

WHOLE-GENOME SEQUENCING REVEALS A MISSENSE VARIANT IN *TUBA3C* AND A PATHOGENIC STOP-GAIN VARIANT IN *GJB2* IN A FAMILY WITH MALE INFERTILITY

M. AJMAL¹, M.R. KHAN¹, T.UL. HAQ¹, A. AKBARI², J.S. AHUJA², D.F. CONRAD^{2,3,4}, A.A. SHAH^{1,*}

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, University of Malakand, Chakdara, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan

² Center for Embryonic Cell and Gene Therapy, Oregon Health and Science

University, Portland, Oregon, USA

³ Division of Genetics, Oregon National Primate Research Center, Beaverton, Oregon, USA

⁴ Department of Molecular and Medical Genetics, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA

E-mail: ajmalkhan055@gmail.com, mriazbio@gmail.com, taqweembio@oahu.com, akbaria@ohsu.edu, jasvinderahuja@gmail.com, conradon@ohsu.edu

Corresponding author: Shah A.A., e-mail: aftabuo@gmail.com

*Infertility mostly affects more than one member in a family, increasing the chances that the underlying cause is genetic. WGS aids in the discovery of novel variations through a variety of processes that cause infertility. To identify potential infertility-causing variations using WGS, a comprehensive method for analyzing the entire genome, and to identify the underlying mechanisms that may be targeted for future disease management. For this purpose, we identified a family with two male members exhibiting clinically diagnosed infertility and one fertile member. Blood samples were collected and subjected to WGS for CNV, SNV, and Run of homozygosity (ROH) analysis. The resulting WGS data were analyzed using bioinformatics tools/pipelines to investigate potential variants. We identified missense and stop-gain variations in *TUBA3C* and *GJB2* genes as probable causes of Deafness Infertility Syndrome. Importantly, the *TUBA3C* variant represents the third deleterious variant linked to azoospermia in this emerging infertility gene. The *TUBA3C* and *GJB2* variants were in a 93kb and 18kb region of overlapping ROHs in 12-1 and 12-2 (chr13:19138488-19231863) and (chr13:20060678-20434605), respectively. Furthermore, 12-3 did not have an ROH overlapping either variant. Families with two or more male individuals presenting with infertility, along with healthy fertile controls, present a vital resource and opportunity to comprehensively identify the genetic landscape in the maintenance of male fertility. This study will help in the mechanistic understanding of*

Deafness Infertility Syndrome and provide for identifying with certainty causal variations among idiopathic patients, targets for management, and the development of future therapy for male infertility.

Keywords: Familial infertility, Deafness Infertility Syndrome, Genome, Next-generation sequencing, Genotyping.

ПОВНОГЕНОМНЕ СЕКВЕНУВАННЯ ДЕМОНСТРУЄ МІСЕНС-ВАРІАНТ У *TUBA3C* ТА ПАТОГЕННИЙ СТОП-ГЕЙН ВАРІАНТ У *GJB2* В РОДИНІ З ЧОЛОВІЧИМ БЕЗПЛІДДЯМ

Переважно безпліддя вражає більше ніж одного члена сім'ї, що збільшує ймовірність того, що основною причиною є генетична схильність. Повногеномне секвенування (ПГС) — це комплексний метод аналізу всього геному, який допомагає виявляти нові варіанти через різноманітні процеси, що спричиняють безпліддя, тому його було використано, щоб виявити потенційні варіанти, які спричиняють безпліддя, та визначити основні механізми, на які можна орієнтуватися в майбутньому лікуванні захворювання. З цією метою ми ідентифікували родину, в якій двоє чоловіків мають клінічно діагностоване безпліддя, а один член сім'ї є фертильним. Було зібрано зразки крові та проведено ПГС для аналізу CNV, SNV та сегментів гомозиготності (ROH). Отримані дані ПГС були проаналізовані за допомогою інструментів біоінформатики/конвеєрів для дослідження потенційних варіантів. Ми ідентифікували місенс- та стоп-гейн-варіанти в генах *TUBA3C* та *GJB2* як імовірні причини синдрому глухоти та безпліддя. Важливо, що варіант *TUBA3C* є третім шкідливим варіантом, пов'язаним з азооспермією в цьому новому гені безпліддя. Варіанти *TUBA3C* та *GJB2* знаходилися в області 93kb та 18kb перекриваючих сегментів гомозиготності в 12-1 та 12-2 (chr13:19138488-19231863) та (chr13:20060678-20434605) відповідно. Крім того, 12-3 не мав сегменту гомозиготності, що перекривав будь-який із варіантів. Сім'ї з двома або більше чоловіками, які страждають на безпліддя, а також здорові фертильні контролі є важливим ресурсом і можливістю для всебічної ідентифікації генетичного ландшафту в підтримці чоловічої фертильності. Це дослідження допоможе в механістичному розумінні синдрому глухоти та безпліддя і забезпечить можливість ідентифікації з певністю каузальних варіантів серед ідіопатичних пацієнтів, цілей для лікування та розробки майбутньої терапії чоловічого безпліддя.

Ключові слова: спадкове безпліддя, синдром глухоти і безпліддя, геном, секвенування нового покоління, генотипування.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2026

REFERENCES

- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., et al., Male infertility, *Lancet*, 2021, vol. 397, no. 10271, pp. 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Akter, M.S., Hada, M., Shikata, D., Watanabe, G., Ogura, A., and Matoba, S., CRISPR/Cas9-based genetic screen of SCNT-reprogramming resistant genes identifies critical genes for male germ cell development in mice, *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 15438. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94851-9>
- Ali, S., Sophie, R., Imam, A.M., Khan, F.I., Ali, S.F., Shaikh, A., et al., Knowledge, perceptions and myths regarding infertility among selected adult population in Pakistan: a cross-sectional study, *BMC Public Health.*, 2011, vol. 11, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-760>
- Ambar, R.F., Gava, M.M., Ghirelli-Filho, M., Yoshida, I.H., De Paula, T.S., and Glina, S., Tissue and sperm handling before assisted reproductive technology (ART): A systematic review, *Arab. J. Urol.*, 2021, vol. 19, no. 3, pp. 238–246. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2021.1954801>
- Anderson, J.E., Farr, S.L., Jamieson, D.J., Warner, L., and Macaluso, M.J., Infertility services reported by men in the United States: national survey data, *Fertil. Steril.*, 2009, vol. 91, no. 6, pp. 2466–2470. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.022>
- Anwar, S., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Tasneem, S., Khan, S.Y., Griffith, A.J., et al., SLC26A4 mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred's syndrome in Pakistanis, *J. Hum. Genet.*, 2009, vol. 54, no. 5, pp. 266–270. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.21>
- Association, G.A. of the W.M., World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, *J. Am. Coll. Dent.*, 2014, vol. 81, no. 3, pp. 14–18. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
- Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F.F., Pozzan, T., and Mammano, F., Impaired permeability to InsP in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness, *Nat. Cell Biol.*, 2005, vol. 7, no. 1, pp. 63–69. <https://doi.org/10.1038/ncb1205>
- Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., et al., Twelve years of SAM tools and BCF tools, *GigaScience*, 2021, vol. 10, no. 2, pp. giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Dohle, G., Colpi, G., Hargreave, T., Papp, G., Jungwirth, A., Weidner, W., et al., EAU guidelines on male infertility, *Eur. Urol.*, 2005, vol. 48, no. 5, pp. 703–711.
- Greene, C.S., Krishnan, A., Wong, A.K., Ricciotti, E., Zelaya, R.A., Himmelstein, D.S., et al., Understanding multicellular function and disease with human tissue-specific networks, *Nat. Genet.*, 2015, vol. 47, no. 6, pp. 569–576. <https://doi.org/10.1038/ng.3259>
- Ilaacqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G.P., Baldari, C., and Aversa, A., Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2018, vol. 16, no. 1, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0436-9>
- Justin Margret, J., Jayasankaran, C., Amritkumar, P., Azariez, H., and Srisailapathy, C.S., Unraveling the genetic basis of combined deafness and male infertility phenotypes through high-throughput sequencing in a unique cohort from South India, *Adv. Genet.*, 2024, vol. 2300206. <https://doi.org/10.1002/ggn.2.202300206>
- Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J., Parry, G., et al., Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness, *Nature*, 1997, vol. 387, no. 6628, pp. 80–83. <https://doi.org/10.1038/387080a0>
- Khan, M.R., Akbari, A., Nicholas, T.J., Castillo-Maden, H., Ajmal, M., Haq, T.U., et al., Genome sequencing of Pakistani families with male infertility identifies deleterious genotypes in SPAG6, CCDC9, TKTL1, TUBA3C, and M1AP, *Andrology*, 2023. <https://doi.org/10.1111/andr.13570>
- Khodiyar, V.K., Maltais, L.J., Sneddon, K.M., Smith, J.R., Shimoyama, M., Cabral, F., et al., A revised nomenclature for the human and rodent α tubulin gene family, *Genomics*, 2007, vol. 90, no. 2, pp. 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.04.008>
- Liu, X., Xia, X., Ke, X., Ouyang, X., Du, L., Liu, Y., et al., The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population, *Hum. Genet.*, 2002, vol. 111, pp. 394–397. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0811-6>
- Mahyari, E., Guo, J., Lima, A.C., Lewinsohn, D.P., Stendahl, A.M., Vigh-Conrad, K.A., et al., Comparative single-cell analysis of biopsies clarifies pathogenic mechanisms in Klinefelter syndrome, *Am. J. Hum. Genet.*, 2021, vol. 108, no. 10, pp. 1924–1945. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.09.001>
- Mahyari, E., Vigh Conrad, K.A., Daube, C., Lima, A.C., Guo, J., Carrell, D.T., et al., The human infertility single-cell testis atlas (HISTA): an interactive molecular scRNA Seq reference of the human testis, *Andrology*, 2024. <https://doi.org/10.1111/andr.13637>
- Maria, M., Ajmal, M., Azam, M., Waheed, N.K., Siddiqui, S.N., Mustafa, B., et al., Homozygosity mapping and targeted Sanger sequencing reveal genetic defects underlying inherited retinal disease in families from Pakistan, *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3, pp. e0119806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119806>

- Mikelsaar, R., Nelis, M., Kurg, A., Žilina, O., Korrovits, P., Rätsep, R., et al., Balanced reciprocal translocation t(5;13)(q33;q12) and 9q31.1 microduplication in a man suffering from infertility and pollinosis, *Hum. Genet.*, 2012, vol. 53, pp. 93–97. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0078-5>
- Nagirnaja, L., Lopes, A.M., Charng, W.-L., Miller, B., Stakaitis, R., Golubickaite, I., et al., Diverse monogenic subforms of human spermatogenic failure, *Nat. Commun.*, 2022, vol. 13, no.1, pp. 7953. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35661-z>
- Nicholas, T.J., Cormier, M.J., and Quinlan, A.R., Annotation of structural variants with reported allele frequencies and related metrics from multiple datasets using SVAFooter, *BMC Bioinformatics*, 2022, vol. 23, no.1, pp. 490. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-05008-y>
- Olayemi, F., Review on some causes of male infertility, *Afr. J. Biotechnol.*, 2010, vol. 9, no. 20, pp. 2822–2825
- Park, H., Shaikat, S., Liu, X., Hahn, S., Naz, S., Ghosh, M., et al., Origins and frequencies of SL-C26A4 (PDS) mutations in East and South Asians: global implications for the epidemiology of deafness, *J. Med. Genet.*, 2003, vol. 40, no. 4, pp. 242–248. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.4.242>
- Pedersen, B.S., *Smooove: structural variant calling and genotyping with existing tools, but smoothly*, GitHub repository, 2020
- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G.M., Shendure, J., and Kircher, M., CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome, *Nucl. Acids Res.*, 2019, vol. 47, no. D1, pp. D886–D894. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier Foster, J., et al., Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet. Med.*, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Sambrook, J., and Russell, D.W., Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2006, vol. 2006, no. 1, pp. pdb.prot4455. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
- Sami, N., and Saeed Ali, T., Perceptions and experiences of women in Karachi, Pakistan regarding secondary infertility: results from a community-based qualitative study, *Obstet. Gynecol. Int.*, 2012, vol. 2012, Article ID 108756. <https://doi.org/10.1155/2012/108756>
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467
- Sedlazeck, F.J., Yu, B., Mansfield, A.J., Chen, H., Krasheninina, O., Tin, A., et al., Multiethnic catalog of structural variants and their translational impact for disease phenotypes across 19,652 genomes, *bioRxiv*, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.02.074096>
- Stoll, C., Alembik, Y., Roth, M., and Dott, B., Parental consanguinity as a cause for increased incidence of birth defects in a study of 238,942 consecutive births, *Ann. Genet.*, 1999. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320490123>
- Sudmant, P.H., Rausch, T., Gardner, E.J., Handsaker, R.E., Abyzov, A., Huddleston, J., et al., An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes, *Nature*, 2015, vol. 526, no. 7571, pp. 75–81. <https://doi.org/10.1038/nature15394>
- Uhl  n, M., Fagerberg, L., Hallstr  m, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., et al., Tissue-based map of the human proteome, *Science*, 2015, vol. 347, no. 6220, pp. 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Vander Borgh, M., and Wyns, C., Fertility and infertility: Definition and epidemiology, *Clin. Biochem.*, 2018, vol. 62, pp. 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Wagner, J., Olson, N.D., Harris, L., McDaniel, J., Cheng, H., Fungtammasan, A., et al., Curated variation benchmarks for challenging medically relevant autosomal genes, *Nat. Biotechnol.*, 2022, vol. 40, no. 5, pp. 672–680. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01158-1>
- Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H., ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res.*, 2010, vol. 38, no. 16, pp. e164–e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
- Wilfert, A.B., Chao, K.R., Kaushal, M., Jain, S., Z  llner, S., Adams, D.R., et al., Genome-wide significance testing of variation from single case exomes, *Nat. Genet.*, 2016, vol. 48, no. 12, pp. 1455–1461. <https://doi.org/10.1038/ng.3697>
- Yang, H., and Wang, K., Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR, *Nat. Protoc.*, 2015, vol. 10, no. 10, pp. 1556–1566. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.105>

Received April 26, 2025

Received June 16, 2025

Accepted March 18, 2026