

TARTU ÜLIKOOL  
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Signe Kalamees

**Mehepoolse viljatusega seotud geneetiliste markerite otsimine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Tarmo Puurand, *M.Sc.*

Andres Salumets, *Ph.D.*

TARTU 2007

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Spermatogenees .....	8
1.1.1. Spermatogeneesi etapid .....	9
1.1.2. Spermatogeneesi anatoomia ja füsioloogia .....	12
1.1.3. Spermatogeneesi regulatsioonis osalevad rakud .....	14
1.1.4. Kapatsitatsioon .....	17
1.1.5. Peamised spermatogeneesi häired .....	17
1.2. Mehepoolne viljatus .....	18
1.3. Mehepoolset viljatust põhjustavad tegurid .....	19
1.3.1. Testikulaarsed probleemid.....	19
1.3.2. Krüptorhism.....	20
1.3.3. Seemnerakkude vastased antikehad.....	20
1.3.4. Geneetilised defektid .....	21
1.3.5. Muud põhjused .....	21
1.4. Inimese genoomi varieeruvus .....	21
1.5. Mikrosatelliitsed variatsioonid .....	24
1.5.1. Trinukleotiidsetest korduvjärjestustest põhjustatud haigused .....	28
1.5.2. Mittekodeerivas alas paiknevate trinukleotiidsete korduste poolt põhjustatud haigused .....	29
1.5.2.1 Friedrichi ataksia .....	29
1.5.2.2. Fragiilse X sündroom. ....	30
1.5.2.3. Fragiilse XE sündroom.....	31
1.5.2.4. Müotooniline düstroofia .....	31
1.5.2.5. Spinotserebellaarne ataksia tüüp 8 .....	32
1.5.2.6. Spinotserebellaarne ataksia tüüp 12 .....	32
1.5.3. Polügutamiini haigused .....	33
1.5.3.1. Huntingtoni tõbi.....	34
1.5.3.2. Spinaarne bulbaarne lihasdüstroofia.....	35
1.5.3.3. Spinotserebellaarne ataksia .....	35
1.6. CNV.....	36

1.6.1. CNV-de poolt põhjustatud haigused .....	37
2. PRAKTILINE OSA.....	41
2.1. Materjal ja meetodika.....	41
2.1.1. Inimese genoomi projekt.....	41
2.1.2. Inimese varieeruvuse projekt.....	42
2.1.3. Geenide valiku kriteeriumid.....	43
2.2. Tulemused ja arutelu .....	43
2.2.1. Mikrosatelliitide asukohad meie poolt vaadeldud geenides.....	43
2.2.2. CNV-de alad meie poolt vaadeldud geenides .....	45
2.2.3. Arutelu.....	46
KOKKUVÕTE .....	47
RESÜMEE (INGLISE KEELES) .....	48
KIRJANDUSE LOETELU .....	49
LISAD .....	55
Lisa 1: Algne geenide nimistu.....	55
Lisa 2: Kõik inimese spetsiifiliste geenide järjestused.....	55
Lisa 3: Inimese spetsiifiliste geenide alguse, lõpu ja eksonite koordinaadid.....	55
Lisa 4: Inimese spetsiifiliste geenide transleeritavate alade koordinaadid.....	55
Lisa 5: Uuritavate geenide nimekiri koos täiendava informatsiooniga .....	55
Lisa 6: Perli programm mikrosatelliitide leidmiseks.....	55
Lisa 7: Leitud mikrosatelliitide andmestik.....	55
Lisa 8: Valitud mikrosatelliitide andmestik .....	55
Lisa 9: Pivot tabel valitud mikrosatelliitide kohta.....	55
Lisa 10: Inimese spetsiifiliste CNV-de nimekiri .....	55
Lisa 11: Perli programm CNV-de leidmiseks .....	56
Lisa 12: Leitud CNV-de andmestik.....	56

## **KASUTATUD LÜHENDID**

- ABP – Androgene binding protein (androgeeni siduv valk)
- ADHD – Attention-deficit hyperactivity disorder (tähelepanu puudulikkuse ja hüperaktiivsuse häire )
- AR – Androgen receptor (androgeeni retseptor)
- ARE – Androgen response element (androgeeni vastuselement)
- CAA – Cerebral amyloid angiopathy (peaaju amüloidangiopaatia)
- CNS – Central nervous system (kesknärvisüsteem)
- CNV – Copy number variant (koopia arvu varieeruvus)
- DMPK – Myotonic dystrophy protein kinase (müotoonilise düstroofia proteiin-kinaas)
- DRPLA – Dentatourupallidolusian atrophy (dentatorupallidolüütiline atroofia)
- EEG – Electroencephalogram (elektroentsefalograafia)
- FMR1 – Fragile X Mental Retardation 1 protein (Fragiilse X sündroomi mentaalse alaarengu proteiin 1)
- FMR2 – Fragile X Mental Retardation 2 protein (Fragiilse XE sündroomi mentaalse alaarengu proteiin 2)
- FMRP – FMR-1 protein (FMR - 1 proteiin)
- FRAXA – Fragile X syndrome (Fragiilse X sündroom)
- FRAXE – Fragile XE syndrome (Fragiilse XE sündroom)
- FRDA – Friedrichs ataxia (Friedrichi ataksia)
- FSH – Follicle Stimulating Hormone (folliikuleid stimuleeriv hormoon)
- FXN – Frataxin (frataksiin)
- HD – Huntingtons disease (Huntingtoni tõbi)
- HGMD – Human Gene Mutation Database (Inimese geeni mutatsiooni andmebaas)
- HGP – Human Genome Project (Inimese Genoomi Projekt)
- HGVS – Human Genome Variation Society (Inimese genoomi variatsiooni selts)
- HUGO – Human Genome Organisation (Inimese Genoomi Organisatsioon)
- HVP – Human Variome Project (Inimese varieeruvuse projekt)
- ISV – Intermediate-sized structural variant (intermediaatide struktuuriline varieeruvus)
- LH – Luteinizing Hormone (luteiniseeriv hormoon)
- MD – Myotonic Dystrophy (müotooniline düstroofia)
- MR – Mental retardation (vaimne alaareng)
- MRI – Magnetic resonance imaging (magnetresonantskuvamine)
- MSV – Multisite variant (multisaisaitide varieeruvus)

mtDNA – Mitochondria genome (mitokondriaalne DNA)  
NCV – Nerve-conduction velocity (närvijuhtivuskiirus)  
NFT – Neurofibrillary tangles (neurofibrillaarsed kämbud)  
OCD – Obsessive-compulsive disorder (obsessiiv-kompulsiivhäire)  
PDD – Pervasive developmental disorder (pervasiivne arenguhäire)  
POLG – DNA polymerase  $\gamma$  (DNA polümeraas  $\gamma$ )  
RFLP – Restriction fragment length polymorphism (restriktsioonifragmentide pikkuse polümorfismi analüüs)  
SBMA – Spinobulbar muscular atrophy (spinaarne bulbaarne lihasdüstroofia)  
SCA – Spinocerebellar ataxia type (spinotserebellaarne ataksia)  
SNP – Single nucleotide polymorphism (ühenukleotiidne polümorfism)  
STR – Simple tandem repeat (lihtne tandeemne kordus)  
Topo II – Topoisomerase II (topoisomeraas II)  
VNTR – Variable number of tandem repeats (varieeruv arv tandeemseid korduseid)

## SISSEJUHATUS

Eestis on loomulik iive ehk rahva taastootmise võime viimaste aastakümnete jooksul pidevalt kahanenud, muutudes 1990. aastate esimesel poolel negatiivseks. Sellest ajast püsib iive jätkuvalt tunduvalt alla taastootmiseks vajaliku määra. Pärast teist maailmasõda on meeste viljakus Euroopas aasta-aastalt drastiliselt langenud: viiekümne aastaga peaaegu poole võrra. Spermatooside arv ühel seemnepurskel, mis on viljakuse peamine näitaja, kahaneb Euroopa meestel iga aastaga peaaegu miljoni võrra ühe milliliitri kohta. Väheneb ka sperma hulk. Seega võib öelda, et mehepoolse viljakuse peamiseks kriteeriumiks on efektiivselt ja stabiilselt toimuv spermatogenees.

Genoomis esineb palju erinevaid kordusjärjestusi, mis põhjustavad erinevaid haiguseid. Need kordusjärjestused võivad esineda nii kodeerivates, kui mitte kodeerivates alades. 1990-ndatel avastati fakt, et nende tavaliste mikrosatelliitsete korduste pikenemine genoomis viib väga tõsiste pärilike haiguste tekkeni. Haiguslikult pikkadel kordustel on kalduvus pikeneda generatsioonide jooksul ning korduste arv on positiivses korrelatsioonis haiguse varase avaldumise ning ka haiguse raskusega - mida enam kordusi, seda varem haigused avalduvad ja seda ägedam on nende kulg. Üldiselt on mikrosatelliitsete korduste haigused dominantselt päritavad või X-seoselised, kuid on üks erand - Friedrichi ataksia, mis on autosomaalne retsessiivne haigus.

Mikrosatelliitsete (trinukleotiidsete) variatsioonide ekspansioonist tingitud haigused võib jagada kaheks: mitte kodeerivas järjestuses olevatest kordustest põhjustatud haigused ja kodeerivas järjestustes olevatest kordustest põhjustatud haigused. Iga haiguse puhul on olulised nii korduste arv, kui nende paiknemine. Erinev on ka kordus trinukleotiidi. Kodeerivas järjestuses on kordus trinukleotiidi kõige sagedamini glutamiin ning seetõttu nimetatakse ka vastavaid haigusi polüglutamiin-haigusteks. Kokku on teada 15 trinukleotiidi korduste haigust. Erinevate geenide trinukleotiidsed kordused mõjutavad ka spermatogeneesi kvaliteeti. Hea näide trinukleotiidsete korduste ja spermatogeneesi kvaliteedi omavahelistest seostest on androgeeni retseptori geeni variatsioonid viljatutel meestel.

Käesoleva töö eesmärgiks on luua mehe fertiilsusgeenide andmebaas, milles sisaldub informatsioon nendes geenides esinevate mikrosatelliitsete ja koopiarvu variatsioonide ehk CNV-de kohta. Selle paremaks mõistmiseks on teoreetilises osas antud ülevaade

spermatogeneesi toimumise protsessidest, mikrosatelliitidest ja CNV-dest ning nendega kaasnevatest haigustest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Spermatogenees

Spermatogeneesiks nimetatakse isassugurakkude moodustumist, mis algab looteas kui moodustuvad munandite algmed ning toimub ka sugurakkude eelrakkude paljunemine. Tõeline spermatogenees, mis viib spermide kujunemiseni, algab 11-14 a. vanuselt. Spermatogenees kestab meestel elu lõpuni, kui ei teki häireid. Antud protsessi tulemuseks on meessugurakud, mida nimetatakse spermideks (vt. joonis 2). Ühest eelrakust tekib 4 sperm. Efektiivne spermatogenees on mehe viljakuse eelduseks.

Eestikeelses kirjanduses on kasutatud spermatogeneesi sünonüümina spermioogeneesi, kuid kirjanduses käsitletakse terminiga spermioogenees vaid spermatogeneesi ühte perioodi — transformatsiooni. Viimase sünonüümiks on ka spermiotelioos. (Kärner, 1997).

Kokkuvõtvalt võib välja tuua järgnevad spermatogeneesile omased tunnused:

1. spermatogenees toimub suguküpsuse saabumisest kuni surmani;
2. spermatogenees toimub keha temperatuurist umbes 4 °C madalamal temperatuuril. See on tagatud 2 mehhanismiga:
  - munandid laskuvad munandikotti, mis on kõhuõõne väline. Kui seda pole toimunud on tegemist peitmunandilisusega e. krüptorhismiga;
  - munanditel on eriline verevarustus. Arterid ja veenid, mis suubuvad ja väljuvad munandist on oma seintega tihedas kontaktis ja soojusülekandega alandavad munanditesse tuleva vere temperatuuri;
3. mehel vältab kogu spermatogeneesitsükkel keskmiselt 68-76 päeva ning täiskasvanud mees toodab iga päev miljoneid sperme ning terve elu jooksul produtseerib mees seega kuni  $10^{13}$  seemnerakku;
4. sugurakud on kehavõõrad rakud ja seetõttu spermatogenees peab olema eraldatud otsesest kokkupuutest verega. Näiteks trauma munanditega võib põhjustada eluaegse viljatuse;
5. väga palju spermatooside on atüüpilised ja need viljastumises ei osale. Spermatogenees toimub piki spermatogeneesi epiteeli, kusjuures formeerunud spermatoosidid satuvad seemnetorukeste valendikku. Spermatogenees on normaalne, kui pole kahjustatud spermatogeneesi epiteel;

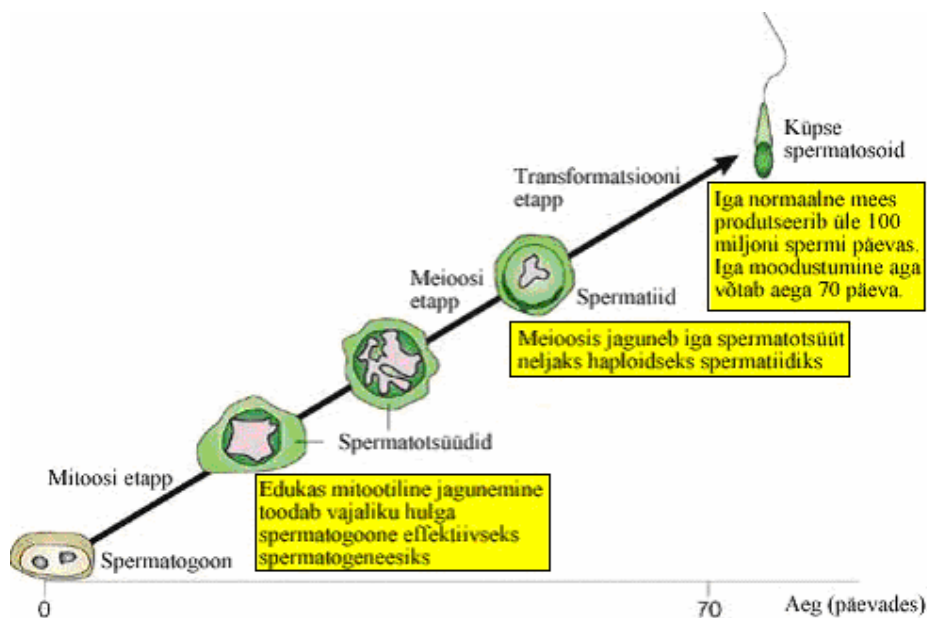


6. erinevad geenid ekspresseeruvad spermatogeneesi erinevatel etappidel, produtseerides erinevaid valkusi. (Eddy, 1998).

### 1.1.1. Spermatogeneesi etapid

Spermatogeneesi saab jagada neljaks perioodiks (vt. joonis 1):

- Paljunemine: mille käigus jagunevad (mitootiliselt) tüvirakud ehk spermatogoonid ja neist pärinevad eellasrakud. Selle eesmärk on rakkude arvu suurendamine mitoosi teel.
- Kasvamiseks: kui spermatogoonid on läbinud kasvamisstaadiumi, siis on tegemist primaarsete spermatotsüütidega. Enne meioosi esimest jagunemist on toimunud DNA replikatsioon ja esineb 46 2-kromatiidilist kromosoomi. Võrreldes oogeneesiga on spermatogeneesi puhul kasvamine suhteliselt tühine, aga sugurakkude mass suureneb siiski.
- Küpsemine ehk meioos: meioosis toimub omakorda kaks jagunemist:
  1. I jagunemise tagajärjel tekib ühest primaarsest spermatotsüüdist 2 sekundaarset spermatotsüüti, milles kummaski on 23 2-kromatiidilist kromosoomi;
  2. II jagunemise tulemusena tekib ühest sekundaarsest spermatotsüüdist 2 spermatiidi, milles kummaski on 23 1-kromatiidilist kromosoomi. Seega lõpptulemusel saadakse haploidsed tütararakud. Kokkuvõttes tekib igast spermatotsüüdist 4 haploidset spermatiidi.
- Transformatsioon: selle etapi tulemusena omandab spermatiid spermatoosoidi ehituse ja kuju:
  1. viburi ehk saba formeerumine;
  2. suur hulk tsütoplasmat eemaldatakse rakust;
  3. tekib akrosoom. See on spermatoosoidi pea osas olev membraanidega piiritletud hüdrofüütiliste ensüümide kompleks. (Kärner, 1997; Son jt., 1999).



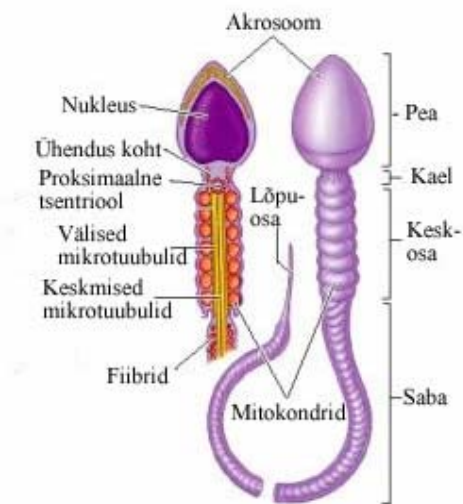
**Joonis 1:** Joonisel on näidatud spermogeneesi etapid. Spermogeneesi jooksul läbivad imetaja idurakud nii mitoosi, meioosi kui ka struktuurilised remodelleerimised, mille tulemuseks on spermatoosid. Joonisel on tsütoplasma värvitud rohelisega ning DNA roosaga. (modifitseeritud: Cooke ja Saunders, 2002).

Spermatiidide transformeerumist lõplikeks seemnerakkudeks nimetatakse spermogeneesiks (vt. joonis 1, viimane etapp). Selle tulemusel saadakse liikumis- ja adheerimisvõimeline sugurakk, mis suudab viljastada munaraku. Nimetatud etapp on mehe viljakuse puhul kriitilise tähtsusega. Selle protsessi käigus toimub haploidse spermatiididega drastilisi muutusi. Muutuste seast on olulisemad järgnevad kolm modifikatsiooni: (i) tuum n.ö. "tõmbub kokku" ja on valdavalt heterokromatiinne, (ii) Golgi kompleks tekitab akrosoomi (organell, mis sisaldab spermi munarakku sisenemist hõlbustatavaid ensüüme) ning (iii) muutub ka raku kuju (Hess, 1999). Nimelt küps sperm on spermatiidist tunduvalt pikem ning seemneraku kaelaossa liiguvad mitokondrid ja kaks tsentriooli, millest üks annab aluse spermi sabale, milleks on tüüpiline eukarüootne viburi aksoneem, mis koosneb 9 x 2 perifeerses ja kahest tsentraalses mikrotorukeses (Hess, 1999). DNA pakkimisel omavad olulist rolli histoonide posttranslatsioonilised modifikatsioonid, sinna hulka kuuluvad histoonide atsetüleerimine, glükoksüleerimine, fosforüleerimine, metüleerimine jne (Li jt., 2007). Seega spermatiid on võrreldes küpse spermiga veidi suurem ning sisaldab rohkem tsütoplasmat.

Enamus spermi tsütoplasmast fagotsüteeritakse Sertoli rakkude poolt, mille tulemusel spermatiid muutub viljastumisvõimeliseks spermatoosidiks. Spermogeneesi üheks tähtsaimaks protsessiks on spermi DNA ümberpakkimine, milles omab olulist rolli Topo II

(DNA topoisomeraas II), mille ülesandeks on teha spermi DNA-sse teha kaheaheelalisi katkeid (Peschon ja Behringer, 1987), mis seejärel ligeeritakse.

Valmis spermatoosidid (vt. joonis 2) vabanevad vääniliste seemnetorukeste seinast ja liiguvad mööda valendikku munandimanusesse ehk epididüümissse, kus toimub nende kogunemine, küpsemine ja säilitamine (Alberts jt., 2002). Sabaga sperm koosneb peast, kaelaosast, vahe- ehk keskosast ja sabast ehk viburist. Spermi peaosas võtab imetaja suguraku tuum enda alla üle 60%. Tuuma ees paikneb akrosoom - spermile spetsiifiline rakuorganell, mis sisaldab hüdrolyüütilisi ensüüme munaraku kestade lammutamiseks. Akrosoomi ja tuuma vahel paikneb lisaks globulaarse aktiini kogumik, mida on vahel kirjeldatud ka kui subakrosomaalset vakuooli (Li jt., 2007).



**Joonis 2:** Joonisel on täiskasvanud mehe spermatoosid. (modifitseeritud: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>).

Samuti jääb peaosas proksimaalne tsentriool, mis kantakse viljastumisel munarakku ja seega osaleb organismi edaspidises arengus. Kaelaosas on vaadeldav moondunud distaalne tsentriool, millest kasvab välja viburi toes ehk aksoneem, mis läbib terve seemneraku saba. Aksoneem koosneb kahest tsentraalsest paaritust mikrotorukesest ja nende ümber asuvast üheksa mikrotorukese dubletist. Paarilistest mikrotorukestest on vaid üks täieliku seinaga tubuliini 13 protofilamendist. Tema paariline on C-tähe kujuline ja koosneb vaid 11 protofilamendist (Li jt., 2007).

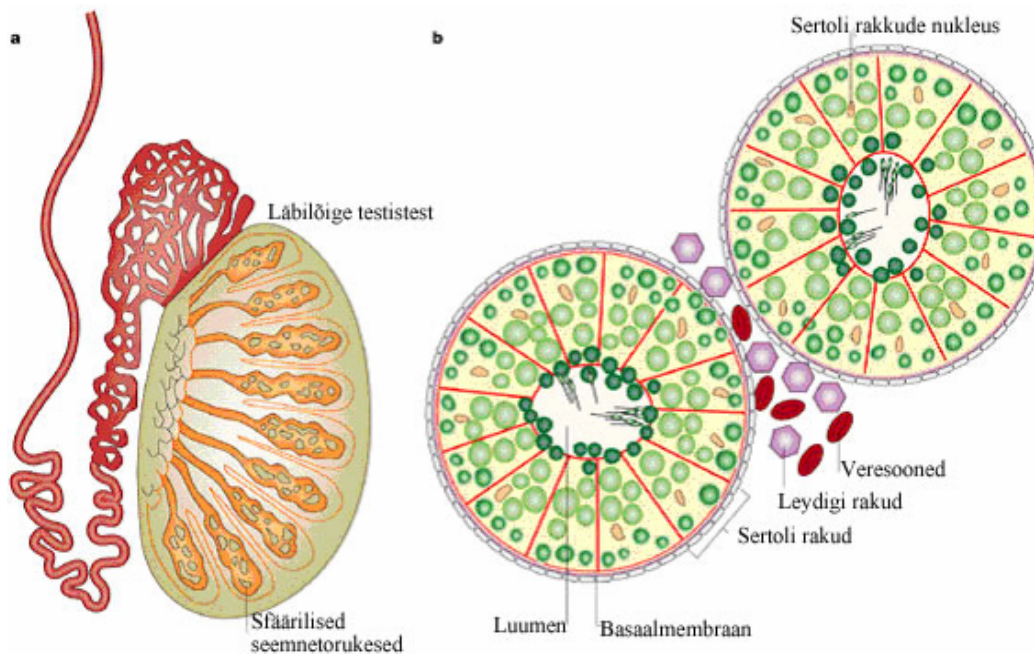
Aksoneemi paarilistele mikrotorukestele kinnituvad haaradena düneiini valgu molekulid. Düneiin hüdrolyüsib ATP molekuli ja konverteerib saadud energia spermi saba

mehhaaniliseks liikumiseks. Aksoneemiga on tihedalt seotud veel mitmed valgud, millest tuleks esile tõsta histoon H1. Sellele tuntud tuumavalgule omistatakse aksoneemis mikrotoruksi stabiliseerivat toimet (Li jt., 2007). Spermi kaelaosast alates kuni saba aheneva lõpposani on aksoneem ümbritsetud nii sirgete kui ka spiraalniitidega, mis lisavad seemneraku liikumisaparaadile tugevust. Lisaks on spermi keskosas ümber aksoneemi sõltuvalt liigist mitokondrid või mitokonder, kust saadakse energiaks vajalik ATP.

### **1.1.2. Spermatogeneesi anatoomia ja füsioloogia**

Kolmandal embrüonaalsel arengunädalal eristuvad rebukoti (loote abiorgan) seinas erilised sugurakkude eellasrakud ehk gonotsüüdid, mis migreeruvad kemotaksise abil amöboidselt liikudes lootesse. Tekivad sugunäärmete algmed - kaks rakkude kogumikku (*ca* 100 rakku) tulevaste gonaadide asukohas. Gonotsüütide arv suureneb mitooside teel (proliferaatsioon) ja kolmandaks elukuuks on moodustunud embrüonaalne gonaad.

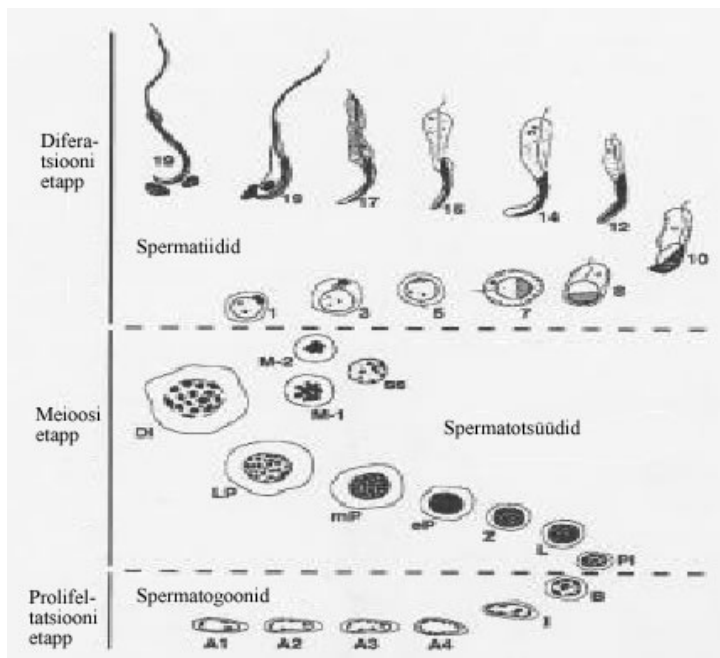
Imetajatel toimub spermatogenees testiste sees paiknevate vääniliste seemnetoruketes (vt., joonis 3), mis on reastatud epiteelile ning sisaldavad vedelikuga täidetud luumenit. Seemnetorukese luumenisse vabanevad täielikult valminud spermid (Hess, 1999). Imetaja isassugunäärmed meenutavad seega ehituselt torujaid liitnäärmeid. Väljastpoolt on nad kaetud kahekordse kihnuga, mille välimine osa on serooskest, ja sisemine sidekiuline valkjaskest (Cooke ja Saunders, 2002). Munandi parenhüümi moodustavad seemnetorukesed on spermide arenemise paigaks.



**Joonis 3:** a) Läbilõige testistest, kus on ära näidatud vääniliste seemnetorukeste paiknemine ja asetus; b) läbilõige sfäärilistest seemnetorukestest koos idurakkudega (helerohelised) ja Sertoli rakkudega. Seemnetorukeste vahel on veresoonte rikas intertubulaarne sidekude, mis sisaldab polügonaalset interstitsiaal- ehk Leydigi rakke. Küpsed spermid on näidatud ära tumeroheliselt seemnetorukeste luumenis. (modifitseeritud: Cooke ja Saunders, 2002).

Seemnetorukeste epiteelis esineb kahte sorti rakke: somaatilised rakud ning tüvirakud. Viimaste rakkude puhul on leitud kahes erinevas arengufaasis olevaid rakke (vt. joonis 4): A spermatogoonid (mitootiliselt jagunevad tüvirakud) ja B spermatogoonid (diferentseeruvad edaspidi primaarseteks spermatotsüütideks) (Hess, 1999). A spermatogoonid jäävad spermatogoonideks ning edasi ei diferentseeru, moodustades nii tüvirakkude varu, millest omakorda mitootiliste raku jagunemiste käigus tekivad mõlemat tüüpi spermatogoonid.

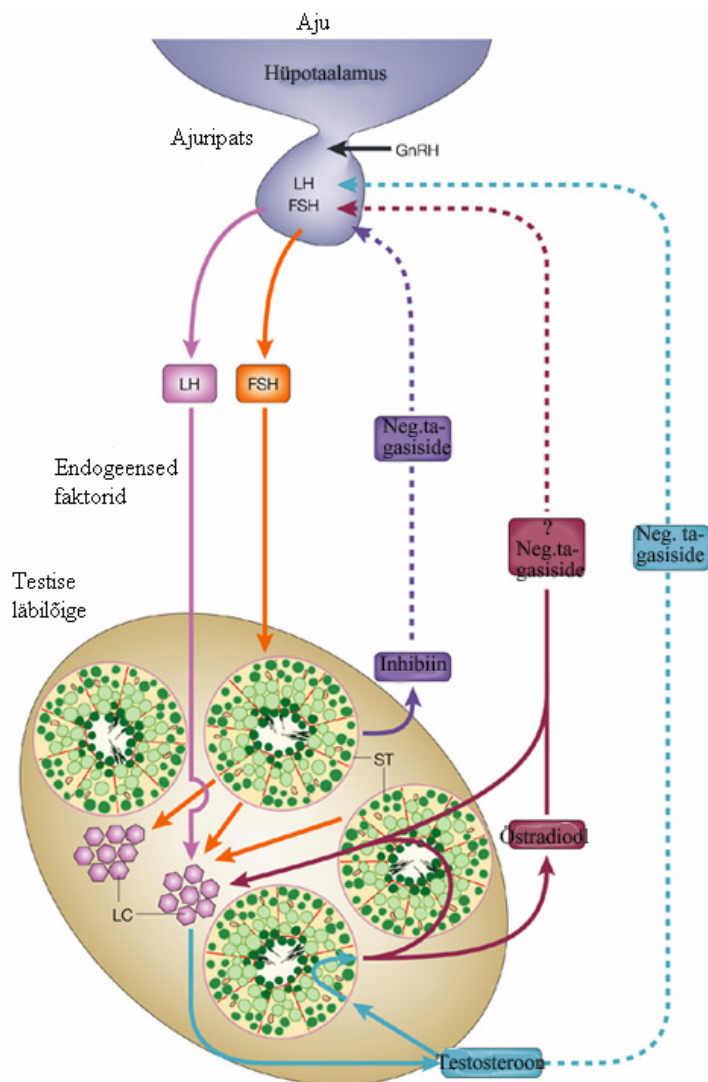
Organismi suguküpsuse saabudes B tüüpi spermatogoonid lõpetavad mitootilise jagunemise (PI), lähevad meiosis, suurenevad ja muutuvad primaarseteks ehk I järku spermatotsüütideks (L), sisaldades kaks korda rohkem DNA-d kui diploidsed somaatilised rakud. Esimese meiotilise jagunemise (M-1) käigus muutub iga primaarne spermatotsüüt kaheks sekundaarseks spermatotsüüdiks (ss). Järgneb meiosis teine jagunemine (M-2), mille korral igast sekundaarsest spermatotsüüdist tekib kaks spermatiidi. Spermatiidid on haploidsed rakud, mis teevad läbi mitmed arenguetapid (1-7) transformeerudes esialgu piklikeks spermatiidideks (8-19) ning hiljem küpseteks spermideks ehk spermatooidideks. Küpsed spermid vabanevad aga seemnetorukese valendikku. (vt. joonis 4).



**Joonis 4:** Antud joonisel on toodud tüvirakkude areng roti spermatogeneesis, kuid protsess iseenesest on sarnane inimestele. Seemnetorukeste seintes asetsevad primitiivsed diferentseerumata tüvirakud nn. spermatogoonid, mille jagunemise tulemusel tekib kahte tüüpi spermatogoonid: A tüüpi spermatogoonid (A1-A4) ja B tüüpi spermatogoonid. (modifitseeritud: Hess, 1999). Seega igast primaarsest spermatotsüüdist tekib neli spermatiidi.

### 1.1.3. Spermatogeneesi regulatsioonis osalevad rakud

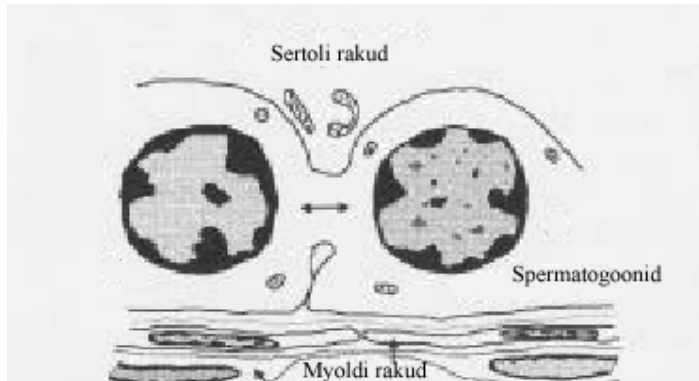
Spermatogenees on täpselt hormonaalselt reguleeritud (vt. joonis 5), milles omavad suurt tähtsust rakk-rakk interaktsioonid, milledest olulisemaks võib pidada Sertoli rakkude ja spermatogoonide omavahelisi interaktsioone (Cooke ja Saunders, 2002). Nimelt asuvad spermatogeneesis osalevate rakkude vahel tugi- ehk Sertoli rakud (vt. joonis 6) (Hess, 1999). Täpsemalt väänilise seemnetorukese siseseinas paikneva spermatogeense epiteeli ehk iduepiteeli rakkude vahel (Hess, 1999). Sertoli rakud on suured, seemnetorukeste basaalmembraanile toetuvad rakud.



**Joonis 5:** Erinevad hüpotalamuse hormoonid - LH (luteiniseeriv hormoon) ja FSH (folliikuleid stimuleeriv hormoon) ja teised regulaatorid (näiteks inhibiinid ning östrogen), mis kõik reguleerivad testiste funktsioneerimist. Spermatogeneesi regulatsioonis osalevad samuti erinevad geeniekspressiooni modulaatorid (joonisel näidatud negatiivne tagasiside). Kindlad rakud toodavad LH ja FSH retseptoreid (modifitseeritud: Cooke ja Saunders, 2002).

Sertoli rakud on eukromatiinse tuuma ja suure tuumakesega rakud, mis omavad spermatogeneesi toimimisel olulist funktsiooni. Nimelt toetavad need rakud spermatogeneesi toitumuslikult ehk alimentaarselt – Sertoli rakk on kontaktis spermatogeense epiteeliga tsükli erinevatel staadiumitel (Kärner, 1997). Seega peab Sertoli rakk toime tulema üheaegselt erinevates arengufaasides olevate rakkude kordineerimisega. Spermatogeense tsükli staadiumites sekreteerivad Sertoli rakud mitmesuguseid valke, näiteks ABP (androgeeni siduv valk), tsükliline valk 2, transferriin ja tseruloplasmiid (Kärner, 1997).

Kui tüvirakud diferentseeruvad kasvades ja arenedes erinevat tüüpi rakkudeks (vt. joonis 4), liiguvad need Sertoli raku külge mööda seemnetorukeste luumenisse, kus toimub vabanemine. Samas kaitsevad Sertoli rakud enneaegse akrosoomreaktsiooni toimumise eest, säilitades seeläbi seemnerakkude viljastumisvõimet (Hess, 1999). Sertoli rakud produtseerivad ka östrogeene (naissuguhormoone, mille teatav kogus on vajalik spermatogeneesi toimumiseks) ja inhibiini (FSH sünteesi pidurdav valguline hormoon) ning hulga teisi spetsiifilisi ühendeid (Pentikainen ja Erkkilä, 2000).



**Joonis 6: Sertoli rakud.** Kaks B-tüüpi spermatogooni on omavahel terve diferentseerumise perioodi jooksul ühendatud tsütoplasmaatiliste sildadega. Raku jagunemiste käigus ei toimu lõplikku tsütokineesi ning seetõttu moodustavad ühest spermatogoonist tekkinud tütararakud süntsüütiime. Süntsüütsiumi tsütoplasmaatilised sillad lagunevad alles kui diferentseerunud spermatoosid vabanevad vääniliste seemnetorukeste luumenisse (modifitseeritud: Alberts jt., 2002). Sertoli raku tsütoplasma aitab hoida silda õiges kohas paigal (Hess, 1999).

Diferentseerumisprotsessid toimuvad enamasti pärast meioosi toimumist ehk postmeiootiliselt. Sellest tulenevalt omavad tsütoplasmaatilised sillad veel ühte ülesannet spermatogeneesis, nimelt aitavad need haploidsetel seemnerakkudel funktsioneerida diploidsetena (Braun ja Behringer, 1989). Sellega seoses saavad kõrvuti asetsevad rakud kasutada naabruses asetsevate rakkude geeniprodukte.

Vääniliste seemnetorukeste vahel, tavaliselt kapillaaride läheduses, asetsevad interstitsiaalsed ehk Leydigi rakud, mille ülesandeks on toota testosterooni. Testosterooni sünteesi Leydigi rakkudes reguleerib LH. LH on enim tuntud meessuguhormoon, mis teiste ülesannete kõrval tagab spermatogeneesi pideva ja stabiilse toimumise. Lisaks omistatakse sellele LH-le androgeenide (näiteks testosteroon) ning prostaglandiinide, angiotensiini ja oksütotsiini



sünteesi stimuleerimist (Holstein jt., 2003). Leydigi rakud on mittejagunevad, mille talitust reguleerivad hüpofüüsi eessagara gonadotroopsed hormoonid - FSH ja LH (Bogerd jt., 2005).

#### **1.1.4. Kapatsitatsioon**

Munandis asuvad spermatoosidid on liikumatud ning arvatakse, et nad ei ole suutelised munarakku viljastama. Spermatoosidide liikuvus ja viljastumisvõime kasvavad järk-järgult transpordil läbi munandimanuse.

Täieliku viljastumisvõime saavad spermid alles emassuguteede läbimisel asetleidva protsessiga, mida nimetatakse kapatsitatsiooniks. Kapatsitatsiooni käigus kaotavad spermid ensüüme inhibeerivad ja membraane stabiliseerivad valgud ning süsivesikud, mis katavad sperme isassuguteedes ning mida on ülehulkades seemnevedelikus. Põhjalikult muutub ka spermi membraani lipiidne koostis ja pinnaretseptorite topograafia. Emassuguteedes olev albumiin ja lipiidi transportvalk 1 kõrvaldavad spermi plasmamembraanist kolesterooli. (Kärner, 1997).

Peale kapatsitatsioonikeskkonna, on emassuguteed suutelised reguleerima spermide eluiga, peroksüdeerides seemnerakkudes lipiide (Kärner, 1997). Peroksüdatsiooniproduktid on ohtlikud ennekõike spermi mitokondrite talitlusele, modifitseerides viimaste membraanide permeaablust ja ensüümide aktiivsust ning nende kaudu ka spermide eluiga.

#### **1.1.5. Peamised spermatogeneesi häired**

Androgeeni retseptor on transkriptsiooni faktor, mis omab kriitilist rolli mehe seksuaalsete tunnuste väljaarenemisel, spermatogeneesis ja hormonaalse tasakaalu säilitamisel (Eacker jt, 2007). AR-i (androgeeni retseptor) produtseeritakse täiskasvanud mehe testistes nii Sertoli rakkudes, Leydigi rakkudes kui ka seemnetorukestes (Merlet jt, 2007).

Kuigi palju on teada fenotüübiliste muutuste kohta AR-i mutatsioonide esinemisel, on vähem teada AR geeni aktiivsuse mõjust erinevatele fenotüübilistele muutustele. Affymetrixi mRNA geeniekspressiooni meetodit kasutades identifitseeriti, et AR mutatsioonide korral on geeniekspressioon testistes ligikaudu kaks korda suurem, kui AR *wild type* korral (Merlet jt, 2007). Seega AR omab peamiselt transkriptsiooni repressori rolli testistes. Uuringu käigus

võrreldi 6 kb pikkuseid lõike transkriptsiooni alguspunktist, otsides konsenveerunud ARE-sid (androgeni vastuselemendid) ning identifitseeriti vähemalt üks ARE, kus 65 % geenidest olid valessti reguleeritud (Merlet jt, 2007). Avatavast, et just need valessti reguleeritud geenid on otseselt AR-i sihtmärkideks.

Teine geen, mille polümorfism võib põhjustada spermatogeneesi häireid on POLG e. DNA polümeraas  $\gamma$ . Mehe viljakus sõltub suuresti spermatoosidide produtseerimise efektiivsusest. Mitmete uuringute käigus on näidatud, et POLG geeni regulatsioon mängib olulist rolli meeste viljakuses erinevates populatsioonides. Uurides spermatoosidide funktsionaalsust, hakati üha enam tähelepanu pöörama spermatoosidide mitokondritele, mis produtseerivad vajaminevat energiat. Mitokondritel on oma genoom, mis kodeerib vajalikke proteiine. Kodeerivad valgud leiavad kasutust respiratoorsetes radades ning oksüdatiivse fosforüleerimises (Jensen jt., 2004). Paljud uuringud on peale seda hakanud omavahel siduma mtDNA-s (mitokondriaalne DNA) esinevaid polümorfisme, mutatsioone ning deletsioone spermatoosidide mittefunktsionaalsusega.

POLG usutakse olevat ainukene polümeraas, mis leiab kasutust mtDNA elongatsioonil ja vigade parandamisel (Harris jt., 2006). POLG-i katalüütiline subühik, mis on kodeeritud POLG geeni poolt, lokaliseerub 15q24 ja omab erineval hulgal CAG korduseid selles regioonis (Jensen jt., 2004). Näidatud on, et CAG liigne korduste arv POLG geenis omab olulist rolli mehe viljakuse vähenemisel. Normaalsel juhul esineb homosügootsel mehel mõlemas POLG geeni alleelis 10 kordust. Mutatsioonid POLG geenis võivad põhjustada seega mitokondriaalsete mutatsioonide akumulatsiooni (Harris jt., 2006).

Seega POLG geeni polümorfismi tuleks pidada arvatavaks põhjuseks viljatusel, kui patsiendil esineb normaalne spermiogramm.

## **1.2. Mehepoolne viljatus**

Vaatamata meditsiini kiirele arengule on meeste viljatuse põhjuste uurimisel oluliselt vähem võimalusi kui naiste viljatuse põhjuste väljaselgitamisel. Viljatus puudutab iga viiendat kooselavat paari. Viljatuse põhjused on 40% naisepoolsed, 40% mehepoolsed ja 20% tingitud mõlemapoolsetest probleemidest. Mehepoolne viljatus võib tuleneda kaasasündinud arenguhäiretest (nagu näiteks krüptorhism), hormoonhäiretest, kroonilistest suguteede põletikest, nakkushaigustest, munandiveeni laienditest (ehk varikotseele), erinevatest

kromosoomhaigustest, närvisüsteemi kahjustustest, stressist ja määrav on ka eluviis. Mehe viljatust võivad põhjustada samuti erinevad toksilised faktorid (näiteks raskemetallid, orgaanilised ühendid, alkohol, tubakas ja ioniseeriv kiirgus), ravimid (näiteks anaboolsed steroidid ja psühhotroopsed ravimid) ning traumad. Mehe viljakust saab hinnata seemnevedeliku analüüsi abil.

### **1.3. Mehepoolset viljatust põhjustavad tegurid**

#### **1.3.1. Testikulaarsed probleemid**

Meeste viljatuse peamiseks põhjuseks on reproduktiivorganite patoloogiad. Seemnerakkude kontsentratsioon, nende liikuvus ja morfoloogia on mehe viljakuse seisukohalt kriitilise tähtsusega ja seetõttu nende parameetrite kõrvalekalded võivad tihti põhjustada viljatust. Suurema osa seemnevedeliku mahust moodustab seemnepõiekestest ja eesnäärme sekreet. Ejakulaadi esimene osa sisaldab tavaliselt kõige rohkem spermatooside ja suuremat osa eesnäärme sekreetidest, samas kui teine osa koosneb valdavalt seemnepõiekestest sekreetidest ja sisaldab vähem spermatooside (Alberts jt., 2002).

Oligozoospermia (seemnerakkude kontsentratsiooni langus) korral on probleemiks, et munajuhasse ei jõua piisavalt seemnerakke, et toimuks viljastumine (Alberts jt., 2002). Liikuvuse seisukohalt peavad seemnerakud jõudma emakakaela piirkonda 15-20 minuti jooksul peale ejakulatsiooni, vastasel juhul seemnerakud inaktiveeritakse tupe happelise keskkonna poolt.

Kaasasündinud häired spermatooside transpordil on tingitud mehe suguteede teatud osade osalisest või täielikust puudumisest. Näiteks tsüstilise fibroosi korral esineb meestel sageli munandimanuse, seemnejuhade ja seemnepõiekestest kaasasündinud hüpoplaasia. Enamasti toob see kaasa seemnerakkude puudumise seemnevedelikus. Omandatud häired spermide transpordil on tavaliselt tingitud suguteede infektsioonidest, mille korral võib munandimanus armistuda ja spermatooside transport blokeerub. Spermatooside transporti võib seemnevädi kahjustamise kaudu häirida ka operatiivne tegevus kubemepiirkonnas.

### **1.3.2. Krüptorhism**

Krüptorhism ehk munandi laskumishäire on ühe või mõlema munandi jäämine kõhuõõnde, kubemekanalisse. Tegemist on sageda arengudefektiga, mis esineb umbes 0,8% täiskasvanud meestest. Laskumata munandi koe struktuur kahjustub juba varajases lapseas. Munandi allatoomine lapsepõlves ei taga täiskasvanuna normaalset munandi arengut. Laskumata munandis tekivad sageli kasvajalised (kasvajate esinemise tõenäosus on tõusnud 8 korda) muutused (Pettersson jt., 2007).

Munandite laskumise probleem põhjustab spermatogeneesi häiret, mis on tingitud testikulaarse metabolismi kõrvalekalletest. Ligikaudu 20% ühepoolse e. unilateraalse krüptorhismiga poistest puutub hilisemas elus kokku viljatuse probleemiga. Vastav näitaja tõuseb aga kuni 70%-ni kahepoolse e. bilateraalse krüptorhismi korral. Ligikaudu ¼ juhtudel on tegemist bilateraalse krüptorhismiga, mis esineb 2-5% sündivatel poistel (Pettersson jt., 2007).

### **1.3.3. Seemnerakkude vastased antikehad**

Seemnerakkude vastased antikehad võivad olla viljatuse põhjuseks umbes 3-7% viljatutel meestel. Sellisel juhul esinevad seemnerakkude vastase autoantikehad kas vereplasmas või seminaalplasmas (Vujisic jt., 2005). Immuunsüsteem ei põhjusta tavaliselt täielikku viljatust, kuid võib põhjustada viljakuse vähenemist. Uurimused on näidanud, et naise rasestumise tõenäosus väheneb umbes 20% kui mehel esinevad seemnerakkude vastased autoantikehad (Vujisic jt., 2005).

Normaalses olukorras on seemnetorukestes arenevad seemnerakud, testikulaarse barjääri tõttu eraldatud seemnetorukesi ümbritsevatest veresoontest, et ära hoida immuunvastust. Immuunvastus tekib siiski, kui seemnerakud satuvad vereringesse ning mehe immuunsüsteem ei ole võimeline ära tundma seemnerakkude antigeene. Immuunvastus väljendub seemnerakkude vastaste autoantikehade tekkimisena ja raskematel juhtudel isegi autoimmuunse reaktsioonina testistes (Eddy, 1998).

#### **1.3.4. Geneetilised defektid**

Erinevad geneetilised defektid võivad olla küllaltki sageli mehepoolse viljatuse põhjuseks. 10-15% viljatutel meestel on viljatus seotud kromosoomide aberatsioonide ning üksikute geenide mutatsioonidega (Ferlin jt., 2006). Viljatute meeste seas esineb viiskümmend korda sagedamini 47,XXY karüotüüpi (Klinefelteri sündroom), neli korda sagedamini 47,XYY karüotüüpi, kuuskümmend korda sagedamini 46,XX karüotüüpi, kakskümmend korda sagedamini 46,X,derY karüotüüpi, kaheksa ja pool korda sagedamini Robertsoni translokatsioonide, viis korda sagedamini retsiprookseid translokatsioonide, kaheksa korda sagedamini inversioonide ning kolm korda sagedamini marker kromosoomide (Crosignani ja Rubin, 1998). Tõenäolisemalt esinevad nimetatud geetilised põhjused azoospermsetel (seemnerakud puuduvad) meestel.

Lisaks võivad mehepoolset viljatust põhjustada X-kromosoomi liiteliste geenide mutatsioonid (androgeeni retseptori geeni mutatsioonid ja variatsioonid) ning autosoomsetes kromosoomides esinevate geenide mutatsioonid (näiteks tsüstilist fibroosi põhjustava CFTR geeni mutatsioonid) (Ferlin jt., 2006). Mehepoolse viljatuse põhjuseks võivad olla ka mtDNA deletsioonid (Jensen jt., 2004).

#### **1.3.5. Muud põhjused**

Ravimid ja kiiritus võivad samuti mõjutada spermatogeneesi. Isegi väikese kiiritusannuse saanud meestel võib normaalse spermatogeneesi taastumine võtta 2-3 aastat. Narkootiliste ainete kasutamine on samuti seotud seerumi testosterooni taseme ja spermatogeneesi häiretega. Sportlaste poolt kasutatavad anaboolsed steroidid võivad põhjustada ajutist viljatust. Kubemeoperatsiooni käigus võivad tekkida iatrogenesed vigastused, mis kahjustavad munandite verevarustust või spermatogeenset kude. Olulisel kohal meeste viljatuse tekkel on liaks reaktiivsete hapnikuühendite liigne produktsioon spermas. Umbes 25% viljatusprobleemidega meestest esineb idiopaatiline ehk teadmata põhjusega viljatus.

#### **1.4. Inimese genoomi varieeruvus**

Läbi aastate on inimese geneetika uurimise põhiküsimuseks kujunenud seosed genotüübi ja fenotüübi vahel. Täpsemalt, millised erinevad muutused DNA-s toovad esile teatud muutused

inimese fenotüübis. Oluline osa meie genoomist (umbes 5 %) koosneb segmenteeritud duplikatsioonidest, mis on oluliselt mõjutanud uuringuid antud valdkonnas (Bailey jt., 2001).

Erinevate uuringute käigus on välja selgitatud, et inimeste vaheline DNA on sarnane 99,9 % ulatuses (Freeman jt., 2006). Seega ainult 0,1 % genoomist paneb aluse inimestevahelisele geneetilisele varieeruvusele. Peamiselt USA, Kanada ja Suurbritannia teadlased on teinud kindlaks suured DNA piirkonnad, mis võivad erinevatel inimestel oluliselt erineda. Need erinevused on seotud eelkõige DNA segmentide erinevate korduste arvu ning erineva asetusega nendes piirkondades (vt. tabel 1). Nende hulka kuuluvad näiteks: SNP-d (ühenukleotiidne polümorfism), VNTR-d (varieeruv arv tandeemseid korduseid), transponeeruvate elementide olemasolu/puudumine ja genoomsed struktuurilised muudatused (nt. deletsioonid, duplikatsioonid ja inversioonid) (Freeman jt., 2006).

Seni on DNA segmentide erinevad korduste arvud jäänud paljuski tähelepanuta, kuna teadlased on keskendunud eelkõige süsteemsete järjestuste otsimisele ning korduvate segmentide kindlakstegemine on seetõttu olnud raskendatud.

**Tabel 1:** Geneetiline varieeruvus inimese genoomis (Feuk jt., 2006)

Variatsiooni tüüp	Variatsiooni kirjeldus	Sagedus inimese genoomis
SNP	Ühealuspaariline variatsioon, mis esineb rohkem kui 1% populatsioonis	10 miljonit SNP-d inimpopulatsioonis
Insertsioon/deletsioon	DNA segmendi insertsioon/deletsioon. Hõlmab väikeseid polümorfseid muutuseid, suuri kromosomaalseid kahjustusi	1 miljon insertsiooni/deletsiooni polümorfismi >1 bp inimgenoomis
Mikrosatelliit	Varieeruva arvuga 1-6 bp pikkused korduvjärjestused, kogupikkusega <200 bp	>1 miljoni mikrosatelliiti, moodustades umbes 3% järjestustest
Minisatelliit ja VNTR	Polümorfne järjestus. 6-100 bp kordused 20-50 koopiana	150 000 minisatelliiti, millest umbes 20% on polümorfseid
MSV (multisaisaitide varieeruvus)	Ühenukleotiidne komplekssete omadustega variant CNV või geeni konversiooni tõttu	MSV-de arv on praegu veel inimpopulatsioonis tuvastamata
CNV	>1 kb segmendi koopia arvu muutus	CNV-de arv inimpopulatsioonis on samuti teadmata

**Tabeli 1 järg**

Variatsiooni tüüp	Variatsiooni kirjeldus	Sagedus inimese genoomis
Inversioon	Ümberkorraldus, kus DNA segment on orienteerunud vastupidises suunas	Mikroskoopiliselt detekteeritavate inversioonide sagedus on 0,12-0,7% (peritsentriilselt) ja 0,1-0,5% (paratsentriilselt). Submikroskoopiliste sagedus on seni teadmata
Translokatsioon	Ümberkorraldus, mille käigus DNA fragmendi asukoht kromosoomistikus muutub	1/500 on heterosügootne retsipookse translokatsiooni ja 1/1000 Robertsoni translokatsiooni
ISV (intermediaatide struktuuriline varieeruvus)	>8 kb DNA segmendi deletsioon/duplikatsioon. Sisaldab ka inversiooni murdepunkte	297 ISV-d identifitseeriti ühes genoomis kasutades fosmiid raamatukogu

Sarnaseid valke kodeerivaid geene nimetatakse geeniperekondadeks, mis võivad kohati sisaldada kuni sadu liikmeid (näiteks immunoglobuliinid, transplantatsiooni antigeenid). Lisaks funktsionaalsetele duplitseerunud geenidele esineb genoomis ka duplitseerunud mittefunktsionaalseid geenikoopiaid e. pseudogene. Lisaks duplitseerunud ja tandeemselt esinevatele geenidele leidub taimede ja loomade genoomis mitmeid korduv-DNA klasse.

Väga suur osa eukarüootide genoomist (inimesel umbes 50%) koosneb korduv-DNA-st, kus teatud järjestuse elemendid on korratud väga palju kordi, kas üksteise järel paiknevadena e. tandeemselt või hajuskordustena unikaalsete järjestuste vahel.

Korduvate tandeemsete järjestuselementide hulka kuuluvad mikrosatelliitsed, minisatelliitsed ja satelliitsed järjestused. Selline jaotus on tingitud korduste arvu ja järjestuste pikkuse erinevusest. Erineb ka vastavate kordusjärjestuste lokalisatsioon kromosoomides. Korduv-DNA ei ole genoomis paigutunud juhuslikult, vaid organiseerunud teatud kindlal viisil.

Mikrosatelliitsed järjestused koosnevad tandeemselt korratud lühikestest (1-6 bp pikkustest) lihtsatest motiividest, sellest ka nende nimetus STR (lihtne tandeemne kordus) (Feuk jt., 2006). Mikrosatelliidid paiknevad genoomis väga paljudes kohtades ning kujutavad endast

tandeemselt korratud lihtsaid DNA motiive, mille pikkus inimestel varieerub. Mikrosatelliite analüüsitakse PCR-i meetodil ning on leitud mono-, di-, tri-, tetra- ja pentanukleotiidsid tandeemseid kordusi (Mueller ja Young, 1995). STR järjestustes leitakse kõigi nukleotiidide kombinatsioone. Kõige sagedamini leitakse inimese genoomis  $(CA)_n \times (GT)_n$  dimeerseid kordusi (Subramanian jt., 2003). Inimese genoomis on leitud kokku umbes  $5 \times 10^4 - 10^5$   $(CA)_n$  korduste koopiat (Muller ja Young, 1995).

Minisatelliidid koosnevad 15-100 bp pikkadest DNA järjestustest, mida on lookuses tandeemselt korratud 10-1000 korda (Subramanian jt., 2003). Minisatelliitseid lookusi on genoomis mõni tuhat ning korduste arv erinevates lookustes erineb. Võrreldes satelliitsete järjestustega on nad rohkem hajutatud üle genoomi ning koondunud peamiselt telomeersetesse piirkondadesse.

Antud töös vaatame näidetena mikrosatelliitseid ja CNV-de variatsioone ning nende poolt põhjustatud haiguseid.

### **1.5. Mikrosatelliitsed variatsioonid**

Klassikalise geneetika reeglite järgi peaks iga valku-kodeeriv DNA segment olema haploidses tuumas ühekordselt. Reaalselt on aga taimede ja loomade erinevate geenide klonerimine näidanud, et vaid ligi pooled valku-kodeerivatest geenidest on hulkraksete organismide genoomis esindatud üksikuna. Ülejäänud on paraku duplitseerunud. Duplitseerunud geenid kodeerivad sarnaseid, kuid mitteidentseid valke (näiteks beeta-globiinid, tubuliinid). Seega duplitseerunud geenid pole enamasti identsed, vaid koosnevad väga sarnastest järjestustest, mis kodeerivad sarnaseid valke.

Aastate jooksul on kindlaks määratud paljud erinevad päranduvad neurodegeneratiivsed haigused, mis on põhjustatud geneetilistest mutatsioonidest. Üks oluline grupp on trinukleotiidsed korduvjärjestuste ekspansioonid, mille põhjuseks on DNAs trinukleotiidsete korduste ülemäärane arvukus (Subramanian jt., 2003).

Haigust tekitavate geenide identifitseerimine on viinud mudelsüsteemide arendamiseni, mis uurivad haiguste mehhanisme ning ravimeetodite võimalusi. Tänapäevaks on dokumenteeritud 15 haigust, mis on seotud trinukleotiidsete kordustega (Tan ja Lai, 2005). Tabelis 2 on toodud ülevaade kõigist haigustest ja geenidest, mis antud haigusi põhjustavad.



Algselt peeti trinukleotiidseid järjestusi inimese genoomis tavapäraseks, kuid juba 1990-datel aastatel tõestati, et sellistel korduvjärjestustel on soodumus pikeneda ja põhjustada nii erinevaid, peamiselt neurodegeneratiivseid, haiguseid (Cummings ja Zoghbi, 2000).

**Tabel 2:** Trinukleotiidsete kordustega seotud haigused. Tabelis kasutatud lühendite selgitus: FRAXA- Fragiilse X sündroom; FRAXE- Fragiilse XE sündroom; FRADA- Friedreichi ataksia; MD- Müotooniline düstroofia; SBMA- Spinaalne bulbaarne lihasedüstroofia; HD- Huntingtoni tõbi; DRPLA- Dentatorupallidolüütiline autroofia; SCA- Spinotserebellaarne ataksia; DMPK- Müotoonilise düstroofia proteiinkinaas. (Tan ja Lai, 2005; Schneider jt., 2006). Tabelis on välja toodud: haiguse nimi, valgu nimetus koos seda valku kodeeriva geeni nimetusega, motiiv, motiivi asukoht ning täpne lokalisatsioon ja samuti ka normaalne korduste arv ning haiguslik korduste arv.

Haiguse nimi	Geen / valk	Lookus	Motiiv	Norm. korduste arv	Haiguslik korduste arv	Korduste lokalisatsioon
FRAXA	FMR1 (FRAXA)/ FMRP (FMR-1 proteiin)	Xq27.3	CGG	5-60	61-200(kesk) >230(täis)	5'-UTR
FRAXE	FMR2 (FRAXE)/ FMR-2 proteiin	Xq28	GCC	6-35	61-200(kesk) >200(täis)	5'-UTR
FRADA	X25 / FXN (Frataksiin)	9q13- 21.1	GAA	7-34	35-80(kesk) >100(täis)	Intron 1
MD	DMPK / DMPK	19q13	CTG	5-37	50-80 (kesk) >81(täis)	3'-UTR
SBMA	AR / AR	Xq13-21	CAG	9-36	38-62	kodeeriv- ala
HD	IT15 / Huntingtiin	4p16.3	CAG	6-35	36-121	kodeeriv- ala
DRPLA	B37 / Atrophin-1	12p13.3 1	CAG	7-23	49-75	kodeeriv- ala
SCA1	SCA1 / Ataxin-1	6p23	CAG	6-44	39-82	kodeeriv- ala

**Tabeli 2 järg**

Haiguse nimi	Geen / valk	Lookus	Motiiv	Norm. korduste arv	Haiguslik korduste arv	Korduste lokalisatsioon
SCA2	SCA2 / Ataxin-2	12q24.1	CAG	15-31	36-63	kodeeriv-ala
SCA3	SCA3 / Ataxin-3	14q32.1	CAG	12-40	55-84	kodeeriv-ala
SCA6	SCA6/ a1A-CA2+ kanal	19p13	CAG	4-18	21-33	kodeeriv-ala
SCA7	SCA7 / Ataxin-7	3p12-13	CAG	4-35	37-306	kodeeriv-ala
SCA8	SCA8 puudub	13q21	CTG	16-37	110-<250	3'-UTR
SCA12	PPP2R2B/ PP2A	5p31-33	CAG	9-28	55-78	5'-UTR
SCA17	TBP/ TATA box binding protein	6q27	CAG	29-42	46-52	kodeeriv-ala

Korduvjärjestusi leidub üle terve inimese genoomi. Esimene korduvjärjestuse ekspansioon avastati 1991 aastal, selleks oli trinukleotiidne CAG kordus (La Spada jt., 1991). See esineb geenis, mis kodeerib AR-i, X kromosoomis. Patsientidel esines neurodegeneratiivne hälv, mida hakati nimetama SBMA-ks. Normaalseks on 9-36 CAG trinukleotiidset kordust, haiguse korral aga on trinukleotiidseid korduseid 38 või rohkem. Peale haiguse identifitseerimist leiti järgnenud kahe aasta jooksul üle kümne sarnase haigusjuhu.

Mikrosatelliidid on ebastabiilsed, seega nende korduste arv võib muutuda põlvkondade lõikes (Richard ja Paques, 2000). Polümorfseid STR järjestusi on kirjeldatud primaatide genoomis nii geenidevahelistes alades kui ka kodeerivates ja mittekodeerivates (intronites ja külgnevates järjestustes) geenialades. Kusjuures kodeerivates alades on leitud ainult trinukleotiidseid kordusi. STR kordused on ideaalseteks markeriteks genoomi kaardistamisel ja geneetilise ahelduse analüüsil, olles kasulikud ka haigusgeenide isoleerimisel (näiteks müotooniline düstroofia, tsüstiline fibroos ning Huntingtoni tõbi). Samuti on näidatud, et polümorfsete trinukleotiidsete järjestuste ekspansioon geeni 5' otsas võib olla paljude raskete geneetiliste haiguste peamiseks põhjuseks (MD ja FRAXE jt.) (Subramanian jt., 2003). Polümorfseid mikrosatelliidid on väga väärtuslikud markerid ka kohtumeditiinis ja isaduse tuvastamisel, samuti molekulaarse evolutsiooni uurimisel.

Inimestel on leitud mitmeid trinukleotiidseid korduvjärjestuste ekspansioone geenidest, mis on seotud erinevate neuroloogiliste haigustega - Fragiilse X sündroomi (Jin ja Warren, 2001), Huntingtoni tõve, erinevate ataksia vormide (Sermon ja Warren, 2001), müotoonilise düstroofia (Timchenok jt., 2001), Friedrichi ataksia ja ka spinotserebellaar ataksiaga. Kokku on avastatud 15 neuroloogilist haigust, mis on põhiliselt põhjustatud järgmistest trinukleotiidsete korduvjärjestuste ekspansioonidest: (CTG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (CCG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub> ning (CAG)<sub>n</sub> (Cummings ja Zoghbi, 2000). CUG koodon kodeerib leutsiini, CGG arginiini, CCG proliini, GAA glutamiinhapet ja CAG glutamiini.

Palju on uuritud trinukleotiidseid korduseid terve inimese genoomi ulatuses ning on täheldatud, et AGC (kodeerib seriini) ning CCG (kodeerib proliini) kordused paiknevad tavaliselt kodeerivates regioonides. CCG kordus võib paikneda ka UTR piirkonnas. Uurides inimese genoomi selgus ka tõsiasi, et peamisteks trinukleotiidseteks kordusteks on AAT ning AAC kordused ning vähem esineb ACT ja ACG korduseid (Subramanian jt., 2003). Need leitud trinukleotiidsed korduvjärjestused ei ole siiani seotud veel ühegi haiglasliku fenotüübiga, kuid on selleks sobivad kandidaadid.

Kuigi pikalt on tegeletud haiguste põhjuste selgitamisega, ei ole siiski veel suudetud välja töötada efektiivseid ravimeetodeid. Tripletsed korduvjärjestuste ekspansioonid, mis asuvad mittekodeerivates alades, põhjustavad tavaliselt kas geeni funktsioonide häiret või toksilist efekti mRNA-le (Prospero ja Fischbeck, 2005). Samas korduvjärjestused, mis asuvad kodeerivates alades, põhjustavad polüglutamiini või polüalaniini osakaalu rohkust proteiini produktides. Selle tulemusel omakorda proteiin muutub toksiliseks, põhjustades valkude väljasadenemist olenemata sellest, kas proteiin kaotab oma algpärase funktsiooni või mitte (Prospero ja Fischbeck, 2005).

Seetõttu ongi peamiseks terapeudiliseks võtteks, mittekodeerivates alades paiknevate trinukleotiidsete korduvjärjestuste ekspansiooni korral, kas siis algse geeni funktsiooni taastamine või korvamine. Lisaks on kodeerivate alade puhul kasutusel meetod, mille eesmärgid on otseselt suunatud proteiini toksiliste tagajärgede leevendamisele. (Prospero ja Fischbeck, 2005).

### 1.5.1. Trinukleotiidsetest korduvjärjestustest põhjustatud haigused

Tegemist on trinukleotiidsete korduvjärjestuste anomaaliatega erinevates geenides, mis põhjustavad neuroloogilisi haiguseid. Peamisteks on järgmised tripletid: CGG, GCC, GAA, CTG ja CAG (mittekodeerivates alades) ning CAG (kodeerivates alades, kodeerides glutamiini) (Prospero ja Fischbeck, 2005). Korduste tüüp ning selle lokalisatsioon genoomis defineerib iga anomaalia ja selle patoloogia. Nimetatud anomaaliade tulemuseks on tihti geeni esialgse funktsiooni kadumine (Cummings ja Zoghbi, 2000).

Iga haiguse puhul on olulised: korduste arv, nende paiknemine ja kordusmotiiv. Kuna kodeerivas järjestuses on tavapäraselt korratavaks aminohappeks glutamiin, siis nimetatakse ka vastavaid haigusi polüglutamiini-haigusteks. (Prospero ja Fischbeck, 2005).

Pikenenud trinukleotiidsed kordused, mis põhjustavad erinevaid geneetilisi haiguseid, jagada peamiselt kahte rühma:

- kodeerivas alas paiknevad trinukleotiidsed kordused (polüglutamiini-haigused, mille puhul on korratavaks motiiviks on CAG). Sellised haigused on näiteks: Huntingtoni tõbi, Spinaarne bulbaarne lihasdüstroofia, Spinotserebellaalne ataksia tüüp 1, 2, 3, 6, 7 ja 17, Haw-River sündroom ehk Dentatoruoallidolüütiline autroofia;
- mittekodeerivas alas paiknevad trinukleotiidsed kordused (mille puhul on korratavateks motiivideks on: CGG, GCC, GAA, CTG või CAG). Sellised haigused on näiteks: Fragiilse X sündroom, Fragiilse XE sündroom, Friedrich ataksia, Müotooniline düstroofia, Spinotserebellaarne ataksia tüüp 8 ja 12.

Üldiselt on sellised eelpool nimetatud haigused kas dominantselt päritavad või X-seoselised (erandiks on ainult FRDA, mis on autosomaalne retsessiivne haigus) (Prospero ja Fischbeck, 2005).

Võimalikud mehhanismid, mille kaudu trinukleotiidsete korduvjärjestuste ekspansioonid osalevad patogeensuse tekitamisel, jaotatakse põhiliselt järgmistesse gruppidesse:

- pikenenud trinukleotiidne kordus võib viia valgus uue funktsiooni tekkeni (*gain of function*) – võimalik toksilisus ja/või uued interaktsioonid teiste valkudega: nt. HD;
- ebanormaalsused proteiini produktides, mis on põhjustatud polüglutamiini rohkusest ning usutakse, et modifitseeritud funktsioonid põhjustavad kõige rohkem patoloogiaid;

- pikenenud trinukleotiidsed kordused võivad viia geenivaigistamise või transkriptsioonilise puudulikkuseni (*loss of function*). Esineb FRAXA ning FRAXE korral ning tulemuseks on proteiini produktide taseme langus;
- valgü aktiivsuse vähenemine või muutumine pikenenud ahelast tulenevalt;
- muutunud rakusisene lokalisatsioon;
- pikenenud trinukleotiidi kordus võib mõjuda RNA rohkust, näiteks müotoonilise düstroofia puhul. (Jasinska jt., 2003).

### **1.5.2. Mittekodeerivas alas paiknevate trinukleotiidsete korduste poolt põhjustatud haigused**

Mittekodeerivas alas paiknevate trinukleotiidsete korduste poolt põhjustatud haigusi iseloomustavad väga pikad ja varieeruvad korduste ekspansioonid. Tulemuseks on erinevate kudede funktsiooni muutus või degeneratsioon (Cummings ja Zoghbi, 2000). Erinevate haiguste puhul erineb nii korduv motiiv kui ka korduste arv, mis põhjustavad haigust. Nagu eelpoolgi mainitud võivad korduvateks motiivideks olla CGG, GCC, GAA, CTG või CAG.

Samuti on erinevate haiguste puhul varieeruv ka patogeensust põhjustav mehhanism, sõltudes enamasti ekspansiooni sisaldava proteiini funktsionaalsuse kao tagajärgedest või mõne haiguse puhul on tulemuseks ka toksiline produkt (Prospero ja Fischbeck, 2005). Kuna kõigi sellesse gruppi kuuluvatel haigustel on väga varieeruvad tekkemehhanismid ja erinevad tagajärjed, siis edaspidi käsitletakse iga haigust eraldi pikemalt.

#### **1.5.2.1 Friedrichi ataksia**

Tegemist on retsessiivse, autosomaalse (seetõttu ei esine ka selle haiguse puhul haiguse raskusastme süvenemist järgnevatel põlvkondades ja avaldumist varasemas eas) päranduva ataksiaga. Nagu enamuste pärilike ataksiate puhul, on tegu väikeaju kahjustusest tingitud haigusega, mis avaldub häiretena tundlikkuses, tasakaalus, liigutustes, kõnnakus ning tihti esineb ka diabeeti (Cummings ja Zoghbi, 2000). FRADA on üks sagedamini esinevaid pärilikku ajukahjustust põhjustav haigus. Olenevalt ataksia alavormist, toimub haiguse avaldumine erinevas vanuses, kuid peamiselt siiski juba varases nooruses.

Seda kahjustust ei ole suudetud siimaani täielikult ravida. Enamikul patsientidel esineb homosügootne GAA korduvjärjestuse ekspansioon X25 geeni esimeses intronis (Prospero ja

Fischbeck, 2005). See omakorda lokaliseerub 9-ndas kromosoomis. Sellise olukorra tulemuseks on enamasti puudujäägid geeni mRNA-des või proteiinis (Prospero ja Fischbeck, 2005). X25 geenilt kodeeritud FXN kogus on pöörvõrdeliselt seotud GAA korduvjärjestuse pikkusega, mis asub patsiendi lühemas alleelis. Normaalne korduste arv geenis on 7-34 ja haigust põhjustav geen omab 35 või rohkem kordust (Fogel ja Perlman, 2007). Frataksiini puudujääk viib mitokondriaalse raua akumulatsioonini (kuna rauaioonide transport on häiritud), oksüdatiivse stressini ja väheneb oksüdatiivne fosforülatsioon (Prospero ja Fischbeck, 2005).

Siiani ei ole selge frataksiini primaarne funktsioon. Tõenäoline on, et vaba-radikaalne formatsioon ning oksüdatiivne stress põhjustavad Friedrichi ataksiat. Seetõttu on viimasel ajal hakatud suuresti uurima antioksidantide võimalikke ravitoimeid. Liigne raua akumulatsioon mitokondris võib mängida rolli FRADA patogeensuses, kuna raud võib suurendada vaba radikaali formatsiooni (Prospero ja Fischbeck, 2005). See võib-olla üheks võimaluseks haiguse pidurdamiseks.

#### **1.5.2.2. Fragiilse X sündroom.**

Pärilik, kaasasündinud defektsest X-kromosoomist põhjustatud haigus. Haiguse kandjatel esineb vaimse arengu mahajäävus ja hüperaktiivsus ning ka tüüpiline välimus: suur pea ehk makrotsefaalia, lihasnõrkus ehk hüpotoonia, väga painduvad liigesed, kõrge suulagi, suured kõrvad, etteulatuv lõug (Cummings ja Zoghbi, 2000). Enamasti on poistel sümptomid rohkem väljendunud kui tüdrukutel. Haigus esineb sagedusega 1:1000-1:1500 poisi kohta ja 1:2000-1:2500 tüdruku kohta. FRAXA on X-liiteline mittetäieliku penetrantsusega geenihaigus. Puuetega (vaimse alaarenguga) on heterosügootsed naised ja hemisügootsed mehed. Kuna naistel on kaks X kromosoomi, millest üks põhjustab haigust, avaldub haigus nendel kergemal kujul kui meestel.

Haigust põhjustab FMR1 (Fragiilse X sündroomi mentaalse alaarengu proteiin 1) geenis CGG trinukleotiidsete korduste arvu suurenemine. CGG trinukleotiidne kordus asetseb geeni 5' UTR piirkonnas (Cummings ja Zoghbi, 2000). Kui normaalses geenis on 5-60 CGG kordust, siis mutantses geenis on kordusi kuni 1000 koopiat. Liigne korduste arv FMR1 geenis mõjutab sellega külgnivate geenide funktsioneerimist (Prospero ja Fischbeck, 2005). Täismutatsiooni korral on muutunud ka FMR1 promootori metülatsioonimuster, mille tulemuseks on FMR1 valgu ebapiisav süntees (Prospero ja Fischbeck, 2005). FRAXA-t

põhjustav mutatsioon on metafaasi kromosoomidel tsütoloogiliselt jälgitav, mille korral oleksid kromosoomi otsad murdunud.

Kindlaks on tehtud, et FMR1 proteiinide puudus korreleerub kliiniliste probleemidega, mis on seotud õppimisega ja mälega. FMR1 *knockout* hiirte puhul on täheldatud õpiraskuseid ning morfoloogiliselt ebanormaalseid dendriite, sarnanedes FRAXA-t põdevate patsientide närvirakkudega (Prospero ja Fischbeck, 2005). Ebanormaalsed neuronid *knockout* hiirtel muudavad sünapside arengut ja plastilisust. Spekuleeritud on, et selle retseptorite antagonistid võiksid vähendada FRAXA sümptomeid, kuna need võivad parandada neuroanatomilisi ja käitumuslikke defekte (Prospero ja Fischbeck, 2005).

### **1.5.2.3. Fragiilse XE sündroom**

Fragiilsait FRAXE paikneb X-kromosoomi pikal õlal FRAXA-st distaalsemalt. FRAXE-lookusega on seotud teine vaimse mahajäämuse sündroom, mille sagedus meestel on 1:50 000. Sündroomi esineb seega oluliselt harvemini kui FRAXA-t. Mõlemad haigused on põhjustatud trinukleotiidse korduse ekspansioonist X- kromosoomi pikal õlal (FRAXE Xq28), vahemaaga 600 kb (Nigro jt., 2000). FRAXE sündroomile tüüpilisi düsmorfseid tunnuseid pole ja seetõttu on seda ka raske kliiniliselt diagnoosida. Kuigi enamus juhtudel on iseloomulikuks kerge vaimse arengu peetus, käitumis- ja kõnelemishäired ja ka õpiraskused (Cummings ja Zoghbi, 2000).

Tegemist on trinukleotiidse CCG korduse ekspansiooniga FMR2 (Fragiilse XE sündroomi mentaalse alaarengu proteiin 2) geenis. Normaalsel juhul esineb geenis 6-35 kordust, täismutatsiooni puhul aga üle 200 korduse (Nigro jt, 2000). Liigsed kordused põhjustavad FMR2 geeni ekspressiooni vähenemist ning võivad viia geeni produkti kadumiseni. Samas viib ka  $(CCG)_n$  amplifikatsioon lähedalasuvate CpG saarte hüpermetülatsioonile (Knight jt., 1993).

### **1.5.2.4. Müotooniline düstroofia**

MD on autosomaalne dominantne haigus, mis avaldub tavaliselt keskeas, kuid esimesed sümptomid avalduvad juba enne 20-dat eluaastat. Antud haigust iseloomustab müotoonia, muskulaarne düstroofia, kataraktid, hüpogonadism, frontaalne kiilaspäisus ja muutused EKG-s e. elektrokardiogrammis (Cummings ja Zoghbi, 2000). Haiguse kulg on aeglaselt

progresseeruv, haiged surevad tavaliselt kuuendal elukümnendil kardiaalsete või respiratoorsete komplikatsioonide tõttu. Haiguse esinemissagedus on erinevates Euroopa riikides 1,2-5 juhtu 1 000 000 inimese kohta (Prospero ja Fischbeck, 2005). On täheldatud haiguse raskusastme süvenemist järgnevas põlvkondades ja avaldumist varasemas eas.

Haiguse molekulaarseks aluseks on 19. kromosoomis paikneva DMPK (MD proteiinkinaas) geeni 3' UTR järjestuses trinukleotiidsete korduste arvu suurenemine (Tan ja Lai, 2005). Korduvaks motiiviks selles piirkonnas on CTG. Need korduvjärjestused on ebastabiilsed, omades tendentsi piknemisele põlvkondade lõikes, mille tulemuseks on omakorda väga varieeruv fenotüüp ning keeruline prognoosimine (Pizzuti jt, 1992). Kliinilise pildi raskus korreleerub korduste arvuga: normaalsetel indiviididel on geenis 5 kuni 37 kordust, kergema haigusvormi põhjustavad 50 kuni 80 kordust ja raskema 81 ja enam kordust (Tan ja Lai, 2005). Seega haiguse kliinilised sümptomid esinevad, kui korduste arv suureneb üle 50-ne.

#### **1.5.2.5. Spinotserebellaarne ataksia tüüp 8**

Spinotserebellaarsed ataksiad on grupp neurodegradatiivseid haiguseid, mis on põhjustatud dünaamiliste mikrosatelliidsete korduste ekspansiooni poolt genoomis. SCA8 on põhjustatud CTG trinuleotiidi ekspansiooni tõttu 13. kromosoomi 3'UTR regioonis (täpsemalt 13q21), SCA8 geenis (Sulek jt., 2004). Antud haigusele viitavad vähenenud vibratsioonitaju ning väikeaju autroofia (Cummings ja Zoghbi, 2000).

Senini ei ole täielikult kindlaks määratud CTG trinukleotiidi korduste arvu, millest alates esineks alati SCA8 seoseline neurodegradatsioon. Uuringute käigus on selgunud, et 99% populatsioonil on CTG korduste arv vahemikus 16-37 ning juhul kui korduste arv on >110, esineb antud haigus (Koob jt., 1999). Samas ei korreleeru suur korduste arv alati haiguse esinemisega, viidates sellele, et mõned geneetilised ja keskkonnafaktorid võivad mõjutada haiguse avaldumist (Koob jt., 1999).

#### **1.5.2.6. Spinotserebellaarne ataksia tüüp 12**

SCA12 on haruldane autosomaalne, dominantselt päranduv, neurodegeneratiivne haigus, mis on põhjustatud CAG trinukleotiidi korduste ekspansioonist. Kordused paiknevad 5-das kromosoomis esinevate PPP2R2B või PP2A-PR55β geenide 5'UTR piirkondades (Holmes jt., 1999). PP2R2B geen kodeerib aju-spetsiifilist proteiini fosfotaas 2A (PP2A) reguloorset



subühikut (Cummings ja Zoghbi, 2000). Antud juhul esinevad CAG kordused konserveerunud promootori piirkonnas transkriptsiooni alguse lähedal. Kuid samas ei ole siiani otseselt näidatud PPP2R2B transkriptsiooni häirumist ekspansiooni tõttu. Antud haigus on tihti väga raskelt diagnoositav. Kõige enam levinumateks haiguse sümptomiteks on koordinatsiooni kadu ning seosetu kõne. Normaalsetel juhtudel on CAG trinukleotiidsete korduste arv 9-28 ning haigus esineb, kui korduseid on 55-78 (Holmes jt., 2001).

### 1.5.3. Polüglutamiini haigused

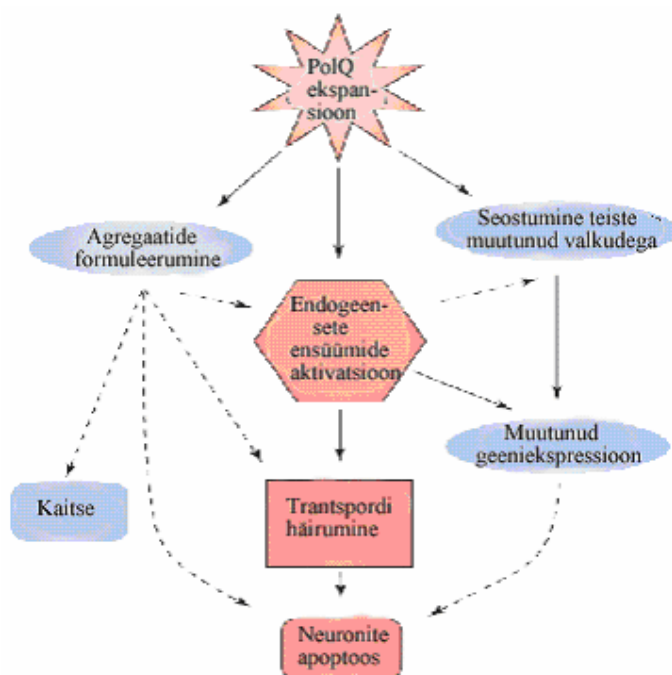
Polüglutamiin-haigused on eraldi neurodegeneratiivsete haiguste grupp, mis päranduvad dominantsetl ning on põhjustatud ebanormaalsest polüglutamiini järjestuse ekspansioonist (Conforti jt., 2007). Erinevate haiguste puhul paiknevad kordused erinevates geenides, mille tulemusena spetsiifilised ajurakud degeneraeruvad. Samas juba polüglutamiini liigne hulk võib olla toksiline (Prospero ja Fischbeck, 2005).

Selliste haiguste üldisteks iseloomulikeks joonteks on:

- normaalsest pikemad trinukleotiidi CAG kordused kodeerivates järjestustes;
- enamasti on sellised haigused neurodegeneratiivsed ning ka täielikult avalduvad;
- seotud erinevate ajupiirkondade degeneratsiooniga;
- mutantsete valkude agregaatide teke tuumas ja tsütoplasmas;
- enamasti avalduvad keskeas;
- dominantsetl päranduvad;
- trinukleotiidi korduste arv on positiivses korrelatsioonis varasema haiguse avaldumise ning haiguse raskusega. (Nagai jt., 2007).

Üks levinud mudeleid polüglutamiin-haiguste patomehhanismides on nn. valgu *misfolding* e. valesti pakkumine, mis tuleneb polüglutamiin järjestuse pikenemisest (Soto, 2003). Tavalised rakkude degeneratsioonini viivad põhjused on kas oksüdatiivne stress, vabade radikaalide teke või kahjustatud metabolism (Gardian ja Vecsei, 2004). Kõik need mehhanismid esinevad polüglutamiin-haiguste korral, kuid ükski neist ei seleta haiguskolde spetsiifilisust (Morfini jt., 2005). Nagu eelpool mainitud on peaaegu kõigi polüglutamiin-haiguste puhul näidatud inklusioonkehade spetsiifiliste valguagregaatide teket nii tuumas kui tsütoplasmas. Valguagregaadid võivad segada raku normaalset funktsioneerimist mitmel erineval tasandil: muutes transkriptsiooni, olles steeriliseks takistuseks erinevatele raku funktsioonidele või aktiveerides otseselt apoptootilisi või ka teisi signaaliradasid rakus (Morfini jt., 2005).

Samas on nt. Huntingtoni tõve puhul näidatud, et valguagregaatides olev huntingtiin ei ole rakule toksiline (Arraste jt., 2004). Toksiline on vabalt tsütoplasmas ja tuumas olev mutantne huntingtiin või selle osad. Agregaatide teke võib rakule olla hoopis kasulik, piiritledes mutantse valgu paiknemist rakus (Arraste jt., 2004). Üks võimalik patogeneesi mudel on kiire aktsionaalse transpordi deregulatsioon ja sellest tulenev neuronaalne apoptoos (vt. joonis 7).



**Joonis 7:** Skemaatiline mudel kiire aktsionaalse transpordi deregulatsiooni rollist polüglutamiin haiguste patogeneesis. Endogeensete ensüümide aktivatsioon, mis mõjutab transporti, viib neuronalse apoptoosini. Agregaatide tekke tulemuseks võib olla raku kaitsefunktsiooni tekkimine või apoptoosi aktiveeriv mõju. Teiste muutunud valkudega seostumine võib muuta geenitranskriptsiooni. (modifitseeritud, Morfini jt., 2005).

### 1.5.3.1. Huntingtoni tõbi

HD on neurodegeneratiivne letaalne haigus, mis pärandub autosoomselt ning avaldub dominantsetl. HD lokaliseeriti esmaselt RFLP (restriktsioonifragmentide pikkuse polümorfismi analüüs) meetodil (Das ja Vaddadi, 2004). HD esineb sagedusega umbes 1:10000, mis teeb HD-st kõige enam levinud päriliku neurodegeneratiivse haiguse (Landles ja Bates, 2004). Haiguse esimesed sümptomid avalduvad tavaliselt 30-50-nda eluaasta vahel. Haiguse varasel arengul on haiguse progressioon kiirem, ning lõppfaas saabub 7-10 aasta jooksul. Algselt ilmnevad patsiendil emotsionaalsed häired (depressioon, depressiivne

käitumine), seejärel mõtlemisteravuse hägustumine, mis lõpuks viivad täieliku dementsuse ning liikumishäireteni (Landles ja Bates, 2004).

Haigust põhjustab mutatsioon 4. kromosoomis asuvas IT15 geenis, mis kodeerib valku huntingtiin. Nimetatud geenis esinevad CAG kordused - normaalselt 6-35 kordust ja haigetel 36-121 kordust (Landles ja Bates, 2004). Mida suurem on korduste arv, seda varem haigus avaldub. Mutatsiooni tagajärjel muutub valgu funktsioon. Huntingtiin seondub valkudega, mis osalevad rakkude apoptoosis. Normaalne valk püsib tsütoplasmas, samas kui mutantne vorm siseneb tuuma, kaotab oma antiapoptootilise funktsiooni ja genereerib toksilisiprodukte (Das ja Vaddadi, 2004).

### **1.5.3.2. Spinaarne bulbaarne lihasdüstroofia**

SBMA-d nimetatakse ka Kennedy haiguseks. Tegemist on väga haruldase päriliku haigusega, mille sümptomiteks on muskulaarne atroofia, lihaskrambid ning nõrkus (Adachi jt., 2007). SBMA esineb meestel ning naised on tavaliselt asümptomaatilised kandjad.

SBMA-d põhjuseks on CAG trinukleotiidi ekspansioon AR geeni esimeses eksonis (Adachi jt., 2007). Normaalsel juhudel on korduste arv 9 ja 36 vahel, mutantsust aga põhjustavad kordused, mis jäävad vahemikku 38-62 (Fischbeck, 1997). AR geen asetseb Xq13-21 (Adachi jt., 2007). Sarnaselt HD-le, mida suurem on korduste arv, seda varem haigus avaldub ning enamikul juhtudel avaldub haigus 30-40 eluaastatel (Fischbeck, 1997). Uurimuste tulemused on näidanud, et SBMA esinemissagedus on umbes 1:40 000 kohta (Fischbeck, 1997). AR geeni ei ekspresserita mitte ainult suguorganites, vaid ka neerudes, skeletilihastes, neerupealistes, nahas ning närvisüsteemis, mis teeb ravivõimaluste leidmise raskeks (Adachi jt., 2007).

### **1.5.3.3. Spinotserebellaarne ataksia**

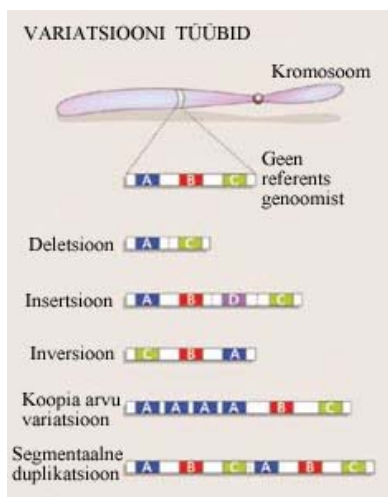
Antud klassi kuuluvad autosoom-dominantset tüüpi spinotserebellaarsed ataksiad, mis on kliiniliselt väga varieeruv progresseeruvate neurodegeneratiivsete haiguste rühm, mille korral on peamiseks ühiseks sümptomiks progresseeruv tserebellaarne ataksia (Basu jt., 2000). Üldiselt algavad antud haigused 3. või 4. elukümnendil, kuid haigus võib alata ka lapse- või vanurieas (Tsai jt., 2004). Kuigi haigus algab tavaliselt täiskasvanueas, on enamusel SCA tüüpidel kirjeldatud antitsipatsiooni.

Molekulaarsel tasandil on kirjeldatud vähemalt 20 erineva geeni seotust SCA erinevate tüüpidega. SCA tüüpide 1, 2, 3, 6, 7 ning 17 puhul on ühiseks tunnuseks, et kõigis haigust põhjustavate geenide kodeerivates alades on suurenenud glutamiini kodeerivate CAG korduste arv (Tsai jt., 2004).

## 1.6. CNV

Uute ja arenenumate geneetiliste uurimismeetodite väljatöötamise ja kasutuselevõtuga on samm-sammult toimunud üleminek lookus-spetsiifilistelt uuringutelt kogu genoomi hõlmavatele uuringutele. Sellega seoses on hakanud üha enam tekkima ettekujutus CNV-de olemusest ja nende olulisusest inimese genoomses varieeruvuses (Freedman jt. 2006).

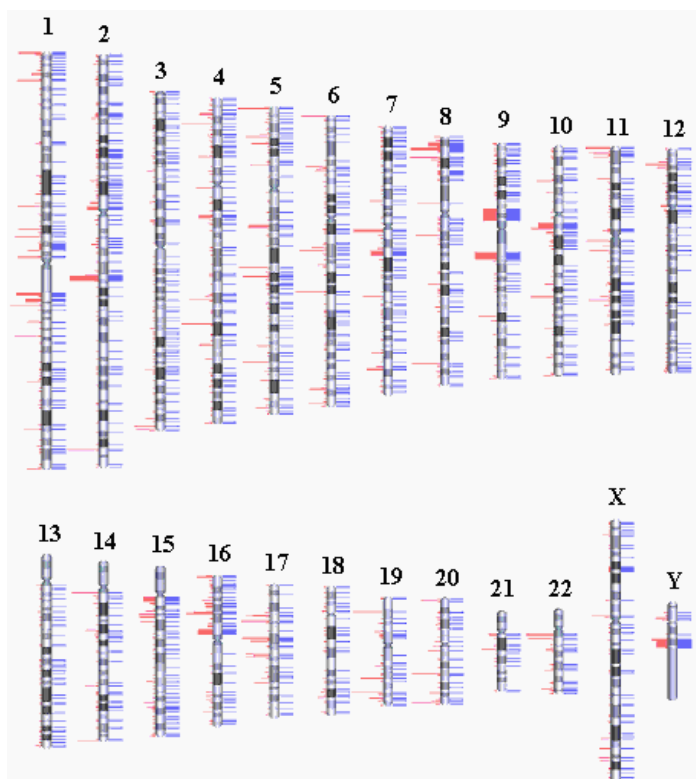
CNV-ks nimetatakse duplitseerunud või deleteerunud DNA segmenti (vt., joonis 8), mis on suurem kui 1 kb ja samas väiksem kui 3 Mb, keskmine CNV-de pikkus jääb siiski 300-460 kb vahele (Feuk jt., 2006). Seega sarnanevad CNV-d mikrosatelliitidega, selle vahega, et kahe- või kolmenukleotiidsete korduste asemel on vähemalt 1 kb pikkused järjestused. CNV-de puhul on oluline, et tegu oleks tandeemsete duplikatsioonidega, mis on vähemalt 1 kb pikkused. Kuid mikrosatelliitide tekkel toimub polümeraasi libisemine DNA ahelal.



**Joonis 8:** Antud joonisel on näidatud ära erinevad võimalused: deletsioon, insertioon, inversioon, koopia-arvu variatsioon ja segmentaalne duplikatsioon. (modifitseeritud: <http://www.ghastlyfop.com>).

Siiamaani on ligi 3000 (vt., joonis 9) geeni seostatud CNV-dega üle terve inimese genoomi, samas kindlasti lisandub neid järgnevate uuringute käigus (Kehrer-Sawatzki, 2007). CNV-de

puhul on oluline vahet teha vanematelt päritud ja *de novo* omandatud koopia arvu varieeruvusel (Holmes, 2006). *De novo* varieeruvuse juhul toimub inimese elu jooksul teatud DNA segmendi koopia arvu muutus somaatilistes rakkudes. Esineda võib kaks võimalust: I.) eelpool kirjeldatud protsess toimub piirkonnas, mis ei mõjuta geenide ekspressiooni ja II.) protsessi toimub piirkonnas, mis mõjutab geenide ekspressiooni (näiteks muutub tuumorsupressorgeeni koopia arv või suureneb onkogeeni koopia arv) (Holmes, 2006).



**Joonis 9:** Antud joonisel on näidatud CNV-de esinemine erinevates kromosoomides. Paremalt pool sinisega on märgitud CNV pikkus ja vasakul pool, punasega, on märgitud esinemissagedus. Mida pikem on punane piik, seda rohkem on antud piirkonnas CNV-sid kirjeldatud ja vastupidi. (Redon jt., 2006). Täpsemat infot iga CNV jaoks leiab aadressilt: <http://projects.tcag.ca/variation/>

### 1.6.1. CNV-de poolt põhjustatud haigused

Geeni koopiaarvu muutused genoomis põhjustavad väga suure osa kõigist genoomsetest ümberkorraldustest, põhjustades nii deletsioone kui ka duplikatsioone. Tulemuseks võib olla geeni koopiate arvu muutumine. Antud protsessi tulemusel võib muutuda geeni ekspressioonitase (toimuda võib nii üle kui ka alaekspressioon). Põhjustades haigusliku fenotüübi esinemist (Kumar jt., 2005). Mitmed üsna levinud ja ohutud haigused on

põhjustatud erinevatest deletsioonidest erinevates geenides, näiteks Rh-negatiivne (reesusnegatiivne) veregrupp või värvipimedus (Holmes, 2006). Samas on CNV-dega seostatud erinevaid hälbeid nii närvisüsteemi arengus kui ka erinevaid psühhiaatrilisi haiguseid.

Väga palju on geeni koopia arvu varieeruvuse uuringuid läbi viidud just närvisüsteemi arenguga seoses ning antud valdkonna häiretega seotud patoloogiate uurimiseks. Tabelites 3-5 on ära toodud siamaani kirjeldatud CNV-de poolt põhjustatud haigused.

**Tabel 3:** Närvisüsteemi häireid põhjustavad genoomi ümberkorraldused ja geeni koopia arvu variatsioonid. Tabelis kasutatud lühendite seletused: ADHD- tähelepanu puudulikkuse ja hüperaktiivsuse häire; MR- mentaalne alaareng; OCD- obsessiiv-kompulsiivhäire; EEG-elektroentsefalograafia; PDD- pervasiivne arenguhäire; MRI- magnetresonantskuvamine; WBS- Williams-Beureni sündroom; AS- Angelmani sündroom; PWS- Prader-Willi sündroom; MDLS- Miliiler-Dieker Lissencephaly sündroom; SMS- Smith-Magenisi sündroom; NF1- Neurofibromatoos; RTT- Rett sündroom; PMD- Pelizaeus-Merzbacheri haigus. (Lee ja Lupski, 2006).

Sündroom	Lookus	Ümber - korraldus	Suurus (MB)	Geen(id)	Sümptomid
WBS	del(7) q11.23	deletsioon	1,6	CGS, ELN	koordinatsiooni häired, hüperrefleksia, ärevus, ADHD, MR
	dup(7) q11.23	duplikatsioon	1,6		kõnehäired, MR, kasvu taandareng
AS	15q11-q13	emapoolne deletsioon, isapoolne disoomia (15)	4	UBE3A	ataksia, autismile iseloomulikud tunnused, MR, hüperaktiivsus, kõne puudumine
PWS		Isapoolne deletsioon, emapolne disoomia (15)	4	CGS	hüpotoonia, motoorsed häired, õppimise võimetus, OCD, rasvumine
	idic(15)	15q12, 15q13 triplikatsioon			ataksia, hüpotoonia, ebanormaalne EEG, epilepsia, PDD, MR, kõnehäired
	dup(15)	15q11-q13 duplikatsioon			hüpotoonia, MR, kõnehäired
MDLS	17q13.3	deletsioon	>1,3	CGS, LIS1	siledapinnaline aju, MR, epilepsia, kramptõbi

**Tabeli 3 järg**

Sündroom	Lookus	Ümber - korraldus	Suurus (MB)	Geen(id)	Sümptomid
SMS	17p11.2	deletsioon	3,7	CGS, RAI1	motoorsed häired, MR, hüpotoonia, ebanormaalne EEG, stereotüüpiline käitumine
dup(17)p11.2		duplikatsioon		RAI1	hüpotoonia, tasakaaluhäired, ADHD
NF1	17q11.2	deletsioon	1,5/1,2	CGS, NF1	neurofibroom, kesknärvisüsteemi kasvaja, koordineerimisvõimehäired, MR, ADHD, ebanormaalne MRI
Del(22)q11.2	22q11.2	deletsioon	3	CGS, TBX1, COMT	väikeaju autroofia, kõne puudumine, ADHD, ärevus, psühhiaatrilised häired
Dup(22)q11.2	22q11.2	duplikatsioon	3-6	CGS	motoorsed häired, agressioon/depressioon/ärevus, ADHD
Del(22)q13.3	22q13.3	deletsioon	0,1-9	SHANK3/PROSAP	hüpotoonia, hilinenud/ puuduv kõne, MR, autismile iseloomulikud tunnused
RTT	Xq28	deletsioon	0,15-0,08	MECP2	stereotüüpiline käitumine, ataksia, autism, epilepsia, krambid, osaline halvatus
Rett-like sündroom	Xq28	duplikatsioon, triplikatsioon	0,2-2,2	MECP2	hüpotoonia, krambid, MR, kõne häired, stereotüüpiline käitumine
PMD	Xq22.2	duplikatsioon	0,4-7	PLP1	silmatõmbus, ataksia, düsartia, ebanormaalne MRI
		deletsioon	0,2-0,75		CNS närvihaigus, hüporefleksia, ebanormaalne MRI
Dup(X)q26.2-q27.1	Xq26.2-q27.1	duplikatsioon	7,5	CGS, SOX3	silmatõmbus, kõne häired

CNV-d põhjustavad ka erinevaid neurodegeneratiivseid haiguseid. Neurodegeneratiivsete haiguste korral toimub neuronite progresseeruv ja pöördumatu kadu kindlast aju piirkonnast ja sellega kaasnevad nähud. Neurodegeneratiivsete haiguste etiopatogeneesis on olulised geneetilised faktorid, keskkonna faktorid, metabolismi eripärad, vananemine ja oksüdatiivne stress. Tabelis 4 on ära toodud siamaani CNV-dega seostatud neurodegeneratiivsed haigused.

**Tabel 4:** Neurodegeneratiivsed haigused, mis on põhjustatud CNV-de esinemisest. Tabelis kasutatud lühendite selgitused: NCV- närvi juhtivuskiirus; CAA- peaaju amüloidangiopaatia; NFT- neurofibrillaarsed kämbud; PD- Parkinsoni tõbi; SMA- Spinaalne lihasedüstroofia; ADLD- Leukodüstroofia; CMT1A- pärilik motosensoorne neuropaatia; HNPP- hereditaarne kompressioonineuropaatia; AD- Alzheimeri tõbi. (Lee ja Lupski, 2006).

Haigus	Lookus	Ümberkorraldus	Suurus (Mb)	Geen	Sümptomid
PD	4q21	duplikatsioon	0,22-0,39	SNCA	liigutusaeglus, kangustus
		triplikatsioon	1,61-2,04		varane dementsus
SMA	5q13	deletsioon, geeni konversioon	0,006	SMN1, SMN2	hüpotoonia, proksimaalsete lihaste nõrkus, kõndimisvõimetus
ADLD	5q23,2	duplikatsioon	0,17-0,34	LMNB1	krambid, ebanormaalne MRI, väikeaju ataksia
CMT1A	17q12	duplikatsioon	u. 1,4	PMP22	Redutseerunud monotoorne NCV, puuduvad lihase kokkutõmbe refleksid, jäsemete ja lihaste nõrkus
HNPP	17q12	deletsioon	u. 1,4	PMP22	kangustus, lihaste nõrkus, redutseerunud monotoorne ja sensoorne NCV
AD	21q21	duplikatsioon	0,58-6,37	APP	CAA, NFT

Väga mitmed CNV-de poolt põhjustatud haigused on seostatud erinevate psühhiaatriliste häiretega. Viimaseid põhjustavad nii keskkonnast tulenevad faktorid kui ka geneetilised faktorid. Hiljuti läbi viidud assotsiatsioonuringute tulemusena on kindlaks määratud mitmed CNV-d, mida saab otseselt seostada haigusliku fenotüübi tekkega (Middleton jt., 2004). Tabelis 5 on ära toodud enimesinevad antud tüüpi haigused.

**Tabel 5:** Psühhiaatrilised haigused (Lee ja Lupski, 2006).

Lookus	Ümberkorraldus	Psühhiaatriline fenotüüp
Kromosoom 4	UPD4	suured depressiivsuse häired
8q22,1-q24,1	duplikatsioon	bipolaarsed häired, kõnehäired, ADHD, agressiivsus
15q14	duplikatsioon	bipolaarsed häired, hüpotoonia
15q24-q26	duplikatsioon	paanika ja foobia häired



## **2. PRAKTILINE OSA**

Praktilise osa eesmärgiks on luua andmebaas spermatogeneesi geenidest, mis lisaks sisaldab infot nendes geenides asetsevate mikrosatelliitide ning CNV-de varieeruvuse kohta.

### **2.1. Materjal ja meetodika**

#### **2.1.1. Inimese genoomi projekt**

1988. a. käivitati USA-s HUGO (Inimese Genoomi Organisatsioon) poolt HGP (Inimese Genoomi Projekt) projekt (Venter, 2001), mille eesmärgiks seati kaardistada ja sekveneerida terve inimese genoom ning kirjeldada kõikide geenide funktsioonid. Projekti lõpptulemusena loodeti lahendada pärilike haiguste põhjustega seotud probleemid ning avardada nende diagnostika ja ravimeetodeid.

Projekti konkreetsed eesmärgid:

1. määrata kogu inimese genoomi nukleotiidne järjestus;
2. identifitseerida kõik geenid;
3. säilitada info andmebaasides;
4. arendada välja andmeanalüüsi tarkvara;
5. vastata projekti käigus tekkivatele eetilistele, õiguslikele ja sotsiaalsetele küsimustele (Venter, 2001).

Inimese genoomi projekt oli esialgu planeeritud 15 aasta peale, kuid seoses projekti eduka kulgemisega lõpetati see 2 aastat varem, 2003 a. Projekti käigus sekveneeriti inimese genoom 99% täpsusega (Venter, 2001). Inimese genoomi järjestuse esialgne variant saadi valmis 2000. a. juunis. Esialgse variandi tegemisel sekveneeriti iga analüüsitava DNA piirkond 5 korda, tavalise 10 korra asemel. Kümnekordsel sekveneerimisel saadakse aga kõrgekvaliteedilised andmed, mis on 99.9% täpsed ning kus on lubatud vaid 1 viga 10 000 aluspaari kohta.

HUGO poolt kasutati tulemuste saamiseks kloonide kaupa sekveneerimist, mis eeldab uuritava DNA kloonide asukoha füüsilist kaardistamist. Seega on antud juhul kasutatud meetod rohkem aeganõudev ja töömahukas. Paralleelselt HUGO konsortsiumiga lõpetas 2003. a.

inimese genoomi sekveneerimise ka “Celera Genomics”, mis ei kasutanud aga kloonide sekveneerimist vaid hoopis terve genoomi *shotgun* sekveneerimist (Venter, 2001).

### **2.1.2. Inimese varieeruvuse projekt**

Erinevaid haigusi põhjustavaid geeni mutatsioone ja varieeruvust kirjeldati molekulaarsel tasemel esmakordselt 1949 a., kuid alles 1970. a. alustas Victor McKusick nimetatud geenimutatsioonide kogumist (Cotton, 2007). Loodud on rahvusvaheline andmebaas, täpsemalt HGMD (Inimese geeni mutatsiooni andmebaas), kuhu kogutakse kirjeldatud mutatsioonide infot. Siiski oli süstemaatilise mutatsioonide kogumise puudumine tõukeks, mis 1994. a. viis uue, HGVS (Inimese genoomi variatsiooni selts) seltsi loomisele.

HGVS seltsi eesmärgiks on soodustada geneetilisi haiguseid põhjustavate geenimutatsioonide ja –variatsioonide süstemaatilist kogumist (Cotton, 2007). Lisaks on sama selts initsieerinud HVP (Inimese varieeruvuse projekt) projekti (Cotton, 2007), mille eesmärgiks on inimese geneetilise varieeruvuse andmete süstemaatiline kogumine. Alustatud projekti missiooniks on parandada mõistmist erinevatest haigustest ning nende geneetilistest tekkemehhanismidest.

Projekti peamisteks eesmärkideks on:

1. kirjeldada ja arhiveerida kõik inimese geeni mutatsioonidest ja variatsioonidest tulenevad haigused;
2. välja töötada standardiseeritud süsteem geeni mutatsioonide/variatsioonide nomenklatuuri loomiseks;
3. töötada välja adekvaatne süsteem, mis tagab võimaluse andmebaasist eraldada lookus-, rahvus- ning haigusspetsiifilisi geeni mutatsioone/variatsioone;
4. pidevalt arendada ja täiustada spetsiifilist tarkvara;
5. ühendada keskused, mis kasutavad andmeid ja produtseerivad vastavaid andmeid;
6. luua tugisüsteem uurimislaboritele;
7. välja töötada eetilised andmebaasi kasutamise standardid;
8. toetada ja teostada uurimistöid (Cotton, 2007).

### 2.1.3. Geenide valiku kriteeriumid

Antud töö eesmärgiks on spermatogeneesis oluliste geenide andmebaasi loomine, baseerudes kirjanduse ülevaatele. Andmebaasi kuuluvad:

1. geenid, mis on vajalikud testiste formuleerumiseks, kasutades cDNA uuringuid, milles võrreldi inimese loote ning täiskasvanud meeste testiste geeniekspressiooni. Uuringusse võeti geenid, mida ekspresseeriti loote testistes, kuid ei ekspresseeritud täiskasvanud meeste testistes (Sha jt. 2002);
2. geenid, mis on vajalikud spermatogeneesis, kasutades cDNA uuringuid, milles võrreldi geeniekspressiooni viljakate ja viljatute meeste testistes (Fox jt., 2003).

## 2.2. Tulemused ja arutelu

### 2.2.1. Mikrosatelliitide asukohad meie poolt vaadeldud geenides

Vaatluse alla võetud artiklites olid ära toodud vaid *GenBank* andmebaasi kood ja geeni nimi (vt. Lisa 1, kokku 724 geeni). Seetõttu tuli juurde otsida geeni koodid andmetötluseks. Selleks laeti alla andmed Hs.seq.all aadressilt [ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/Homo\\_sapiens/Hs.seq.all.gz](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/Homo_sapiens/Hs.seq.all.gz) (vt. Lisa 2), mis sisaldavad fasta formaadis kõiki inimese spetsiifilisi geenijärjestusi. Iga järjestuse päises oli kirjas *GenBank accession* number ja *UniGene* kood. Andmetötluse tulemusena saadi *UniGene* kood, mida läks vaja geeni asukoha lokaliseerimiseks genoomis tabeli *unigene\_3.txt* põhjal, mis paikneb aadressil [ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/unigene\\_3.txt.gz](ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/unigene_3.txt.gz) (vt. Lisa 3).

Kuna *unigene\_3.txt* sisaldas küll infot geeni alguse, lõpu ja eksonite kohta, kuid ei sisaldanud infot transleeritava ala kohta, siis võrdlesime viimast tabelit tabeli *refGene.txt*-ga, mis paikneb aadressil <ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/refGene.txt> (vt. Lisa 4). Võrdlus toimus esmalt automaatselt. Juhul kui automaatselt vastet ei leidunud (30% juhtudel), siis võrreldi manuaalselt geeni alguse ja lõpu koordinaate. Manuaalse töö tingis fakt, et *unigene\_3.txt* ja *refGene.txt* tabelis on erinevusi geeni alguse koordinaatide ja eksonite (enamalt jaolt mitte transleeritavas osas) asukoha osas. Nende kolme tabeli andmete põhjal formuleeriti koontabel vajaliku informatsiooniga, sisaldades nii geeni koodi, asukohta kui ka alguse ja lõpu koordinaate (vt. Lisa 5).

Meeste viljatusega seotud geenides ja nende lähiümbruses asetsevad tandeemsed kordusjärjestused otsiti inimese kromosoomidest (vt. Lisa 6) üles Perlis kirjutatud programmi abil (vt. Lisa 7). Programm leiab üles kõik 2-30 bp tandeemsed kordused nende asukoha järgi uuritava geeni suhtes:

- 60000 bp - 300 bp enne mRNA-d;
- 299 bp - 50 bp enne mRNA-d;
- 49 bp - 0 bp enne mRNA-d;
- mRNA sees, enne ATG signaali;
- intronis, mis asub enne ATG signaali;
- eksonis;
- intronis peale ATG signaali;
- eksonis peale stoppkoodonit;
- intronis peale stoppkoodonit;
- 60000 bp peale mRNA-d.

Programmi tulemusel leiti uuritavatest geenidest kokku 85043 mikrosatelliiti (vt. Lisa 8). Andmehulga vähendamiseks seadsime kriteeriumiteks, et motiivi pikkus peab olema kolm (trinukleotiidsed kordused) ning korduseid peaks olema vähemalt  $> 10$  (vt. Lisa 9). Kitsenduste tulemusel saadud andmete (kokku 56128 kirjet) põhjal formuleeriti Exceli pivot tabel (vt. Lisa 10). Olulisemad kokkuvõtted on ära toodud tabelites 6 ja 7.

**Tabel 6:** Antud tabelis on välja toodud, kitsenduste tulemusel saadud andmetest, mikrosatelliidi iseloom ning palju neid oli.

Iseloom	Arv	Iseloom	Arv
60000	18312	promootor500	137
-60000	19536	utr3 ekson	232
ekson	269	utr3 intron	139
ekson to intron	1	utr5 ekson	134
intron	15199	utr5 ekson to intron	3
intron to ekson	1	utr5 intron	2136
promootor	19	utr5 intron to ekson	1
promootor mRNA	2	teadmata	7

**Tabel 7:** Antud tabelis on välja toodud uuritavatest piirkondadest leitud kolmesed motiivid, mille korduste arv oli vähemalt üle 10 ning nende arvukus uuritavates geenides. Kõige olulisemaks korduvaks motiiviks võib pidada CAG, mis kodeerib glutamiini, mis liigeses hulgas on toksiline.

Motiiv	Arv	Motiiv	Arv	Motiiv	Arv	Motiiv	Arv
AAA	20252	CAC	260	GAG	271	TAG	33
AAC	484	CAG	162	GAT	128	TAT	393
AAG	243	CAT	100	GCA	133	TCA	83
AAT	707	CCA	183	GCC	122	TCC	346
ACA	99	CCC	155	GCG	91	TCG	1
ACC	127	CCG	67	GCT	165	TCT	143
ACG	2	CCT	416	GGA	380	TGA	107
ACT	18	CGA	5	GGC	146	TGC	142
AGA	120	CGC	73	GGG	125	TGG	209
AGC	151	CGG	93	GGT	148	TGT	126
AGG	371	CGT	5	GTA	33	TTA	599
AGT	24	CTA	36	GTC	2	TTC	248
ATA	385	CTC	294	GTG	173	TTG	729
ATC	93	CTG	211	GTT	623	TTT	22641
ATG	136	CTT	240	NNN	6		
ATT	803	GAA	271	TAA	581		
CAA	587	GAC	2	TAC	26		

### 2.2.2. CNV-de alad meie poolt vaadeldud geenides

CNV-de analüüsiks võrdlesime juba genereeritud geenide tabelit (vt. Lisa 5) ja CNV tabelit variation.hg18.txt (vt. Lisa 11), kasutades samuti Perlis kirjutatud programmi (vt. Lisa 12). Tulemusena formuleeriti andmestik, mis sisaldas informatsiooni CNV-de paiknemise kohta (vt. Lisa 13). Tabelis on ära toodud CNV-d sisaldava geeni GenBan-ki kood ning inglise keelne nimi, kromosoomi number ja allikas. Mitmed CNV-d on välja toodud mitmes erinevad artiklis ja seetõttu esinevad andmestikus mitmes korduses.

Kokku tuli 105 vastet 68-lt erinevalt geenilt. Vastetest olid 7 seostatud inversiooni piirkonnaga ja 99 koopiaarvu varieeruvusega.

### 2.2.3. Arutelu

Mikrosatelliitide korral on määrava tähtsusega selle paiknemise asukoht, korduste arv ja kordusmotiiv. Paiknemise kohapealt on huvipakkumateks mikrosatelliitideks need, mis paiknevad näiteks eksonites. Põhjustades sellega näiteks mõne valgu esinemise vähenemise või hoopis puudumise organismis. Näiteks CAG korduste puhul osutub polüglutamiini liigne hulk toksiliseks (Prospero ja Fischbeck, 2005). Viimase arvatavaks põhjuseks peetakse polüglutamiini rohkusest tulenevat valgu konformatsiooni muutust. Korduvatest motiividest võib huvipakkumaks pidada neid triplette, mis kodeerivad mõnda aminohapet. Mida pikem on kordus, seda suurem on tõenäosus, et häirub organismile omane tasakaal.

Antud töös täheldati, et kõigist valiku alla sattunud kordustest 1,7% (promootori ja eksoni alad) pakuvad edaspidiseks analüüsiks suurt huvi. Vastavate kordustega vahetult piirnevate alade võrdlemine *trace* andmebaasiga (sekveneerimise andmebaas, milles hetkel on üle 100 miljoni, keskmiselt 1000 aluspaari pikkust, järjestust) peaks välja tooma need kordused, mis on inimese evolutsiooni käigus muutunud polümorfseks.

CNV-de puhul on samuti kaks varianti:

1. koopiaarvu muutused on toimunud piirkonnas, mis ei mõjuta mingit geeni ekspressiooni. Samas aga eksisteerib võimalus, et somaatilise raku jagunemise käigus deleteerub mingi konkreetne tuumorsupressorgeen või mittehomoloogilise rekombinatsiooni käigus tekib hübriidvalk, mis osutub onkogeeniks. Tulemuseks võib olla kasvaja teke;
2. geeni koopiaarvu muutused genoomis põhjustavad väga suure osa kogu genoomsetest ümberkorraldustest, põhjustades nii deletsioone kui ka duplikatsioone. Need omakorda võivad põhjustada muutusi geeni koopiaarvus. Erinev geeni koopiaarv muudab geeni ekspressioonitaset (toimuda võib nii üle kui ka alaekspressioon) ning võib põhjustada haigusliku fenotüübi esinemise antud muutust omaval inimesel.

Käesolevas töös leiti, et valitud geenidest 10% asuvad kas siis osaliselt või tervikuna regioonides, mis on kirjeldatud, kui muutuva koopiaarvuga regioonid. Huvitavaim neist on geen Dihydrofolate reductase geen, mis on seotud enneaegse sünnitusega ja laste arenguanomaaliatega ning mõjutab folaadi ainevahetust.

## KOKKUVÕTE

Erinevate uuringute käigus on välja selgitatud, et inimestevaheline DNA langeb kokku 99,9 % ulatuses. Seega ainult 0,1 % genomist paneb aluse inimestevahelisele geneetilisele varieeruvusele. Käesolevas töös võeti vaatluse alla mikrosatelliitide ja CNV-de põhjustatud varieeruvus mehe viljakusega seotud geenides.

Töö eesmärgiks oli luua mehe fertiilsusgeenide andmebaas, milles sisaldub ka informatsioon nendes geenides ja geeniga piirnevates alades esinevate mikrosatelliitide ja CNV-de kohta. Selle paremaks mõistmiseks on teoreetilises osas antud ülevaade spermatogeneesi toimumise protsessidest, mikrosatelliitidest ja CNV-dest ning nendega kaasnevatest haigustest.

Andmebaasi koostamiseks kasutati andmeid, mis saadi eelnevalt publitseeritud andmetest (Sha jt. 2002; Fox jt., 2003). Esimeses olid kirjeldatud geenid, mis on vajalikud testiste formuleerumiseks. Selleks kasutati uuringuid, milles võrreldi inimese loote ning täiskasvanud meeste testiste geeniekspressiooni. Tulemuseks saadi geenid, mida ekspresseeritakse loote testistes, kuid ei ekspresseerita läkiskasvanud meeste testistes. Ning teises olid ära toodud geenid, mis on vajalikud spermatogeneesiks. Selleks kasutati cDNA uuringuid, milles võrreldi täiskasvanud viljakate ning viljatute meeste testiste geeniekspressiooni. Tulemuseks saadi geenid mida ekspresseeritakse viljakate meeste testistes, kuid ei ekspresseerita viljatute meeste testistes. Töö käigus teostati meeste viljatusega seotud geenide bioinformaatiline eelanalüüs.

Käesoleva töö tulemusena formuleerisime kaks andmebaasi, kus ühes on ära toodud vaadeldud piirkondades paiknevad CNV-d ja teises nendes samades piirkondades paiknevad mikrosatelliidid, kusjuures mikrosatelliitide puhul seati kitsenduseks, et motiivi pikkus peab olema kolm ning korduseid vähemalt üle kümne.

Töö tulemused aitavad paremini planeerida edasisi uuringuid viljatuse põhjuste väljaselgitamisel meestel. Kindlasti tuleb tulevikus meie töögrupi poolt antud andmebaasi täiendada ja teostada praktilist kontrolli. Käesoleva töö tulemused on aluseks edaspidistele praktilistele uuringutele spermatogeneesi geenide osas viljatute ja viljakate meeste vahel.

## Searching for the male infertility genetic markers

Signe Kalamees

### SUMMARY

Different research has shown the coincidence of human DNA in 99.9%. So the genetic variation of people comes from the single 0,1 % of the genome. The present work is a survey of variation of man fertility genes caused by microsatellites and CNV.

The goal of the research is to create database of man fertility genes with an information about microsatellites and CNV in genes and areas surrounding them. For better understanding is given a review of spermatogenesis process, microsatellites and CNV and diseases involved.

Data used for composing database is based on previously published information (Sha jt. 2002; Fox jt., 2003). The first one describes genes necessary for formulation of testicle. Taking advantage of research on gene expression (genes expressed in embryo testis but do not express in mature men testicle) comparison of human embryo and mature men testicle. In second one genes necessary for spermatogenesis. DNA research on comparison of mature fertile and infertile men gene expression of testicle. Bioinformational pre-analysis of men infertility was done in the course of paper.

The result was formulation of two databases. One of CNV surveyed in different areas. Another one micro satellites of the same areas. In microsatellites the restriction of motive length of three and at least ten repetitions was set.

The result will help better plan the further research on finding out reasons of men infertility. In future it is necessary to complement the database composed by our work group and check it practically. The results of this data will be the ground for practical studies of spermatogenesis genes between infertile and fertile men.



## KIRJANDUSE LOETELU

- Adachi, H., Waza, M., Katsuno, M., Tanaka, F., Doyu, M., Sobue, G.** (2007). Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33: 135–151
- Alberts, B., Johanson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th edition, p. 1127-1156. USA
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., Finkbeiner, S.** (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805-810
- Bailey, J.A., Z. Gu, R.A. Clark, K. Reinert, R.V. Samonte, S. Schwartz, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, and E.E. Eichler.** (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297:1003-1007.
- Basu, P., Chattopadhyay, B., Gangopadhaya, P. K., Mukherjee, S. C., Sinha, K. K., Das, S. K., Roychoudhury, S., Majumder, P. P., Bhattacharyya, N. P.** (2000). Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum Genet.* 106(6): 587-604
- Bogerd, J., Granneman, J. C., Schulz, R. W., Vischer, H. F.** (2005). Fish FSH receptors bind LH: how to make the human FSH receptor to be more fishy? *Gen Comp Endocrinol.* 142: 34-43
- Braun, R. E., Behringer, R. R.** (1989). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337(6205):371-386
- Conforti, L., Adalbert, R., Coleman, M. P.** (2007). Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci* 30(4):159-166
- Cooke, H. J., Saunders, P. T. K.** (2002). Mouse models of male infertility. *Nat. Genet.* 3: 790-801
- Cotton, R. G. H.** (2007). Recommendations of the 2006 Human Variome Project meeting. *Nature Genetics* 39(4): 433-436
- Cummings, C. J., Zoghbi, H. Y.** (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases; *Human Molecular Genetics* 9(6): 909-916
- Crosignani, P. G., Rubin, P. L. (1998). Male infertility update. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod.*13(7): 2025-2032
- Das, U. N., Vaddadi, K. S.** (2004). Essential fatty acids in huntington's disease. *Nutriton* 20: 924-927

- Eacker, S. M., Shima, J. E., Connolly, C. M., Sharma, M., Holdcraft, R. W., Griswold, M. D., Braun, R. E.** (2007). Transcriptional profiling of androgen receptor (AR) mutants suggests instructive and permissive roles of AR signaling in germ cell development. *Mol Endocrinol* 21(4): 895-907
- Eddy, E. M.** (1998). Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9: 451-457
- Eichler, E. E.** (2001). Segmental duplications: what's missing, misassigned, and misassembled- and should we care? *Genome Res* 11: 653-656.
- Ferlin, A., Arredi, B., Foresta, C.** (2006) Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol.* 22(2):133-41
- Feuk, L., Marshall, C.R., Wintle, R.F., Scherer, S.W.** (2006). Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 15 (1): 57-66
- Fischbeck, K. H.** (1997). Kennedy disease. *J. Inher. Metab. Dis.* 20: 152-158
- Fogel, B. L., Perlman, S.** (2007). Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol* 6: 245-257
- Fox, M. S., Ares, V. X., Turek, P. J., Haqq, C., Pera, R. A. R.** (2003). Feasibility of Global Gene Expression Analysis in Testicular Biopsies From Infertile Men. *Molecular Reproduction and Development* 66:403-421
- Freeman, J. L., Perry, G.H., Feuk, L., Redon, R., McCarroll, S. A., Altshuler, D.M., Aburatani, H., Jones, K.W., Tyler-Smith, C., Hurles, M. E., Carter, N. P., Scherer, S. W., Lee, C.** (2006). Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research* 16: 949-961
- Gardian, G., Vecsei, L.** (2004). Huntington's disease pathomechanism and therapeutic perspectives. *J. Neural Transm.* 111: 1485-1497
- Harris, T. P., Gomas, K. P., Weir, F., Holyoake, A. J., McHugh, P., Wu, M., Sin, Y., Sin, I. L., Sin, F. Y.** (2004). Molecular analysis of polymerase gamma gene and mitochondrial polymorphism in fertile and subfertile men. *Int J Androl.* 29(3): 421-433
- Hess, R. A.** (1999). Spermatogenesis, Overview. *Academic Press* 4: 539-545
- Holmes, B.** (2006). Genomics: We are all numbers. *New Scientist* 2546: 37-38
- Holmes, S. E., O'Hearn, E. E., McInnis, M. G., Gorelick-Feldman, D. A., Kleiderlein, J. J., Callahan, C., Kwak, N.G., Ingersoll-Ashworth, R.G., Sherr, M., Sumner, A. J., Sharp, A. H., Ananth, U., Seltzer, W.K., Boss, M.A., Vieria-Saecker, A. M., Epplen, J. T., Riess, O., Ross, C. A., Margolis, R. L.** (1999). Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23: 391-392

- Holmes, S. E., O'Hearn, E. E., Ross, C. A., Margolis, R. L.**(2001). SCA12: An unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia. *Brain Research Bulletin* 56: 397-403
- Holstein, A. F., Schulze, W., Davidoff, M.** (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 107-113
- Jasinska, A., G. Michlewski, M. M., Sobczak, K., Kozłowski, P., Napierala, M., Krzyzosiak, W. J.** (2003). Structures of trinucleotide repeats in human transcripts and their functional implications. *Nucleic Acids Research*. 31(19): 5463-5468
- Jensen, M., Leffers, H., Petersen, J. H., Nyboe, A. 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. *Hum Reprod* 19(1): 65-70
- Jin, P., S., Warren, T.** (2001). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 9: 901-918
- Kehrer-Sawatzki, H.** (2007). What a difference copy number variation makes. *BioEssays*: 311-313
- Knight, S. J. L., Flannery, A. V., Hirst, M. C., Campbell, L., Christodoulou, Z., Phelps, S. R., Pointon, J., Middleton-Price, H. R., Barnicoat, A., Pembrey, M. E., Holland, J., Oostra, B. A., Bobrow, M., Davies, K. E.** (1993). Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRA3E mental retardation. *Cell*, 74: 127–134,
- Koob, M. D., Moseley, M. L., Schut, L. J., Benzow, K. A., Bird, T. D., Day, J. W., Ranum, L. P.** (1999). An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21: 379-384
- Kumar, J., Kumar, A., Das, S. K., Shukla, G., Sengupta, S.** (2005). Detection of differential gene copy number using denaturing high performance liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 64(3): 226-234.
- Kärner, J.** 1997. Sissejuhatus arengubioloogiasse p.46-63. Tartu Ülikooli kirjastus. Tartu
- Landles, C., Bates, G.** (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington disease. *EMBO reports* 5: 958-963
- La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E., Fischbeck, K. H.** (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352(6330):77-9
- Lee, J. A., Lupski, J. R.** (2006). Genomic rearrangements and gene-copy number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 53: 103-121.

- Li, W., Zhang, J., Liu, X., Xu, R., Zhang, Y.** (2007) Correlation of appearance of metastasis-associated protein1 (Mta1) with spermatogenesis in developing mouse testis. *Cell Tissue Res.* –Printimisel
- Merlet, J., Racine, C., Moreau, E., Moreno, S. G., Habert, R.** (2007). Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*104(9): 3615-3620
- Middleton, F. A., Trauzzi, M. G., Shrimpton, A. E., Gentile, K. L., Morley, C. P., Medeiros, H., Pato, M. T., Pato, C. N.** (2006). Complete maternal uniparental isodisomy of chromosome 4 in a subject with major depressive disorder detected by high density SNP genotyping arrays. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141(1): 28-32.
- Morfini, G., Pigino, G., Brady, S. T.** (2005). Polyglutamine expansion diseases: failing to deliver. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.11 No.2: 64 – 70
- Mueller, R. F., Young, I. D.** 1995. *Emery's Elements of Medical Genetics.* 9th ed. Edinburgh
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H., Toda, T.** (2007). A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol.* 14(4): 332-340.
- Nigro, C. L., Faravelli, F., Cavani, S., Perroni, L., Novello, P., Vitali, M., Bricarelli, F. D., Grasso, M.** (2000). FRAXE mutation in a mentally retarded subject and in his phenotypically normal twin brother. *European Journal of Human Genetics* 8: 157-162
- Pentikainen, V., Erkkila, K.** (2000). Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85(5): 2057-2067
- Perschon, J. J., Behringer, R. R.** (1987). Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15):5316-5319.
- Pettersson, A., Richiardi, L., Nordenskjold, A., Kaijser, M., Akre, O.** (2007). Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med.* 358(18):1835-41
- Pizzuti, A., Fenwick, R. G., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., Jong, P.** (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256-1258
- Prospero, N. A., Fischbeck, K. H.** (2005). Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nature* 6: 756-765
- 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., Gonzalez, J.R., Gratacos, M., Huang J.** (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118): 444-54

- Richard, G. F., Paques, F.** (2000). Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep.* 1: 122-126
- Schneider, S. A., Warrenburg, B. P., Hughes, T. D., Davis, M., Sweeney, M., Wood, N., Quinn, N. P., Bhatia, K. P.** (2006). Phenotypic homogeneity of the Huntington disease-like presentation in a SCA17 family. *Neurology* 67(9): 1701-1703
- Sha, J., Zhou, Z., Li, J., Yin, L., Yang, H., Hu, G., Luo, M., Chan, H. C., Zhou, H.** (2002). Identification of testis development and spermatogenesis – related genes in human and mouse testis using cDNA arrays. *Molecular Human Reproduction* 6:511-517
- Son, W.Y., Hwang, S. H., Han, C. T., Lee, J. H., Kim, S., Kim, Y. C.** (1999). Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Molecular Human Reproduction* vol 5, no 12: 1122-1126
- Soto, C.** (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 49-60
- Subramanian S., Magula, V. M., George, R., Mishra, R. K., Pandit, M. V., Kumar, C. S., Singh, L.** (2003). Triplet repeats in human genome: distribution and their association with genes and other regions. *Bioinformatics* 19(5): 549-552
- Sulek, A., Hoffman-Zacharska, D., Bednarska-Makaruk, M., Szirkowiec, W., Zaremba, J.** (2004). Polymorphism of trinucleotide repeats in non-translated regions of SCA8 and SCA12 genes: allele distribution in a Polish control group. *J. Appl. Genet.* 45: 101-105
- Tan, E., Lai, P.** (2005). Molecular diagnosis of neurogenetic disorders involving trinucleotide repeat expansions. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5(1), 101-109
- Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., Timchenko, L. T.** (2001). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol. Cell Biol.* 21: 6927-6938
- Tsai, H. F., Liu, C. S., Leu, T. M., Wen, F. C., Lin, S. J., Liu, C. C., Yang, D. K., Li, C., Hsieh, M.** (2004). Analysis of trinucleotide repeats in different SCA loci in spinocerebellar ataxia patients and in normal population of Taiwan. *Acta Neurol Scand* 109(5): 355-360
- Venter, J. C.** (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* 291(5507): 1304-1351.
- Vujisic, S., Lepej, S. Z., Jerkovic, L., Emedi, I., Sokolic, B.** (2005). Antisperm antibodies in semen, sera and follicular fluids of infertile patients: relation to reproductive outcome after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 54(1):13-20
- Wilson, R. B.** (2006). Iron Dysregulation in Friedreich Ataxia. *Science Direct* 13 (3): 166-175

**Bioinformaatika blogi kodulehekül:** <http://www.ghastlyfop.com>

**Genoomse varieeruvuse andmebaas:** <http://projects.tcag.ca/variation/>

**Inimese spetsiiviliste geenide andmestik:**

[ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/Homo\\_sapiens/Hs.seq.all.gz](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/Homo_sapiens/Hs.seq.all.gz)

**Inimese spetsiifiliste geenide transleeritavate alade andmestik:**

<ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/refGene.txt>

**Inimese spetsiifiliste geenide täiendatud andmestik:**

[ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/unigene\\_3.txt.gz](ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/unigene_3.txt.gz)

**Kromosoomi järjestused (NCBI36, Oktoober 2006):**

[ftp://ftp.ensembl.org/pub/current\\_homo\\_sapiens/data/fasta/dna/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/current_homo_sapiens/data/fasta/dna/)

**Meditiiniline sõnaraamat:** <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>

## **LISAD**

### **Lisa 1: Algne geenide nimistu**

Antud andmestikus on ära toodud eelnevalt avaldatud uurimustest valitud uuritavate geenide nimekiri GeneBank koodi ja geeni ingliskeelse nimega.

### **Lisa 2: Kõik inimese spetsiifiliste geenide järjestused**

Fasta formaadis kõik inimese spetsiifiliste geenide järjestused.

### **Lisa 3: Inimese spetsiifiliste geenide alguse, lõpu ja eksonite koordinaadid**

Sisaldab informatsiooni inimese spetsiifiliste geenide alguse, lõpu ja eksonite kohta.

### **Lisa 4: Inimese spetsiifiliste geenide transleeritavate alade koordinaadid**

Sisaldab informatsiooni inimese spetsiifiliste geenide transleeritavate alade kohta.

### **Lisa 5: Uuritavate geenide nimekiri koos täiendava informatsiooniga**

Koondtabel, mis sisaldab informatsiooni uuritavate geenide koodi, asukoha kui ka geeni alguse ja lõpu koordinaatide kohta.

### **Lisa 6: Inimese spetsiifiliste kromosoomide järjestused**

Antud lisa on ära toodud kõikide inimese spetsiifiliste kromosoomide järjestused eraldi failidena.

### **Lisa 7: Perli programm mikrosatelliitide leidmiseks**

Perlis kirjutatud programm, mis leiab üles kõik 2-30 bp tandeemsed kordused nende asukoha järgi uuritava geeni suhtes.

### **Lisa 8: Leitud mikrosatelliitide andmestik**

Koondtabel uuritavatest geenidest leitud mikrosatelliitide kohta.

### **Lisa 9: Valitud mikrosatelliitide andmestik**

Kitsendatud koondtabel uuritavatest geenidest leitud mikrosatelliitide kohta.

### **Lisa 10: Pivot tabel valitud mikrosatelliitide kohta**

Exceli pivot tabel uuritud geenides leitud mikrosatelliitide kohta.

### **Lisa 11: Inimese spetsiifiliste CNV-de nimekiri**

Koondtabel seni kirjeldatud inimese spetsiifiliste CNV-de kohta.

**Lisa 12: Perli programm CNV-de leidmiseks**

Perlis kirjutatud programm, mis leiab üles CNV-d meid huvitavates geenides.

**Lisa 13: Leitud CNV-de andmestik**

Koondtabel, mis sisaldab informatsiooni CNV-de paiknemise kohta meid huvitavates geenides.

Lisad on ära toodud tööga kaasas oleval DVD-l.