

THE ASSOCIATION OF *TEX15* rs323346 WITH MALE INFERTILITY IN 401 VIETNAMESE INDIVIDUALS

Nguyen Phuong Anh¹, La Duc Duy¹, Bui Minh Duc¹, Nguyen Thuy Duong^{1,2*}

¹Institute of Genome Research – VAST, ²Graduate University Science and Technology – VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 13/10/2022	Male infertility is a complex disease caused by many factors, including defects in many genes involved in spermatogenesis. In particular, <i>TEX15</i> gene has been shown to be associated with male infertility in many populations around the world. This study aimed to evaluate the correlation of <i>TEX15</i> rs323346 polymorphism with male infertility in Vietnamese population. Total DNA was extracted from 401 samples, including 202 male infertility and 199 healthy men with at least one child. The genotypes/alleles of the <i>TEX15</i> rs323346 were determined by PCR-RFLP. Statistical analysis results showed that the distribution of the genotypes of the rs323346 follows Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). Chi-square test results showed that this polymorphism did not affect the risk of male infertility ($p > 0.05$). This is the first study to evaluate the association of <i>TEX15</i> rs323346 with male infertility in the Vietnamese population. The results will contribute to the genetic database of male infertility in the Vietnamese population.
Revised: 07/12/2022	
Published: 20/12/2022	
KEYWORDS	
PCR-RFLP	
rs323346	
<i>TEX15</i>	
Vietnamese	
Male infertility	

ĐÁNH GIÁ MỐI LIÊN QUAN CỦA ĐA HÌNH rs323346 GEN *TEX15* VỚI BỆNH VÔ SINH NAM Ở 401 NGƯỜI VIỆT NAM

Nguyễn Phương Anh¹, Lê Đức Duy¹, Bùi Minh Đức¹, Nguyễn Thùy Dương^{1,2*}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 13/10/2022	Vô sinh nam là một bệnh phức tạp gây ra bởi nhiều nguyên nhân, bao gồm các sai hỏng của nhiều gen tham gia quá trình sinh tinh. Trong đó, gen <i>TEX15</i> (testis expressed 15) được chứng minh là có liên quan đến vô sinh nam ở nhiều quần thể trên thế giới. Nghiên cứu này nhằm đánh giá mối tương quan của đa hình rs323346 gen <i>TEX15</i> với vô sinh nam ở người Việt Nam. DNA tổng số được tách chiết từ 401 mẫu, bao gồm 202 nam giới được chẩn đoán vô sinh và 199 nam giới khỏe mạnh có ít nhất một con. Kiểu gen/allele của đa hình rs323346 gen <i>TEX15</i> được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự phân bố kiểu gen của đa hình rs323346 tuân theo định luật Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Kết quả kiểm định Chi-square cho thấy đa hình này không ảnh hưởng đến nguy cơ mắc vô sinh nam ($p > 0,05$). Đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá mối liên quan của đa hình rs323346 gen <i>TEX15</i> với vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu này sẽ góp phần vào cơ sở dữ liệu di truyền của bệnh vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 07/12/2022	
Ngày đăng: 20/12/2022	
TỪ KHÓA	
PCR-RFLP	
rs323346	
<i>TEX15</i>	
Việt Nam	
Vô sinh nam	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6668>

* Corresponding author. Email: tdnguyen@igr.ac.vn

1. Giới thiệu

Vô sinh là một vấn đề sức khỏe toàn cầu có ảnh hưởng tới khoảng 48,5 triệu cặp vợ chồng trên khắp thế giới [1]. Bất thường ở nam giới gây vô sinh khoảng 50% các cặp vợ chồng và chiếm khoảng 7% dân số thế giới [2]. Trong đó, khoảng 15 - 30% trường hợp vô sinh nam là do các bất thường di truyền, bao gồm biến đổi nhiễm sắc thể, mất đoạn AZF (azoospermia factor) trên nhiễm sắc thể Y, đột biến gen [3], [4]. Các đột biến này có thể làm ảnh hưởng tới quá trình sinh tinh dẫn đến không có tinh trùng trong tinh dịch hay vô tinh (azoospermia) hoặc ít tinh trùng trong tinh dịch hay thiếu tinh (oligozoospermia) [5], [6]. Sinh tinh là một quá trình vô cùng phức tạp, xảy ra trong các ống sinh tinh trong tinh hoàn, kéo dài 74 ngày bắt đầu từ tinh nguyên bào, trải qua các giai đoạn nguyên phân, giảm phân và biến đổi hình thái, từ đó tạo ra tinh trùng trưởng thành [3], [7], [8]. Quá trình này diễn ra dưới sự hoạt động của hơn 2000 gen với khoảng 600–900 gen chỉ được biểu hiện duy nhất ở các tế bào mầm đực [9]–[11]. Trong đó, đột biến ở bất kỳ gen nào cũng có thể là nguyên nhân gây ra khiếm khuyết tinh trùng, dẫn đến vô sinh nam [2]. Họ gen *TEX* (testis expressed) rất đáng chú ý, với hầu hết các gen trong họ được biểu hiện trong tinh hoàn và tham gia vào các con đường khác nhau trong quá trình sinh sản nói chung và sinh tinh nói riêng xảy ra ở cả người và các loài động vật có vú khác [12]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các thành viên của họ gen *TEX* có vai trò quan trọng trong việc gây vô sinh nam và một số gen có thể được sử dụng như các marker sinh học trong chẩn đoán vô sinh nam [12], [13].

Gen *TEX15* (MIM*605795) là một trong các gen thuộc họ *TEX*, nằm trên nhiễm sắc thể số 8 (8p12), có kích thước khoảng 81 kb và gồm 12 exon [14]. Gen này mã hóa cho protein *TEX15* với 3172 axit amin biểu hiện chỉ ở tinh hoàn và trứng [14]. Trong quá trình sinh tinh, gen *TEX15* biểu hiện nhiều trong tế bào mầm, tinh nguyên bào, tinh bào ở giảm phân I và được điều hòa ở kỳ đầu của giảm phân I [15], [16]. Hơn nữa, *TEX15* cần thiết cho quá trình tiếp hợp nhiễm sắc thể và tái tổ hợp trong giảm phân ở tế bào mầm, do đó thiếu protein này có thể dẫn đến ức chế giảm phân [17].

Các nghiên cứu trước đây đã phát hiện được nhiều đột biến trên gen *TEX15* ở bệnh nhân vô sinh nam [18]–[22]. Ngoài ra, các nghiên cứu tương quan giữa đa hình trên gen *TEX15* với vô sinh nam cũng được tiến hành trên nhiều quần thể người trên thế giới như Châu Âu, Trung Quốc, Iran... [23]–[27], trong đó có nghiên cứu về đa hình rs323346 gen *TEX15*. Đa hình này là một biến thể sai nghĩa thay đổi nucleotide A>G tại vị trí 4252 trên cDNA của gen *TEX15*, dẫn đến thay đổi axit amin Isoleucine thành Valine tại vị trí 1418 (NM_001350162.2:c.4252A>G, p.I1418V). Phân tích *in silico* ảnh hưởng của đa hình p.I1418V đối với protein *TEX15* bằng phần mềm CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), một công cụ đánh giá mức độ ảnh hưởng của các biến đổi nucleotide đơn lên chức năng protein, cho thấy đa hình này có chỉ số ảnh hưởng có hại tương đối cao là 13,74 [28]. Để đánh giá ảnh hưởng của đa hình này với vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu bệnh chứng của đa hình rs323346 gen *TEX15* với nguy cơ mắc vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Mẫu máu ngoại vi thu thập từ 401 nam giới (gồm 202 bệnh nhân được chẩn đoán mắc vô sinh nam và 199 nam giới khỏe mạnh có ít nhất một người con sinh ra bằng phương pháp mang thai tự nhiên) được sử dụng cho nghiên cứu này. Những bệnh nhân vô sinh nam được lựa chọn bao gồm những người mắc vô tinh không bế tắc tự phát (thực hiện tinh dịch đồ không phát hiện thấy tinh trùng hoặc số lượng tinh trùng thấp (< 15 triệu tinh trùng/ml tinh dịch)). Các bệnh nhân được kiểm tra đảm bảo không mang bất thường nhiễm sắc thể, mất đoạn AZF và không mắc các bệnh có ảnh hưởng đến khả năng sinh sản (viêm mào tinh hoàn, các bệnh lây truyền qua đường tình dục, nghiện ma túy, quai bị...). Người tham gia trong nghiên cứu này đều tự nguyện và đồng ý xác nhận vào đơn hiến mẫu cho nghiên cứu. Việc tiến hành lấy mẫu máu và thực hiện nghiên cứu đã

được sự đồng ý của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu máu (2 mL) thu thập từ các đối tượng trên được đựng trong ống chống đông EDTA và bảo quản ở -20°C.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu máu toàn phần

DNA tổng số được tách chiết từ 401 mẫu máu toàn phần sử dụng bộ kit "GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification" của hãng Thermo Fisher (USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch và chất lượng của DNA được kiểm tra bằng phương pháp đo quang phổ và điện di trên gel agarose 1%. Tất cả các mẫu DNA đạt chất lượng sau đó được pha loãng về nồng độ ~ 2,5 ng/μL và được lưu trữ ở -20°C.

2.2.2. Kỹ thuật PCR và RFLP

DNA tổng số của 401 mẫu được sử dụng để khuếch đại đoạn gen chứa đa hình rs323346 gen *TEX15* bằng phản ứng PCR với cặp mồi thiết kế bởi Primer blast (NM_001350162.2), tổng hợp bởi Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam (Bảng 1). Chất lượng sản phẩm PCR được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,2%. Sau đó, sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn *TasI* (Thermo Fisher, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hỗn hợp phản ứng cắt được ủ ở 65°C trong bể ủ nhiệt từ 4-6 giờ và sau đó được điện di trên gel agarose 3%. Kiểu gen của các mẫu được xác định dựa trên số lượng và kích thước các băng DNA xuất hiện trên gel điện di (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách mồi được dùng cho phản ứng PCR-RFLP

Gen/SNP	Trình tự mồi (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	PCR-RFLP	
			Kiểu gen	Kích thước các đoạn cắt (bp)
<i>TEX15</i> rs323346	F: CTTTCCCAGAAATGATTGCATATAA R: CAGTCAGAAAAGCACATTAAG	224	TT	23; 201
			TC	23; 201; 224
			CC	224

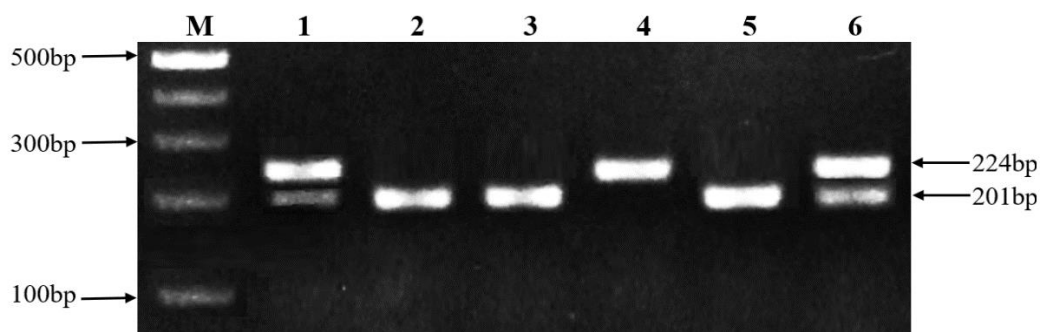
2.2.3. Phân tích thống kê

Kiểu gen của 401 mẫu thu được từ kết quả PCR-RFLP được phân tích bằng Microsoft Excel (Microsoft Corp., Washington, DC, USA) và phần mềm R bản 4.0.3 [29]. Phân bố kiểu gen của đa hình rs323345 gen *TEX15* được kiểm tra xem có tuân theo định luật Hardy-Weinberg (HWE) sử dụng kiểm định Chi-square (χ^2), nếu giá trị $p > 0,05$ thì tuân theo HWE [30]. Phân tích mối tương quan giữa kiểu gen/tần suất allele của đa hình rs323346 với vô sinh nam được thực hiện theo 3 mô hình di truyền là cộng gộp, trội và lặn sử dụng gói công cụ "epitools" [31]. Mối tương quan giữa đa hình và vô sinh nam được tính khoảng tin cậy 95% (95% CI) và tỷ lệ chênh lệch (OR) cho biến nhị phân, nếu giá trị $p < 0,05$ thì được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định thành phần kiểu gen của đa hình rs323346 gen *TEX15*

Đoạn DNA chứa đa hình rs323346 gen *TEX15* sau khi khuếch đại bằng phản ứng PCR được cắt bằng enzyme giới hạn *TasI*. Kết quả điện di 6 mẫu đại diện trên gel 3% được thể hiện trong hình 1 cho thấy, ở giếng 4 có 1 băng với kích thước là 224 bp tương ứng kiểu gen là đồng hợp tử CC. Theo lý thuyết, mẫu điện di ở hai giếng số 1 và 6 có kiểu gen dị hợp tử TC cần có 3 băng với kích thước là 224 bp, 201 bp và 23 bp (Hình 1). Tuy nhiên, băng DNA kích thước 23 bp không quan sát được trên gel agarose 3% do kích thước quá nhỏ. Tương tự, mẫu ở giếng số 2, 3 và 5 có kiểu gen TT chỉ có 1 băng kích thước là 201 bp.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *TaqI*
M: Marker 100 bp; 1 - 6: Sản phẩm cắt bằng enzyme *TaqI* một số mẫu đại diện;
 1, 6: Kiểu gen TC; 4: Kiểu gen CC; 2, 3, 5: Kiểu gen TT

Thành phần kiểu gen và tần số allele của đa hình rs323346 gen *TEX15* được thống kê ở bảng 2. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự phân bố kiểu gen của đa hình này ở quần thể nghiên cứu tuân theo định luật Hardy-Weinberg (HWE) (giá trị $p > 0,05$). Tần số allele C trong nhóm bệnh, nhóm đối chứng và toàn bộ quần thể nghiên cứu tương ứng là 0,124; 0,113 và 0,118 (Bảng 2). Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy không có sự khác biệt giữa tần số allele của đa hình nghiên cứu giữa nhóm bệnh và nhóm chứng.

Bảng 2. Thống kê thành phần kiểu gen và tần số allele của đa hình rs323346 gen *TEX15*

	Kiểu gen			Tần số allele (%)		HWE (Giá trị p)
	TT	TC	CC	T	C	
Nhóm bệnh (n=202)	156 (0,77)	42 (0,21)	4 (0,02)	0,876	0,124	0,556
Nhóm đối chứng (n=199)	155 (0,78)	43 (0,21)	1 (0,01)	0,887	0,113	0,275
Tổng (n=401)	311 (0,78)	85 (0,21)	5 (0,01)	0,882	0,118	0,764

Ghi chú: n: Số đối tượng nghiên cứu; HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg.

3.2. Phân tích mối tương quan giữa đa hình rs323346 gen *TEX15* và vô sinh nam

Để phân tích mối tương quan giữa đa hình rs323346 gen *TEX15* với vô sinh ở nam giới, kiểm định Chi-square đã được thực hiện trên cả ba mô hình trội, lặn và cộng gộp [32]. Giá trị p ở ba mô hình này lần lượt là 0,873; 0,182; 0,408, đều lớn hơn 0,05, cho thấy không có bất cứ mối liên quan nào giữa kiểu gen của đa hình này với vô sinh nam trong 401 cá thể nghiên cứu (Bảng 3).

Bảng 3. Mối tương quan giữa đa hình rs323346 gen *TEX15* và vô sinh nam

	Mô hình	Nhóm bệnh (n = 202)	Nhóm chứng (n = 199)	OR	95% CI	Giá trị p
<i>TEX15</i> rs323346	Cộng gộp					0,408
	TT	77,23%	77,89%	1,000		
	TC	20,79%	21,6%	1,03	0,636 – 1,669	0,902
	CC	1,98%	0,51%	0,278	0,01 – 2,035	0,185
	Trội					
	TT	77,23%	77,89%	1,000		
	TC + CC	22,77%	22,11%	0,962	0,6 – 1,542	0,873
	Lặn					
	TT + TC	98,02%	99,49%	1,000		
	CC	1,98%	0,51%	0,276	0,01 – 2,015	0,182
	Allele					
	T	87,6%	88,7%	1,000		
	C	12,4%	11,3%	0,902	0,585 – 1,387	0,639

Ghi chú: n: Số lượng cá thể; OR: Tỷ số odds ratio; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%; Giá trị p : Được tính bằng phương pháp Chi-square.

Với những vai trò quan trọng trong quá trình sinh tinh, *TEX15* là một gen tiềm năng cho các nghiên cứu về bệnh vô sinh. Nghiên cứu bất hoạt gen *TEX15* ở chuột cho thấy trong khi chuột cái vẫn có khả năng sinh sản bình thường thì chuột đực bị vô sinh, teo nhỏ kích thước tinh hoàn, không có tế bào sinh tinh ở giai đoạn thứ ba của kỳ đầu giảm phân I và tế bào mầm sau giảm phân [17]. Nghiên cứu đầu tiên xác định đột biến trên gen *TEX15* ở bệnh nhân vô sinh nam được thực hiện vào năm 2015. Trong nghiên cứu này, Okutman và các cộng sự đã phát hiện được một đột biến vô nghĩa trên gen *TEX15* ở 3 con trai bị vô sinh của gia đình người Thổ Nhĩ Kỳ. Đột biến này tạo ra mã kết thúc mới, dẫn đến protein biểu hiện ra ngắn hơn kích thước bình thường và không có hoạt tính, cả ba bệnh nhân vô sinh này đều có tinh hoàn nhỏ giống với kiểu hình teo tinh hoàn của chuột bị bất hoạt gen *TEX15* [18]. Trong một nghiên cứu khác, Colombo và cộng sự đã phát hiện được các đột biến dị hợp tử trên gen *TEX15* ở hai anh em người Ý vô sinh có tinh hoàn nhỏ và vô tinh không tắc nghẽn (nonobstructive azoospermia - NOA). Đột biến này không được tìm thấy ở 65 mẫu đối chứng cùng chủng tộc [19]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu về đa hình trên gen *TEX15* đã được thực hiện trên nhiều quần thể khác nhau trên thế giới [23-27]. Trong đó, nghiên cứu về đa hình rs323346 trên quần thể người Trung Quốc gồm 309 người bệnh (trong đó có 199 ca vô tinh NOA và 110 ca thiếu tinh nặng) và 377 nam giới khỏe mạnh cho thấy, allele C làm tăng nguy cơ thiếu tinh nặng ($p = 0,041$; OR = 1,635; 95% CI = 1.018 – 2.628) [23]. Tuy nhiên, nghiên cứu đánh giá tương quan của đa hình rs323346 với bệnh vô sinh nam trên 158 nam giới khỏe mạnh (>20 triệu tinh trùng/ml), 141 ca thiếu tinh (<5 triệu tinh trùng/ml) và 80 ca NOA trên quần thể người ở Châu Âu, không chỉ ra mối liên hệ nào của đa hình này với vô sinh nam [25]. Hơn nữa, nghiên cứu của Zhang và các cộng sự phân tích mối liên hệ giữa đa hình rs323346 và vô sinh nam ở 316 người đàn ông vô sinh (244 người mắc chứng vô tinh và 72 người mắc chứng thiếu tinh) và 298 mẫu chứng có ít nhất một con ở quần thể người Trung Quốc cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm bệnh và nhóm chứng [27]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng không tìm thấy sự liên quan nào giữa đa hình rs323346 và nguy cơ mắc vô sinh nam ở người Việt Nam (Bảng 3), từ đó cho thấy sự không nhất quán giữa mối tương quan của đa hình rs323346 gen *TEX15* với vô sinh nam trên các quần thể khác nhau. Sự khác biệt này có thể do số lượng các cá thể nghiên cứu trên từng quần thể, đặc trưng di truyền giữa các quần thể người, sự khác biệt về môi trường sống, sắc tộc hoặc các yếu tố khác [23], [27].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình rs323346 gen *TEX15* với vô sinh nam ở 401 cá thể người Việt Nam bằng phương pháp PCR-RFLP. Tỷ lệ kiểu gen TT, TC và CC của đa hình rs323346 gen *TEX15* được tìm thấy trong quần thể nghiên cứu lần lượt là 0,78; 0,21; 0,01. Sự phân bố kiểu gen của đa hình này tuân theo định luật Hardy-Weinberg. Tuy nhiên, nghiên cứu này không tìm thấy mối tương quan giữa đa hình rs323346 gen *TEX15* và nguy cơ vô sinh nam ở quần thể nghiên cứu. Để khẳng định chắc chắn về ảnh hưởng của gen *TEX15* với vô sinh nam ở người Việt Nam, các nghiên cứu bệnh chứng với các đa hình khác trên gen *TEX15* cần được thực hiện thêm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.01-2018.316.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Agarwal, A. Mulgund, A. Hamada, and M. R. Chyatte, "A unique view on male infertility around the globe," *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 13, p. 37, 2015.
- [2] C. Krausz and A. Riera-Escamilla, "Genetics of male infertility," *Nature Reviews Urology*, vol. 15, no. 6, pp. 369-384, 2018.

- [3] F. T. Neto, P. V. Bach, B. B. Najari, P. S. Li, and M. Goldstein, "Genetics of Male Infertility," *Curr Urol Rep*, vol. 17, no. 10, p. 70, 2016.
- [4] S. Colaco and D. Modi, "Consequences of Y chromosome microdeletions beyond male infertility," *J Assist Reprod Genet*, vol. 36, no. 7, pp. 1329-1337, 2019.
- [5] P. Asero *et al.*, "Relevance of genetic investigation in male infertility," *J Endocrinol Invest*, vol. 37, no. 5, pp. 415-427, 2014.
- [6] S. Colaco and D. Modi, "Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 16, no. 1, p. 14, 2018.
- [7] R. A. Hess and L. Renato de Franca, "Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium," *Adv Exp Med Biol*, vol. 636, pp. 1-15, 2008.
- [8] S. J. Potter and T. DeFalco, "Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function," *Reproduction*, vol. 153, no. 4, pp. R151-R162, 2017.
- [9] N. Schultz, F. K. Hamra, and D. L. Garbers, "A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 21, pp. 12201-12206, 2003.
- [10] W. Yan, "Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 306, no. 1-2, pp. 24-32, 2009.
- [11] F. Chalmel *et al.*, "Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility," *Human Reproduction*, vol. 27, no. 11, pp. 3233-3248, 2012.
- [12] H. Bellil, F. Ghieh, E. Hermel, B. Mandon-Pepin, and F. Vialard, "Human testis-expressed (TEX) genes: a review focused on spermatogenesis and male fertility," *Basic and Clinical Andrology*, vol. 31, no. 1, p. 9, 2021.
- [13] P. B. Boroujeni *et al.*, "Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia," *JBRA Assist Reprod*, vol. 22, no. 3, pp. 185-192, 2018.
- [14] P. J. Wang, J. R. McCarrey, F. Yang, and D. C. Page, "An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia," *Nature Genetics*, vol. 27, no. 4, pp. 422-426, 2001.
- [15] P. J. Wang, D. C. Page, and J. R. McCarrey, "Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse," *Hum Mol Genet*, vol. 14, no. 19, pp. 2911-2918, 2005.
- [16] A. Loriot, T. Boon, and C. De Smet, "Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia," *Int J Cancer*, vol. 105, no. 3, pp. 371-376, 2003.
- [17] F. Yang, S. Eckardt, N. A. Leu, K. J. McLaughlin, and P. J. Wang, "Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis," *J Cell Biol*, vol. 180, no. 4, pp. 673-679, 2008.
- [18] O. Okutman *et al.*, "Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family," *Hum Mol Genet*, vol. 24, no. 19, pp. 5581-5588, 2015.
- [19] R. Colombo, A. Pontoglio, and M. Bini, "Two Novel TEX15 Mutations in a Family with Nonobstructive Azoospermia," *Gynecol Obstet Invest*, vol. 82, no. 3, pp. 283-286, 2017.
- [20] X. Wang, H. R. Jin, Y. Q. Cui, J. Chen, Y. W. Sha, and Z. L. Gao, "Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation," *Asian J Androl*, vol. 20, no. 1, pp. 101-102, 2018.
- [21] T. F. Araujo *et al.*, "Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: challenges in variant assessment and validating genes," *Andrology*, vol. 8, no. 2, pp. 434-441, 2020.
- [22] R. Cannarella *et al.*, "Next-generation sequencing: toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure," *Asian J Androl*, vol. 23, no. 1, pp. 24-29, 2021.
- [23] J. Ruan *et al.*, "Genetic variants in TEX15 gene conferred susceptibility to spermatogenic failure in the Chinese Han population," *Reprod Sci*, vol. 19, no. 11, pp. 1190-1196, 2012.
- [24] T. Plaseski, P. Noveski, Z. Popeska, G. D. Efremov, and D. Plaseska-Karanfilska, "Association study of single-nucleotide polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 genes with male infertility," *J Androl*, vol. 33, no. 4, pp. 675-83, 2012.

-
- [25] K. I. Aston, C. Krausz, I. Laface, E. Ruiz-Castane, and D. T. Carrell, "Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent," *Hum Reprod*, vol. 25, no. 6, pp. 1383-1397, 2010.
- [26] E. Ghadirkhomi, S. A. Angaji, M. Khosravi, and M. R. Mashayekh, "Correlation of Novel Single Nucleotide Polymorphisms of USP26, TEX15, and TNP2 Genes with Male Infertility in North West of Iran," *Int J Fertil Steril*, vol. 16, no. 1, pp. 10-16, 2022.
- [27] X. Zhang, M. Ding, X. Ding, T. Li, and H. Chen, "Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility," *Syst Biol Reprod Med*, vol. 61, no. 4, pp. 187-193, 2015.
- [28] P. Rentzsch, M. Schubach, J. Shendure, and M. Kircher, "CADD-Splice—improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores," *Genome Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 31, 2021.
- [29] R Core Team. "R: A language and environment for statistical computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. [Online]. Available at: <https://www.R-project.org/>. [Accessed Aug. 2022].
- [30] J. Graffelman, "Exploring Diallelic Genetic Markers: The HardyWeinberg Package," *Journal of Statistical Software*, vol. 64, no. 3, pp. 1-23, 2015.
- [31] T. J. Aragon, M. P. Fay, D. Wollschlaeger, and A. Omidpanah, "Epidemiology tools", 2020. [Online]. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/epitools/epitools.pdf>. [Accessed Aug. 2022].
- [32] C. M. Lewis, "Genetic association studies: design, analysis and interpretation," *Brief Bioinform*, vol. 3, no. 2, pp. 146-153, 2002.