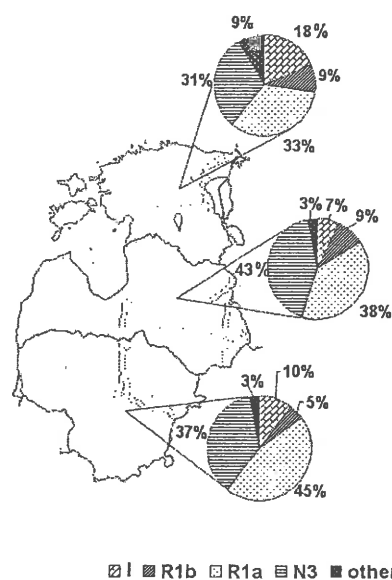


Fig. 3. Y chromosomal lineages distribution in the Baltic States. Diagram is constructed basing on the data from Tambets *et al.* (2004) and Kasperaviciute *et al.* (2004) shown in Table 1.

sity among Baltic State populations (36%), Scandinavians (25%), and Volga-Uralic populations (31%). The first study on the Y chromosomal sub-hg N3 was by Zerjal *et al.* (1997), who found that the spread of this lineage was mainly related to two language families: Altaic (Buryats, Yakuts) and the Finno-Ugric branch of the Uralic (Saamis, Finns, Estonians). N3 is about 4,000 years old and marks a recent Uralic migration confined to Northern Europe. The sub-hg N3 is absent or detected at low frequencies in Slavic-speaking populations. N3 is found at very high frequencies among Finno-Ugric-speaking Finns and Saami and Udmurts and Mari populations living in the Volga-Uralic region. However, sub-hg N3 is common among Indo-European-speaking Baltic region populations (Tambets *et al.*, 2001).

The N2 branch of the Y-chromosomal tree is exclusively restricted to the Volga-Uralic region with an average frequency of 13%, with the highest distribution among Udmurts (Tambets *et al.*, 2004). N2 has also been observed among two Slavic populations—Czechs and East-Russians (Rosser *et al.*, 2000; Karafet *et al.*, 2002).

Hg I is the only major lineage of the Y phylogeny that is widespread over Europe (22%), but virtually absent elsewhere, except Siberia (Rootsi *et al.*, 2004). It is guessed to be a putative Palaeolithic polymorphism, which originated in Europe about 22,000 years ago in descendants of men that arrived from Middle East (Semino *et al.*, 2000). Hg I reaches a 40%–50% frequency in the Scandinavian Indo-European-speaking populations (Semino *et al.*, 2000; Barac *et al.*, 2003). Hg I is not as common in the Baltic States (12%) and Volga-Uralic region populations (10%). Significant frequency changes over short geographical distances occur between the Southern Slavic-speaking populations and their neighbours: the Slovenians versus the Italians (38% and 5%) and Macedonians versus Greeks (30% and 14%) (Rootsi *et al.*, 2004).

Hgs E, G and J represent the male contribution of demic diffusion of farmers from Middle East to Europe. Lineage E accounts for 13% of hg among South European populations, especially among the Mediterranean area inhabiting nations—Italians and Greeks. In the same two populations a high diversity of hg J is found (Rosser *et al.*, 2000; Semino *et al.*, 2000). In other parts of Europe these lineages occur at not as high significant frequencies.

The paternal phylogeny of the Baltic States

The first studies of Y chromosomal markers in the Latvian population were conducted by Zerjal *et al.* (1997). In their investigations of the genetic structure of Latvians they used 10 biallelic markers and five STRs. However, the sample size of Latvians did not exceed 50 and geographical sources of samples were not identified. Later Lessig *et al.* (2001) studied the diversity of nine STRs in Latvians, but they did not make any conclusions on correlation and distribution of SNPs and STRs. Furthermore, Laitinen and co-authors

(2002) studied five biallelic markers and have used a wide set of DNA samples. Tambets *et al.* (2004) studied Latvians, using 16 biallelic markers, but did not include STRs in the Y chromosomal analyses.

Some of these studies revealed that Latvians are very similar to other two Baltic region populations—Estonians and Lithuanians (Zerjal *et al.*, 1997). However, STR haplotype analysis showed significant differences between Indo-European-speaking Latvians, Lithuanians and Finno-Ugric-speaking Estonians, but there were no significant dissimilarities found between both of the Balt populations (Latvians and Lithuanians). Perhaps, these two population groups (Finno-Ugric Estonians and Indo-European Balts) have had a distinctive demographic history or there may have been an isolation period and genetic drift after the population split (Lessig *et al.*, 2001; Kasperaviciute *et al.*, 2004). Laitinen *et al.* (2002) found that the Indo-European-speaking Latvians and Lithuanians are genetically very similar to the Finno-Ugric-speaking Estonians and Mari population, and suggested that they could have originated from the same Finno-Ugric-speaking founder population.

Two main paternal lineages of the Baltic region populations are N3 and R1a (Estonians 64%, Latvians 81%, Lithuanians 82%) (Figure 3) and they are defined by unique-event binary polymorphisms, the spread of which is assumed to be unaffected by selection and considered to be the result of male migration, influenced by local processes—gene flow, genetic drift, and founder effect (Kasperaviciute *et al.*, 2004).

A sharp cline of N3 frequencies was observed between Lithuanians and Poles (Kasperaviciute *et al.*, 2004; Tambets *et al.*, 2004). This may be explained by the Comb Ware culture carriers (thought to be proto-Finno-Ugrians) who about 9,000 to 5,500 years ago inhabited the area of present-day Latvia and Lithuania, but not the region of Poland (Tambets *et al.*, 2001).

Zerjal *et al.* (2001) found a genetic boundary between Balt (Latvians and Lithuanians) and Finno-Ugric (Estonians) populations: differences in N3 regarding the DYS19 allele frequencies. This has been interpreted as a result of two different early migrations of the people carrying N3 from Asia to Europe. Kasperaviciute *et al.* (2004) detected lower gene diversity among N3 chromosomes in Latvians and Lithuanians than in Estonians. Latvians and Lithuanians are distinctive from Estonians in DYS19 alleles; 15 repeats at this STR are detected predominantly in 94% of Lithuanians and 88% of Latvians, but found only in 40% of Estonians. In contrast, among Estonians the 14-repeat haplotype frequently occurs (60%). These differences possibly occurred due to different source populations or due to a period of isolation and genetic drift after an early migration from Asia between Lithuanians, Latvians, and Estonians (Kasperaviciute *et al.*, 2004). Similar results were obtained and reported by Lessig *et al.* (2001).

Sub-hg R1a is found in 39% of all investigated male chromosomes from the Baltic region (Table 1). The STRs asso-

ciated with R1a have a low diversity in Baltic region populations due to its recent spread (Zerjal *et al.*, 2001). R1a is detected in Slavic populations in a higher density, with an average frequency of 48% (Rosser *et al.*, 2000; Semino *et al.*, 2000; Karafet *et al.*, 2002). The high frequency of R1a in Baltic region populations may be suggested as an historical admixture with proto-Slavic populations (Tambets *et al.*, 2001). A similarly high frequency of R1a is found in the Finno-Ugric-speaking Mari population (48%), but in other Volga-Uralic region populations the density of this lineage is not as high (Semino *et al.*, 2000; Tambets *et al.*, 2004).

Sub-hg R1b is not common in Baltic region populations (8%), but this lineage is more common among Estonians and Latvians than Lithuanians. This sub-hg is even less frequent in Volga-Uralic region, but in other parts of Europe its frequency is rather high.

Hg I is relatively frequently dispersed in the Baltic States territory (12%), but the highest density is observed in Scandinavian populations (37%). In Estonians this lineage reaches a frequency of 18%, but in Latvians only 7% (Figure 3). I and R1b lineages have been proposed to have arisen in Western Europe, while R1a and N3 extended from the east part of Europe (Rootsi *et al.*, 2004; Tambets *et al.*, 2004).

Until recently, there have not been any attempts to carry out a detailed study on the genetical structure of Latvians from different ethnolinguistic sub-populations.

CONCLUSIONS

The Y chromosome is unique in several aspects. It is always in the haploid state, consists of repeated sequences, but it is also responsible for important biological roles, such as sex determination and male fertility. Moreover, the Y is a powerful tool to study human populations and evolutionary pathways.

Infertility is a major health problem affecting 10–15% of couples seeking to have children, and Y chromosomal microdeletions can be identified in about half of these cases. Therefore, the study of Yq microdeletions will help in the development of better diagnostic methods and the expansion of the current knowledge of spermatogenesis.

The distribution of the Y chromosome diversity is able to describe some of the most important human prehistoric movements, and delineate the composition of modern populations. In most cases, the portrait of the Y chromosome phylogeny appears to be continent-specific and has a pattern of geographical distribution quite unlike mtDNA and autosomes.

Previous studies of the Y chromosome variability have shown that the large majority of non-European and European Y chromosomal hgs is continent specific with a non-uniform pattern of their distribution. In the Americas, hgs Q, R, and C encompass virtually all of the Native American

variation; in Africa hg E and ancient lineages of hgs A and B are present; and in Asia hg C represents ~ 40% of Y chromosomes, with other less common hgs (O, N, and R) making up most of the remaining Asian lineages. Detailed studies of Y chromosome diversity are available for Europe, where a clinal pattern has been found. The most frequent hg R (excluding R1a), which accounts for 37% of the total sample, is present in all populations but is concentrated in the West. Therefore, it is thought that the hg that was introduced by the first Palaeolithic inhabitants. Sub-hg R1a has an opposite distribution as R1b; it is rather frequent in the Central and East populations. Other clines in the frequency of hgs E3b (13%), J (10%), R1a (8%), and N3 (30%), point to sources to the South, South-West and North-West, respectively. The distribution of hg J fits archaeological data for the introduction of farming from the South-East, and sub-hg N3 distribution represents movement of Uralic speakers from the East. The correlation with E3b and R1a remains less clear. Hg I (20–50%) is connected with Neolithic dispersals, and is the only clade of the Y phylogeny that is widespread over Europe, but virtually absent elsewhere. Europe shows a remarkable linguistic homogeneity, with most of the populations speaking languages belonging to the Indo-European family. Nevertheless, in Northern Europe strong geographical and cultural barriers can be identified. Previous studies on the paternal phylogeny of populations of the Baltic States (Latvia, Lithuania, and Estonia) have provided some information on the genetics of these populations, but several questions have remained unanswered. The SNP variation data shows that Latvians are very similar to other Baltic region populations (Lithuanians and Estonians) as well as to the Finno-Ugric speaking Mari population. On the other hand, STRs haplotype analysis has shown significant differences between Indo-European-speaking Latvians, Lithuanians and Finno-Ugric-speaking Estonians. Therefore, future studies need to determine the relationship between Latvians and the observed phylogenetical patterns of the Y chromosome variation in other populations.

Furthermore, analyses of Latvian phylogeny on the micro-regional level needs to be performed, using a wide set of bi-allelic markers and STRs. Analyses of microdeletions in the AZF region is important to solve medical aspects of the Y chromosome.

REFERENCES

- Ammerman, A. J., Cavalli-Sforza, L. L. (1984) *The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe*. Princeton University Press. Princeton, N.J. 176 pp.
- Armstrong, B., Stewart, M., Mazumder, A. (2000) Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry*, 40, 102–108.
- Barac, L., Pericic, M., Klaric, I. M., Rootsi, S., Janicijevic, B., Kivisild, T., Parik, J., Rudan, I., Villems, R., Rudan, P. (2003) Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates. *Eur. J. Hum. Genet.*, 11, 535–542.
- Bergen, A. W., Wang, C. Y., Tsai, J., Jefferson, K., Dey, C., Smith, K. D., Park, S. C., Tsai, S. J., Goldman, D. (1999) An Asian–Native American pa-

- ernal lineage identified by RPS4Y resequencing and by microsatellite haplotyping. *Ann. Hum. Genet.*, 63 (Pt.1), 63–80.
- Bertorelle, G., Barbujani, G. (1995) Analysis of DNA diversity by spatial autocorrelation. *Genetics*, 140, 811–819.
- Bosch, E., Calafell, F., Rosser, Z. H., Norby, S., Lynnerup, N., Hurles, M. E., Jobling, M. A. (2003) High level of male-biased Scandinavian admixture in Greenlandic Inuit shown by Y-chromosomal analysis. *Hum. Genet.*, 112, 353–363.
- Britton-Jones, C., Haines, C. J. (2000) Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *Hong Kong Med. J.*, 6, 184–189.
- Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Erickson, R. P., Longepied, G., Mitchell, M., Jones, M. H., Hargreave, T. B., Cooke, H. J., Affara, N. A. (1998) Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human *DFFRY* gene and comparative expression analysis and mapping to the *Sxrb* interval of the mouse Y chromosome of the *Dffry* gene. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 97–107.
- Burgoyne, P. S. (1996) Fruit(less) flies provide a clue. *Nature*, 381, 740–741.
- Butler, J. M., Schoske, R., Vallone, P. M., Kline, M. C., Redd, A. J., Hammer, M. F. (2002) A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci. Int.*, 129, 10–24.
- Cann, R. L., Stoneking, M., Wilson, A. C. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325, 31–36.
- Cruciani, F., Santolamazza, P., Shen, P., Macaulay, V., Moral, P., Olckers, A., Modiano, D., Holmes, S., Destro-Bisol, G., Coia, V., Wallace, D. C., Oefner, P. J., Torroni, A., Cavalli-Sforza, L. L., Scozzari, R., Underhill, P. A. (2002) A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Amer. J. Hum. Genet.*, 70, 1197–1214.
- Dada, R., Gupta, N. P., Kucheria, K. (2004) Yq microdeletions—azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest. *J. Biomol. Tech.*, 15, 176–183.
- Eberhart, C. G., Maines, J. Z., Wasserman, S. A. (1996) Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in Azoospermia. *Nature*, 381, 783–785.
- Foresta, C., Ferlin, A., Garolla, A., Moro, E., Pistorello, M., Barbaux, S., Rossato, M. (1998) High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum. Reprod.*, 13, 302–307.
- Foresta, C., Ferlin, A., Moro, E. (2000) Deletion and expression analysis of *AZF* genes on the human Y chromosome revealed a major role for *DBY* in male infertility. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1161–1169.
- Foresta, C., Moro, E., Ferlin, A. (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 22, 226–239.
- Forster, P., Harding, R., Torroni, A., Bandelt, H. J. (1996) Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. *Amer. J. Hum. Genet.*, 59, 935–945.
- Gill, P., Brenner, C., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Jobling, M. A., De Knijff, P., Kayser, M., Krawczak, M., Mayr, W. R., Morling, N., Olaisen, B., Pascali, V., Prinz, M., Roewer, L., Schneider, P. M., Sajantila, A., Tyler-Smith, C. (2001) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci. Int.*, 124, 5–10.
- Hammer, M. F., Karafet, T. M., Redd, A. J., Jarjanazi, H., Santachiara-Benerecetti, S., Soodyall, H., Zegura, S. L. (2001) Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1189–1203.
- Hurles, M. E., Nicholson, J., Bosch, E., Renfrew, C., Sykes, B. C., Jobling, M. A. (2002) Y chromosomal evidence for the origins of oceanic-speaking peoples. *Genetics*, 160, 289–303.
- Jobling, M. A., Tyler-Smith, C. (2003) The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 598–612.
- Karafet, T. M., Zegura, S. L., Posukh, O., Osipova, L., Bergen, A., Long, J., Goldman, D., Klitz, W., Harihara, S., de, K. P., Wiebe, V., Griffiths, R. C., Templeton, A. R., Hammer, M. F. (1999) Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 817–831.
- Karafet, T., Xu, L., Du, R., Wang, W., Feng, S., Wells, R. S., Redd, A. J., Zegura, S. L., Hammer, M. F. (2001) Paternal population history of East Asia: Sources, patterns, and microevolutionary processes. *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 615–628.
- Karafet, T. M., Osipova, L. P., Gubina, M. A., Posukh, O. L., Zegura, S. L., Hammer, M. F. (2002) High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life. *Hum. Biol.*, 74, 761–789.
- Kasperaviciute, D., Kucinskas, V., Stoneking, M. (2004) Y chromosome and mitochondrial DNA variation in Lithuanians. *Ann. Hum. Genet.*, 68, 438–452.
- Kayser, M., Sajantila, A. (2001) Mutations at Y-STR loci: Implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci. Int.*, 118, 116–121.
- Kivisild, T., Rootsi, S., Metspalu, M., Mastana, S., Kaldma, K., Parik, J., Metspalu, E., Adojaan, M., Tolk, H. V., Stepanov, V., Golge, M., Usanga, E., Papiha, S. S., Cinnioglu, C., King, R., Cavalli-Sforza, L., Underhill, P. A., Villems, R. (2003) The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations. *Amer. J. Hum. Genet.*, 72, 313–332.
- Krausz, C., Forti, G., McElreavey, K. (2003) The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int. J. Androl.*, 26, 70–75.
- Lahn, B. T., Page, D. C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*, 278, 675–680.
- Laitinen, V., Lahermo, P., Sistonen, P., Savontaus, M. L. (2002) Y-chromosomal diversity suggests that Baltic males share common Finno-Ugric-speaking forefathers. *Hum. Hered.*, 53, 68–78.
- Lell, J. T., Sukernik, R. I., Starikovskaya, Y. B., Su, B., Jin, L., Schurr, T. G., Underhill, P. A., Wallace, D. C. (2002) The dual origin and Siberian affinities of Native American Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 70, 192–206.
- Lessig, R., Edelmann, J., Krawczak, M. (2001) Population genetics of Y-chromosomal microsatellites in Baltic males. *Forensic Sci. Int.*, 118, 153–157.
- Ma, K., Inglis, J. D., Sharkey, A., Bickmore, W. A., Hill, R. E., Prosser, E. J., Speed, R. M., Thomson, E. J., Jobling, M., Taylor, K. (1993) A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: Candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell*, 75, 1287–1295.
- Mansfield, E. S., Vainer, M., Enad, S., Barker, D. L., Harris, D., Rappaport, E., Fortina, P. (1996) Sensitivity, reproducibility, and accuracy in short tandem repeat genotyping using capillary array electrophoresis. *Genome Res.*, 6, 893–903.
- Mellars, P. A. (1992) Archaeology and the population-dispersal hypothesis of modern human origins in Europe. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 337, 225–234.
- Mumm, S., Molini, B., Terrell, J., Srivastava, A., Schlessinger, D. (1997) Evolutionary features of the 4-Mb Xq21.3 XY homology region revealed by a map at 60-kb resolution. *Genome Res.*, 7, 307–314.
- Otte, M. (2000) The History of European Populations as Seen by Archaeology. In: *Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe*. Renfrew, C., Boyle, K. (eds.). McDonald Institute Monographs, Cambridge, UK, pp. 41–44.
- Paracchini, S., Arredi, B., Chalk, R., Tyler-Smith, C. (2002) Hierarchical high-throughput SNP genotyping of the human Y chromosome using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, 30, e27.
- Passarino, G., Cavalleri, G. L., Lin, A. A., Cavalli-Sforza, L. L., Borresen-Dale, A. L., Underhill, P. A. (2002) Different genetic components in the Norwegian population revealed by the analysis of mtDNA and Y chromosome polymorphisms. *Eur. J. Hum. Genet.*, 10, 521–529.
- Qamar, R., Ayub, Q., Mohyuddin, A., Helgason, A., Mazhar, K., Mansoor, A., Zerjal, T., Tyler-Smith, C., Mehdi, S. Q. (2002) Y-chromosomal DNA variation in Pakistan. *Amer. J. Hum. Genet.*, 70, 1107–1124.

- Raicu, F., Popa, L., Apostol, P., Cimponeriu, D., Dan, L., Ilinca, E., Dracea, L. L., Marinescu, B., Gavrilă, L. (2003) Screening for microdeletions in human Y chromosome—AZF candidate genes and male infertility. *J. Cell. Mol. Med.*, **7**, 43–48.
- Raitio, M., Lindroos, K., Laukkanen, M., Pastinen, T., Sistonen, P., Sajantila, A., Syvanen, A. C. (2001) Y-chromosomal SNPs in Finno-Ugric-speaking populations analyzed by minisequencing on microarrays. *Genome Res.*, **11**, 471–482.
- Redd, A. J., Agellon, A. B., Kearney, V. A., Contreras, V. A., Karafet, T., Park, H., de Knijff, P., Butler, J. M., Hammer, M. F. (2002) Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. *Forensic Sci. Int.*, **130**, 97–111.
- Reijo, R., Lee, T. Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O. (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet.*, **10**, 383–393.
- Richards, M., Macaulay, V., Torroni, A., Bandelt, H. J. (2002) In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1168–1174.
- Rootsi, S., Magri, C., Kivisild, T., Benuzzi, G., Help, H., Bermisheva, M., Kutuev, I., Barac, L., Pericic, M., Balanovsky, O., Pshenichnov, A., Dion, D., Grobei, M., Zhivotovsky, L. A., Battaglia, V., Achilli, A., Al-Zahery, N., Parik, J., King, R., Cinnioglu, C., Khusnutdinova, E., Rudan, P., Balanovska, E., Scheffrahn, W., Simonescu, M., Brehm, A., Goncalves, R., Rosa, A., Moisan, J. P., Chaventre, A., Ferak, V., Furedi, S., Oefner, P. J., Shen, P., Beckman, L., Mikerezi, I., Terzic, R., Primorac, D., Cambon-homsen, A., Krumina, A., Torroni, A., Underhill, P. A., Santachiara-Benerecetti, A. S., Villems, R., Semino, O. (2004) Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Amer. J. Hum. Genet.*, **75**, 128–137.
- Rosser, Z. H., Zerjal, T., Hurler, M. E., Adojaan, M., Alavantic, D., Amorim, A., Amos, W., Armenteros, M., Arroyo, E., Barbujahi, G., Beckman, G., Beckman, L., Bertranpetit, J., Bosch, E., Bradley, D. G., Brede, G., Cooper, G., Corte-Real, H. B., de K. P., Decorte, R., Dubrova, Y. E., Evgrafov, O., Gilissen, A., Glisic, S., Golje, M., Hill, E. W., Jeziorowska, A., Kalaydjieva, L., Kayser, M., Kivisild, T., Kravchenko, S. A., Krumina, A., Kucinskas, V., Lavinha, J., Livshits, L. A., Malaspina, P., Maria, S., McElreavey, K., Meitinger, T. A., Mikelsaar, A. V., Mitchell, R. J., Nafa, K., Nicholson, J., Norby, S., Pandya, A., Parik, J., Patsalis, P. C., Pereira, L., Peterlin, B., Pielberg, G., Prata, M. J.; Previdere, C., Roewer, L., Rootsi, S., Rubinsztein, D. C., Saillard, J., Santos, F. R., Stefanescu, G., Sykes, B. C., Tolun, A., Villems, R., Tyler-Smith, C., Jobling, M. A. (2000) Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Amer. J. Hum. Genet.*, **67**, 1526–1543.
- Rozen, S., Skaletsky, H., Marszalek, J. D., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Page, D. C. (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*, **423**, 873–876.
- Sanchez, J. J., Borsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernandez, A., Morling, N. (2003) Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci. Int.*, **137**, 74–84.
- Schmalzing, D., Koutny, L., Chisholm, D., Adourian, A., Matsudaira, P., Ehrlich, D. (1999) Two-color multiplexed analysis of eight short tandem repeat loci with an electrophoretic microdevice. *Anal. Biochem.*, **270**, 148–152.
- Scozzari, R., Cruciani, F., Malaspina, P., Santolamazza, P., Ciminelli, B. M., Torroni, A., Modiano, D., Wallace, D. C., Kidd, K. K., Olckers, A., Moral, P., Terrenato, L., Akar, N., Qamar, R., Mansoor, A., Mehdi, S. Q., Meloni, G., Vona, G., Cole, D. E., Cai, W., Novelletto, A. (1997) Differential structuring of human populations for homologous X and Y microsatellite loci. *Amer. J. Hum. Genet.*, **61**, 719–733.
- Scozzari, R., Cruciani, F., Santolamazza, P., Malaspina, P., Torroni, A., Sellitto, D., Arredi, B., Destro-Bisol, G., De Stefano, G., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Modiano, D., Biondi, G., Moral, P., Olckers, A., Wallace, D. C., Novelletto, A. (1999) Combined use of biallelic and microsatellite Y-chromosome polymorphisms to infer affinities among African populations. *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 829–846.
- Scozzari, R., Cruciani, F., Pangrazio, A., Santolamazza, P., Vona, G., Moral, P., Latini, V., Varesi, L., Memmi, M. M., Romano, V., De Leo, G., Gennarelli, M., Jaruzelska, J., Villems, R., Parik, J., Macaulay, V., Torroni, A. (2001) Human Y-chromosome variation in the western Mediterranean area: Implications for the peopling of the region. *Hum. Immunol.*, **62**, 871–884.
- Semino, O., Passarino, G., Oefner, P. J., Lin, A. A., Arbuzova, S., Beckman, L. E., De Benedictis, G., Francalacci, P., Kouvatsi, A., Limborska, S., Marcikiae, M., Mika, A., Mika, B., Primorac, D., Santachiara-Benerecetti, A. S., Cavalli-Sforza, L. L., Underhill, P. A. (2000) The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: A Y chromosome perspective. *Science*, **290**, 1155–1159.
- Shriver, M. D., Smith, M. W., Jin, L., Marcini, A., Akey, J. M., Deka, R., Ferrell, R. E. (1997) Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 957–964.
- Simoni, M., Bakker, E., Eurlings, M. C., Matthijs, G., Moro, E., Muller, C. R., Vogt, P. H. (1999) Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int. J. Androl.*, **22**, 292–299.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfling, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S. P., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Rozen, S., Page, D. C. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, **423**, 825–837.
- Slatkin, M., Maddison, W. P. (1990) Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics*, **126**, 249–260.
- Tambets, K., Rootsi, S., Kivisild, T., Richard, V. (2001) The concepts of Richard Indreko about origin of Finno-Ugric speakers and the population genetics of the extant North-Eastern European populations. *Trames*, **5**, 59–74.
- Tambets, K., Rootsi, S., Kivisild, T., Help, H., Serk, P., Loogvali, E. L., Tolk, H. V., Reidla, M., Metspalu, E., Pliss, L., Balanovsky, O., Pshenichnov, A., Balanovska, E., Gubina, M., Zhadanov, S., Osipova, L., Damba, L., Voevoda, M., Kutuev, I., Bermisheva, M., Khusnutdinova, E., Gusar, V., Grechanina, E., Parik, J., Pennarun, E., Richard, C., Chaventre, A., Moisan, J. P., Barac, L., Pericic, M., Rudan, P., Terzic, R., Mikerezi, I., Krumina, A., Baumanis, V., Koziel, S., Rickards, O., De Stefano, G. F., Anagnou, N., Pappa, K. I., Michalodimitrakis, E., Ferak, V., Furedi, S., Komel, R., Beckman, L., Villems, R. (2004) The western and eastern roots of the Saami—the story of genetic “outliers” told by mitochondrial DNA and Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 661–682.
- Templeton, A. (2002) Out of Africa again and again. *Nature*, **416**, 45–51.
- Templeton, A. R., Routman, E., Phillips, C. A. (1995) Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**, 767–782.
- Thomson, R., Pritchard, J. K., Shen, P., Oefner, P. J., Feldman, M. W. (2000) Recent common ancestry of human Y chromosomes: Evidence from DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 7360–7365.
- Tiepolo, L., Zuffardi, O. (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, **34**, 119–124.
- Underhill, P. A., Jin, L., Lin, A. A., Mehdi, S. Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R. W., Cavalli-Sforza, L. L., Oefner, P. J. (1997) Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.*, **7**, 996–1005.
- Underhill, P. A., Shen, P., Lin, A. A., Jin, L., Passarino, G., Yang, W. H., Kauffman, E., Bonne-Tamir, B., Bertranpetit, J., Francalacci, P., Ibrahim, M., Jenkins, T., Kidd, J. R., Mehdi, S. Q., Seielstad, M. T., Wells, R. S., Piazza, A., Davis, R. W., Feldman, M. W., Cavalli-Sforza, L. L., Oefner, P. J.

- (2000) Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat. Genet.*, 26, 358–361.
- Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Shen, P., Mirazon, L. M., Foley, R. A., Oefner, P. J., Cavalli-Sforza, L. L. (2001) The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.*, 65, 43–62.
- Van der Ven, K., Montag, M., Peschka, B., Leygraaf, J., Schwanz, G., Haidl, G., Krebs, D., Van der Ven, H. (1997) Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 699–704.
- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K., Wilson, A. C. (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253, 1503–1507.
- Vot, P. H., Edelman, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kieseewetter, F., Kohn, F. M., Schill, W. B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H. M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Grone, H. J., Jung, A., Engel, W., Haidl, G. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 933–943.
- Wells, R. S., Yuldasheva, N., Ruzibakiev, R., Underhill, P. A., Evseeva, I., Blue-Smith, J., Jin, L., Su, B., Pitchappan, R., Shanmugalakshmi, S., Balakrishnan, K., Read, M., Pearson, N. M., Zerjal, T., Webster, M. T., Zholoshvili, I., Jamarjashvili, E., Gambarov, S., Nikbin, B., Dostiev, A., Aknazarov, O., Zalloua, P., Tsoy, I., Kitaev, M., Mirrakhimov, M., Chariev, A., Bodmer, W. F. (2001) The Eurasian heartland: A continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 10244–10249.
- Woolley, A. T., Mathies, R. A. (1994) Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 11348–11352.
- Zegura, S. L., Karafet, T. M., Zhivotovsky, L. A., Hammer, M. F. (2004) High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol. Biol. Evol.*, 21, 164–175.
- Zerjal, T., Dashnyam, B., Pandya, A., Kayser, M., Roewer, L., Santos, F. R., Schiefenhover, W., Fretwell, N., Jobling, M. A., Harihar, S., Shimizu, K., Semjida, D., Sajantila, A., Salo, P., Crawford, M. H., Ginter, E. K., Evgrafov, O. V., Tyler-Smith, C. (1997) Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Amer. J. Hum. Genet.*, 60, 1174–1183.
- Zerjal, T., Beckman, L., Beckman, G., Mikelsaar, A. V., Krumina, A., Kucinskas, V., Hurles, M. E., Tyler-Smith, C. (2001) Geographical, linguistic, and cultural influences on genetic diversity: Y-chromosomal distribution in Northern European populations. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1077–1087.
- Zerjal, T., Wells, R. S., Yuldasheva, N., Ruzibakiev, R., Tyler-Smith, C. (2002) A genetic landscape reshaped by recent events: Y-chromosomal insights into central Asia. *Amer. J. Hum. Genet.*, 71, 466–482.
- Zhivotovsky, L. A. (2001) Estimating divergence time with the use of microsatellite genetic distances: impacts of population growth and gene flow. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 700–709.

Received 14 June 2005

Y HROMOSOMA UN TĀS LOMA CILVĒKA PATOLOĢIJAS UN POPULĀCIJU FILOĢENĒTISKAJOS PĒTĪJUMOS

Datādu populāciju ģenētiskās daudzveidības pētījumi ļauj labāk izprast cilvēces vēsturi un *Homo sapiens sapiens* ģeogrāfisko izplatību. Y hromosoma ir īpaši pakļauta gēnu dreifam un ciltstēva efektam, tāpēc Y hromosomas lokusu pētījumi dod priekšstatu par mūsdienu populāciju izcelsmi, migrācijas ceļiem, daudzveidību, kā arī ļauj noteikt Y hromosomā notikušo strukturālo izmaiņu korelāciju ar vīriešu neauglību. Lai noteiktu Latvijas populācijas Y hromosomas ģenētisko heterogenitāti un salīdzinātu to ar citām Eiropas populācijām, ir nepieciešami detalizēti Y hromosomas bināro marķieru un īso tandēmisko atkārtojumu polimorfismu pētījumi. Savukārt, lai spriestu par Latvijā dzīvojošo vīriešu reproduktīvās patoloģijas korelāciju ar Y hromosomā atklātām mikrodelēcijām, nepieciešama Y hromosomas azoospermijas faktora rajona analīze.