



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana OGRINC

**IZDELAVA GENOMSKEGA ATLASA
KANDIDATNIH GENOV ZA REPRODUKCIJO
PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana OGRINC

**IZDELAVA GENOMSKEGA ATLASA
KANDIDATNIH GENOV ZA REPRODUKCIJO
PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**DEVELOPMENT OF GENOMIC ATLAS OF
CANDIDATE GENES FOR
MALE REPRODUCTION IN MAMMALS**

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje - Biotehnologija. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Tanjo Kunej in za somentorja prof. dr. Simona Horvata.

Recenzent: doc. dr. Jernej JAKŠE

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentorica: prof. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Somentor: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Recenzent: doc. dr. Jernej JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ana Ogrinc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 575:57.017.5(043.2)
KG	genetika/genomika/genomski atlas/kandidatni geni/sesalci/reprodukcija/moški spol/laboratorijske miši
AV	OGRINC, Ana
SA	KUNEJ, Tanja (mentorica)/HORVAT, Simon (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	IZDELAVA GENOMSKEGA ATLASA KANDIDATNIH GENOV ZA REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XI, 62 str., 7 pregl., 3 sl., 175 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Raziskave genomike reprodukcije pri sesalcih so pomembne iz dveh glavnih razlogov: 1.) z neplodnostjo se v moderni družbi sreča že kar vsak šesti par in pri 30% neplodnih parov so vzroki pri moškem; 2.) odkrivanje genov, povezanih z dobrimi reproduktivnimi lastnostmi, je zelo pomembno pri vzreji domačih živali. Neplodnost je pogosto posledica različnih genetskih nepravilnosti med katerimi jih je veliko še neznanih. Reprodukcijsko preučujejo številne raziskovalne skupine z različnimi raziskovalnimi pristopi, zato so genomske informacije zelo razpršene v različnih podatkovnih zbirkah in publikacijah. Namen naloge je zato bil izdelati centralno spletno mesto za zbiranje in urejanje genetskih lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Iz različnih podatkovnih zbirk smo zbrali 1069 različnih lokusov, ki so bili do sedaj povezani z zmanjšano reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Združili smo podatke pridobljene pri različnih živalskih vrstah (človek, bik, konj, merjasec, oven, miš, in podgana) in z različnimi raziskovalnimi pristopi kot so: različice v številu kopij, kvantitativni lokusi, dedni sindromi in razvojne nepravilnosti, ki vsebujejo neplodnost v svoji klinični sliki, modeli miši, asociacijske študije, transkriptomске študije, nekodirajoče RNA, proteomske, metabolomske in epigenomske študije. Na osnovi razvite zbirke smo z uporabo bioinformatičnega orodja DAVID Bioinformatics Resources 6.7 izvedli obogatitveno analizo kandidatnih genov in ugotovili, da so zbrani geni uvrščeni v 263 bioloških poti. Trinajst genov, prisotnih v vsaki izmed prvih desetih bioloških poti, smo predlagali za močnejše kandidatne gene odgovorne za reprodukcijo pri sesalcih. To napoved smo preverili na eksperimentalnih podatkih iz podatkovne zbirke MPD (angl. <i>Mouse Phenome Database</i>). Primerjali smo dve plodni (C57BL/6J, FVB/NJ) in dve slabo plodni inbridirani mišji liniji (AKR/J, C3H/HeJ), ki se razlikujejo glede na število semenčic v semenski tekočini. Pri šestih izmed 13 predlaganih kandidatnih genov smo našli razlike v razporeditvi alelov med plodnimi in manj plodnimi linijami: <i>Brca2</i> , <i>Pafah1b1</i> , <i>Oca2</i> , <i>Zbtb16</i> , <i>Fancg</i> in <i>Kit</i> . Izdelani seznam kandidatnih genov je primeren za eksperimentalno preverjanje v medicini in živalih ter za izdelavo genskega testa, za identifikacijo lokusov povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDC 575:636.2(043.2)=163.6
 CX genetics/genomics/genomic atlas/candidate genes/mammals/male reproduction/laboratory mice
 AU OGRINC, Ana
 AA KUNEJ, Tanja (supervisor)/HORVAT, Simon (co-supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study in Biotechnology
 PY 2013
 TI DEVELOPMENT OF GENOMIC ATLAS OF CANDIDATE GENES FOR MALE REPRODUCTION IN MAMMALS
 DT M.Sc. thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)
 NO XI, 62 p., 7 tab., 3 fig., 175 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Studies of mammalian reproductive genomics are important for two main reasons: 1) infertility is a common problem in the modern society affecting one in six couples with an estimate of 30% male infertility 2) identification of genes associated with good reproductive traits is very important in animal breeding. Various genetic disorders are the cause for infertility, many of them are still unknown. A large number of research groups study reproduction using different research approaches hence genomic information is scattered in various databases and publications. The aim of this study was therefore to create a central online database for collection and compilation of genetics loci associated with male reproduction in mammals. We performed a literature search and assembled 1069 different genetic loci associated with male infertility. Data were integrated from different species (human, cattle, horse, pig, sheep, mouse, and rat) and by using different approaches including copy number variations, quantitative trait loci, syndromes and disorders displaying infertility, mouse models, association studies, transcriptomics, noncoding RNA, proteomic, metabolomics, and epigenetics studies. Data from the developed database were analyzed by bioinformatics tool »DAVID Bioinformatics Resources 6.7 to reveal pathway enrichment of candidate genes. This analysis demonstrated that the assembled genes occur in 263 statistically significant pathways. Thirteen genes present in each of the first ten most statistically significant biological pathways were proposed as stronger candidate genes responsible for male reproduction in mammals. This prediction was verified using experimental data from the MPD database (Mouse Phenome Database). We compared two fertile (C57BL/6J, FVB/NJ) and two less fertile inbred mouse lines (AKR/J, C3H/HeJ) which differ in the sperm count of ejaculate. In six out of the 13 proposed candidate genes we found differences in the distribution of alleles between fertile and less fertile mouse lines: *Brca2*, *Pafah1b1*, *Oca2*, *Zbtb16*, *Fancg*, and *Kit*. Our study therefore developed a database of candidate genes suitable for further experimental verification in medicine and animal breeding, and for development of gene-based therapeutic approaches or diagnostic genetic tests for male infertility in mammals.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
3 MATERIAL IN METODE	9
3.1 ZBIRANJE IN SINTEZA GENOMSKIH PODATKOV	9
3.2 IZDELAVA KATALOGA LOKUSOV, POVEZANIH Z REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV IN NJIHOVA GENOMSKA RAZPOREDITEV ..	10
3.3 ANALIZA BIOLOŠKIH POTI IN RAZVRŠČANJE KANDIDATNIH GENOV PO PRIORITETI	10
3.4 PREVERJANJE POVEZAVE KANDIDATNIH GENOV Z REPRODUKTIVNIMI LASTNOSTMI.....	11
4 REZULTATI	13
4.1 ZBIRANJE IN SINTEZA GENOMSKIH PODATKOV	13
4.1.1 Raven DNA	16
4.1.1.1 Različice v številu kopij (CNV)	17
4.1.1.2 Lokusi za kvantitativne lastnosti (QTL).....	17
4.1.1.3 Dedni sindromi in razvojne nepravilnosti z neplodnostjo v klinični sliki	18
4.1.1.4 Modeli miši - pristop iskanja kandidatnih genov	20
4.1.1.5 Asociacijske študije in iskanje mutacij.....	20
4.1.2 Raven RNA	22
4.1.2.1 Študije izražanja genov.....	22
4.1.2.2 Majhne nekodirajoče RNA.....	23
4.1.3 Raven proteinov	24

4.1.4 Epigenetika	26
4.2 IZDELAVA KATALOGA LOKUSOV, POVEZANIH Z REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV IN NJIHOVA GENOMSKA RAZPOREDITEV ..	28
4.3 ANALIZA BIOLOŠKIH POTI IN RAZVRŠČANJE KANDIDATNIH GENOV PO PRIORITETI	28
4.4 PREVERJANJE POVEZAVE KANDIDATNIH GENOV Z REPRODUKTIVNIMI LASTNOSTMI.....	33
5 RAZPRAVA	35
5.1 ZBIRANJE IN SINTEZA GENOMSKIH PODATKOV	35
5.1.1 Raven DNA	36
5.1.1.1 Različice v številu kopij (CNV)	36
5.1.1.2 Lokusi za kvantitativne lastnosti (QTL).....	36
5.1.1.3 Dedni sindromi in razvojne nepravilnosti z neplodnostjo v klinični sliki	37
5.1.1.4 Modeli miši - pristop iskanja kandidatnih genov	37
5.1.1.5 Asociacijske študije in iskanje mutacij.....	38
5.1.2 Raven RNA	40
5.1.2.1 Študije izražanja genov.....	40
5.1.2.2 Majhne nekodirajoče RNA	41
5.1.3 Raven proteinov	42
5.1.4 Epigenetika	43
5.2 IZDELAVA KATALOGA LOKUSOV, POVEZANIH Z REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV IN NJIHOVA GENOMSKA RAZPOREDITEV ..	43
5.3 ANALIZA BIOLOŠKIH POTI IN RAZVRŠČANJE KANDIDATNIH GENOV PO PRIORITETI	44
5.4 PREVERJANJE POVEZAVE KANDIDATNIH GENOV Z REPRODUKTIVNIMI LASTNOSTMI.....	45
6 SKLEPI	47
7 POVZETEK	49
8 VIRI	51
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Raziskovalni pristopi oz. tipi lokusov povezanih s posameznimi omikami ter živalske vrste pri katerih so te lokuse povezali z moško neplodnostjo.	14
Preglednica 2: Pregled metod za študij neplodnosti pri moških glede na posamezne omike. Veliko metod je naštetih z angleškim izrazom, saj slovenska različica ne obstaja ali pa se ne uporablja.	15
Preglednica 3: Dedni sindromi in razvojne nepravilnosti, ki vsebujejo neplodnost v svoji klinični sliki.	19
Preglednica 4: Preglednica prikazuje prvih deset najbolj pomembnih bioloških poti glede na p-vrednost in Bonferroni statistiko.	29
Preglednica 5: Preglednica prikazuje seznam genov, ki se pojavljajo v večjem številu najbolj pomembnih bioloških poti glede na analizo z bioinformacijskim orodjem DAVID.	30
Preglednica 6: Seznam statistično najbolj značilnih kandidatnih genov povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Preglednica prikazuje gene, ki se pojavijo v vseh desetih ali devetih izmed prvih deset statistično najbolj značilnih bioloških poti glede na p-vrednost in Bonferroni p-vrednost.	31
Preglednica 7: Seznam šestih kandidatnih genov, v katerih se pojavljajo SNP-ji, ki imajo različne alele med plodnimi in neplodnimi inbridiranimi mišjimi linijami. Preglednica prikazuje tudi lokacijo SNP-ja v genu ter biotip posamezne mutacije.	35

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Slika iz domače strani raziskovalne skupine Integratomics TIME, ki prikazuje idejo novega načina raziskovanja kompleksnih bolezni. Prikazuje združitev različnih omik, kot so genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika, miRNomika in epigenomika (Integratomics TIME, 2013).	8
Slika 2: Slika iz MPD, ki prikazuje 14 inbridiranih linij miši, ki se razlikujejo v reprodukcijskih lastnostih. Samci imajo v semenski tekočini prisotno različno število semenčic. Z rdečima pravokotnikoma so označene linije, katere smo izbrali za testiranje seznama naših predlaganih kandidatnih genov (Mouse Phenome Database. 2013).	12
Slika 3: Slika prikazuje posnetek zaslona (angl. print screen) dela preglednice v Excelu s 509 vrsticami v kateri je prikazana razporeditev alelov posameznih genov med plodnimi in neplodnimi linijami miši. V rdečem okvirčku je prikazana razporeditev alelov, kjer sta imeli plodni liniji miši drugačen alel od neplodnih.	34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-D DIGE	dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza (angl. <i>two-dimensional differential gel electrophoresis</i>)
A	adenin
array-CGH	na mikromrežah osnovana primerjalna genomska hibridizacija (angl. <i>array based comparative genome hybridization</i>)
ART	umetna oploditev (angl. <i>artificial reproductive technologie</i>)
AZF	regija dejavnika za azoospermijo (angl. <i>AZoospermia Factor region</i>)
cAMP	ciklični adenzin monofostfat (angl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CBAVD	kongenitalna obojestranska odsotnost semenovoda (angl. <i>congenital bilateral absence of the vas deferens</i>)
CF	cistična fibroza (angl. <i>cystic fibrosis</i>)
CNV	različice v številu kopij (angl. <i>copy number variants</i>)
DCN	decorin
DMR	diferencialno metilirane regije (angl. <i>differentially methylated region</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
FSH	folikle stimulirajoči hormon (angl. <i>follicle stimulating hormone</i>)
GMOD	(angl. <i>Generic Model Organism Database</i>)
GWAS	asociacijska študija na ravni celotnega genoma (angl. <i>genome-wide association studies</i>)
HSA	človeški serumski albumin (angl. <i>human serum albumin</i>)
ICSI	vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice (angl. <i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
kb	kilo baza
KO	mišji modeli z izbitim genom (angl. <i>mouse knock-out models</i>)
MALDI-TOF	(angl. <i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>)
MAPH	mnogokratno namnoževanje sonde za hibridizacijo (angl. <i>multiplex amplifiable probe hybridization</i>)
MGI	podatkovna zbirka » <i>Mouse genome informatics</i> «

MPD	podatkovna zbirka za fenom miši (angl. <i>Mouse Phenome Database</i>)
mRNA	informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
mtDNA	mitohondrijska DNA (angl. <i>mitochondrial DNA</i>)
ncRNA	nekodirajoča RNA (angl. <i>non-coding RNA</i>)
OMIM	podatkovna zbirka » <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> «
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
piRNA	(angl. <i>piRNA like RNA</i>)
PIP	prolaktin inducibilni protein (angl. <i>prolactin inducible protein</i>)
piRNA	(angl. <i>Piwi-interacting RNA</i>)
rasiRNA	(angl. <i>Repeat associated small interfering RNA</i>)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RGD	podatkovna zbirka » <i>Rat genome database</i> «
RNAi	interferenčna RNA (angl. <i>interference RNA</i>)
SCOS	sindrom sertolijevih celic (angl. <i>Sertoli-cell-only syndrome</i>)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem (angl. <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>quantitative PCR assay</i>)
QTL	lokusi za kvantitativne lastnosti (angl. <i>quantitative trait loci</i>)
T	timin (angl. <i>thymine</i>)
TBP	TATA-vezavni protein (angl. <i>TATA-binding protein</i>)
UTR	neprevedljivo območje (angl. <i>untranslated region</i>)

1 UVOD

Neplodnost je čedalje pogostejši problem moderne družbe. Z njo se sreča vsak šesti par, kar predstavlja 15% ljudi, ki načrtuje družino. Pri 30% neplodnih parov so vzroki pri moškem (Drozdik in sod., 2009; Harton inTempest, 2011). Neplodnost je definirana kot nezmožnost moškega, da v 12 mesecih rednih, nezaščitnih, spolnih odnosov uspe oploditi žensko (Hackstein in sod., 2000). Kar pri 30-45% neplodnih moških ne znamo določiti vzroka nepravilnosti v procesu spermatogeneze. Slednje patološko stanje imenujemo nepojasnjena neplodnost (angl. *idiopathic male infertility*) (Jungwirth in sod., 2012). Termin nepojasnjena neplodnost se uporablja samo v primeru, če za neplodni fenotip ni kriv kateri od poznanih vzrokov neplodnosti. Med slednje uvrščamo npr. avtoimunost semenčic (angl. *sperm autoimmunity*), nepravilnosti pri ejakulaciji/seksu (angl. *sexual and/or ejaculatory dysfunction*), kriptorhizem (angl. *cryptorchidism*), pridobljena poškodba testisov (angl. *acquired testicular damage*), vzrok pa so lahko tudi droge, obsevanje, varikokela (angl. *varicocele*), vnetje moških spolnih žlez (angl. *male accessory gland infection*) ali pa različni endokrini vzroki in kongenitalna obojestranska odsotnost semenovoda (angl. *congenital bilateral absence of the vas deferens*; CBAVD), hipogonadotropni hipogonadizem (angl. *hypogonadotrophic hypogonadism*), cistična fibroza (angl. *cystic fibrosis*; CF), miotonična distrofija (angl. *myotonic dystrophy*), hipospadija (angl. *hypospadias*), atrofija testisov (angl. *testis atrophy*) ter kromosomske mutacije. Neplodne moške lahko razvrstimo v naslednje skupine (oz. v kombinacijo teh skupin): nepojasnjena oligospermija (koncentracija semenske tekočine je med 0–20 milijonov ml⁻¹), nepojasnjena astenospermija (koncentracija semenske tekočine je nad 20 milijonov ml⁻¹, vendar so semenčica slabo gibljiva), nepojasnjena teratospermija (koncentracija in gibljivost sta normalni, vendar so semenčica morfološko nepravilna), nepojasnjena azospermija (v semenski tekočini ni semenčic) (Hackstein in sod., 2000).

Kromosomske nepravilnosti, tako strukturne kot številčne, so bile med prvimi genetskimi označevalci in so v večini primerov povezane s težavami pri reprodukciji. Moški z nenormalnim kariotipom imajo namreč zelo povečano tveganje za produkcijo aneuploidne sperme (Harton inTempest, 2011). Vendar pa moramo poudariti, da smo se v tej magistrski nalogi osredotočili samo na molekularne vzroke neplodnosti in zato kromosomskih

nepravilnosti nismo posebej izpostavljali. Citogenetski vzroki neplodnosti so namreč zelo obširno področje in tako presegajo okvir te naloge. Naš namen je bil osredotočiti se na nepojasnjeno neplodnost, saj kljub napredku na področju genetike še vedno ne poznamo vzroka za približno 50% primerov neplodnosti (Krausz, 2011). Slednji zaskrbljujoči podatek smo vzeli za izziv in se odločili raziskati to področje.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil izdelati centralno spletno mesto za raziskave genetskih lokusov povezanih z neplodnostjo pri moškem spolu sesalcev. Neplodnost je namreč kompleksen problem, saj k njej prispevajo številni dejavniki, zato smo želeli z "omskim" pristopom ter z uporabo systemske biologije zbrati in urediti vse lokuse ter kandidatne gene razporediti po prioriteti in s tem identificirati tiste z večjim vplivom na neplodnost. Združili smo podatke, povezane z neplodnostjo pri različnih živalskih vrstah (človek, bik, merjasec, konj, oven, miš in podgana) z različnimi raziskovalnimi pristopi. Namen je bil pripraviti katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev, lokuse analizirati z bioinformacijskimi orodji in poiskati močnejše kandidatne gene za neplodnost. Poiskali smo biološke poti, ki so pomembno povezane z geni iz našega seznama. V naslednjem koraku smo želeli izbrane gene preveriti pri miših in sicer s primerjavo razlik v nukleotidnem zaporedju med plodnimi in neplodnimi linijami miši. Končni namen te raziskovalne naloge je bil izdelati seznam kandidatnih genov, ki imajo potencial kot geni z močnejšim vplivom pri neplodnosti, prihodnje raziskave pa bodo pokazale če so le-te dobri kandidati tudi za diagnostični test za identifikacijo vzroka neplodnosti pri moških z nepojasnjeno neplodnostjo.

1.2 HIPOTEZA

1. S pristopom integracije genomskih podatkov je možno identificirati prioritete kandidatne gene, ki so v največji meri odgovorni za neplodnost pri moškem spolu sesalcev.
2. Z integracijo vseh do sedaj poznanih genetskih vzrokov neplodnosti je možno identificirati pomembne biološke poti, ki bi jih bilo možno razviti v biomarkerje (angl. *pathway-based biomarkers*).

2 PREGLED OBJAV

V zadnjem desetletju zaradi velikega napredka znanosti veliko bolje poznamo biologijo moških spolnih celic. Neplodnost sedaj učinkoviteje diagnosticiramo in jo v veliko primerih lahko tudi pozdravimo. Slednje je rezultat združitve moči proteomike, biokemije, funkcionalne genomike in primerjalne integratomike (angl. *comparative integratomics*). Pristop primerjalne integratomike nam omogoča združitev podatkov o reprodukciji pri različnih živalskih vrstah, ne glede na raziskovalni pristop s katerim so bili pridobljeni (Cannistraci in sod., 2013). V prihodnosti veliko obeta sistemska biologija z novimi orodji, katera prinaša "omska" revolucija (Baker in sod., 2012). Do sedaj je bilo z reprodukcijo pri različnih sesalskih vrstah povezanih več kot 800 genetskih lokusov (Ogorevc in sod., 2011), kljub temu pa se dandanes pred vstopom v postopke oploditve z biomedicinsko pomočjo, pri moških, rutinsko testira le nekaj genetskih vzrokov, kot so kromosomske nepravilnosti in mikrodelecije kromosoma Y, predvsem zaradi pomanjkanja znanja o genih oz. mutacijah vpletenih v moško neplodnost (Peterlin in sod., 2004; Krausz, 2011). Z neplodnostjo so bile povezane tudi nepravilnosti pri mitohondrijski DNA (mtDNA), kot so točkovne mutacije, delecije in prisotnost določenih mtDNA haploskupin (angl. *haplogroup*). Na plodnost vpliva celo količina mtDNA, v spermi neplodnih posameznikov so namreč dokazali višjo koncentracijo mtDNA (May-Panloup in sod., 2003). Za pravilen potek spermatogeneze je prav tako zelo pomembna ustrezna dinamika sterolov, saj se tekom zorenja semenčic odvijajo spremembe v lipidni sestavi membrane semenčic, katere pa so pomembne za morebitno kasnejšo oploditev (Keber in sod., 2013). Spermatogeneza je torej kompleksen proces v katerega je udeleženih veliko število genov, zato je zelo verjetno, da je veliko neplodnih fenotipov posledica genetskih nepravilnosti (Reijo in sod., 1995; Aston in Carrell, 2009).

Testisi imajo specializiran transkripcijski kompleks, ki precizno uravnava izražanje genov in tako vodi zapleten diferenciacijski proces spermatogeneze. V testisih je povečano izražanje družine TATA-vezavnega proteina (angl. *TATA-binding protein*; TBP) in njenih kofaktorjev. Številni rezultati nakazujejo, da naj bi bil prepisovalni dejavnik, odzivni modulator cikličnega adenozin monofosfata (angl. *cAMP-response-element modulator*;

CREM), odgovoren za pot signalne transdukcije cAMP in naj bi s tem nadzoroval izražanje ključnih testis-specifičnih genov. Testis-specifični geni s promotorji, ki jih prepozna CREM, so zato kandidadni geni za moško neplodnost (*ACR*, *CAMK4*, *PRM1*, *PRM2*, *TNP1* in *TNP2*) (Kimmins, 2004). Yan in sod. (2010) so ugotovili, da protein ZMYND15 deluje kot represor in je nadzorovan s histonsko deacetilazo. Zadolžen je za normalno izražanje genov haploidne celice tekom procesa spermatogeneze. ZMYND15 je prvi transkripcijski represor, ki so mu pripisali ključno vlogo v procesu spermatogeneze, posledično pa je zato tudi morebitni vzrok marsikaterega primera neplodnosti.

Želimo si, da bi pojasnitev genetskega ozadja neplodnih fenotipov prinesla nova spoznanja in bi bilo v bodoče s tem omogočeno učinkovitejše zdravljenje neplodnih moških (O'Flynn O'Brien in sod., 2010). Eno izmed tovrstnih pomembnih odkritij je, da povečana prisotnost -211T alela v promotorju beta podenote folikle stimulirajočega hormona (FSH) sovpada z nižjo koncentracijo FSH-ja pri neplodnih moških. Ta genetski označevalec je zato mogoče uporabiti v klinični molekularni diagnostiki reprodukcijskega uspeha moških. Na ta način lahko že pred začetkom terapije z veliko gotovostjo predvidimo, kateri pacienti se bodo pozitivno odzvali na zdravljenje s FSH (Grigorova in sod., 2009).

Kot je bilo že omenjeno je neplodnost kompleksen problem in k njej prispevajo številni dejavniki. Tako je lahko tudi posledica sprememb v različicah števila kopij (angl. *copy number variants*; CNV), ki vplivajo na gensko dozo ali pa na aktivnost posameznih genov, pomembnih za spermatogenezo. Slednje ni nič presenetljivega, saj lahko ta tip variacij vključuje milijone baz DNA in s tem obsega celotne gene in njihove regulatorne regije (Feuk in sod., 2006). Feuk in sod. (2006) definirajo CNV kot odsek DNA, dolg eno kb ali več, ki se pojavi v drugačnem številu kopij, kot v referenčnem genomu. V študijah, kjer preučujejo CNV-je, raziskovalci zberejo dve skupini osebkov, neplodne in plodne, ki služijo za kontrolo. Osebkom odvzamejo biološki material, izolirajo DNA, nato pa iščejo morebitne CNV-je s tehnikami kot so: na mikromrežah osnovana primerjalna genomska hibridizacija, genotipizacijske mreže za polimorfizem posameznih nukleotidov, kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. *quantitative PCR assay*; qPCR), mnogokratno namnoževanje sonde za hibridizacijo (angl. *multiplex amplifiable probe hybridization*; MAPH) in fluorescentna »*in-situ*« hibridizacija.

Omeniti velja tudi, da so pri domačih živalih reprodukcijske lastnosti zelo pomembne, ampak težko merljive. Tu je prvi korak na poti, odkrivanja odgovornih genov, mapiranje lokusov za kvantitativne lastnosti (angl. *quantitative trait loci*; QTL). Območja v genomu, ki so z uporabo statistike spoznana za hipotetično odgovorna za genetsko variacijo v določeni lastnosti, imenujemo QTL. Določanje QTL poteka eksperimentalno, tako da preučujemo populacijo živali z znanim rodovnikom, parjenih po posebnem vzorcu, ki je bil zasnovan tako, da bi opazili genetsko segregacijo (Hu in sod., 2012; Ren in sod., 2009). Poznamo tudi nekaj dednih sindromov in razvojnih nepravilnostih, ki vodijo v moško neplodnost. To so npr. precej pogost Kallmannov sindrom, cistična fibroza in prirojena dvostranska odsotnost (Hardelin in sod., 2008). K boljšemu razumevanju reprodukcijskih problemov ljudi lahko veliko doprinesejo raziskave na živalskih modelih. Transgeni ter mutirani modeli miši s plodnostnim fenotipom (modeli z izbitim genom, (angl. *mouse knockouts*), s prekomernim izražanjem genov (angl. *overexpression transgenics*) spontane ter inducirane mutantne linije) pomagajo pri iskanju genetskih mutacij, ki vodijo v neplodnost pri človeku (Escalier, 2006). Pristop iskanja kandidatnih genov (pristop reverzne genetike), katerega namen je poiskati genetske vzroke neplodnosti, poteka tako, da prvo poiščemo gene, ki so nefunkcionalni pri neplodnih živalih. V naslednjem koraku pa tem genom v ustrezni podatkovni zbirki poiščemo ortologe pri ljudeh, tako da uporabimo karte sintenije (angl. *synteny maps*), seveda ob predpostavki, da so geni ohranjeni skozi evolucijo (El Inati in sod., 2012). Z namenom študija genov in mehanizmov, ki so ključni za reprodukcijo, so Yatsenko in sod. (2010) naredili mišje mutante, katerim manjkajo ključni proteini za različne stopnje spermatogeneze. Zavedati se moramo, da vseh genetskih informacij, ki jih pridobimo na živalskih študijah, ne moremo neposredno prenesti na človeka. Kljub temu, pa nam poznavanje genomskega zaporedja različnih živalskih vrst, ponuja možnost integracije podatkov (Yatsenko in sod., 2010). Prav tako, lahko v literaturi najdemo mnoge kandidatne gene, ki naj bi bili ključni za spermatogenezo in posledično zatorej povezani z moško neplodnostjo. V večini študij še vedno uporabljajo star pristop iskanja kandidatnih genov. Različne polimorfizeme posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphisms*; SNP) skušajo povezati z različnimi tipi moške neplodnosti. Namen asociacijskih študij je preučiti ali je mutacija v nekem genu odgovorna za določen fenotip, v tem primeru za neplodnost. Da bi preučili ali polimorfizem posameznega gena vpliva na plodnost, v tovrstnih študijah, ki veljajo za

starejši pristop asociacijskih študij, testirajo skupino neplodnih moških in kontrolno skupino plodnih, ter gledajo ali je moč najti razlike v SNP-jih preučevanega gena. V ta namen se uporabljajo metode kot je: neposredno (direktno) sekvenciranje, tehnika enoverižnega konformacijskega polimorfizma (angl. *Single Strand Conformation Polymorphism*; SSCP), pirosekvenciranje kateremu sledi elektroforeza in pa metoda PCR-RFLP (verižna reakcija s polimerazo, kateri sledi polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov; angl. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Učinkovitejši pristop pa so asociacijske študije, ki potekajo na celotnem genomu (angl. *genome-wide association studies*; GWAS). Le te omogočajo iskanje genetskih različic povezanih s poslabšano spermatogenezo na ravni celotnega genoma (Aston in sod., 2010).

Povečanje ponovitev števila nukleotidov je bilo prav tako povezano z neplodnostjo pri moških. Da bi preučili ta pojav, raziskovalci najpogosteje zberejo vzorce neplodnih moških in plodnih, ki služijo za kontrolo, nato odseke DNA, ki vsebujejo tarčno ponovitev nukleotidov, pomnožijo s PCR, kasneje pa za določitev števila ponovitev uporabijo sekvenciranje ali elektroforezo (Peterlin in sod., 2007). Naslednji način, ki nam tudi omogoča študij moške neplodnosti, so študije izražanja genov. Celostna analiza informacijskih molekul RNA (angl. *messenger RNA*; mRNA), ki se nahajajo v semenčici, z uporabo mikromrež, nam omogoča meritve izražanja tisočih genov v posameznem vzorcu sperme. Na ta način je mogoče identificirati nove genetske označevalce za moško neplodnost. Pridobljeni »molekulski podpis« pa lahko nato uporabimo, kot diagnostično podlago in na ta način določimo, kateri geni naj bodo tarče terapije v namen zdravljenja moške neplodnosti (He, 2006; Rockett in sod., 2004).

Seveda pa vsi kandidatni geni za moško neplodnost ne kodirajo proteinov, nekateri so namreč zapisi za nekodirajoče RNA (angl. *non-coding RNA*; ncRNA). Jedro odrasle semenčice tako vsebuje kompleksno populacijo molekul RNA, katere se ne prepisujejo v proteine. Z oploditvijo semenčice dostavi tovrstne molekule RNA v jajčno celico, kjer nato ekstragenomsko prispevajo k zgodnjem embrionalnem razvoju (Hamatani, 2012). Med ncRNA uvrščamo mikro RNA (miRNA), ki igrajo pomembno vlogo v spermatogenezi in so zelo verjetno povezane z neplodnostjo (He in sod., 2009). Grivna (2006) poroča, da so z

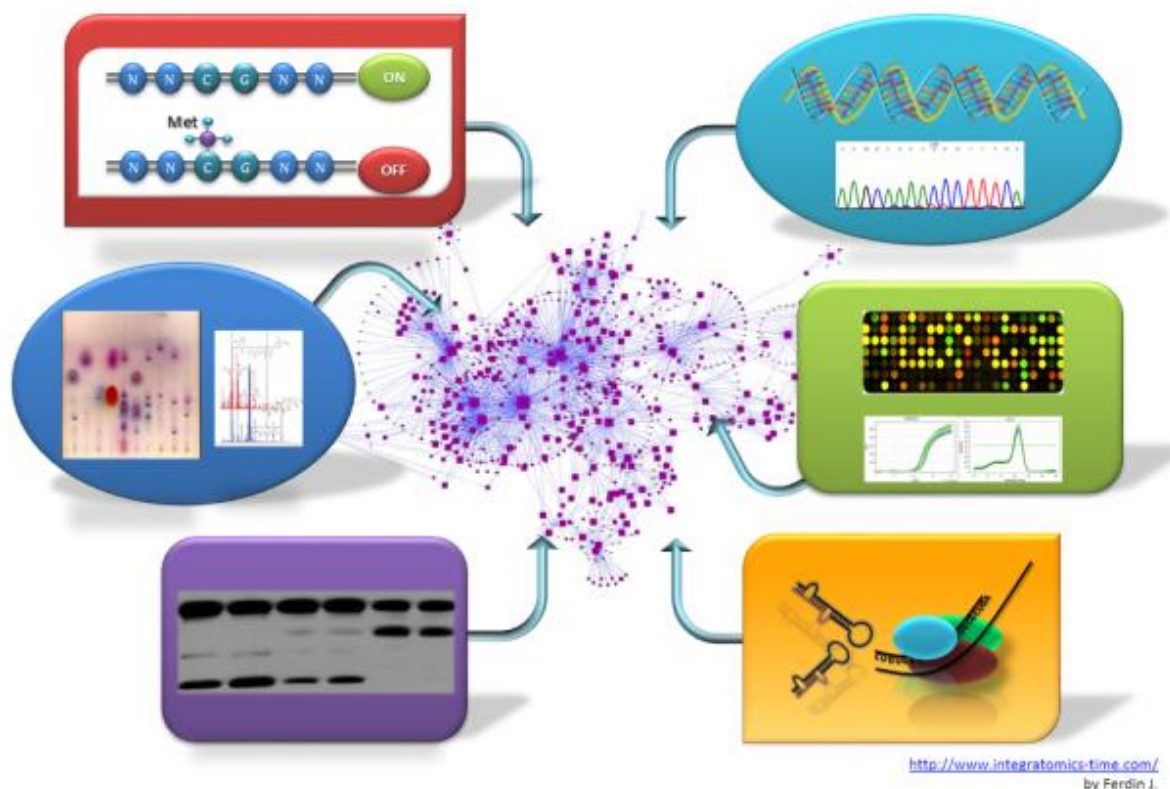
neplodnostjo najverjetneje povezane tudi piRNA (angl. *Piwi-interacting RNA*). Yan in sod. (2007) pa enako domnevajo za piRNA (angl. *piRNA like RNA*). Ne glede na vse, pa zagotovo drži, da imajo RNA semenčic potencial v raziskavah in diagnostiki moške neplodnosti (Hamatani, 2012).

Do danes so odkrili številne proteine, ki igrajo pomembno vlogo pri reprodukciji. Z uporabo proteomike lahko primerjamo različno izražanje proteinov med plodnimi in neplodnimi moškimi in tako najdemo odločilno pomembne proteine. Proteini so lahko preučevani s tehnikami kot je masna spektrometrija, kromatografske ločevalne tehnike, gelska elektroforeza, ko-immunoprecipitacija sklopljena z western blotom, lahko jih določimo z MALDI-TOF (angl. *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*) masno spektrometrijo ter še z nekaterimi redkeje uporabljenimi tehnikami (Thacker in sod., 2011). Na plodnost pa vpliva tudi nenormalno epigenetsko programiranje/reprogramiranje. Vzorce DNA metilacije je mogoče določati s pirosekvenciranjem ali pa jih ugotavljamo z metilacijsko specifično PCR reakcijo (angl. *methylation-specific polymerase chain reaction*) ter bisulfitno sekvenčno metodo. Rezultati študij nakazujejo, da nenormalna metilacija DNA testisov vodi v neplodnost. Khazamipour in sod. (2009) so tako opazili hipermetilacijo DNA testisov pri pacientih z azoospermijo, zaradi česar predvidevajo, da epigenetsko utišanje gena *MTHFR* vodi v azoospermijo.

Nedavni napredek v vnosu semenčic v citoplazmo jajčne celice (angl. *intracytoplasmic sperm injection*; ICSI) omogoča doseg nosečnosti tudi z uporabo sperme moških z oligospermijo, astenospermijo, teratospermijo in celo z azoospermijo (Mansourin sod., 2003; Ali in sod., 2009). Z ICSI tako obidemo prvotni problem, ampak pojavi pa se skrb, da smo s tem omogočili prenos letalnih genov iz očeta na potomce, kar je narava z očetovo neplodnostjo skušala preprečiti (Lai in sod., 2009). Kljub temu, da se zdi večina otrok, spočetih s pomočjo postopkov umetne oploditve, normalna, je pri njih moč zaznati rahlo povečanje aneuploidij spolnih kromosomov (od 0,07% do 0,4%) (O'Flynn in sod., 2010). S primerjavo naravno spočetih otrok in otrok spočetih z ICSI, starih pet let, so ugotovili, da imajo slednji povečano tveganje za prirojene deformacije, še posebno so povečane urogenitalne deformacije pri dečkih (Bonduelle in sod., 2005; Visser in Repping, 2010).

Preden izvedemo oploditev s postopkom ICSI je torej nujno genetsko svetovanje parom, ki se soočajo z moško neplodnostjo (Johnson, 1998).

Magistrska naloga je potekala v okviru širšega projekta raziskovalne skupine Integratomics TIME (slika 1), katere cilj je integracija genomskih podatkov in razvijanje novih biomarkerjev kompleksnih bolezni, kot so nalaganje maščobe, reprodukcija, kriporhizem, izguba sluha, in RASopatije. Raziskovalci omenjene skupine so že leta 2009 izdelali podatkovno zbirko kandidatnih genov in genetskih označevalcev za produkcijo mleka ter mastitis (Ogorevc in sod., 2009). V letu 2012 so objavili podatkovno zbirko in genomski pogled vseh lokusov povezanih z debelostjo (Kunej in sod., 2012). Pred kratkim pa je bila objavljena še podatkovna zbirka vseh lokusov povezanih s kriporhizmom, genomski pogled in biološke poti, v katerih se ti lokusi pojavljajo (Cannistraci in sod., 2013). Po zgledu omenjenih projektov raziskovalne skupine Integratomics TIME smo izdelali katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev.



Slika 1: Slika iz domače strani raziskovalne skupine Integratomics TIME, ki prikazuje idejo novega načina raziskovanja kompleksnih bolezni. Prikazuje združitev različnih omik, kot so genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika, miRNomika in epigenomika (Integratomics TIME, 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZBIRANJE IN SINTEZA GENOMSKIH PODATKOV

V različnih podatkovnih zbirkah smo poiskali vse lokuse, ki so bili do sedaj povezani z neplodnostjo pri moškem spolu sesalcev. Združili smo podatke pridobljene pri različnih živalskih vrstah (človek, miš, bik, merjasec, konj, oven in podgana) z različnimi raziskovalnimi pristopi. Zbirali smo podatke o: različicah v številu kopij; kvantitativnih lokusih; dednih sindromih in razvojnih nepravilnostih, ki vsebujejo neplodnost v svoji klinični sliki; transgenih ter mutiranih modelih miših s plodnostnim fenotipom (modeli z izbitim genom, s prekomernim izražanjem genov, spontanah ter induciranih mutantnih linijah); asociacijskih študijah na ravni celotnega genoma; diferencialno izraženih genih (raven mRNA); nekodirajočih molekulah RNA; proteomskih študijah in epigenetsko uravnanih genih. V raziskavi smo pregledali več kot 500 originalnih in preglednih znanstvenih člankov objavljenih do marca 2013.

Literaturo, povezano z moško neplodnostjo, smo pridobili iz National Center for Biotechnology Information - PubMed (NCBI-PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in Web of Science (<http://isiknowledge.com>), s pomočjo iskalnih izrazov: »genetics« (genetika), »gene candidates« (kandidatni geni), »male infertility« (moška neplodnost), »quantitative trait loci (QTL)« (lokusi za kvantitativne lastnosti), »microarray« (mikromreže), »association« (asociacija), »non-coding RNA (ncRNA)« (nekodirajoče RNA), »miRNA« (mikro RNA), »epigenetics« (epigenetika), »reproduction« (reprodukcija), »syndromes« (sindromi) in »ART (angl. *artificial reproductive technology*)« (umetna oploditev). Literaturo o moški neplodnosti, povezano s poskusi na živalih, smo zbrali iz podatkovnih zbirk Mouse Genome Informatics (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>), Reproductive Genomics Program (<http://reprogenomics.jax.org/>), Mouse Phenome Database (MPD) (<http://phenome.jax.org/>), podatkovne zbirke AnimalQTL (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>) in piRNABank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/index.shtml> (Marec 2013)).

Lokacijo za miRNA gene smo pridobili v Sanger miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/> (Release 19: August 2012)). Podatke za sindrome in razvojne nepravilnosti, z moško

neploidnostjo v klinični sliki, smo črpali iz podatkovne zbirke Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<http://omim.org/>).

3.2 IZDELAVA KATALOGA LOKUSOV, POVEZANIH Z REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV IN NJIHOVA GENOMSKA RAZPOREDITEV

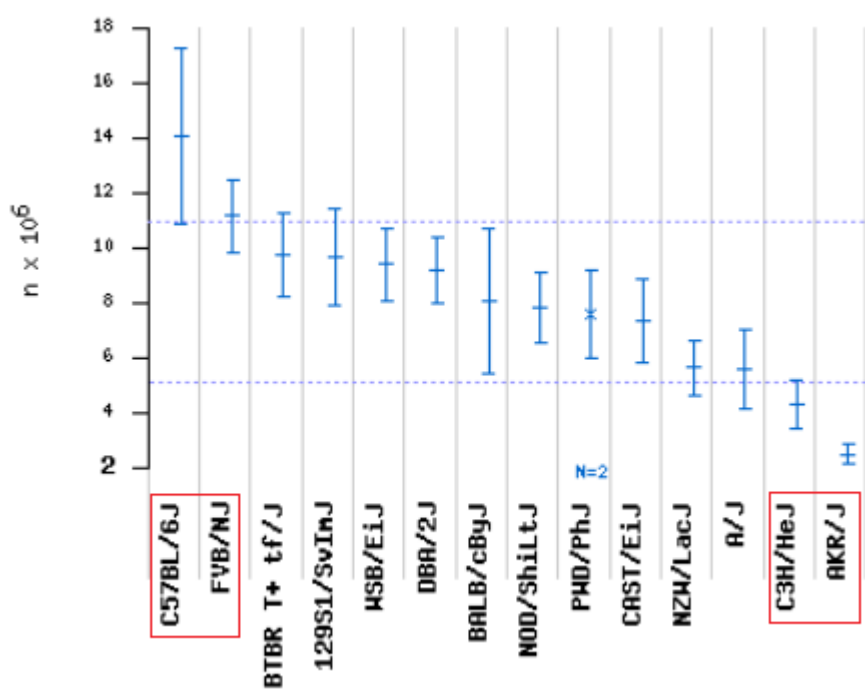
Izdelana podatkovna zbirka kandidatnih genov za moško neplodnost je dostopna na spletni strani Integratomics-TIME (http://www.integratomics-time.com/male_reproduction) in omogoča enostavno iskanje kandidatnih genov glede na različne kriterije. Kandidatni geni iz različnih živalskih vrst so bili zbrani in so predstavljeni, kot človeški ortologi. Terminologija zbranih genetskih lokusov je bila poenotena in preverjena na HGNC gene names (<http://www.genenames.org/>). Ortologe smo poiskali z uporabo Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Genom smo določili lokacijo na genski karti s pomočjo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). V primeru proteomskih študij pa smo ortologe proteinom poiskali v podatkovni zbirki UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Pregled kromosomskih lokacij lokusov povezanih z moško neplodnostjo smo tudi grafično predstavili v obliki genomskega prikaza (angl. *genomic view*), kot je bilo že predhodno opisano (Zorc in sod., 2012). Genomski pregled je izdelan s spletnim vizualizacijskim orodjem Flash GViewer (<http://gmod.org/wiki/Flashgviewer/>), katerega so razvili pri projektu GMOD.

3.3 ANALIZA BIOLOŠKIH POTI IN RAZVRŠČANJE KANDIDATNIH GENOV PO PRIORITETI

Zbrane lokuse, povezane z neplodnostjo, smo analizirali z bioinformatičnim orodjem DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang da in sod., 2007) ter tako izvedli obogatitveno analizo kandidatnih genov, kakor je bilo opisano v predhodni raziskavi Cannistraci in sod. (2013). V analizo bioloških poti smo lahko vključili človeške ortologe zbranih kandidatnih genov (826 genov). Za določitev značilnosti rezultata obogatitvene analize smo upoštevali Bonferronijevo statistiko (Bonferroni p-vrednost $< 0,0095$) in p-vrednost značilnosti rezultata, ki je morala biti manjša od 0,01. Orodje nam je omogočilo pridobiti seznam bioloških poti, ki vsebujejo kandidatne lokuse za neplodnost iz naše podatkovne zbirke.

3.4 PREVERJANJE POVEZAVE KANDIDATNIH GENOV Z REPRODUKTIVNIMI LASTNOSTMI

V naslednjem koraku smo želeli preveriti ali so geni, ki so se pojavili v vseh desetih bioloških poteh razlikujejo v reproduktivnih lastnosti na modelu miši. To smo naredili tako, da smo preverili ali obstajajo polimorfizmi znotraj predlaganih genov in če se ti SNP-ji razlikujejo med plodnimi in neplodnimi samci, se pravi ali imajo plodni samci drugačen alel določenega gena od neplodnih samcev. V podatkovni zbirki za fenom miši smo z orodjem za iskanje fenotipov poiskali linije miši, ki se razlikujejo v reprodukcijskih lastnostih. Osredotočili smo se na linije, katerih samci se razlikujejo v številu semenčic. Tovrstnim iskalnim kriterijem na MPD ustreza 14 inbridiranih linij miši, ki so prikazane na sliki 2. Izmed teh linij smo v nadaljnjo analizo vključili dve liniji, ki imata v semenski tekočini največ semenčic na mililiter ($14,1 \pm 7,12 \times 10^6$ in $11,2 \pm 3,00 \times 10^6$), to sta liniji C57BL/6J in FVB/NJ, in dve liniji, ki imata v semenski tekočini najmanj semenčic ($4,35 \pm 1,97 \times 10^6$ in $2,55 \pm 0,818 \times 10^6$), to pa sta liniji AKR/J in C3H/HeJ. V naslednjem koraku smo želeli preveriti ali se ti dve skupini miši razlikujeta v alelih predlaganih kandidatnih genov, se pravi ali ima plodna skupina drugačen alel posameznega gena kot neplodna skupina. To smo naredili z orodjem za preiskovanje genotipov v podatkovni zbirki MPD. Poiskali smo vse SNP-je prisotne predlaganih genih, nato pa iz celotnega seznama najdenih SNP-jev izbrali tiste, ki imajo različne alele med plodno in neplodno skupino miši.



Slika 2: Slika iz MPD, ki prikazuje 14 inbridiranih linij miši, ki se razlikujejo v reprodukcijskih lastnostih. Samci imajo v semenski tekočini prisotno različno število semenčic. Z rdečima pravokotnikoma so označene linije, katere smo izbrali za testiranje seznama naših predlaganih kandidatnih genov (Mouse Phenome Database. 2013).

4 REZULTATI

4.1 ZBIRANJE IN SINTEZA GENOMSKIH PODATKOV

S pregledovanjem podatkov, ki izvirajo iz različnih omik smo zbrali 1069 različnih lokusov (CNV, QTL, dedni sindromi in razvojne nepravilnosti, mutacije DNA in polimorfizmi, vzorci izražanja genov (raven RNA), majhne nekodirajoče RNA molekule (miRNA, piRNA), vzorci izražanja proteinov (angl. *protein expression profile*) in epigenetski dejavniki) (preglednica 1). Pristop primerjalne integratomika nam je omogočil združiti podatke o reprodukciji pri različnih živalskih vrstah, ne glede na raziskovalni pristop s katerim so bili pridobljeni. Različni raziskovalni pristopi in tehnike, ki se tu uporabljajo so prikazani v preglednici 2. Vse zbrane lokuse smo prikazali na enem genomskem pogledu, ki bo po objavi članka dostopen na spletni strani http://www.integratomics-time.com/male_reproduction/genomic_view/. Genomski pogled lokusov povezanih z neplodnostjo je izdelan s Flash GViewer, ki so ga oblikovali pri konzorciju GMOD (angl. *Generic Model Organism Database*).

Preglednica 1: Raziskovalni pristopi oz. tipi lokusov povezanih s posameznimi omikami ter živalske vrste pri katerih so te lokuse povezali z moško neplodnostjo.

	raziskovalni pristop/tip lokusa	vrste	
raven DNA	različice v številu kopij (CNV)	človek	
	kvantitativni lokusi (QTL)	merjasec, bik, oven, podgana, miš	
	dedni sindromi in razvojne nepravilnosti	človek	
	mišji modeli (pristop iskanja kandidatnih genov)	miš	
	asociacijske študije in iskanje mutacij	asociacijske študije na ravni celotnega genoma (GWAS)	človek, bik, merjasec
		polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP)	človek, konj, merjasec
sprememba števila ponovitev posameznih nukleotidov		človek	
raven RNA	študije izražanja protein-kodirajočih genov	človek, miš	
	majhne nekodirajoče molekule RNA	človek, merjasec, oven, podgana, miš	
raven proteinov		človek, bik, merjasec, miš	
epigenetika		človek	

Preglednica 2: Pregled metod za študij neplodnosti pri moških glede na posamezne omike. Veliko metod je naštetih z angleškim izrazom, saj slovenska različica ne obstaja ali pa se ne uporablja.

omike	metode za študij
raven DNA	<ul style="list-style-type: none"> -prenos po Southernu, -kvantitativni PCR (qPCR), -verižna reakcija s polimerazo (PCR), -alelno specifični PCR, -verižna reakcija s polimerazo-polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (PCR-RFLP), - metoda CRE/loxP, -"Denaturing high performance liquid chromatography" (DHPLC), -"exon gene trap vector", -"RNAi-mediated knockdown", -"Primer-Introduced Restriction Analysis" (PIRA), -"single strand conformation polymorphism (SSCP) method", -pirosekvenciranje in analiza na gelski elektroforezi, -SNP mikromreža, -citogenetika, -ugotavljanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje), -primerjalna genomska hibridizacija -"multiplex amplifiable probe hybridization" (MAPH), -"Comparative Genomic Hybridization" (CGH)
raven RNA	<ul style="list-style-type: none"> -northern prenos, -kvantitativni PCR (qPCR), -"reverse transcription polymerase chain reaction" (RT-PCR), -"Next Generation Sequencing" (NGS), - sekvenciranje z ligacijo, - pirosekvenciranje, - pirosekvenciranje promotorja, -študije izražanja genov na mikromrežah (npr. Affymetrix, Alilen),

se nadaljuje...

omike	metode za študij
raven proteinov	-western prenos, -imunohistokemijska analiza, -"matrix assisted laser desorption ionization" (MALDI), -MALDI-TOF/TOF analysis (TOF = "time of flight"), -dvo-dimenzionalna gelska elektroforeza, -"two-dimensional (2-D) difference gel electrophoresis" (DIGE), -tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo, -"sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" (SDS-PAGE), -imunopercipitacija, -metoda BioID, -metoda zamika na gelu (EMSA), -"CHiP on chip", -imunoprecipitacija kromatina (ChIP), -metoda odtisa na gelu, -metoda "supershift", -"differential detergent fractionation multidimensional protein identification technology" (DDF-Mud PIT), -mikromreže za proteine
epigenetika	-"Next Generation Sequencing" (NGS), -"methylated DNA immunoprecipitation sequencing" (MeDip-Seq), -metoda bisulfitne modifikacije -metilacijsko specifični PCR (MSP)

4.1.1 Raven DNA

Pod raven DNA smo v raziskavi uvrstili podatke o različicah v številu kopij, lokusih za kvantitativne lastnosti, gene povezane z dednimi sindromi in razvojnimi nepravilnostmi, ki vsebujejo neplodnost v svoji klinični sliki, kandidatne gene iz asociacijskih študij in povišanje števila nukleotidnih ponovitev, ki lahko prav tako vodi v moško neplodnost.

4.1.1.1 Različice v številu kopij (CNV)

Različice v številu kopij v posameznem območju, oziroma genu, vključenem v spermatogenezo, so lahko vzrok neplodnosti. S pregledom literature smo zbrali 36 tovrstnih lokusov, ki so bili povezani z neplodnostjo pri ljudeh. Študije CNV dokazujejo, da različice v številu kopij vodijo v neplodnost pri moških in navajajo številne gene, ki najverjetneje predstavljajo tveganje za neuspešno spermatogenezo (Tüttelmann in sod., 2011). Vse od prvega opisa regije dejavnika za azoospermijo (angl. *Azoospermia Factor regions*; AZF), je kromosom Y pomembna tarča študij, katere si prizadevajo poiskati genetske dejavnike pomembne za moško neplodnost. Zaradi svoje posebne strukture, polne ponovljivih homolognih sekvenc, je kromosom Y namreč zelo dovzeten za strukturne preureditve, posebno za delecije in duplikacije. Delecije AZF (AZFa, AZFb in AZFc) so v jasni vzorčno posledični povezavi z neuspešno spermatogenezo. Med njimi delecija gr/gr predstavlja edinstven primer v andrologiji in je dokazano genetsko tveganje za neplodnost (Reijo in sod., 1995; Repping in sod., 2002; Krausz, 2011). Stouffs in sod. (2012) so iskali delecije in duplikacije po celotnem genomu in jih odkrili osem, katerih ni bilo v skupini plodnih kontrolnih moških in so zatoj morda povezane z moško neplodnostjo. Tüttelmann in sod. (2011) so prav tako želeli poiskati CNV-je vključene v neplodnost in so v ta namen primerjali povprečno število CNV-jev ter količino pridobljene/izgubljene DNA med plodno in dvema neplodnima skupinama. Našli so deset CNV-jev, ki so bili prisotni izključno v skupini z oligospermijo, tri samo pri pacientih s sertolojevim sindromom (angl. *Sertoli-cell-only syndrome*; SCOS) in enega v obeh skupinah z neuspešno spermatogenezo, vendar ne pri zdravih moških. Dokazano pa je bilo tudi, da različno število kopij *TSPY1* gena opazno zmanjša učinkovitost spermatogeneze, pri čemer nizko število kopij predstavlja veliko tveganje za neplodnost (Giachini in sod., 2009).

4.1.1.2 Lokusi za kvantitativne lastnosti (QTL)

Lokusi za kvantitativne lastnosti so območja v genomu, ki so z uporabo statistike spoznana za hipotetično odgovorna za genetsko variacijo v določeni lastnosti. Do sedaj je bilo razkritih 130 QTL-ov pomembnih za reprodukcijo pri samcih. Z iskanjem po podatkovnih zbirkah in publikacijah smo našli 40 QTL-ov pri miših, 32 pri bikih, 8 pri ovnih, 48 pri merjascih in enega pri podgani (Zidek in sod., 1999; Ford in sod., 2001; Le Roy in sod.,

2001; Rohrer in sod., 2001; Sato in sod., 2003; L'Hote in sod., 2007; Ren in sod., 2009; Hu in sod., 2012).

4.1.1.3 Dedni sindromi in razvojne nepravilnosti z neplodnostjo v klinični sliki

Poznamo številne molekularne vzroke, ki povzročajo moško neplodnost (Matzuk in Lamb, 2008). Številni avtosomni geni so bili preučevani, da bi spoznali njihovo vlogo v bolezenskem fenotipu, vendar pa jih ima do sedaj le malo pomen v rutinski klinični praksi (Ferlin in sod., 2007). Zbrali smo 36 sindromov in razvojnih nepravilnosti, ki vsebujejo neplodnost v svoji klinični sliki (Tsatsoulis in Shalet, 1991; Meschede in Horst, 1997; Hackstein in sod., 2000; Belet in sod., 2002; Ferlin in sod., 2006; Bhagavath in Layman, 2007; Olesen in sod., 2007; Zhang in sod., 2007; Hardelin in sod., 2008; Schwabe in sod., 2008; Torra in sod., 2008; Zuccarello in sod., 2008; Shefi in sod., 2009; Hildebrand in sod., 2010; Dalgaard in sod., 2011; Zhang in sod., 2011; Kanagarajah in sod., 2012). Zbrani rezultati so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Dedni sindromi in razvojne nepravilnosti, ki vsebujejo neplodnost v svoji klinični sliki. Zaradi težav s slovensko terminologijo, so nekatere bolezni zapisane v angleščini.

DEDNI SINDROMI
<i>Aarskog–Scot</i>
<i>Aper</i>
<i>Bardet–Biedl</i>
<i>Bloom</i>
<i>Kallmann</i>
<i>Kartagener</i>
<i>Opitz</i>
<i>Usher</i>
<i>deafness-infertility syndrome</i>
<i>Testicular dysgenesis</i>
<i>Androgen insensitivity</i>
<i>Spinal and bulbar muscular atrophy</i>
<i>Young</i>
<i>Dauwese-Peters</i>
<i>Persistent Mullerian duct, type I</i>
<i>Persistent Mullerian duct, type II</i>
<i>Kearns–Sayre</i>
<i>Beckwith–Wiedemann</i>
<i>Prader-Willi</i>
<i>Autoimmune polyendocrinopathy, type I</i>
<i>Autoimmune polyendocrinopathy, type II</i>
RAZVOJNE NEPRAVILNOSTI
Hipogonadotropni hipogonadizem 7 z ali brez anozmije
<i>Albright hereditary osteodystrophy</i>
Cistična fibroza
Eliptocitoza
Miotonična distrofija
Primarna hipomagneziemija
Policistična bolezen ledvic pri odraslih
Hipoplazija Leydigovih celic s pseudo-hematofrodizmom
Hipoplazija Leydigovih celic s hipergonadotropnim hipogonadizmom
<i>Adrenomyeloneuropathy</i>
Prirojena adrenalna hipoplazija s hipergonadotropnim hipogonadizmom
Prirojena dvostranska odsotnost semenovoda
Moški psevdohermafroditizem zaradi pomankanja LH

4.1.1.4 Modeli miši - pristop iskanja kandidatnih genov

V podatkovni zbirki MGI in v drugi literaturi je opisanih veliko linij miši z izbitimi geni, ki so moško sterilne v primeru, če imajo nedelujoča oba alela. Z uporabo modelov miši je bilo razkritih 574 genov pomembnih za plodnost pri moških. V kolikor opazimo podobnost med fenotipom človeka in miši, z neko poznano mutacijo, lahko preverimo ali je ta gen mutiran tudi pri človeku s podobnim fenotipom (Jamsai in O'Bryan, 2011). Do sedaj je bilo opisanih 604 modelov miši (modelov s tarčno izničeni gen in takih, ki so rezultat naključne mutageneze), ki imajo fenotipe povezane z moško neplodnostjo. Iz podatkovne zbirke MGI in iz literature objavljene v zbirki PubMed smo tako pridobili 571 modelov miši s tarčno izničeni genom. V podatkovni zbirki »*The Reproductive Genomics Program*« smo našli 35 dodatnih modelov pridobljenih z naključno mutagenezo, do katere je prišlo zaradi uporabe N-etil-N-nitrouree (angl. *N-ethyl-N-nitrosourea*). V literaturi pa sta bila opisana še dva modela miši, pridobljena z naključno mutagenezo, ki jih v zgoraj omenjeni podatkovni zbirki ni zaslediti (Sun in sod., 2010; La Salle in sod., 2012). Opisan je bil tudi en primer neplodne miši, ki je bil posledica spontane mutacije (Holloway in sod., 2011).

4.1.1.5 Asociacijske študije in iskanje mutacij

Številni SNP-ji in ostale mutacije (majhne insercije ali delecije) v posameznih genih ter ne-kodirajočih regijah so bili povezani z moško neplodnostjo. Tvrstne spremembe DNA predstavljajo potencialno tveganje še posebno takrat, kadar gre za gene pomembne v procesu spermatogeneze. S pregledovanjem literature o polimorfizmih posameznih nukleotidov iz asociacijskih študij ter literature o številčnih polimorfizmih smo zbrali 157 kandidatnih lokusov, ki so bili povezani z moško neplodnostjo.

a.) Asociacijske študije na ravni celotnega genoma (GWAS)

Pristop asociacijskih študij na ravni celotnega genoma se je izkazal za zelo učinkovit, nov, pristop identifikacije »sumljivih« lokusov. Zbrali smo 46 kandidatnih lokusov, ki so jih z neplodnostjo povezali na podlagi rezultatov GWAS (49 pri ljudeh in osem pri živalih). Aston in Carrell (2009) sta uporabila tehnologijo genotipizacijskih mrež in z njo preverila

več kot 370.000 SNP-jev pri moških z azoospermijo in oligospermijo ter ti dve skupini primerjala s kontrolno skupino plodnih moških. Želela sta poiskati nove genetske različice, ki so signifikantno povezane z neplodnostjo. Našla sta 20 SNP-jev, ki so bili značilno povezani z azoospermijo ali oligospermijo. Z namenom, da bi našli pogoste variacije v genomu, ki prispevajo k azoospermiji, so Hu in sod. (2011) izvedli GWAS študijo in našli značilne povezave med azoospermijo in variacijami v okolici genov *PRMT6*, *PEX10* in *SOX5*. SNP mikromreže igrajo zelo pomembno vlogo tudi v predimplantacijski diagnostiki, saj omogočajo identifikacijo kromosomskih preureditev ter s tem ločevanje med normalnimi embrii in tistimi, ki so nosilci podedovane mutacije. Slednje omogoča pacientom, nosilcem kromosomskih mutacij, da za implantacijo izberejo zarodek, ki ni podedoval njihove mutacije (Harton in Tempest, 2011).

b.) Asociacijske študije posameznih lokusov

- Polimorfizmi posameznih nukleotidov

Asociacijske študije, v katerih se osredotočajo le na študij posameznih lokusov, so starejši pristop. Zbrali smo 119 SNP-jev, ki so bili v različnih študijah povezani z neplodnostjo pri moških (112 pri človeku in deset pri domačih živalih).

- Povišanje števila nukleotidnih ponovitev

Različna obolenja, povezana s povišanjem števila ponovitev nukleotidov (angl. *nucleotide repeat expansion disorder*) so bila povezana z neplodnostjo pri moških. Ko so preučevali število trinukleotidnih ponovitev (angl. *trinucleotide repeat*) in petnukleotidnih ponovitev (angl. *pentanucleotide repeat*) v posameznih genih, je bilo ugotovljeno, da imajo neplodni moški več ponovitev teh nukleotidov, kot kontrolna skupina plodnih moških. Safarinejad in sod. (2011) poročajo, da polimorfizem (TAAAA)_n v genu *SHBG*, lahko vpliva na količino proteina SGBG, kar pa je morda vzrok moški neplodnosti. Povečanje števila trinukleotidne ponovitve (CAG)_n v genu za androgeni receptor (*AR*), je bilo že velikokrat preučevano v povezavi z neplodnim fenotipom (Mifsud in sod., 2001; Pan in sod., 2002; Peterlin in sod., 2007). Mifsud in sod. (2001) so ugotovili, da je povprečno število ponovitev (CAG)_n v genu *AR*, statistično značilno višje pri neplodnih moških z nepojasnjeno azospermijo, kot

pa v plodni, kontrolni skupini. Preučevana je bila povezava med dolžino (CAG)_n ponovitev v genu za mitohondrijsko polimerazo gama (*POLG*) in neplodnostjo pri moških (Rovio in sod., 2001; Jensen in sod., 2004). Poleg tega je bilo ugotovljeno, da se dolžina ponovitev (CAG)_n, med kontrolno skupino in skupino moških z oligospermijo razlikuje tudi v primeru gena *ATXN1* (Ali in sod., 2009). Predlagano pa je bilo tudi, da je višje število ponovitev nukleotidov (CTG)_n, v genu *DMPK*, prav tako povezano z nepojasnjeno azospermijo (Pan in sod., 2002), vendar nekatere študije te povezave niso potrdile (Kunej in sod., 2004).

4.1.2 Raven RNA

Pod raven RNA smo uvrstili študije, ki predlagajo nove kandidatne gene za moško neplodnost na podlagi študij izražanja genov ter opisujejo majhne nekodirajoče molekule RNA (angl. *non-coding RNA*; ncRNA), ki tudi vplivajo na moško plodnost.

4.1.2.1 Študije izražanja genov

Naša podatkovna zbirka vključuje podatke iz 22 objav, kjer opisujejo 140 genov, iz obsežnih analiz izražanja genov, v katerih so vzorce izražanja genov povezali z neplodnostjo samcev miši in človeške vrste (Cheng, 2002; Wagenfeld in sod., 2002; Cheng in sod., 2003; Fox in sod., 2003; Xu in sod., 2003; Xu in sod., 2003; Ellis in sod., 2004; Fang in sod., 2004; Maratou in sod., 2004; Rockett in sod., 2004; Wang in sod., 2004; Yang in sod., 2004; Toure in sod., 2005; Zheng in sod., 2005; Zheng in sod., 2005; Lin in sod., 2006; Perl in sod., 2006; Feig in sod., 2007; Platts in sod., 2007; Garrido in sod., 2009; Montjean in sod., 2012). V štirih študijah so se osredotočili le na prepise posameznih genov in tako z neplodnostjo povezali šest genov (Son in sod., 2000; Huang in sod., 2006; Steger in sod., 2008; Bonaparte in sod., 2010). Nedavno objavljena študija pa je pokazala, da se razmerje prepisov mRNA za gena *PRM1* in *PRM2* spermatozoidov v testisih zelo razlikuje med plodnimi in neplodnimi moškimi (Steger in sod., 2008). Dokazano je bilo tudi, da je zelo pomembna vloga molekul mRNA protamina v procesu nastajanja odraslih semenčic in imajo zato potencial pri diagnostiki moške neplodnosti (Hamatani, 2012). Gen *Gpi1* je v odraslih semenčicah različno izražen med plodnimi in neplodnimi osebki. Ta pojav so študirali na miših in pri ljudeh (Rockett in sod., 2004). Prav tako je bilo v dveh neodvisnih

študijah dokazano, da je gen *Vim* različno izražen v primeru neplodnosti pri miših (Ellis in sod., 2004; Rockett in sod., 2004).

4.1.2.2 Majhne nekodirajoče RNA

Jedro odrasle semenčice vsebuje raznovrsten nabor molekul RNA, ki pa se ne prepisujejo in so transkripcijsko inertne. Te molekule imajo velik potencial v diagnostiki. Bioinformacijska analiza v študiji Krawetz in sod. (2011) je razkrila, da je v človeški semenčici prisotnih veliko razredov majhnih molekul RNA. Med njimi najdemo mikro molekule RNA (angl. *microRNA*; miRNA) ($\approx 7\%$), molekule piRNA (angl. *Piwi-interacting*) ($\approx 17\%$) in še nekatere druge molekule RNA, kot so npr. »repeat-associated small interfering RNAs« (rasiRNA) ($\approx 65\%$). Na podlagi uporabe mikromrež je bilo pokazano, da se vzorec izražanja majhnih nekodirajočih molekul RNA tekom poteka spermatogeneze dinamično spreminja in je različen pri različnih tipih neplodnosti. Tako so preučevali razlike v izražanju molekul miRNA med plodnimi moškimi in tistimi, ki trpijo za azoospermijo. Ugotovili so da sta dve molekuli miRNA pri pacientih z azoospermijo povečano izraženi, pri drugih dveh miRNA pa je izražanje zmanjšano (Lian in sod., 2009). V drugi študiji so opazili, da je molekula miRNA *hsa-mir-191* manj izražena pri pacientih s teratozoospermijo (Grinchuk in sod., 2010). Namen študije Grinchuka in sod. (2010) je bil poiskati razlike v izražanju miRNA med normalno spermo merjascev in tisto, ki ima veliko morfoloških nepravilnosti. Ugotovili so, da je v primeru morfološko oporečne sperme prisotno povečano izražanje štirih miRNA, ena molekula miRNA pa je manj izražena (Curry in sod., 2011). Številne raziskave, v katerih so preučevali razlike v izražanju molekul miRNA, tekom različnih faz spermatogeneze, nakazujejo, da je za pravi razvoj semenčic zelo pomemben ravno pravi nabor molekul miRNA na posameznih stopnjah zorenja. Vendar pa moramo povedati, da vseh teh molekul miRNA ne boste našli v naši podatkovni zbirki, saj niso bile neposredno povezane z neplodnostjo. V eni takih raziskav so Yan in sod. (2009) želeli raziskati izražanje miRNA tekom spermatogeneze sesalcev. Uporabili so mikromreže miRNA, da bi ugotovili razlike v vzorcih izražanja genov med zrelo in nezrelo spermo opic (angl. *rhesus monkey*) ter v testikularnem tkivu odraslih samcev, človeške vrste. Analiza je pokazala, da se 15, od skupno najdenih 26 miRNA razlikuje med zreli in nezreli testisi. Druga skupina (Yan

in sod., 2007) pa je našla 19 molekul miRNA, katerih izražanje se razlikuje med zreli in nezreli mišji testisi. 14 jih je povečano izraženih, pet pa jih ima zmanjšano izražanje. V sorodni raziskavi so Lian in sod. (2009) opazili, da se med nezreli in zreli merjaščevimi testisi pojavljajo razlike v izražanju pri kar 122 molekulah miRNA. Ro in sod. (2007) so ugotavljali katere molekule miRNA se nahajajo v mišjih testisih. Našli so 28 takih, ki se ne izražajo v nobenem drugem tkivu razen v testisih. Torley in sod. (2011) pa so za model uporabili ovna in so skušali preučiti izražanje miRNA v spolnih celicah zarodkov. Našli so 24 miRNA, ki se pojavijo v testisih zarodka pri 42 dnevih in 43 miRNA, ki jih je moč najti v zarodku starem 75 dni. Poleg tega pa rezultati slednje raziskave nakazujejo tudi, da je *miR-22* udeležena v zaviranju signalne poti estrogena v fetusu.

4.1.3 Raven proteinov

S pregledom obstoječe literature smo zbrali 79 proteinov, za katere je bilo domnevano, da so udeleženi v moški neplodnosti. Študije opisujejo razlike v izražanju proteinov ali pre-proteinov med kontrolno skupino plodnih moških in moškimi, z nepravilnostmi pri procesu zorenja semenčic. Tako so Milardi in sod. (2012) zabeležili vsaj 919 različnih proteinov v posameznem vzorcu semenske tekočine, izmed teh pa so nekateri najverjetneje krivci za neplodnost. Eden izmed takih kandidatov je fertilin, površinski protein semenčic, heterodimer, sestavljen iz α in β podenote. Fertilin najverjetneje spodbuja pripenjanje semenčice na jajčno celico, kasnejše zlitje omenjenih celic in aktivacijo jajčne celice (Bigler in sod., 1997). Omenjeni protein so odkrili z imunoblot analizo proteinov semenčic. Ugotovili pa so tudi, da so semenčice mišk, katere nimajo fertilina β , nezmožne pripenjanja na membrano jajčne celice. V tem primeru torej ne pride do zlitja semenčice in jajčne celice ter posledično ne do potovanja iz maternice v ovidukt in pripetja jajčeca na cono pelucida (Cho, 1998). Kumar in sod. (2012) so prvi poročali o nativni, inducibilni, formaciji kompleksa albumin-prolaktin (angl. *native human serum albumin (HSA)–prolactin inducible protein (PIP) complex formation*) v serumu človeške semenske plazme. Že pred tem je bilo znano, da HSA ohranja gibljivost semenčic (Harrison in sod., 1982), nativno oblikovanje HSA-PIP kompleksa pa nakazuje na pomembno vlogo PIP, kar direktno korelira z moško neplodnostjo/plodnostjo. V drugi študiji, ki so jo izvedli Coştur

in sod. (2012) pa je predlagano, da ima protein NOS2 esencialno vlogo pri spermatogenezi. Izvedli so histološko analizo vzorcev semenske tekočine moških, brez semenčic v semenski tekočini, in plodnih moških, iz kontrolne skupine. V vzorcih testisov moških z azoospermijo niso našli spolnih celic, prav tako pa so odkrili, da se NOS2 pojavlja v Sertolijevih in Leydigovih celicah, vendar pa je njegovo izražanje, v vzorcih plodnih moških, zelo šibko. Skupina Adama in sod. (2012) je ugotovila, da povečanje decorina (DCN), proteina zunajceličnega matriksa, ki ga proizvajajo miofibroblasti, peritubularne celice v stenah semenskih kanalčkov (angl. *seminiferous tubules*), lahko povzroči naravnovesje v parakrilnih signalnih poteh človeških testisov in ima lahko zato vlogo pri moški neplodnosti. Ta hipoteza je bila potrjena z imunohistokemijsko analizo, katera je pokazala depozite DCN v stenah semenskih kanalčkov pri moških z okvarjeno spermatogenezo. Da bi razkrili proteinske kandidate in razvili diagnostične označevalce za astenospermijo je bilo preučevano izražanje 101 proteinov semenske tekočine, v 20 pacientih z astenospermijo. Dobljeni rezultati pa so bili primerjani z rezultati izražanja proteinov v kontrolnih vzorcih desetih plodnih posameznikov. V tej študiji so uporabili dvo-dimenzionalno proteomsko analizo in našli 17 proteinov, katerih količina se razlikuje med kontrolno skupino in skupino moških z astenospermijo (Martinez-Heredia in sod., 2008). Podobno raziskavo je izvedla tudi druga raziskovalna skupina, ki je preučevala razlike v izražanju proteinov semenske tekočine neplodnih pacientov. Našli so 24 različno izraženih proteinov, ki so zato potencialni diagnostični označevalci. Omenjene proteine so razvrstili v pet skupin: spolno razmnoževanje, odziv na poškodbe, metabolni procesi, celična rast in/ali vzdrževanje ter skupino s proteini, katerih niso znali uvrstiti v nobeno izmed naštetih (Xu in sod., 2012). V naslednji študiji so primerjali pojavljanje proteinov v plazmi semenske tekočine med plodnimi moškimi ter skupinami moških z astenospermijo, oligozoospermijo in azoospermijo. Uporabili so dvodimenzionalno diferenčno gelsko elektroforezo ter z njo odkrili osem proteinov, ki so potencialni označevalci za azoospermijo, saj so statistično značilno bolj izraženi v skupini moških z azoospermijo, če primerjamo z vsaj eno od ostalih skupin moških (kontrola, astenospermija, oligozoospermija) (Davalieva in sod., 2012). Thacker in sod. (2011) so s primerjavo vzorca proteinov semenske tekočine med plodnimi in neplodnimi moškimi našli štiri proteine (angl. *semenogelin II precursor*, *prolactin-induced protein*, *clusterin isoform 1*, and *prostate-specific antigen isoform 1 preproprotein*), ki so pretežno prisotni v semenčicah

zdravih moških. Prekursorja semenogelina II in izoforme clusterina 1 pa v semenčicah neplodnih moških sploh ni bilo. Poleg tega je bilo odkritih 45 proteinov, katerih izražanje je povišano, in 56 proteinov z zmanjšanim izražanjem v skupini moških z astenospermijo. DJ-1 protein je eden izmed tistih, ki so manj izraženi v semenski tekočini moških z astenospermijo. Na podlagi te ugotovitve so prišli do spoznanja, da je DJ-1 protein udeležen v nadzoru oksidativnega stresa in je bil zato nivo reaktivnih kisikovih radikalov v pacienti z astenospermijo kar 3,3-krat višji (Wang in sod., 2009). Omeniti velja tudi študijo Barde in sod. (2012), kjer so preučili izražanje družine *BET* genov v človeških testisih z nepravilnostmi pri spermatogenezi. Ugotovili so, da je *BRDT* gen edini iz družine *BET*, ki se izraža v testisih pacientov s sindromom Sertolijevih celic. V literaturi navajajo tudi, da visoka in nizka gibljivost semenčic kaže različen vzorec fosforilacije proteinov. S proteomsko analizo so namreč Chan in sod. (2009) odkrili, da je TUBGCP2 (angl. *γ-tubulin complex associated protein 2*) hipofosforiliran v primeru semenčic s slabo gibljivostjo. Podobno so pomembnost fosforilacije proteinov dokazali tudi Vijayaraghavan in sod. (2000), ki so pokazali, da fosforilacija tirozina, v 55 kDa velikem GSK3A proteinu, variira. Slednje ima neposreden vpliv na gibljivost, kar nakazuje na regulacijo gibljivosti semenčic s fosforilacijo.

4.1.4 Epigenetika

Kar nekaj študij nakazuje, da je lahko moška neplodnost prav tako posledica epigenetskih mehanizmov, kot je npr. metilacija DNA. S pregledovanjem literature, ki opisuje stanje metilacije DNA, smo zbrali 12 kandidatnih genov, katerih epigenetske modifikacije imajo vpliv na plodnost moških. Tako je bila npr. izvedena študija, v kateri so preučevali ponastavitev genetskega vtisnjenja pri neplodnih moških, ter našli nenormalno očetovsko metilacijsko genetsko vtisnjenje (angl. *abnormal paternal methylation imprint*) v 14,4% neplodnih pacientov in nenormalno genetsko vtisnjenje podedovano od mame pri 20,6% neplodnih pacientov (Kobayashi in sod., 2007). Hartmann in sod. (2006) pa so drugačnega mnenja, saj pravijo, da glavni vzroki za epigenetske nepravilnosti po ART izhajajo iz dogodkov v jajčni celici. Pri ljudeh so spermatogoniji ploda (angl. *fetal spermatogonia*) večinoma nemetilirani na mestu *H19* diferencialno metilirane regije (angl. *differentially methylated region*, DMR), v nasprotju pa so spermatogoniji v testisih odraslih moških

značilno metilirani v tej regiji. Boissonnas in sod. (2009) so dokazali, da so epigenetske motnje na šestem *CTFC* mestu (angl. *6th CTFC site*) H19 DMR morda pomemben biooznačevalec za kvantitativne nepravilnosti pri spermatogenezi (teratozoospermija in/ali oligo-asteno-teratozoospermija) ljudi. Nedavni rezultati so pokazali, da nepravilnosti metilacije sperme lahko obsegajo veliko število genov, prizadeti pa so lahko tudi neimprintirani geni. V skladu s tem Wu in sod. (2010) poročajo, da je hipermetilacija promotorja gena *MTHFR* v semenčicah povezana z nepojasnjeno moško neplodnostjo. Poleg tega so Dhillon in sod. (2007) študirali metilacijski status otočkov CpG v genu *GSTM1* z metilacijsko specifičnim PCR in odkrili, da epigenetsko utišanje gena *GSTM1* povzroči moško neplodnost. Huang in sod. (2006) so s pomočjo kvantitativnega metilacijsko specifičnega PCR našli značilne razlike v metilaciji gena *ALF* med testisi pri odraslih, pri zarodku in pri neplodnih moških. V drugi študiji pa so analizirali vzorec metilacije DNA genov *H19* in *MEST*, ki spadata med imprintirane gene, ter ugotovili, da je nenormalna metilacija teh genov v semenski tekočini pri človeku povezana z oligozoospermijo (Marques in sod., 2007). Preučevan je bil tudi metilacijski status diferencialno metiliranih regij v semenski tekočini 97 moških, ki so prišli na zdravljenje zaradi neplodnosti. V njihovih vzorcih so našli nenormalno očetovsko metilacijo, v *H19* in *MEG3*, ter nenormalno metilacijo podedovano po materi, v *MEST*, *KCNQ1OT1*, *PLAGL1*, *PEG3* in *SNRPN* (Kobayashi in sod., 2007). Ugotavljanje metilacije DNA na območju otočkov CpG s pirosekvenciranjem, je v vzorcih človeške sperme zdravih moških, moških s teratozoospermijo in/ali oligo-asteno-teratozoospermijo, pokazalo odsotnost metilacije v skupini moških s teratozoospermijo. V skupini pacientov z oligo-asteno-teratozoospermijo je bila pogosta izguba metilacije v šesti regiji CTCF in to je koreliralo s koncentracijo semenčic v semenski tekočini (Boissonnas in sod., 2009). Nanassy in sod. (2011) so preučevali metilacijski status promotorja gena *CREM* v pacientih z nenormalnim razmerjem med genoma za protamin1 in protamin2 (*P1/P2*), pri pacientih z oligozoospermijo. Ugotovili so, da imajo ti pacienti v primerjavi z zdravimi moškimi, povečano metilacijo promotorja gena *CREM*. Predlagano je bilo, da imajo protamini morda pomembno vlogo v mehanizmih epigenetskega imprintinga. Študije so namreč pokazale, da je povprečno razmerje med protaminom 1 in protaminom 2 približno 1 in da je nenormalno izražanje protaminov odkrito pri značilnem odstotku neplodnih moških. Aoki

in sod. (2006) so objavili prvo študijo v kateri navajajo, da je vsebnost protaminov v spermi značilno povezana s fragmentacijo DNA.

4.2 IZDELAVA KATALOGA LOKUSOV, POVEZANIH Z REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV IN NJIHOVA GENOMSKA RAZPOREDITEV

Po obsežnem pregledu vse razpoložljive literature smo najprej izdelali seznam, ki smo ga nato uredili, prečistili, in dobili katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Podatkovna zbirka bo po objavi članka prosto dostopna na spletni strani Integratomics-TIME (http://www.integratomics-time.com/male_reproduction). Kandidatni geni so predstavljeni kot človeški ortologi. Katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev nameravamo dopolnjevati z novimi kandidatnimi geni, ki jih bodo raziskovalci v prihodnosti povezali z neplodnostjo.

Kromosomske lokacije lokusov povezanih z moško neplodnostjo smo tudi grafično prikazali v obliki genomskega prikaza. Prikaz bo po objavi članka prosto dostopen na spletni strani Integratomics-TIME (http://www.integratomics-time.com/male_reproduction).

4.3 ANALIZA BIOLOŠKIH POTI IN RAZVRŠČANJE KANDIDATNIH GENOV PO PRIORITETI

Z bioinformatičnim orodjem DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang da in sod., 2007) smo izvedli obogatitveno analizo kandidatnih genov iz naše podatkovne zbirke lokusov povezanih z moško neplodnostjo. V orodje smo vnesli 826 genov, katerim je bilo možno določiti ortologe za človeka. Rezultat analize je bil seznam 1744 bioloških poti, v katerih se pojavijo geni, ki smo jih vnesli v analizo. Za določitev značilnosti rezultata obogatitvene analize smo upoštevali Bonferronijevo statistiko (Bonferroni p-vrednost $< 0,0095$) in pa p-vrednost značilnosti rezultata ($p < 0,01$). Izmed 1744 bioloških poti je 263 poti zadostilo obema pogojema. Za nadaljnjo analizo smo se osredotočili na prvih deset najbolj statistično značilnih bioloških poti, ki so prikazane v preglednici 4.

Preglednica 4: Preglednica prikazuje prvih deset najbolj pomembnih bioloških poti glede na p-vrednost in Bonferroni statistiko.

Biološka pot	št. genov*	p-vrednost	Bonferroni p-vrednost
<i>sexual reproduction</i>	181	4,6E-110	1,8E-106
<i>multicellular organism reproduction</i>	176	4,2E-99	1,6E-95
<i>reproductive process in a multicellular organism</i>	176	4,2E-99	1,6E-95
<i>gamete generation</i>	157	5,4E-95	2,1E-91
<i>spermatogenesis</i>	139	1,6E-92	6,3E-89
<i>male gamete generation</i>	139	1,6E-92	6,3E-89
<i>reproductive developmental process</i>	123	5,6E-84	2,2E-80
<i>reproductive cellular process</i>	83	6,9E-60	2,7E-56
<i>disease mutation</i>	200	1,1E-48	7,3E-46
<i>germ cell development</i>	58	2,5E-45	9,8E-42

*Število genov iz kataloga lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev, ki se nahaja tudi v tej biološki poti.

V naslednjem koraku smo podrobneje preučili gene, ki se nahajajo v naštetih desetih bioloških poteh (preglednica 4) in poiskali gene, ki se pojavijo v več poteh. Ugotovili smo, da se 13 genov pojavi v vseh desetih bioloških poteh, 40 v devetih poteh, devet v osmih, 22 v sedmih, 65 v šestih in šest v šestih najbolj statistično značilnih bioloških poteh. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Preglednica prikazuje seznam genov, ki se pojavljajo v večjem številu najbolj pomembnih bioloških poti glede na analizo z bioinformacijskim orodjem DAVID.

Število bioloških poti	Simboli genov
10	<i>BRCA2, MKKS, PAFAH1B1, OCA2, ZBTB16, FANCG, BAX, KIT, SIX5, BBS2, BBS4, DHH, DLD</i>
9	<i>YBX2, NEURL, HOOK1, AFF4, DAZL, DMC1, REC8, PRM1, KLHL10, SPAG6, PRM2, TPGS1, NR2C2, H1FNT, FNDC3A, UBE2B, CAPZA3, GAPDHS, PVRL2, SOX3, NR0B1, PCSK4, ERCC1, HSPA2, MEI1, RNF17, ADAD1, ALMS1, TRIP13, TNP1, TSSK6, SPANXB1, FSHB, PIWIL1, SYCP3, FSHR, DDX25, STRBP, TBPL1, AGFG1</i>
8	<i>WT1, AKT1, FANCC, BCL2, BCL2L2, ACVR2A, INSL3, PIWIL2, BMP4</i>
7	<i>CSDA, APOB, HMGB2, MLH1, SPATA16, SMAD5, BCL2L11, GAMT, MSH4, CXCL12, CCND2, SHBG, PROK2, TEX15, LMNA, CXCR4, SOHLH1, SIRT1, PIWIL4, TNP2, ACOX1, PCYT1B</i>
	<i>GMCL1, WFDC2, SPAG11B, CREM, MORC1, OVOL1, UBR2, BCL6, SPAG16, RBMY1A 1, CADM1, CATSPER2, HOXA10, MAK, NANOS2, HSF2, HSF1, DAZ1, SPAG11A, GPR64, ADAM29, ACSBG2, SPATA9, CATSPER3, DAZ2, PSME4, SIAH1, THEG, SPO11, OAZ3, CATSPER4, H2AFX, FOXJ1, PTTG1, PAFAH1B2, ODF1, BOLL, B4GALNT1, SPEM1, CREB3L4, TAF7L, KDM3A, ADCY10, RAD23B, ADAMTS2, TSSK2, NOS3, DNAJA1, NANOS3, TSSK4, SBF1, DNMT3L, GSR, SERPINA5, SYCP1, LIMK2, CCNA1, CLDN11, GPX4, CATSPER1, USP9Y, GLI1, CDY1, BPY2, UTP14C</i>
5	<i>ATM, FANCD2, B4GALT1, LEPR, HEXB, PICK1</i>

Geni, ki se pojavijo v vseh desetih ali devetih najbolj značilnih bioloških poteh so podrobneje opisani v preglednici 6. Analiza genomske lokacije kandidatnih genov je pokazala, da glede na zastopanost genov izstopata kromosom 12 in kromosom 19. Na kromosomu HSA12 se nahaja pet genov, na HSA19 pa osem izmed 53 kandidatnih genov, ki se pojavijo v vseh desetih ali pa v vsaj devetih najbolj značilnih bioloških poteh.

Preglednica 6: Seznam statistično najbolj značilnih kandidatnih genov povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Preglednica prikazuje gene, ki se pojavijo v vseh desetih ali devetih izmed prvih deset statistično najbolj značilnih bioloških poti glede na p-vrednost in Bonfferoni p-vrednost.

	Entrez_ID	simbol	ime gena	kromosom
Geni prisotni v desetih bioloških poteh	675	<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2, early onset</i>	13
	8195	<i>MKKS</i>	<i>McKusick-Kaufman syndrome</i>	20
	5048	<i>PAFAH1B1</i>	<i>platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kDa)</i>	17
	4948	<i>OCA2</i>	<i>oculocutaneous albinism II</i>	15
	7704	<i>ZBTB16</i>	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>	11
	2189	<i>FANCG</i>	<i>Fanconi anemia, complementation group G</i>	9
	581	<i>BAX</i>	<i>BCL2-associated X protein</i>	19
	3815	<i>KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>	4
	147912	<i>SIX5</i>	<i>SIX homeobox 5</i>	19
	583	<i>BBS2</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 2</i>	16
	585	<i>BBS4</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 4</i>	15
	50846	<i>DHH</i>	<i>desert hedgehog</i>	12
	1738	<i>DLD</i>	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	7
Geni prisotni v devetih bioloških poteh	51087	<i>YBX2</i>	<i>Y box binding protein 2</i>	17
	9148	<i>NEURL</i>	<i>neuralized homolog (Drosophila)</i>	10
	51361	<i>HOOK1</i>	<i>hook homolog 1 (Drosophila)</i>	1
	27125	<i>AFF4</i>	<i>AF4/FMR2 family, member 4</i>	5
	1618	<i>DAZL</i>	<i>deleted in azoospermia-like</i>	3
	11144	<i>DMC1</i>	<i>DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast)</i>	22
	9985	<i>REC8</i>	<i>REC8 homolog (yeast)</i>	14
	5619	<i>PRM1</i>	<i>protamine 1</i>	16
	317719	<i>KLHL10</i>	<i>kelch-like family member 10</i>	17
	9576	<i>SPAG6</i>	<i>sperm associated antigen 6</i>	10
	5620	<i>PRM2</i>	<i>protamine 2</i>	16
	91978	<i>TPGS1</i>	<i>tubulin polyglutamylase complex subunit 1</i>	19
	7182	<i>NR2C2</i>	<i>nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2</i>	3

se nadaljuje...

	Entrez_ID	simbol	ime gena	kromosom
Geni prisotni v devetih bioloških poteh	341567	<i>H1FNT</i>	<i>H1 histone family, member N, testis-specific</i>	12
	22862	<i>FNDC3A</i>	<i>fibronectin type III domain containing 3A</i>	13
	7320	<i>UBE2B</i>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2B</i>	5
	93661	<i>CAPZA3</i>	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3</i>	12
	26330	<i>GAPDHS</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic</i>	19
	5819	<i>PVRL2</i>	<i>poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)</i>	19
	6658	<i>SOX3</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 3</i>	X
	190	<i>NR0B1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>	X
	54760	<i>PCSK4</i>	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 4</i>	19
	2067	<i>ERCC1</i>	<i>ERCC1 excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)</i>	19
	3306	<i>HSPA2</i>	<i>heat shock 70kDa protein 2</i>	14
	150365	<i>MEI1</i>	<i>meiosis inhibitor 1</i>	22
	56163	<i>RNF17</i>	<i>ring finger protein 17</i>	13
	132612	<i>ADAD1</i>	<i>adenosine deaminase domain containing 1 (testis-specific)</i>	4
	7840	<i>ALMS1</i>	<i>Alstrom syndrome 1</i>	2
	9319	<i>TRIP13</i>	<i>thyroid hormone receptor interactor 13</i>	5
	7141	<i>TNP1</i>	<i>transition protein 1 (during histone to protamine replacement)</i>	2
	83983	<i>TSSK6</i>	<i>testis-specific serine kinase 6</i>	19
	728695	<i>SPANXB1</i>	<i>SPANX family, member B1</i>	X
	2488	<i>FSHB</i>	<i>follicle stimulating hormone, beta polypeptide</i>	11
	9271	<i>PIWIL1</i>	<i>piwi-like RNA-mediated gene silencing 1</i>	12
	50511	<i>SYCP3</i>	<i>synaptonemal complex protein 3</i>	12
	2492	<i>FSHR</i>	<i>follicle stimulating hormone receptor</i>	2
	29118	<i>DDX25</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 25</i>	11
	55342	<i>STRBP</i>	<i>spermatid perinuclear RNA binding protein</i>	9
	9519	<i>TBPL1</i>	<i>TBP-like 1</i>	6
3267	<i>AGFG1</i>	<i>ArfGAP with FG repeats 1</i>	2	

4.4 PREVERJANJE POVEZAVE KANDIDATNIH GENOV Z REPRODUKTIVNIMI LASTNOSTMI

Predlagani seznam kandidatnih genov, ki se pojavljajo v vseh desetih poteh smo preverili na eksperimentalnih podatkih iz podatkovne zbirke MPD. Zanimalo nas je ali obstajajo polimorfizmi znotraj močnejših kandidatnih genov odgovornih za moško neplodnost, in če se geni razlikujejo v razporeditvi alelov med plodnimi in neplodnimi samci; ali imajo plodni drugačen alel posameznega gena od neplodnih. V ta namen smo v podatkovni zbirki MPD poiskali linije, ki se razlikujejo v reprodukcijskih lastnostih. Izbrali smo tiste, katerih samci se razlikujejo v številu semenčic. Podatek o številu semenčic semenske tekočine je bilo v MPD možno dobiti za 14 inbridiranih linij miši (prikazane na sliki 2). Za nadaljnjo analizo smo nato izbrali štiri linije: dve liniji, ki sta imeli v semenski tekočini največ semenčic (C57BL/6J in FVB/NJ) in dve liniji, ki sta imeli v semenski tekočini najmanj semenčic (AKR/J in C3H/HeJ). V naslednjem koraku nas je zanimalo ali imata te dve skupini linij miši različno razporeditev alelov genov, katere smo predlagali za močnejše kandidatne gene, odgovorne za moško neplodnost. Slika 3 prikazuje del obširne Excelove tabele z rezultati analize prisotnosti polimorfizmov v kandidatnih genih. Iskali smo torej različno razporeditev alelov trinajstih genov, ki so se pojavili v vseh desetih statistično najbolj značilnih bioloških poteh: *BRCA2*, *MKKS*, *PAFAH1B1*, *OCA2*, *ZBTB16*, *FANCG*, *BAX*, *KIT*, *SIX5*, *BBS2*, *BBS4*, *DHH*, *DLD*. Z orodjem MPD za preiskovanje genotipov smo preverili ali obstajajo razlike v SNP-jih (angl. *SNP / genotype variation query*). Našli smo 17936 različnih SNP-jev, ki se pojavljajo v omenjenih 13 genih. Nato pa smo postavili kriterij, da se morajo aleli med plodnima in neplodnima linijama miši razlikovati. S tem kriterijem smo seznam skrajšali na 508 SNP-jev, ki se nahajajo v šestih genih: *Brca2*, *Pafah1b1*, *Oca2*, *Zbtb16*, *Fancg* in *Kit* (preglednica 7).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	kromosom	ime gena	Mesto/biotip mutacije	ime SNP-ja	alel1	alel2	plodni liniji		neplodni liniji	
2							C57BL/6J	FVB/NJ	C3H/HeJ	AKR/J
3	11	Pafah1b1	mutacija v intronu	rs26904660	C	T	T	T	C	C
4	11	Pafah1b1	mutacija v intronu	rs29422624	C	T	T	T	C	C
5	11	Pafah1b1	mutacija v intronu	rs47604951	A	T	T	T	A	A
6	11	Pafah1b1	mutacija v intronu	rs3667338	C	T	T	T	C	C
7	11	Pafah1b1	mutacija v intronu	rs29450859	C	T	T	T	C	C
8	7	Oca2	mutacija v intronu	rs31851983	C	T	T	T	C	C
9	7	Oca2	mutacija v intronu	rs32979053	C	T	T	T	C	C
10	7	Oca2	mutacija v intronu	rs108121339	C	T	T	T	C	C
11	9	Zbtb16	mutacija v 3'-UTR	rs51361052	A	G	G	A	A	G
12	9	Zbtb16	mutacija v 3'-UTR	rs46498715	A	G	G	A	H	A
13	9	Zbtb16	mutacija v intronu	rs253353334	A	G	G	A	G	A
14	9	Zbtb16	mutacija v intronu	rs49462789	G	T	G	T	G	T
15	9	Zbtb16	mutacija v intronu	rs48137256	G	T	G	T	G	T
16	7	Oca2	mutacija v intronu	rs32293095	A	G	A	A	G	G
17	7	Oca2	mutacija v intronu	rs31381045	A	C	A	A	C	C
18	7	Oca2	nesinonimna mutacija	rs31090430	A	C	A	A	C	C
19	7	Oca2	mutacija v intronu	rs32388505	A	C	A	A	C	C
20	7	Oca2	mutacija v intronu	rs32011119	A	G	A	A	G	G
21	7	Oca2	mutacija v intronu	rs218893915	A	G	A	A	G	
22	11	Pafah1b1	mutacija v 3'-UTR + transkripcijska različica nekodirajočega gena	rs13461651	C	T	T	T	C	C
23	7	Oca2	mutacija v intronu	rs47031406	A	G	A	A	G	
24	7	Oca2	mutacija v intronu	rs46326105	A	T	A	A	T	

Slika 3: Slika prikazuje posnetek zaslona (angl. *print screen*) dela preglednice v Excelu s 509 vrsticami v kateri je prikazana razporeditev alelov posameznih genov med plodnimi in neplodnimi linijami miši. V rdečem okvirčku je prikazana razporeditev alelov, kjer sta imeli plodni liniji miši drugačen alel od neplodnih.

Preglednica 7: Seznam šestih kandidatnih genov, v katerih se pojavljajo SNP-ji, ki imajo različne alele med plodnimi in neplodnimi inbridiranimi linijami miši. Preglednica prikazuje tudi lokacijo SNP-ja v genu ter biotip posamezne mutacije

Mesto/biotip mutacije	Geni					
	<i>BRCA2</i>	<i>PAFAH1B1</i>	<i>OCA2</i>	<i>ZBTB16</i>	<i>KIT</i>	<i>FANCG</i>
mutacija v intronu	2	185	46	263	1	1
sinonimna mutacija	0	0	0	0	1	0
nesinonimna mutacija	0	0	1	0	0	0
mutacija v 3'-UTR + transkripcijska različica nekodirajočega gena	0	6	0	0	0	0
mutacija v 3'-UTR	0	0	0	2	0	0
število vseh SNP-jev	2	191	47	265	2	1

5 RAZPRAVA

Z sistematičnim pregledom literature in podatkovnih zbirk smo zbrali 1069 genetskih lokusov, ki so bili predhodno povezani z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Zaradi uporabe pristopa primerjalne integratomike nam je bilo omogočeno združiti podatke iz različnih živalskih vrst pridobljenih z različnimi raziskovalnimi metodami. Na osnovi kataloga vseh pridobljenih podatkov smo sestavili seznam najbolj obetavnih kandidatnih genov, katerim lahko v ustrezni podatkovni zbirki poiščemo ortologe za vsako izmed živalskih vrst, tako da uporabimo karte sintenije.

5.1 ZBIRANJE IN SINTEZA GENOMSKIH PODATKOV

S sistematičnim pregledom literature in podatkovnih zbirk smo zbrali 1069 genskih lokusov, ki so bili predhodno povezani z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev: CNV, QTL, dedni sindromi in razvojne nepravilnosti, mutacije DNA in polimorfizmi, vzorci izražanja (raven RNA), majhne nekodirajoče RNA (miRNA, piRNA), ekspresijski vzorci proteinov in epigenetski dejavniki. Uporabili smo pristop primerjalne integratomike, da smo lahko združili podatke o različnih živalskih vrstah, ki so bili pridobljeni z različnimi raziskovalnimi metodami. Z uporabo tovrstnega pristopa se lahko namreč bolje spopademo

s problemom razdrobljenih in pogosto nasprotujočih si podatkov pridobljenih iz študij, ki uporabljajo samo eno metodo. Združitev informacij iz različnih živalskih vrst ima prav tako velik potencial za izboljšanje našega poznavanja reprodukcije sesalcev. Podatki pridobljeni iz različnih modelnih organizmov so namreč omogočili razkritje številnih kandidatnih genov udeleženih v reprodukcijo sesalcev.

5.1.1 Raven DNA

5.1.1.1 Različice v številu kopij (CNV)

Različice v številu kopij posameznega odseka DNA, oziroma gena, vključenega v spermatogenezo, lahko povzročijo neplodnost. Na aktivnost posameznih genov, pomembnih za plodnost, lahko vplivajo CNV-ji, prav tako pa lahko povečano število kopij vodi v nepravilno rekombinacijo tekom mejoze in posledično v izgubo funkcionalnih spolnih celic (Tuttelmann in sod., 2011). Različice v številu kopij obsegajo več nukleotidov, kot pa SNP-ji, kar še dodatno poudari njihovo pomembnost za genetsko raznolikost in evolucijo (Redon in sod., 2006).

5.1.1.2 Lokusi za kvantitativne lastnosti (QTL)

Pri sesalcih moškega spola je plodnost kvantitativna lastnost, ki jo določa veliko število genov delujočih na različnih ravneh. Posledično je vzročne gene znotraj teh območij še posebno težko določiti (L'Hote in sod., 2007). Določanje obsežnih kromosomskih regij, vključenih v moško plodnost, je prvi korak na poti do finega mapiranja vzročnih genov. Le Roy in sod. (2001) so v svoji študiji uporabili imbridirane linije laboratorijskih miši in z njimi izvedli kvantitativno genetsko analizo ter pregledali celotni genom, da bi našli regije odgovorne za težo semenskih veziklov in testisov. Identifikacija slednjih genov bi namreč pomagala pri iskanju sorodnih genov v človeku, tako da bi uporabili primerjalne zemljevide (angl. *comparative maps*), hkrati pa bi omogočila tudi razvoj živalskih modelov za sterilnost (Le Roy in sod., 2001).

5.1.1.3 Dedni sindromi in razvojne nepravilnosti z neplodnostjo v klinični sliki

Številni molekularni dejavniki so bili povezani z moško neplodnostjo, a jih ima do sedaj le malo resnični pomen v rutinski klinični praksi (Ferlinin sod., 2007; Matzuk in Lamb, 2008). Znani so številni monogeni sindromi in razvojne nepravilnosti, ki so zbrani v podatkovni zbirki OMIM in so povezani z napakami v spermatogenezi. Nefunkcionalnost določenih genov rezultira v neuspešni spermatogenezi in fenotipih kot so hipogonadotropni hipogonadizem, kriptorhizem, odložena puberteta (angl. *delayed puberty*), moški psevdohermafroditizem in dvoumna spolovila (angl. *ambiguous genitalia*) (Hardelin in sod., 2008; Visser in Repping, 2010). Meschede in sod. (1997) ocenjujejo, da je veliko tovrstnih stanj spregledanih. Cilj mora biti povečati zavedanje prisotnosti teh fenotipov in jih pravilno diagnosticirati, saj le to bolniku prinese številne koristi. Spoznanje, da gre za genetsko nepravilnost, je pomembno tudi pri ocenjevanju tveganja, da se bo stanje preneslo na potomca. Kljub temu, da so monogenne nepravilnosti redke, jih ne smemo zanemariti, ko skušamo ugotoviti zakaj par ne more imeti otrok. Ena izmed najbolj pogostih prirojenih nepravilnosti, ki je povezana z moško neplodnostjo, je mutacija v genu *CFTR* (angl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), ki se kaže v azoospermiji, zaradi prekinjene povezave med epididimisom in ejakulacijskim kanalom. Slednje prepreči oploditev, oziroma povzroči kongenitalno obojestransko odsotnost semenovoda (O'Flynn O'Brien in sod., 2010). Genetski sindromi in nepravilnosti so sicer redki povzročitelji oligospermije in azoospermije pri moških, ki vstopajo v postopke ICSI, vendar pa jih moramo imeti v mislih, saj se v tem primeru genetska okvara lahko prenese na potomce (Johnson, 1998).

5.1.1.4 Modeli miši - pristop iskanja kandidatnih genov

V literaturi in v podatkovni zbirki MGI je moč najti podatke o številnih linijah miši, ki so pomembne za študij neplodnosti. Znanje pridobljeno na tovrstnih modelnih organizmih nam omogoča, da lažje najdemo pravi vzrok podobnim bolezenskim stanjem pri ljudeh (Rockett in sod., 2004). V biomedicinskih raziskavah se uporabljajo transgeni ter mutirani modeli miši s plodnostnim fenotipom in pa spontane ter inducirane mutantne linije. Mutacije so torej lahko tarčne ali naključne. Za tarčno spreminjanje genoma se uporablja metoda CRE/loxP, homologna rekombinacija ter vektor za ujetje eksona (angl. *exon gene*

trap vector). V ta namen pa je mogoče uporabiti tudi podobno tehniko za utišanja gena (angl. *gene knock-down*), kjer zmanjšamo izražanje gena z uporabo interferenčne RNA (angl. *interference RNA*; RNAi). V literaturi smo zasledili en tovrstni primer, kjer so pri miši preprečili izražanje proteina VAMP4 z uporabo RNAi in s tem poizkusom prvič neposredno dokazali, da imajo proteini SNARE pomembno vlogo pri nastanku akrosoma. Pri miših z utišanim proteinom VAMP4 so namreč opazili nepravilnosti v jedru in pri zlitju akrosomalnega vezikla v spermatidah in kasneje v spermi (Guo, Shen in sod., 2010). Ker tovrstne strategije, ki temeljijo na fenotipu, ne zahtevajo predhodnega poznavanja odgovornega gena, so popolnoma nepristranske in nam zato omogočajo najti gene, za katere nebi pričakovali, da imajo vlogo pri reprodukciji (Handel in sod., 2006).

5.1.1.5 Asociacijske študije in iskanje mutacij

Mnogi polimorfizmi posameznih nukleotidov in ostale mutacije (majhne insercije ali delecije) v posameznih genih, še posebno tistih, ki so neposredno pomembni za spermatogenezo, ter v ne-kodirajočih regijah, so bili povezani z moško neplodnostjo. Zavedati pa se moramo, da so tovrstni rezultati pogosto v neskladju, povezave z neplodnostjo pa so šibke in prihodnje študije velikokrat ne uspejo potrditi prvotnih rezultatov (Aston in Carrell, 2009; Hu in sod., 2011).

a.) Asociacijske študije na ravni celotnega genoma (GWAS)

Pri pristopu GWAS gre za primerjavo celotnega genoma plodnih in neplodnih moških ter iskanje razlik v nukleotidnem zaporedju med tema dvema skupinama. Zavedati se moramo, da neplodnost spada med kompleksne bolezni in je zato najpogosteje rezultat številnih dednih dejavnikov, torej je povezana z velikim številom genov. Glavni cilj asociacijskih študij je določiti kolikšno tveganje za določeno bolezen ima posameznik. Slednje določimo na podlagi njegovega genoma, nato pa skušamo to tveganje zmanjšati/preprečiti s preventivnimi ukrepi (model predvidi in prepreči) (Libioulle in Bours, 2012). Testiranja, ki temeljijo na mrežnih platformah (angl. *Array-based testing platforms*), bodo najverjetneje zelo spremenile naše razumevanje molekularnih osnov neplodnosti. Po zgledu genetskih mrež, je tudi na tem področju želja razviti diagnostični test v obliki plošče z deset do 1000

proteinskih in peptidnih označevalcev, saj bi s tovrstnim testom dosegli mnogo višjo diagnostično specifičnost (Petricoin in sod., 2006). Najverjetneje bo v prihodnosti pristop GWAS zelo razširil naše poznavanje vzrokov moške neplodnosti in s tem pomembno doprinesel k odkritju novih diagnostičnih metod in novih možnosti zdravljenja (Aston in Carrell, 2009).

b.) Asociacijske študije posameznih lokusov

- Polimorfizmi posameznih nukleotidov

Da bi preučili ali polimorfizem posameznega gena vpliva na plodnost, v tovrstnih študijah, ki veljajo za starejši pristop asociacijskih študij, testirajo skupino neplodnih moških in kontrolno skupino plodnih ter gledajo ali je moč najti razlike v SNP-jih preučevanega gena. Do sedaj je bilo samo 61, izmed skupno 571, izbitih genov pri miših in samo 15, izmed skupno 135, diferencialno izraženih genov, testiranih z asociacijskimi študijami pri ljudeh ali domačih živalih. Kljub obširnemu seznamu kandidatnih genov, se v asociacijskih študijah še vedno osredotočajo le na omejeno število, dobro poznanih, kandidatnih genov ali genskih območij (regij). Npr. preučujejo polimorfizem znotraj gena *AR* in iščejo mikrolelecije v območju AZF. V tej študiji smo združili kandidatne gene, povezane z neplodnostjo pri človeku, z geni iz asociacijskih študij na živalih ter jih prikazali kot človeške ortologe. Velika večina zbranih kandidatnih lokusov, testiranih za povezavo z neplodnostjo, izvira iz asociacijskih študij na ljudeh, in le nekaj jih je iz asociacijskih študij na merjascih, bikih in konjih. Potrebno pa je omeniti, da ponovitve posameznih študij, kjer uporabijo druge vzorce, pogosto ne uspejo potrditi rezultatov prvotne študije. Razlogi za ne-ponovljivost rezultatov so etnična raznolikost, heterogenost v preučevani skupini in pa nepravilnosti pri zasnovi poteka poskusa. Dodatne študije, na večjem številu vzorcev, bodo potrebne, da bodo validirale tovrstne rezultate in ugotovile vzroke variabilnosti (Aston in Carrell, 2009).

- Povišanje števila nukleotidnih ponovitev

Povečanje ponovitev števila nukleotidov je bilo prav tako povezano z neplodnostjo pri moških. Vendar pa Peterlin in sod. (2007) opozarjajo na slabo ponovljivost rezultatov. Našli so namreč deset študij, ki so preučevale polimorfizem v genu *AR* in njegovo povezavo z neplodnostjo, ter to povezavo potrdile. Vendar so našli tudi 10 študij, ki omenjene povezave niso potrdile. Slednje nakazuje, da so rezultati pogosto v neskladju in da nadaljnje študije mnogokrat ne uspejo potrditi prvotnih ugotovitev. Tudi v primeru povezave med dolžino ponovitev CAG v genu za mitohondrijsko polimerazo gama (*POLG*) in neplodnostjo pri moških, so rezultati v neskladju, saj sta dve skupini povezavo potrdili (Rovio in sod., 2001; Jensen in sod., 2004), štiri skupine pa niso uspeli dokazati korelacije (Krausz in sod., 2004; Akinin-Seifer in sod., 2005; Brusco in sod., 2006; Liu in sod., 2011). Da bi preverili hipotezo, da se dolžina ponovitev CAG, med kontrolno skupino in skupino moških z oligospermijo razlikuje tudi v primeru gena *ATXN1*, so Kunej in sod. (2004) preučevali alele gena *DMPK*, ampak te povezave niso uspeli potrditi. Kot je razvidno iz omenjenih študij naj še enkrat poudarimo, da so si rezultati pogosto v neskladju. Če želimo odpraviti pomanjkanje ponovljivosti, moramo študije izvesti na večjih skupinah moških, saj bo le to povečalo zanesljivost interpretacije podatkov. Variabilnost rezultatov pa je pogosto tudi posledica etnične raznolikosti preučevanih skupin in zaradi tega morajo biti študije izvedene na različnih populacijah (Aston in Carrell, 2009).

5.1.2 Raven RNA

5.1.2.1 Študije izražanja genov

S podrobno analizo in primerjavo vzorcev izražanja genov, pridobljenih z mikromrežami, lahko opazimo razlike med genskimi prepisi prisotnimi pri plodnih in neplodnih moških (Garrido in sod., 2009). Zanimiv študijski pristop so uporabili Maratou in sod. (2004), ki so želeli preučevati kako na celotni transkriptom vpliva delecija gena *Dazl*. Slednje so preučevali tako, da so miši izbili gen *Dazl* ter nato njen vzorec izražanja primerjali s tistim iz kontrolne skupine normalnih miši. Dokazali so, da ima odsotnost izražanja gena *Dazl* velik učinek in da zaradi tega večina genov v zarodnih celicah ostane na bazičnem nivoju

(angl. *baseline levels*). Na podlagi molekul RNA, izoliranih iz semenčic, lahko torej ugotovimo zakaj je moški neploden (Hamatani, 2012).

5.1.2.2 Majhne nekodirajoče RNA

V jedru odrasle semenčice se nahaja veliko število molekul RNA, ki pa se ne prepisujejo. Pomen majhnih nekodirajočih molekul RNA, kot regulatorjev stabilne RNA transkripcije in translacije postaja vedno bolj očiten (Plasterk, 2006). Predpostavlja se, da so miRNA povezane z moško neplodnostjo, ker delujejo kot postranskripcijski zaviralci (angl. *suppressors*), tako da se preko baznega parjenja pripnejo na svoje tarčne molekule mRNA in posledično povzročijo zaviranje njihovega prepisovanja ali pa jih destabilizirajo (Kim in Nam, 2006). Zatorej visok nivo genskega izražanja ne rezultira vedno tudi v povišanem izražanju proteinov (McIver in sod., 2011), saj molekule miRNA vplivajo na molekule mRNA in s tem zavirajo sintezo proteinov, ki jih le te kodirajo. Na ta način je nadzorovanih približno 30% človeških genov (Lewis in sod., 2005). He in sod. (2009) pa so nedavno tega pojasnili, kako nadzor prepisovanja molekul mRNA v proteine poteka na molekularnem nivoju. Pomembno je poudariti, da SNP-ji igrajo pomembno vlogo tudi na ravni RNA, saj se lahko pojavijo v prekurzorjih miRNA, v tarčnih mestih za miRNA in pa v izrezovalnem kompleksu (angl. *silencing machinery*). Poleg naštetega lahko SNP-ji vplivajo na funkcijo miRNA in zelo pogosto imajo zaradi tega fenotipske učinke, kot je npr. nagnjenost k določeni bolezni (Georges, 2007). Zaradi pomembnosti poznavanja tovrstnih polimorfizmov so Zorc in sod. (2012) izdelali katalog SNP-jev v regiji *seed* molekul miRNA za šest različnih živalskih vrst (človek, miš, piščanec, šimpanz, podgana in cebrica), ki je prosto dostopen na medmrežju (<http://www.integratomics-time.com/miR-seed-SNPs/catalog/>). Ogorevec in sod. (2011) pa so raziskovali vpliv variabilnosti tarč molekul miRNA, v genih povezanih z moško neplodnostjo. Tovrstni geni imajo potencial postati novi molekularno-genetski označevalci, ki bi jih lahko uporabili v diagnostiki moške neplodnosti. Geni, ki se večinoma izražajo samo v testisih ter imajo polimorfne 3'-UTR (neprevedljivo območje; angl. *untranslated region*) in/ali ohranjena tarčna mesta za miRNA so najverjetneje geni, na katere vplivajo molekule miRNA ter lahko s tem prispevajo k moški neplodnosti. Nedolgo nazaj so odkrili nov razred majhnih nekodirajočih molekul RNA in jih poimenovali molekule piRNA (angl. *Piwi-interacting*

RNAs). Te molekule so obilno izražene med spermatogenezo in imajo najverjetneje vlogo v njeni regulaciji, represiji prenosa retrotranspozonov v spolnih celicah, epigenetski regulaciji ter pozitivni regulaciji prevajanja in stabilnosti molekul mRNA (Grivna, 2006; Sai Lakshmi in Agrawal, 2007). Sai Lakshmi in Agrawal (2007) sta pripravila piRNABanko, ki trenutno vsebuje 35823 piRNA najdenih pri človeku, poleg tega pa še 53895 pri miši, 46444 pri podgani, 44417 od drozofile, 356550 od cebrice in 147 od »platypus«. Tako piRNA kot molekule miRNA se vežejo na protein MIWI, ki je nujen za pravilen potek spermatogeneze in pripada družini Argonautnih proteinov po imenu PIWI. Ta protein je najverjetneje povezan z regulacijo celičnega aparata za prevajanje molekul (Grivna, 2006). Reuter in sod. (2011) so pokazali, da okvara katalitične aktivnosti MIWI proteina pri miših, zaradi točkovne mutacije, povzroča neplodnost samčkov. Zaradi tega mutirane spolne celice povečano skladiščijo prepise transpozona LINE1. S to ugotovitvijo so dokazali, da protein MIWI neposredno razreže informacijsko molekulo RNA transpozona. Yan in sod. (2007) so našli molekulam piRNA podobne molekule ter jih poimenovali pilRNA (angl. *piRNA like RNA*). Te molekule se večinoma nahajajo v mišjih testisih, kar pa nakazuje, da verjetno igrajo pomembno vlogo v nadzoru spermatogeneze. Da bi ugotovili natančno vlogo in potek regulacije s strani molekul piRNA pa so na tem področju potrebne še nadaljnje študije.

5.1.3 Raven proteinov

Proteomika se je razvila v pomembno področje biologije in medicine, katerega glavni namen je poiskati in validirati močne tarče na molekularnem nivoju, katere bi lahko uporabili za razvoj občutljivih diagnostičnih postopkov (Tomar in sod., 2010). Potencialne biooznačevalce za moško neplodnost iščejo v semenski plazmi, ki predstavlja mešanico izločkov iz testisov, obmodka in nekaterih pomožnih žlez. V njej najdemo številne proteine, ki so pomembni za pravilno delovanje in preživetje semenčic (Davalieva in sod., 2012). Za razvoj novih biooznačevalcev v diagnostične namene je pomembno določiti celotni nabor proteinov v semenski tekočini, vse proteine v repu semenčice, vse membranske proteine itd. (Barratt, 2008). Sedanja proteomska orodja omogočajo poiskati proteine, katerih izražanje je spremenjeno v vzorcih sperme neplodnih moških in zatorej verjetno prispevajo k neplodnosti. Uporaba bioinformatike pa bo pripomogla k

razumevanju velike količine podatkov, zbranih s proteomskimi študijami (du Plessis, Kashou in sod., 2011). Proteinski bioznačevalci lahko pripomorejo k boljšemu razumevanju nepoznatih vzrokov moške neplodnosti in nas lahko zatorej vodijo k odkrivanju boljših terapevtskih rešitev (Tomar in sod., 2012).

5.1.4 Epigenetika

Znano je, da je moška neplodnost lahko tudi posledica epigenetskih nepravilnosti, kot je npr. neustrezna metilacija DNA. Nenormalno epigenetsko programiranje je bilo predlagano za enega izmed mogočih faktorjev, ki prispevajo k moški neplodnosti. Dokazano je bilo, da okoljski toksini povzročijo kromosomske ali pa epigenetske nepravilnosti v spolnih celicah, kar ima vpliv na naslednje generacije. Če npr. brejo podgano izpostavimo enokrilnemu motilcu vinclozolinu ali pa methoxychloru, potem ima generacija F1 samčkov semenčica slabše kvalitete (število celic, živost celic) in posledično večje možnosti za neplodnost (Anway in Skinner, 2006). DNA metilacijske značke, ključna modifikacija imprintinga, so izbrisane v primordialnih spolnih celicah in nato spolno specifično nazaj vzpostavljene tekom spermatogeneze (Kerjean in sod., 2000; Reik, 2001). Identifikacija genov vključenih v spremenjeno metilacijo DNA, lahko predstavlja nov pristop diagnostike s katero bi določili zakaj je prišlo do bolezni. Slednje lahko izboljša končni izid sedanjih zdravstvenih terapij, kot je oploditev z biomedicinsko pomočjo (Anway in Skinner, 2006). Poleg tega pa Kobayashi in sod. (2007) ugotavljajo, da je izid umetnih oploditev s spermo, ki ima nenormalen vzorec metilacije DNA, relativno slab.

5.2 IZDELAVA KATALOGA LOKUSOV, POVEZANIH Z REPRODUKCIJO PRI MOŠKEM SPOLU SESALCEV IN NJIHOVA GENOMSKA RAZPOREDITEV

Oblikovali smo katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Na enem mestu smo tako združili raznovrstne genomske podatke, pridobljene pri različnih živalskih vrstah (človek, konj, oven, bik, merjasec, miš in podgana). Izdelava tovrstnih zbirk je zelo dolgotrajno delo, saj zahteva obsežen pregled vse razpoložljive literature. Vendar pa so tovrstne podatkovne zbirke zelo pomembne, še posebej pri poligenetskih kompleksnih boleznih, kot je npr. moška neplodnost, saj nudijo centralni dostop do vseh do sedaj poznanih kandidatnih genov. Raziskovalcem na ta način olajšamo raziskave in

omogočimo celosten pregled znanih kandidatnih genov. Prizadevali si bomo, da bo podatkovna zbirka redno posodobljena z novimi lokusi iz prihodnjih raziskav ter bo s tem pripomogla k napredku raziskav na področju moške neplodnosti, katera zadnja leta postaja vse bolj zaskrbljujoč problem moderne družbe.

5.3 ANALIZA BIOLOŠKIH POTI IN RAZVRŠČANJE KANDIDATNIH GENOV PO PRIORITETI

Z bioinformacijsko analizo 826 genov, predhodno povezanih z moško neplodnostjo, smo identificirali 1744 bioloških poteh, kjer se le ti geni pojavljajo. Kar 263 bioloških poti je zadostilo pogojem za statistično značilnost rezultata glede na p-vrednost in Bonferroni statistiko. Še bolj zanimiv pa je naslednji del analize, kjer smo bolj podrobno analizirali prvih deset najbolj statistično značilnih bioloških poti ter poiskali gene, ki se pojavijo v večih. Dejstvo, da se 13 z neplodnostjo povezanih genov ponovi kar v vseh desetih bioloških poteh in da se jih kar 40 ponovi v devetih izmed 10 poti, vzbudi pozornost. Če pa vzamemo pod drobnogled kromosomsko razporeditev genov, ki se pojavijo v vseh desetih bioloških poteh, in pa pozicije tistih, ki se pojavijo v devetih izmed desetih bioloških poti, lahko opazimo, da se kar pet genov nahaja na kromosomu številka 12 in osem genov na kromosomu številka 19. Slednja ugotovitev utegne biti zanimiva, saj nakazuje na pomembnost kromosoma 12 in 19 za nemoteno spermatogenezo. V tej magistrski nalogi torej predlagamo seznam kandidatnih genov, ki bi bili potencialno primerni za izdelavo genskega testa za identifikacijo lokusov povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev. Tovrstni test bi bil namreč zelo dobrodošel, saj kljub temu, da je neplodnost tako pereč problem, dandanes pred vstopom v postopke oploditve z biomedicinsko pomočjo pri moških še vedno rutinsko testirajo le nekaj genetskih vzrokov, kot so kromosomske nepravilnosti in mikrodelecije kromosoma Y. Slednje je predvsem posledica pomanjkanja znanja o genih oz. mutacijah vpletenih v moško neplodnost. Identifikacija lokusov, povezanih z neplodnostjo, pa je potrebna tudi za selekcijo v živinoreji, kjer želimo čim bolj plodne živali, saj slednje pomeni več potomcev.

5.4 PREVERJANJE POVEZAVE KANDIDATNIH GENOV Z REPRODUKTIVNIMI LASTNOSTMI

Testiranje seznama predlaganih močnejših kandidatnih genov za moško neplodnost na eksperimentalnih podatkih iz podatkovne zbirke MPD, je pokazalo, da obstaja 508 poznanih SNP-jev, ki se razlikujejo med plodnimi (C57BL/6J in FVB/NJ) in slabo plodnimi inbridiranimi linijami miši (AKR/J in C3H/HeJ). Se pravi, da ima plodna skupina miši drugačen alel določenega gena, kot ga ima neplodna skupina miši. Iskali smo razlike v alelih trinajstih genov, ki so se pojavili v vseh desetih statistično najbolj značilnih bioloških poteh glede na analizo z orodjem DAVID (*BRCA2*, *MKKS*, *PAFAH1B1*, *OCA2*, *ZBTB16*, *FANCG*, *BAX*, *KIT*, *SIX5*, *BBS2*, *BBS4*, *DHH*, *DLD*) in ustrezne SNP-je našli kar pri šestih genih (*Brca2*, *Pafah1b1*, *Oca2*, *Zbtb16*, *Fancg* in *Kit*). Večina mutacij (498 od skupno 508) se nahaja v intronih, kar sicer nima vpliva na zaporedje proteina, a so tovrstne mutacije lahko vseeno zelo pomembne, saj se v intronih nahajajo genski elementi, ki vplivajo na izražanje genov (Frankel, 2012). V genu *Kit* smo našli eno sinonimno mutacijo. Pri tem biotipu mutacij se zaradi degeneriranosti genskega koda aminokislinsko zaporedje proteina sicer ne spremeni, a je bilo v zadnjem času dokazano, da imajo sinonimne mutacije velik vpliv na izražanje, konformacijo in funkcijo proteinov ter so zato povezane s številnimi boleznimi (Sauna in Kimchi-Sarfaty, 2011). Zelo dobro potrditev predlaganega kandidatnega gena pa predstavlja nesinonimna mutacija v genu *Oca2* (angl. *oculocutaneous albinism II*). Nesinonimne mutacije so tip mutacij, kjer se aminokislinsko zaporedje proteina zaradi določenega SNP-ja spremeni. V primeru gena *Oca2* imata torej plodni liniji miši drugačno aminokislinsko zaporedje proteina, kot neplodni liniji miši, kar pa nakazuje na pomembnost tega gena v reprodukciji. Gen smo v katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev uvrstili na podlagi podatkovne zbirke MGI, kjer smo našli podatek, da so KO miši za ta gen neplodne. $Oca2^{p-25H}/Oca2^{p-25H}$ miši imajo značilno neobarvano dlako in roza oči. Ta fenotip vključuje tudi nekoliko sunkovito tresočo hojo, manjšo velikost živali (v primerjavi s kontrolnimi), moško sterilnost in delno sterilnost samic (Gardner in sod., 1992). Protein, ki ga kodira ta gen je integralni membranski protein udeležen pri transportu majhnih molekul, posebno triožina, ki je prekurzor za melanin. Mutacije v tem genu pri ljudeh povzročijo albinizem. Za albino ljudi sicer ni znano, da bi imeli težave z neplodnostjo, je pa zanimivo, da se gen *Oca2* nahaja v

regiji kromosoma 15q, ki je odgovorna za pojav sindromov Prader-Willi in Angelman. Za paciente s sindromom Prader-Willi je značilno, da se pri njih pojavlja hipohonadotropni hipogonadizem (Horsthemke in Wagstaff, 2008). Slednje dokazuje pomembnost gena *OCA2* za nemoteno reprodukcijo. Tekom nadaljnjega preučevanja polimorfizmov preučevanih genov smo našli še 6 SNP-jev v regiji 3'-UTR gena *Pafah1b1* in 2 SNP-ja v regiji 3'-UTR gena *Zbtb16*. Regija 3'-UTR je del molekule mRNA, ki se ne prevede v protein, a kljub temu pomembno vpliva na izražanje genov, saj je tu nahajajo različni cis-elementi, povezani s post-transkripcijsko regulacijo, kot so tarčna mesta za molekule miRNA in RNA-vezavne proteine (Rehfeld in sod., 2013). Z vezavo miRNA na specifična mesta znotraj 3'-UTR lahko le te povzročijo znižanje izražanja genov številnih molekul mRNA, tako da inhibirajo prevajanje ali pa neposredno povzročijo njeno razgradnjo. V omenjeni regiji se nahajajo tudi vezavna mesta za represorske proteine, katerih vezava zmanjša izražanje molekule mRNA. Regulatorne regije znotraj 3'-UTR lahko torej vplivajo na poliadenilacijo, učinkovitost prevajanja, lokalizacijo in obstojnost molekule mRNA (Barrett in sod., 2012), zato razlike v alelih med plodno in neplodno skupino miši potrjujejo pomembnost teh dveh genov za reprodukcijo. V katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev smo tudi ta dva omenjena gena uvrstili na podlagi informacije iz MGI, da so KO miške za ta dva gena neplodne. Gen *Pafah1b1* (angl. *platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1*) je protein-kodirajoči gen, katerega mutacija ali izguba ima za posledico sindrom "Miller-Dieker lissencephaly". Za moške paciente s tem sindromom so značilne hipoplastične zunanje genitalije, kar pomeni, da so nerazvite oz. so nepopolnoma razvite (Schinzel, 1988). Znano je, da se gen *PAFAH1B1* izraža v testisih, da pa bi točno določili njegovo tamkajšnjo vlogo, so Nayernia in sod. (2003) izdelali homozigotno KO miš za omenjeni gen. Pokazali so, da so homozigotni mutantni samci neplodni in da se gen izraža predvsem v spermatidih ter je zato spermatogeneza blokirana v primeru njegove odsotnosti. Mutantne spermatide namreč ne tvorijo pravih akrosomov, njihova jedra pa so nepravilne velikosti in oblike. Rezultati omenjene raziskovalne skupine potrjujejo pomembnost gena *Pafah1b1* za spermatogenezo, še posebno v diferenciaciji spermatid v odrasle spermatozoe. Naslednji gen s prisotnima SNP-jema v regiji 3'-UTR, gen *ZBTB16* (angl. *zinc finger and BTB domain containing 16*) kodira protein, ki se nahaja v jedru in je vključen pri napredovanju celičnega cikla, je pa tudi v proteinski interakciji s histonsko deacetilazo (NCBI, 2013). Tako pravilni potek

celičnega cikla, kot delovanje histonske deacetilaze, sta ključna za spermatogenezo, kar potrjuje pomembnost gena *ZBTB16* za reprodukcijo. Okvare tega gena pa se kažejo v deformaciji skeleta, genitalni hipoplaziji in mentalni zaostalosti (Wieczorek in sod., 2002).

Če povzamemo rezultate naše raziskave, lahko zaključimo, da je test na eksperimentalnih podatkih vzetih iz MPD potrdil, da je vsaj šest izmed 13 predlaganih močnejših kandidatnih genov pomembnih za neplodnost pri moškem spolu sesalcev. Pri treh izmed teh šestih genov so mutacije intronske, kar seveda ne izključi njihove pomembnosti, a vseeno imajo večji vpliv nesinonimna mutacija v genu *Oca2* ter mutaciji v regiji 3'-UTR genov *Pafah1b1* in *Zbtb16*. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno sekvencirati še več živali, saj obstaja možnost, da pri teh genih vsi SNP-ji še niso odkriti. V nadaljnje pa bi bilo potrebno seznam kandidatnih genov testirati še pri drugih vrstah sesalcev, npr. smiselno bi bilo preveriti ali imajo plodni in neplodni moški v predlaganih genih drugačne alelne različice. Enaka študija pa bi bila vsekakor koristna tudi pri domačih živalih, kot so npr. biki, saj je dobra plodnost domačih živali in posledično veliko število njihovih potomcev izrednega pomena za dobrobit človeštva.

6 SKLEPI

- S pristopom primerjalne integratomike smo združili podatke o reprodukciji pri različnih vrstah sesalcev, ne glede na raziskovalni pristop, s katerim so bili pridobljeni.
- S sistemstskim pregledom vse razpoložljive literature in podatkovnih zbirk smo izdelali prvi centralni katalog lokusov, povezanih z reprodukcijo pri moškem spolu sesalcev, ki bo zelo pripomogel k razvoju podočja.
- Za zbrane kandidatne gene smo poiskali človeške ortologe in jih prikazali v obliki genomskega prikaza.
- Z bioinformatičnim orodjem DAVID Bioinformatics Resources smo izvedli obogatitveno analizo kandidatnih genov ter identificirali 263 značilnih bioloških poti, v katere so ti geni uvrščeni (npr.: angl. *sexual reproduction, multicellular organism reproduction, reproductive process in a multicellular organism...*).
- Geni, ki se pojavijo v večih bioloških poteh, so najverjetneje močnejši kandidatni geni za moško neplodnost. Identificirali smo 13 genov, ki se nahajajo v vseh

desetih bioloških poteh: *BRCA2*, *MKKS*, *PAFAH1B1*, *OCA2*, *ZBTB16*, *FANCG*, *BAX*, *KIT*, *SIX5*, *BBS2*, *BBS4*, *DHH* in *DLD*. Naštete gene predlagamo za kandidatne gene, ki imajo potencial kot geni z močnejšim vplivom pri neplodnosti.

- Za predlagani seznam kandidatnih genov smo preverili eksperimentalne podatke iz podatkovne zbirke MPD. Pri šestih genih (*Brca2*, *Pafah1b1*, *Oca2*, *Zbtb16*, *Fancg* in *Kit*) se razlikujejo aleli med dobro in slabo plodnimi inbridiranimi linijami miši.

7 POVZETEK

Neplodnost je vedno večji problem moderne družbe, vendar pa se ji kljub pogostosti posveča manj pozornosti, kot ostalim kompleksnim boleznim (Aston in sod., 2010). Študije zadnjih let nedvomno dokazujejo, da ima veliko nepravilnosti v poteku spermatogeneze genetske vzroke. Raziskovalci si prizadevajo poiskati nove genetske označevalce, ki bi pomagali sklepati o zmožnosti oploditve in o sami moški neplodnosti (Ferlin, 2012). Na spletu je mogoče najti podatkovno zbirko »the SpermatogenesisOnline 1.0 database«, ki je bila zadnjič posodobljena 13. junija 2012 in vsebuje kar 22901 različnih proteinov za katere je bilo ugotovljeno, da so vključeni v procesu spermatogeneze (SpermatogenesisOnline, 2012). V zadnjih letih pa je bil dosežen velik napredek, ki je v veliki meri rezultat izdelave številnih mišjih modelov z nepravilnosti pri reprodukciji in izvršitve mnogih asociacijskih študij pri človeku (Yatsenko in sod., 2010). Znanstveniki se ne osredotočajo več samo na posamične lokuse, kot je bila navada v preteklosti, ampak se poslužujejo tudi analize na ravni celotnega genoma z metodo GWAS. Ko študiramo genetske vzroke kompleksnih, več genskih boleznih, se moramo zavedati, da imajo različne populacije različna genetska ozadja. Slednje ima neposreden, a kljub temu velik vpliv. Zaradi tega ne smemo zavreči kandidatnega lokusa, kateri ne presega mejne vrednosti, da bi ga lahko imenovali za statistično značilnega. Tovrstnim lokusom moramo preveriti povezavo z neplodnostjo še pri drugih populacijah, saj bodo pri njih morda statistično značilni. Veliko obetajo genetski označevalci, katerim je bila povezava z neplodnostjo dokazana v različnih živalskih vrstah, so do enakih rezultatov prišli z uporabo različnih raziskovalnih pristopov ali pa so to povezavo potrdile različne neodvisne študije. Na splošno pa velja, da lokus ne mora biti potrjen oziroma zavrnjen, kot kandidat za neplodnost, na podlagi le ene asociacijske študije oziroma študije izražanja genov. S to tezo se strinja tudi Mackay (2001), ki pravi, da kandidatni gen lahko velja za verodostojnega le če to pokaže več različnih študij. Rezultatom lahko še bolj zaupamo, če so le ti plod raziskav na različnih živalskih vrstah. Womack (2006) opozarjajo, da zanemarjamo in premalo cenimo pomen študij na domačih živalih, saj rezultati le teh lahko veliko prispevajo k napredku sodobne medicine. Kljub temu pa seveda vseeno velja, da imajo različne populacije značilni »genetski make-up« in zato rezultati asociacijskih študij ali pa najdeni QTL-i, med njimi niso neposredno prenosljivi (Ren in sod., 2009). Našli smo veliko število potencialnih kandidatnih lokusov

identificiranih v miši, ki pa do sedaj še niso bili preverjeni na človeku. Želimo si, da bi ta več-vrstni pregled pospešil razvoj novih genetskih označevalcev in doprinesel k napredku v medicini. Dandanes se zavedamo, da je neplodnost kompleksen fenotip, in zato moramo, če jo želimo razumeti, uporabiti vsa orodja sistemske biologije (Nutti in Krausz, 2008; Yatsenko in sod., 2010). Raziskovalci se s tem namenom poslužujejo genomskih, transkriptomskih, MiRnomskih, proteomskih in epigenomskih tipov študij. Kljub temu pa še vedno ni diagnostičnega testa, ki bi zanesljivo predvidel neplodnost. Sedanji testi so osnovani samo na mikrolecijah kromosoma Y (Peterlin in sod., 2004; Nutti in Krausz, 2008). V tej magistrski nalogi smo želeli zbrati vse z neplodnostjo povezane lokuse, ki bodo v prihodnosti omogočili razvoj učinkovitega in zanesljivega diagnostičnega testa.

8 VIRI

- Adam M., Schwarzer J.U., Kohn F.M., Strauss L., Poutanen M., Mayerhofer A. 2011. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Human Reproduction*, 26, 10: 2613-2625
- Aknin-Seifer I.E., Touraine R.L., Lejeune H., Jimenez C., Chouteau J., Siffroi J.P., McElreavey K., Bienvenu T., Patrat C., Levy R. 2005. Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multi-centre French study. *Human Reproduction*, 20, 3: 736-740
- Anway M.D, Skinner M.K. 2006. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*, 147: 11
- Aoki V., Liu L., Jones K., Hatasaka H., Gibson M., Peterson C., Carrell D. 2006. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility*, 86, 5: 1408-1415
- Aston K.I. Carrell D.T. 2009. Genome-Wide Study of Single-Nucleotide Polymorphisms Associated With Azoospermia and Severe Oligozoospermia. *Journal of Andrology*, 30, 6: 711-725
- Aston K.I., Krausz C., Laface I., Ruiz-Castane E., Carrell D.T. 2010. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Human Reproduction*, 25, 6: 1383-1397
- Baker M.A., Nixon B., Naumovski N., Aitken R. J. 2012. Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 4: 211-217
- Barda S., Paz G., Yogev L., Yavetz H., Lehavi O., Hauser R., Botchan A., Breitbart H., Kleiman S.E. 2012. Expression of BET genes in testis of men with different spermatogenic impairments. *Fertility and Sterility*, 97, 1: 46-52
- Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 21: 3613-3634
- Barratt C.L.R. 2008. The human sperm proteome: the potential for new biomarkers of male fertility and a transformation in our understanding of the spermatozoon as a machine: Commentary on the article 'Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples' by Martinez et al. *Human Reproduction*, 23, 6: 1240-1241
- Belet U., Danaci M., Sarikaya S., Odabas F., Utas C., Tokgoz B., Sezer T., Turgut T., Erdogan N., Akpolat T. 2002. Prevalence of epididymal, seminal vesicle, prostate, and testicular cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Urology*, 60, 1: 138-141
- Bhagavath B., Layman L.C. 2007. The genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25, 4: 272-286
- Bigler D., Chen M., Waters S., White J.M. 1997. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trends in Cell Biology*, 7, 6: 220-225
- Boissonnas C. C., Abdalaoui H.E., Haelewyn V., Fauque P., Dupont J.M., Gut I., Vaiman D., Jouannet P., Tost J., Jammes H. 2009. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19

- locus in spermatozoa from infertile men. *European Journal of Human Genetics*, 18, 1: 73-80
- Bonaparte E., Moretti M., Colpi G.M., Nerva F., Contalbi G., Vaccalluzzo L., Tabano S., Grati F.R., Gazzano G., Sirchia S.M., Simoni G., Gallina A. 2010. ESX1 gene expression as a robust marker of residual spermatogenesis in azoospermic men. *Human Reproduction*, 25, 6: 1398-1403
- Bonduelle M., Wennerholm U.B., Loft A., Tarlatzis B.C., Peters C., Henriët S., Mau C., Victorin-Cederquist A., Van Steirteghem A., Balaska A., Emberson J.R., Sutcliffe A.G. 2005. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Human Reproduction*, 20, 2: 413-419
- Brusco A., Michielotto C., Gatta V., Foresta C., Matullo G., Zeviani M., Ferrari G., Dragone E., Calabrese G., Rossato M., Stuppia L., Migone, N. 2006. The polymorphic polyglutamine repeat in the mitochondrial DNA polymerase gamma gene is not associated with oligozoospermia. *Journal of Endocrinological Investigation*, 29, 1: 1-4
- Cannistraci C.V., Ogorevc J., Zorc M., Ravasi T., Dovc P., Kunej T. 2013. Pivotal role of the muscle-contraction pathway in cryptorchidism and evidence for genomic connections with cardiomyopathy pathways in RASopathies. *BMC Medical Genomics*, 6, 1: 5
- Chan C.C., Shui H.A., Wu C.H., Wang C.Y., Sun G.H., Chen H.M., Wu G.J. 2009. Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm. *Journal of Proteomic Research*, 8, 11: 5382-5386
- Cheng L.J., Li J.M., Chen J., Ge Y.H., Yu Z.R., Han D.S., Zhou Z.M., Sha J.H. 2003. NYD-SP16, a novel gene associated with spermatogenesis of human testis. *Biology of Reproduction*, 68, 1: 190-198
- Cheng L. J., Zhou Z.M., Li J.M., Zhu H., Zhou Y.D., Wang L.R., Lin M., Sha J.H. 2002. Expression of a novel HsMCAK mRNA splice variant, tsMCAK gene, in human testis. *Life Sciences*, 71, 23: 2741-57
- Cho C. 1998. Fertilization Defects in Sperm from Mice Lacking Fertilin . *Science*, 281, 5384: 1857-1859
- Coştur P., Filiz S., Gonca S., Çulha M., Güleçen T., Solakoğlu S., Canberk Y., Çalışkan E. 2012. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the azoospermic human testis. *Andrologia*, 44: 654-660
- Curry E., Safranski T.J., Pratt S.L. 2011. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology*, 76, 8: 1532-1539
- Dalgaard M.D., Weinhold N., Edsgard D., Silver J.D., Pers T.H., Nielsen J.E., Jorgensen N., Juul A., Gerds T.A., Giwercman A., Giwercman Y.L., Cohn-Cedermark G., Virtanen H.E., Toppari J., Dugaard G., Jensen T.S., Brunak S., Rajpert-De Meyts E., Skakkebaek N.E., Leffers H., Gupta R. 2011. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *Journal of Medical Genetics*, 49, 1: 58-65
- Davalieva K., Kiprijanovska S., Noveski P., Plaseski T., Kocevaska B., Broussard C., Plaseska-Karanfilska D. 2012. Proteomic analysis of seminal plasma in men with different spermatogenic impairment. *Andrologia*, 44, 4: 256-264
- Dhillon V.S., Shahid M., Husain S.A. 2007. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of

- GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Molecular Human Reproduction*, 13, 4: 213-222
- Drozdik M., Stefankiewicz J., Kurzawa R., Gornik W., Baczkowski T., Kurzawski M. 2009. Association of the MDR1 (ABCB1) gene 3435C>T polymorphism with male infertility. *Pharmacological Reports*, 61, 4: 690-696
- du Plessis S.S., Kashou A.H., Benjamin D.J., Yadav S.P., Agarwal A. 2011. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 36
- El Inati E., Muller J., Viville S. 2012. Autosomal mutations and human spermatogenic failure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 27: 27
- Ellis P.J., Furlong R.A., Wilson A., Morris S., Carter D., Oliver G., Print C., Burgoyne P.S., Loveland K.L., Affara N.A. 2004. Modulation of the mouse testis transcriptome during postnatal development and in selected models of male infertility. *Molecular Human Reproduction*, 10, 4: 271-281
- Escalier D. 2006. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Human Reproduction Update*, 12, 4: 449-461
- Fang X., Zhou Z.M., Lu L., Yin L.L., Li J.M., Zhen Y., Wang H., Sha J.H. 2004. Expression of a novel pyridoxal kinase mRNA splice variant, PKH-T, in human testis. *Asian Journal of Andrology*, 6, 2: 83-91
- Feig C., Kirchhoff C., Ivell R., Naether O., Schulze W., Spiess A.N. 2007. A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 13, 1: 33-43
- Ferlin A. 2012. New genetic markers for male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 14, 6: 807-808
- Ferlin A., Bogatcheva N.V., Ganesello L., Pepe A., Vinanzi C., AgoulNIK A.I., Foresta C. 2006. Insulin-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome: clinical and functional characterization. *Molecular Human Reproduction*, 12, 6: 401-406
- Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. 2007. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*, 14, 6: 734-745
- Feuk L., Carson A.R., Scherer S.W. 2006. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 7, 2: 85-97
- Ford J.J., Wise T.H., Lunstra D.D., Rohrer G.A. 2001. Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. *Biology of Reproduction*, 65, 3: 906-912
- Fox M.S., Ares V.X., Turek P.J., Haqq C., Reijo Pera R.A. 2003. Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. *Molecular Reproduction and Development*, 66, 4: 403-421
- Frankel N. 2012. Multiple layers of complexity in cis-regulatory regions of developmental genes. *Developmental Dynamics*, 241, 12: 1857-1866
- Gardner J.M., Nakatsu Y., Gondo Y., Lee S., Lyon M.F., King R.A., Brilliant M.H. 1992. The mouse pink-eyed dilution gene: association with human Prader-Willi and Angelman syndromes. *Science*, 257, 5073: 1121-1124
- Garrido N., Martínez-Conejero J.A., Jauregui J., Horcajadas J.A., Simón C., Remohí J., Meseguer M. 2009. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertility and Sterility*, 91, 4: 1307-1310

- Georges M. 2007. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait Loci in domestic animals. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8: 131-162
- Giachini C., Nuti F., Turner D.J., Laface I., Xue Y., Daguin F., Forti G., Tyler-Smith C., Krausz C. 2009. TSPY1 Copy Number Variation Influences Spermatogenesis and Shows Differences among Y Lineages. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94, 10: 4016-4022
- Gottlieb B., Beitel L.K., Trifiro M.A. 1999. Androgen Insensitivity Syndrome. *GeneReviews*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1429/> (11. apr. 2013)
- Grigorova M., Punab M., Poolamets O., Kelgo P., Ausmees K., Korrovits P., Vihljajev V., Laan M. 2009. Increased Prevalance of the -211 T Allele of Follicle Stimulating Hormone (FSH) Subunit Promoter Polymorphism and Lower Serum FSH in Infertile Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95, 1: 100-108
- Grinchuk O.V., Jenjaroenpun P., Orlov Y.L., Zhou J., Kuznetsov V.A. 2010. Integrative analysis of the human cis-antisense gene pairs, miRNAs and their transcription regulation patterns. *Nucleic Acids Research*, 38, 2: 534-547
- Grivna S.T. 2006. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 36: 13415-13420
- Guo X., Shen J., Xia Z., Zhang R., Zhang P., Zhao C., Xing J., Chen L., Chen W., Lin M., Huo R., Su B., Zhou Z., Sha J. 2010. Proteomic analysis of proteins involved in spermiogenesis in mouse. *Journal of Proteome Research*, 9, 3: 1246-1256
- Hackstein J.H., Hochstenbach R., Pearson P.L. 2000. Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Trends in Genetics*, 16, 12: 565-572
- Hamatani T. 2012. Human spermatozoal RNAs. *Fertility and Sterility*, 97, 2: 275-281
- Handel M.A., Lessard C., Reinholdt L., Schimenti J., Eppig J.J. 2006. Mutagenesis as an unbiased approach to identify novel contraceptive targets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250, 1-2: 201-205
- Hardelin J.P., Dod C. 2008. The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sexual Development*, 2, 4-5: 181-193
- Harrison R.A., Dott H.M., Foster G.C. 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect". *Journal of Experimental Zoology*, 222, 1: 81-88
- Hartmann S. 2006. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 12, 6: 407-411
- Harton G.L., Tempest H.G. 2011. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 14, 1: 32-39
- He Z. 2006. Microarray technology offers a novel tool for the diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. *Reproduction*, 132, 1: 11-19
- He Z., Kokkinaki M., Pant D., Gallicano G.I., Dym M. 2009. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, 137, 6: 901-911
- Hildebrand M.S., Avenarius M.R., Fellous M., Zhang Y., Meyer N.C., Auer J., Serres C., Kahrizi K., Najmabadi H., Beckmann J.S., Smith R.J.H. 2010. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *European Journal of Human Genetics*, 18, 11: 1178-1184

- Holloway K., Roberson E.C., Corbett K.L., Kolas N.K., Nieves E., Cohen P.E. 2011. NEK1 Facilitates Cohesin Removal during Mammalian Spermatogenesis. *Genes*, 2, 1: 260-279
- Horsthemke B., Wagstaff J. 2008. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *American Journal of Medical Genetics*, 146A: 2041-2052
- Hu Z., Xia Y., Guo X., Dai J., Li H., Hu H., Jiang Y., Lu F., Wu Y., Yang X., Yao B., Lu C., Xiong C., Li Z., Gui Y., Liu J., Zhou Z., Shen H., Wang X., Sha J. 2011. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nature Genetics*, 44, 2: 183-186
- Hu Z.L., Park C.A., Wu X.L., Reecy J.M. 2012. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Research*, 24: 24
- Huang da W., Sherman B.T., Tan Q., Kir J., Liu D., Bryant D., Guo Y., Stephens R., Baseler M.W., Lane H.C., Lempicki R.A. 2007. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 35: 18
- Huang M., Wang H., Li J., Zhou Z., Du Y., Lin M., Sha J. 2006. Involvement of ALF in human spermatogenesis and male infertility. *International Journal of Molecular Medicine*, 17, 4: 599-604
- Integratomics TIME. 2013.
<http://www.integratomics-time.com/user> (april 2013)
- Jamsai D., O'Bryan M.K. 2011. Mouse models in male fertility research. *Asian Journal of Andrology*, 13, 1: 139-151
- Jensen M., Leffers H., Petersen J.H., Nyboe Andersen A., Jorgensen N., Carlsen E., Jensen T.K., Skakkebaek N.E. Rajpert-De Meyts E. 2004. Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility. *Human Reproduction*, 19, 1: 65-70
- Johnson M.D. 1998. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertility and Sterility*, 70, 3: 397-411
- Jungwirth A., Giwercman A., Tournaye H., Diemer T., Kopa Z., Dohle G., Krausz C. 2012. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 62, 2: 324-332
- Kanagarajah P., Ayyathurai R., Lynne C.M. 2012. Male infertility and adult polycystic kidney disease - revisited: case report and current literature review. *Andrologia*, 44: 838-841
- Keber R., Rozman D., Horvat S. 2013. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. *The Journal of Lipid Research*, 54, 1: 20-33
- Kerjean A., Dupont J.M., Vasseur C., Le Tessier D., Cuisset L., Paldi A., Jouannet P., Jeanpierre M. 2000. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Human Molecular Genetics*, 9, 14: 2183-2187
- Khazamipour N., Noruzinia M., Fatehmanesh P., Keyhaneh M., Pujol P. 2009. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Human Reproduction*, 24, 9: 2361-2364
- Kim V.N., Nam J.W. 2006. Genomics of microRNA. *Trends in Genetics*, 22, 3: 165-173

- Kimmins S. 2004. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 128, 1: 5-12
- Kobayashi H., Sato A., Otsu E., Hiura H., Tomatsu C., Utsunomiya T., Sasaki H., Yaegashi N., Arima T. 2007. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics*, 16, 21: 2542-2551
- Krausz C. 2011. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25, 2: 271-285
- Krausz C., Guarducci E., Becherini L., Degl'Innocenti S., Gerace L., Balercia G., Forti G. 2004. The clinical significance of the POLG gene polymorphism in male infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 9: 4292-4297
- Krawetz S.A., Kruger A., Lalancette C., Tagett R., Anton E., Draghici S., Diamond M.P. 2011. A survey of small RNAs in human sperm. *Human Reproduction*, 26, 12: 3401-3412
- Kumar S., Tomar A.K., Singh S., Saraswat M., Singh S., Singh T.P., Yadav S. 2012. Human serum albumin as a new interacting partner of prolactin inducible protein in human seminal plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 2: 317-322
- Kunej T. 2004. CTG amplification in the DM1PK gene is not associated with idiopathic male subfertility. *Human Reproduction*, 19, 9: 2084-2087
- Kunej T., Jevsinek Skok D., Zorc M., Ogrinc A., Michal J.J., Kovac M., Jiang Z. 2012. Obesity Gene Atlas in Mammals. *Journal of Genomics*, 1: 45-55
- L'Hote D., Serres C., Laissue P., Oulmouden A., Rogel-Gaillard C., Montagutelli X., Vaiman D. 2007. Centimorgan-Range One-Step Mapping of Fertility Traits Using Interspecific Recombinant Congenic Mice. *Genetics*, 176, 3: 1907-1921
- La Salle S., Palmer K., O'Brien M., Schimenti J.C., Eppig J., Handel M.A. 2012. Spata22, a novel vertebrate-specific gene, is required for meiotic progress in mouse germ cells. *Biology of Reproduction*, 86, 2: 45
- Lai Y.C., Wang W.C., Yang J.J., Li S.Y. 2009. Expansion of CAG repeats in the spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) gene in idiopathic oligozoospermia patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26, 5: 257-261
- Le Roy I., Tordjman S., Migliore-Samour D., Degrelle H., Roubertoux P.L. 2001. Genetic architecture of testis and seminal vesicle weights in mice. *Genetics*, 158, 1: 333-340
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, 120, 1: 15-20
- Lian J., Zhang X., Tian H., Liang N., Wang Y., Liang C., Li X., Sun F. 2009. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 1: 13
- Libioulle C., Bours V. 2012. [Complex diseases: the importance of genetics]. *Revue médicale de Liège*, 67, 5-6: 220-225
- Lin C., Tholen E., Jennen D., Ponsuksili S., Schellander K., Wimmers K. 2006. Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 6: 538-543
- Liu S.Y., Zhang C.J., Peng H.Y., Yao Y F., Shi L., Chen J.B., Lin K.Q., Yu L., Huang X.Q., Sun H., Chu J.Y. 2011. CAG-repeat variant in the polymerase gamma gene and male infertility in the Chinese population: a meta-analysis. *Asian Journal of Andrology*, 13, 2: 298-304

- Mackay T.F. 2001. The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics*, 35: 303-339
- Mansour R.T., Fahmy I.M., Taha A.K., Tawab N.A., Serour G.I., Aboulghar M.A. 2003. Intracytoplasmic spermatid injection can result in the delivery of normal offspring. *Journal of Andrology*, 24, 5: 757-764
- Maratou K., Forster T., Costa Y., Taggart M., Speed R.M., Ireland J., Teague P., Roy D., Cooke H.J. 2004. Expression profiling of the developing testis in wild-type and *Dazl* knockout mice. *Molecular Reproduction and Development*, 67, 1: 26-54
- Marques C.J., Costa P., Vaz B., Carvalho F., Fernandes S., Barros A., Sousa M. 2007. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction*, 14, 2: 67-74
- Martinez-Heredia J., de Mateo S., Vidal-Taboada J.M., Balleca J.L., Oliva R. 2008. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction*, 23, 4: 783-791
- Matzuk M.M. Lamb D.J. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, 14, 11: 1197-1213
- May-Panloup P., Chretien M.F., Savagner F., Vasseur C., Jean M., Malthiery Y., Reynier, P. 2003. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*, 18, 3: 550-556
- Mouse Phenome Database. 2013.
<http://phenome.jax.org/> (maj 2013)
- McIver S.C., Roman S.D., Nixon B., McLaughlin E.A. 2011. miRNA and mammalian male germ cells. *Human Reproduction Update*, 18, 1: 44-59
- Meschede D. Horst J. 1997. The molecular genetics of male infertility. *Molecular Human Reproduction*, 3, 5: 419-430
- Mifsud A., Sim C.K., Boettger-Tong H., Moreira S., Lamb D.J., Lipshultz L.I., Yong E.L. 2001. Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertility and Sterility*, 75, 2: 275-281
- Milardi D., Grande G., Vincenzoni F., Messana I., Pontecorvi A., De Marinis L., Castagnola M., Marana R. 2012. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertility and Sterility*, 97, 1: 67-73
- Montjean D., De La Grange P., Gentien D., Rapinat A., Belloc S., Cohen-Bacrie P., Menezo Y., Benkhalifa M. 2012. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 1: 3-10
- Nanassy L., Carrell D.T. 2011. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*, 95, 7: 2310-2314
- Nayernia K., Vauti F., Meinhardt A., Cadenas C., Schweyer S., Barbara I.M., Schwandt I., Chowdhury K., Engel W., Arnold H.H. 2003. Inactivation of a testis-specific *Lis1* transcript in mice prevents spermatid differentiation and causes male infertility. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 48: 48377-48385
- NCBI. 2013.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7704> (maj 2013)
- Nuti F., Krausz C. 2008. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, 16, 4: 504-513
- O'Flynn O'Brien K.L., Varghese A.C., Agarwal A. 2010. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility*, 93, 1: 1-12

- Ogorevc J., Dovc P., Kunej T. 2011. Comparative Genomics Approach to Identify Candidate Genetic Loci for Male Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 2: 229-239
- Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*, 40, 6: 832-851
- Olesen I.A., Sonne S.B., Hoei-Hansen C.E., Rajpert-DeMeyts E., Skakkebaek N.E. 2007. Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21, 3: 462-478
- Pan H., Li Y.Y., Li T.C., Tsai W.T., Li S.Y., Hsiao K.M. 2002. Increased (CTG/CAG)(n) lengths in myotonic dystrophy type 1 and Machado-Joseph disease genes in idiopathic azoospermia patients. *Human Reproduction*, 17, 6: 1578-1583
- Perl A., Qian Y., Chohan K.R., Shirley C.R., Amidon W., Banerjee S., Middleton F.A., Konkrite K.L., Barcza M., Gonchoroff N., Suarez S.S., Banki K. 2006. Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 40: 14813-14818
- Peterlin B., Kunej T., Hristovski D. 2004. Diagnostic test for Y chromosome microdeletion screening in male infertility. *Genetic Testing*, 8, 1: 45-49
- Peterlin B., Zorn B., Teran N., Kunej T. 2007. Analysis of the CAG repeat number in exon 1 of the androgen receptor gene in Slovene men with idiopathic azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Asian Journal of Andrology*, 9, 2: 280-282
- Petricoin E.F., Belluco C., Araujo R.P., Liotta L.A. 2006. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nature Reviews Cancer*, 6, 12: 961-967
- Plasterk R.H.A. 2006. Micro RNAs in Animal Development. *Cell*, 124, 5: 877-881
- Platts A.E., Dix D.J., Chemes H.E., Thompson K.E., Goodrich R., Rockett J.C., Rawe V.Y., Quintana S., Diamond M.P., Strader L.F., Krawetz S.A. 2007. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Human Molecular Genetics*, 16, 7: 763-773
- Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.h., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., González J.R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura k., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 7118: 444-454
- Rehfeld A., Plass M., Krogh A., Friis-Hansen L. 2013. Alterations in polyadenylation and its implications for endocrine disease. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 4: 53
- Reijo R., Lee T.Y., Salo P., Alagappan R., Brown L.G., Rosenberg M., Rozen S., Jaffe T., Straus D., Hovatta O., Chapelle a., Silber S., Page D.C. 1995. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 10, 4: 383-393
- Reik W. 2001. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*, 293, 5532: 1089-1093
- Ren D.R., Ren J., Xing Y.Y., Guo Y.M., Wu Y.B., Yang G.C., Mao H.R., Huang L.S. 2009. A genome scan for quantitative trait loci affecting male reproductive traits in a

- White Duroc x Chinese Erhualian resource population. *Journal of Animal Science*, 87, 1: 17-23
- Repping S., Skaletsky H., Lange J., Silber S., Van D.V.F., Oates R.D., Page D.C., Rozen S. 2002. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *The American Journal of Human Genetics*, 71, 4: 906-922
- Reuter M., Berninger P., Chuma S., Shah H., Hosokawa M., Funaya C., Antony C., Sachidanandam R., Pillai R.S. 2011. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*, 480, 7376: 264-267
- Ro S., Park C., Sanders K. M., McCarrey J.R., Yan W. 2007. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental Biology*, 311, 2: 592-602
- Rockett J.C., Patrizio P., Schmid J.E., Hecht N.B., Dix D.J. 2004. Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 549, 1-2: 225-240
- Rohrer G.A., Wise T.H., Lunstra D.D., Ford J.J. 2001. Identification of genomic regions controlling plasma FSH concentrations in Meishan-White Composite boars. *Physiological Genomics*, 6, 3: 145-151
- Rovio A.T., Marchington D.R., Donat S., Schuppe H.C., Abel J., Fritsche E., Elliott D.J., Laippala P., Ahola A.I., McNay D., Harrison R.F., Hughes B., Barrett T., Bailey D.M., Mehmet D., Jequier A.M., Hargreave T.B., Kao S.H., Cummins J.M., Barton D.E., Cooke H.J., Wei Y.H., Wichmann L., Poulton J., Jacobs H.T. 2001. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nature Genetics*, 29, 3: 261-262
- Safarinejad M.R., Shafiei N., Safarinejad S. 2011. Association of the (TAAAA)_n repeat and Asp327Asn polymorphisms in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with idiopathic male infertility and relation to serum SHBG concentrations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 123, 1-2: 37-45
- Sai Lakshmi S., Agrawal S. 2007. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Research*, 36: D173-D177
- Sato S., Oyamada Y., Atsuji K., Nade T., Kobayashi E., Mitsunashi T., Nirasawa K., Komatsuda A., Saito Y., Terai S., Hayashi T., Sugimoto Y. 2003. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population. *Journal of Animal Science*, 81, 12: 2938-2949
- Sauna Z.E., Kimchi-Sarfaty C. 2011. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12, 10: 683-91
- Schinzl a. 1988. Microdeletion syndromes, balanced translocations, and gene mapping. *Journal of Medical Genetics*, 25: 454-462
- Schwabe G.C., Hoffmann K., Loges N.T., Birker D., Rossier C., de Santi M.M., Olbrich H., Fliegau M., Faily M., Liebers U., Collura M., Gaedicke G., Mundlos S., Wahn U., Blouin J.L., Niggemann B., Omran H., Antonarakis S.E., Bartoloni L. 2008. Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Human Mutation*, 29, 2: 289-298
- Shefi S., Levron J., Nadu A., Raviv G. 2009. Male infertility associated with adult dominant polycystic kidney disease: a case series. *Archives of Gynecology Obstetrics*, 280, 3: 457-460

- Son, W.Y., Han C.T., Hwang S.H., Lee J.H., Kim S., Kim Y.C. 2000. Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 73, 6: 1138-1144
- SpermatogenesisOnline. 2012.
<http://mcg.ustc.edu.cn/sdap1/spermgene/index.php> (april 2013)
- Steger K., Wilhelm J., Konrad L., Stalf T., Greb R., Diemer T., Kliesch S., Bergmann M., Weidner W. 2008. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Human Reproduction*, 23, 1: 11-16
- Stouffs K., Vandermaelen D., Massart A., Menten B., Vergult S., Tournaye H., Lissens W. 2012. Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Human Reproduction*, 27, 3: 921-929
- Sun F., Palmer K., Handel M.A. 2010. Mutation of Eif4g3, encoding a eukaryotic translation initiation factor, causes male infertility and meiotic arrest of mouse spermatocytes. *Development*, 137, 10: 1699-1707
- Thacker S., Yadav S.P., Sharma R.K., Kashou A., Willard B., Zhang D., Agarwal A. 2011. Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertility and Sterility*, 95, 8: 2745-2748
- Tomar A.K., Saraswat M., Chhikara N., Kumar S., Yadav V.K., Sooch B.S., Singh T.P., Yadav S. 2010. Differential proteomics of sperm: insights, challenges and future prospects. *Biomarkers in Medicine*, 4, 6: 905-910
- Tomar A.K., Sooch B.S., Singh S., Yadav S. 2012. Differential proteomics of human seminal plasma: A potential target for searching male infertility marker proteins. *Proteomics Clinical Applications*, 6, 3-4: 147-151
- Torley K.J., da Silveira J.C., Smith P., Anthony R.V., Veeramachaneni D.N., Winger Q.A., Bouma G.J. 2011. Expression of miRNAs in ovine fetal gonads: potential role in gonadal differentiation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 2
- Torra R., Sarquella J., Calabia J., Marti J., Ars E., Fernandez-Llama P., Ballarin J. 2008. Prevalence of cysts in seminal tract and abnormal semen parameters in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society and Nephrology*, 3, 3: 790-793
- Toure A., Clemente E.J., Ellis P., Mahadevaiah S.K., Ojarikre O.A., Ball P.A., Reynard L., Loveland K.L., Burgoyne P.S., Affara N.A. 2005. Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm. *Genome Biology*, 6, 12: 2
- Tsatsoulis A., Shalet S.M. 1991. Antisperm antibodies in the polyglandular autoimmune (PGA) syndrome type I: response to cyclical steroid therapy. *Clinical Endocrinology*, 35, 4: 299-303
- Tuttelmann F., Simoni M., Kliesch S., Ledig S., Dworniczak B., Wieacker P., Ropke A. 2011. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS ONE*, 6, 4: 463-658
- Vijayaraghavan S., Mohan J., Gray H., Khatra B., Carr D.W. 2000. A role for phosphorylation of glycogen synthase kinase-3alpha in bovine sperm motility regulation. *Biology of Reproduction*, 62, 6: 1647-1654
- Visser L., Repping S. 2010. Unravelling the genetics of spermatogenic failure. *Reproduction*, 139, 2: 303-307

- Wagenfeld A., Yeung C.H., Lehnert W., Nieschlag E., Cooper T.G. 2002. Lack of glutamate transporter EAAC1 in the epididymis of infertile c-ros receptor tyrosine-kinase deficient mice. *Journal of Andrology*, 23, 6: 772-782
- Wang H., Zhou Z., Xu M., Li J., Xiao J., Xu Z.Y., Sha J. 2004. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine*, 82, 5: 317-324
- Wang J., Zhang H.R., Shi H.J., Ma D., Zhao H.X., Lin B., Li R.S. 2009. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian Journal of Andrology*, 11, 4: 484-491
- Wieczorek D., Koster B., Gillessen-Kaesbach G. 2002. Absence of thumbs, A/hypoplasia of radius, hypoplasia of ulnae, retarded bone age, short stature, microcephaly, hypoplastic genitalia, and mental retardation. *American Journal of Medical Genetics*, 108: 209-213
- Womack J.E. 2006. The bovine genome. *Genome Dynamics*, 2: 69-78
- Wu W., Shen O., Qin Y., Niu X., Lu C., Xia Y., Song L., Wang S., Wang X. 2010. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS ONE*, 5, 11
- Xu M., Xiao J., Chen J., Li J., Yin L., Zhu H., Zhou Z., Sha J. 2003. Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Molecular Human Reproduction*, 9, 1: 9-17
- Xu W., Hu H., Wang Z., Chen X., Yang F., Zhu Z., Fang P., Dai J., Wang L., Shi H., Li Z., Qiao Z. 2012. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *Journal of Proteomics*, 75, 17: 5426-5436
- Xu Y., Yeung C.H., Setiawan I., Avram C., Biber J., Wagenfeld A., Lang F., Cooper T.G. 2003. Sodium-inorganic phosphate cotransporter NaPi-IIb in the epididymis and its potential role in male fertility studied in a transgenic mouse model. *Biology of Reproduction*, 69, 4: 1135-1141
- Yan N., Lu Y., Sun H., Qiu W., Tao D., Liu Y., Chen H., Yang Y., Zhang S., Li X., Ma Y. 2009. Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26, 4: 179-186
- Yan N., Lu Y., Sun H., Tao D., Zhang S., Liu W., Ma Y. 2007. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 134, 1: 73-79
- Yan W., Si Y., Slaymaker S., Li J., Zheng H., Young D.L., Aslanian A., Saunders L., Verdin E., Charo I.F. 2010. Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 41: 31418-31426
- Yang B., Wang H., Gao X.K., Chen B.Q., Zhang Y.Q., Liu H.L., Wang Y., Qin W.J., Qin R.L., Shao G.X., Shao C. 2004. Expression and significance of Rap1A in testes of azoospermic subjects. *Asian Journal of Andrology*, 6, 1: 35-40
- Yatsenko A.N., Iwamori N., Iwamori T., Matzuk M.M. 2010. The power of mouse genetics to study spermatogenesis. *Journal of Andrology*, 31, 1: 34-44
- Zhang Q., Nishimura D., Seo S., Vogel T., Morgan D.A., Searby C., Bugge K., Stone E.M., Rahmouni K., Sheffield V.C. 2011. Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 108, 51: 20678-20683

- Zhang Y., Malekpour M., Al-Madani N., Kahrizi K., Zanganeh M., Lohr N.J., Mohseni M., Mojahedi F., Daneshi A., Najmabadi H., Smith R.J. 2007. Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 44, 4: 233-240
- Zheng Y., Yuan W., Zhou Z., Xu M., Sha J.H. 2005. Molecular cloning and expression of a novel alternative splice variant of BRDT gene. *International Journal of Molecular Medicine*, 15, 2: 315-321
- Zheng Y., Zhou Z.M., Min X., Li J.M., Sha J.H. 2005. Identification and characterization of the BGR-like gene with a potential role in human testicular development/spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, 7, 1: 21-32
- Zidek V., Pintir J., Musilova A., Bila V., Kren V., Pravenec M. 1999. Mapping of quantitative trait loci for seminal vesicle mass and litter size to rat chromosome 8. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116, 2: 329-333
- Zorc M., Skok D.J., Godnic I., Calin G.A., Horvat S., Jiang Z., Dovc P., Kunej T. 2012. Catalog of microRNA seed polymorphisms in vertebrates. *PLoS ONE*, 7, 1: 27
- Zuccarello D., Ferlin A., Cazzadore C., Pepe A., Garolla A., Moretti A., Cordeschi G., Francavilla S., Foresta C. 2008. Mutations in dynein genes in patients affected by isolated non-syndromic asthenozoospermia. *Human Reproduction*, 23, 8: 1957-1962

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Tanji Kunej se zahvaljujem za potrpežljivost, strokovnost in spodbudo pri pisanju naloge.

Za komentarje, predloge in pomoč pri izvedbi naloge se zahvaljujem somentorju prof. dr. Simonu Horvatu.

Doc. dr. Jerneju Jakšetu se zahvaljujem za hiter in temeljit pregled naloge.

Družini in prijateljem najlepša hvala za spodbudo in podporo v času študija.