

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Jaan Vihalemm

Meeste reproduktiivfüsioloogia geneetiline komponent

Magistritöö geenitehnoloogia erialal
(30 EAP)

Juhendajad: Marina Grigorova, Ph.D.
prof. Maris Laan, Ph.D.

TARTU 2018

Meeste reproduktiivfüsioloogia geneetiline komponent

Hüpotaalamus, ajuripats ja sugunäärmed moodustavad inimese reproduktiivfüsioloogia seisukohast möödapääsmatu tähtsusega endokriinsüsteemi, mille ülesanne on sekreteerida reproduktiivhormoone ning tagada normaalne sooline areng embrüonaalsel, puberteedi ja täiskasvanu perioodil. Meestel hõlmab see munandite diferentseerumist, puberteedi käivitamist ning suguhormoonide ja seemnerakkude püsivat tootmist. Endokriinsete signaalide eest vastutavad reproduktiivhormoone ekspresseerivad geenid, mille aktiivsust ning seeläbi hormooni taset ja toimet vereringluses mõjutavad mitmed pärilikud tegurid. Reproduktiivfüsioloogia talituslike häiretega on tihti seotud arvukad kumulatiivse mõjuga geneetilised markerid. Käesoleva magistritöö kirjanduse osa keskendub reproduktiivhormoonide ja nende retseptorite geneetilise varieeruvuse kirjeldamisele. Eksperimentaalses osas analüüsiti kolme geenivariandi (*KISS1* rs12998, *GNRH1* rs6185 ja *NPFFR1* rs3812694) mõju Balti noorte meeste reproduktiivsetele parameetritele.

Märksõnad: Hüpotalaamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg, gonadotropiinid, suguhormoonid, steroidogenees, spermatogenees

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Genetic Component of Male Reproductive Physiology

Sexual development of the embryonic and pubertal stages, followed by maintenance of reproductive system in adulthood, is all mediated via reproductive hormones of hypothalamus, pituitary and gonads – the HPG axis. This endocrine signaling regulates the differentiation of testes, onset of puberty, sex hormone secretion and spermatogenesis in mature male. However, mutations in the genes encoding reproductive hormones give rise to impaired signaling of the HPG axis resulting in disorders of the reproductive system. The genetic causes of the aberrant gene expression of these hormones are largely unknown. The focus of this study is upon genetic variation of hormones and receptors of the HPG axis. The study is also aimed to analyse the effect of the *KISS1* rs12998, *GNRH1* rs6185 and *NPFFR1* rs3812694 alternative genotypes on a boarder range of reproductive parameters using a Baltic male cohort.

Keywords: Hypothalamic-pituitary-gonadal axis, gonadotropins, sex steroids, steroidogenesis, spermatogenesis

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Meeste sooline areng.....	8
1.1.1 Prenataalne areng.....	9
1.1.2 Postnataalne areng	10
1.2 Meeste reproduktiivfüsioloogia	11
1.2.1 Hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg	12
1.2.2 Kisspeptiin	15
1.2.3 Gonadotropiine vabastav hormoon.....	16
1.2.4 Gonadotropiinid.....	20
1.2.5 Steroidogenees ja spermatogenees	25
1.3 Kandidaatgeenide assotsiatsiooniuuringud	27
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	29
2.1 Töö eesmärgid	29
2.2 Materjal ja metoodika	30
2.2.1 Valim	30
2.2.2 Geneetiliste variantide leidmine	33
2.2.3 Genotüpiseerimine.....	35
2.2.4 Statistiline analüüs.....	36
2.3 Tulemused.....	38
2.3.2 Geneetiliste variantide valik	38
2.3.3 Genotüpiseerimise tulemuste kvaliteedikontroll	43
2.3.4 Geneetiliste variantide assotsiatsioonianalüüs	44

2.3.5	<i>GNRH1</i> variant rs6185 mõjutab testosterooni taset vereseerumis	47
2.3.6	<i>NPFFR1</i> variant rs3812694 mõjutab E ₂ taset vereseerumis	48
2.3.7	<i>KISS1</i> variant rs12998 ei mõjuta noorte meeste reproduktiivparameetreid	49
2.4 Arutelu		49
KOKKUVÕTE		54
ABSTRACT		55
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....		56
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		66
LISAD		67
LIHTLITSENTS.....		72

KASUTATUD LÜHENDID

α -GSU	gonadotropiini α subühik (<i>α Gonadotropin subunit</i>)
ADT	antiandrogeeniravi (<i>Androgen deprivation therapy</i>)
AMH	anti-Mülleri hormoon (<i>Anti-Müllerian hormone</i>)
AR	androgeeniretseptor (<i>Androgen receptor</i>)
ARE	androgeeni vastuselement (<i>Androgen response element</i>)
BioT	bioaktiivne testosteroon (<i>Bioavailable testosterone</i>)
CAIS	androgeenitundetuse sündroom (<i>Complete androgen insensitivity syndrome</i>)
CPP	enneaegse puberteedi sündroom (<i>Central precocious puberty</i>)
DHEA	dehüdroepiandrosteroon (<i>Dehydroepiandrosterone</i>)
DHT	dihüdrotestosteroon (<i>Dihydrotestosterone</i>)
E ₂	östradiol (<i>Estradiol</i>)
EIMA	ensüüm-immunomeetria analüüs (<i>Enzyme immunometric assay</i>)
EM	(<i>Median eminence</i>)
ER	östrogeeniretseptor (<i>Estrogen receptor</i>)
FAI	vaba androgeeni indeks (<i>Free androgen index</i>)
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
FT	vaba testosteroon (<i>Free testosterone</i>)
GAP	GnRH seoseline peptiid (<i>GnRH-associated peptide</i>)
GnIH	gonadotropiini inhibeeriv hormoon (<i>Gonadotrophin-inhibitory hormone</i>)
GnRH	gonadotropiini vabastav hormoon (<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
GPCR	G-valkudega seotud retseptorid (<i>G-protein-coupled receptors</i>)
hCG	inimese koorioni gonadotropiin (<i>Human chorionic gonadotropin</i>)
HPG	hüpotalamus-ajuripats-gonaadide telg (<i>Hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>)
IGD	isoleeritud GnRH defitsiit (<i>Isolated GnRH deficiency</i>)
IHH	idiopaatiline hüpogonadotroopne hüpogonadism (<i>Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism</i>)
K-W	Kruskal-Wallis test (<i>Kruskal-Wallis test</i>)
LDL	madala tihedusega lipoproteiin (<i>Low-density lipoprotein</i>)
LH	luteiniseeriv hormoon (<i>Luteinizing hormone</i>)

MAF	minoorse alleeli sagedus (<i>Minor allele frequency</i>)
M-W	Mann-Whitney U test (<i>Mann-Whitney U test</i>)
NLS	tuuma lokalisatsiooni järjestus (<i>Nuclear localization sequence</i>)
NTC	nullproov (<i>No template control</i>)
RF	ajutüve retikulaarne võrgustik (<i>Brain stem reticular formation</i>)
RFRP	RF-amiiditud peptiidide rühm (<i>RFamide-related peptides</i>)
RIA	radioimmuuanalüüs (<i>Radioimmunoassay</i>)
RT-PCR	reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (<i>Real-time polymerase chain reaction</i>)
SHBG	suguhormoone siduv globuliin (<i>Sex hormone-binding globulin</i>)
SNV	üksiknukleotiidne variant (<i>Single nucleotide variant</i>)
SRP	signaaliäratundja partikkel (<i>Signal-recognition particle</i>)
TPM	miljoni transkripti kohta (<i>Transcripts per million</i>)
TR-FIA	aeg-resolutsiooniga fluoroimmuuanalüüs (<i>Time-resolved fluorescence immunoassay</i>)
TR-IFMA	aeg-resolutsiooniga immuunofluoromeetriline test (<i>Time-resolved immunofluorometric assay</i>)
WHO	Maailma Terviseorganisatsioon (<i>World Health Organization</i>)

SISSEJUHATUS

Inimese reproduktiivne tervis on Maailma Terviseorganisatsiooni poolt määratletud kui füüsilise, vaimse ja sotsiaalse heaolu seisund, sealjuures haiguste- ja häiringutevaba reproduktiivfüsioloogia talitus. Sama määratluse kohaselt kuulub mehe reproduktiivne tervis androloogia valdkonda. Eesti on seejuures üks väheseid riike maailmas, kus androloogia on meditsiinilise teadusharuna juurutatud. Mehe reproduktiivse tervise eest vastutavad sisenõre- ja sugunäärmed, sekreteerides hormoone, mis vastutavad seksuaalse arengu ja võimekuse saavutamise ning säilimise eest erinevates eluetappides. Reproduktiivhormoonide hulka kuuluvad mitmed signaalpeptiidid, gonadotropiinid ja suguhormoonid. Gonadotropiinid mõjutavad sugunäärmete diferentseerumist ja sugurakkude tagavara loomist inimese looteas, misjärel nende signaal vaigistatakse aastateks. Signaalpeptiidid on möödapääsmatud puberteedi käivitamisel, stimuleerides gonadotropiinide sekretsiooni, mis hakkavad vastutama reproduktiivse võimekuse säilimise eest, reguleerides sugunäärmete aktiivsust tootmaks suguhormoone ja seemnerakke.

Selle reproduktiivse endokriinse süsteemi talituste eest vastutavates geenides esinevad variatsioonid võivad mõjutada reproduktiivhormoonide ekspressiooni ja seeläbi soolist arengut ja sugurakkude tootmist stimuleerivate signaalide aktiivsust. Kogu reproduktiivtelje signaaliahela vaigistamiseks piisab vaid üksiku hormooni bioaktiivsuse täielikust puudumisest, põhjustades organismile korvamatut kahju üheskoos viljatusega. Sellised juhtumid on siiski väga haruldased ning inimesegeneetikas pööratakse rohkem tähelepanu ühiskonnas sagedamini esinevatele geneetilistele variatsioonidele. Reproduktiivfüsioloogia talituslike häiretega seotud geneetiliste markerite tuvastamine on aga küllalt keeruline tulenevalt multifaktoriaarsest olemusest – nende kujunemist põhjustavad tihti mitmed populatsioonis levinud kumulatiivse mõjuga variatsioonid.

Käesoleva magistritöö kirjanduse osa keskendub hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telje hormoonide ja nende retseptorite geneetilise varieeruvuse kirjeldamisele. Eksperimentaalses osas analüüsiti kolme geenivariandi (*KISS1* rs12998, *GNRH1* rs6185 ja *NPFFR1* rs3812694) mõju Balti noorte meeste reproduktiivsetele parameetritele.

Töö on valminud Meditsiiniteaduste valdkonnas Bio- ja Siirdemeditsiini Instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Meeste sooline areng

Imetajate soo kujunemise protsessi saab jagada kolme faasi: kromosomaalse soo määratlemine viljastumisel, bipotentsiaalse gonaadi diferentseerumine testiseks või munasarjaks ning sekundaarsete sootunnuste areng reguleerituna väljakujunenud sugunäärme poolt (Val ja Swain, 2005). Esimesed kaks faasi on geneetiliselt suunatud protsessid ning moodustavad primaarse soo määratluse, mis omakorda reguleerib hormonaalselt sekundaarse soo määratlemist.

Inimese primaarne soo määratlemine toimub molekulaarsel tasandil. Mehe sugu määratlev geen *SRY* (Yp11.2) võimendab transkriptsioonifaktori Sox9 ekspressiooni, indutseerides seeläbi mehe sugunäärmete ehk munandite arenguks ja spetsiifilisuse säilitamiseks vajalike geenide ekspressiooni (Hanley jt., 2000; Oh jt., 2010). Inimesel moodustub bipotentsiaalne gonaadi alge (ingl. *Bipotential primordium*) neljandal loote nädalal, kui mesodermist arenevad genitaalvallid, kuhu migreeruvad idurakud (ingl. *Germ cells*). Viiendal nädalal osa genitaalvalli rakkudest diferentseeruvad Sertoli rakkudeks ning algab Sox9 tootmine, indutseerides munandite moodustumist (Val ja Swain, 2005; Mamsen jt., 2017). Idurakud ümbritsetakse Sertoli ja peritubulaarsete müoidsete rakkude (ingl. *Peritubular myoid cells*) poolt ning moodustuvad munandiväädid (ingl. *Testis cords*). Munandiväätide ümber hakkavad diferentseeruma Leydig'i rakud (Brennan ja Capel, 2004).

Peale munandite moodustumist järgneb sekundaarne soo määratlus, mille käigus sugunäärme poolt sekreteeritud suguhormoonid ja parakriinsed faktorid stimuleerivad mehele omaste sootunnuste arengut ja talitust. Sekundaarse määratluse puhul eristatakse kahte ajalist perioodi mehe elus: prenataalset arengut ehk embrüonaalset organogeneesi ja postnataalset arengut ehk puberteeti.

1.1.1 Prenataalne areng

Embrüonaalse arengu käigus vallanduv soospetsiifliste suguhormoonide endokriinne induksioon on vajalik suguorganite diferentseerumiseks, signaali mõju organogeneesile on resoluutne ning kandub inimese fenotüüpi. Põhilised soolise arengu eest vastutavad hormoonid sekreteeritakse sugunäärmetes Sertoli ja Leydig'i rakkude poolt (DeFalco ja Capel, 2009).

Meestel sekreteerivad Sertoli rakud anti-Mülleri hormooni (AMH), mis tagab Mülleri juhade taandarengu ning hoiab seeläbi ära emaka ja munajuhade moodustumise (Hiort, 2013). Seejuures on AMH sünteesi aktiveerimiseks möödapääsmatu Sox9 vahendatud signaal (Lucas-Herald ja Bashamboo, 2014). AMH sekretsioon jätkub kuni puberteedini ning langeb seejärel. Leydig'i rakkudes sekreteeritakse meessuguhormooni testosteroon, mis tagab Wolffi juhade diferentseerumise munandimanuseks, seemnejuhadeks ja seemnepõiekeseks (Ono ja Harley, 2013). Osa testosterooni konverteeritakse, näiteks suguhormooniks dihidrotestosteroon (DHT) või östradiool (E_2). DHT signaal on seejuures vajalik kusiti, eesnäärme, munandikoti ja peenise arenguks (Yamada jt., 2006).

Suguhormoonide mõju avaldub läbi spetsiifilise seondumise androgeeni- või östrogeenireseptoriga (ingl. *Androgen/Estrogen receptor*, AR või ER). AR ja ER retseptorid on transkriptsioonifaktorid tsütoplasmas suurema valgulise kompleksi koosseisus. Ligandiga seondudes kompleksi konformatsioon muutub ning paljastab tuuma lokalisatsiooni järjestuse (ingl. *Nuclear localization sequence*, NLS), mis seondub vastuselemendiga kromatiinil ning mõjutab seeläbi suguhormoonide signaali sihtmärkgeenide ekspressiooni (Shaffer jt., 2004; Werner ja Holterhus, 2014). Enim AR ja ER retseptoreid ekspresseerivad rakke leidub vaheajus paiknevas hüpotalamuses, teiste hulgas spetsiifiliste neuronite populatsioonides, näiteks kisspeptiini neuronites (Smith jt., 2005). See annab põhjust arvata, et suguhormoonide toime üks peamisi sihtmärke organismis on hüpotalamus, mis kontrollib muuhulgas gonadotropiini vabastava hormooni (ingl. *Gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) ning seeläbi gonadotropiinide sekretsiooni (Thompson ja Kaiser, 2014).

1.1.2 Postnataalne areng

Puberteedi saabudes käivituvad organismis reproduktiivfüsioloogilised protsessid ning sekundaarsete sootunnuste areng. Poistele on sel perioodil omane suguelundite küpsemine, kasvu kiirenemine, lihasmassi suurenemine, luude tihenemine ning häälemuure. Pooltel juhtudest on täheldatud ka günekomastiat ehk rindade suurenemist, mida põhjustab kasvav E_2 kontsentratsioon puberteedi ajal (Nuttall jt., 2015; Mieritz jt., 2015). Puberteedi saabumine varieerub indiviiditi, olles mõjutatud nii keskkondlikest kui geneetilistest faktoritest, viimaste roll on hinnanguliselt 50 - 80% (Palmert jt., 2001; Gajdos jt., 2010; van den Berg jt., 2007). Hiline või varane puberteet on mitmete vanemas eas ilmnevate tervisehädade, teistehulgas metaboolse sündroomi, suhkrutõve, ülekaalulisuse, südamelihaste infarkti ning munandivähi riskiteguriks (Golub jt., 2008).

Suurimad geeniekspressiooni muutused enne puberteedi saabumist toimuvad hüpotalamuses ning ajuripatsis. Seda stimuleerib suguhormoonide sekretsiooni tõus umbes seitsmendal eluaastal, kui neerupealsed hakkavad tootma hormooni dehüdroepiandrosterooni (DHEA). Kümnenädaks eluaastaks tõuseb GnRH sekretsioon hüpotalamuses, indutseerides mitmeid kaskaadseid signaaliahelaid ajuripatsi ja munandite küpsemiseks ja talituseks (Hou jt., 2017). Gonadotropiinide vabanemine ajuripatsis algab pulsseeruva sekretsiooniga unetundidel, mis progresseerub puberteedi jooksul jäävaks nähtuseks kuni täiskasvanule omase sekretsioonimustri saavutamiseni (Weinbauer jt., 2010). Meestel stimuleerivad gonadotropiinid androgeene Leydig'i rakkudes ning Sertoli rakkude proliferatsiooni. Androgeenide sekretsiooni võimendumisega algab sugurakkude ja sekundaarsete sugutunnuste areng, seejuures testosterooni puudumine põhjustab meestel sugurakkude apoptoosi (Rhen ja Cidlowski, 2009). Tõuseb ka inhibiini B sekretsioon Sertoli rakkudes, mida seostatakse tugevalt Sertoli rakkude proliferatsiooni ning spermatogeneesiga (Yalti jt., 2002; Dadfar jt., 2010; Barbotin jt., 2015).

Inimestes toimub üleminek puberteedile kahe protsessi käigus – neerupealsete androgeenide tootmine ehk *adrenarche* ja suguelundite areng ehk *gonadarche*. Esimene toimub tavaliselt ajaliselt varem, hõlmab neerupealiste androgeenide sekretsiooni tõusu ning toob kaasa hääbemekarvade kasvu ja akne. Selle faasi ära jäämine või hiline mine ei mõjuta suguelundite arengut või viljatust (Mouritsen jt., 2012). *Gonadarche* hõlmab sugunäärmete kasvu ja küpsemist ning seda seostatakse suguhormoonide sekretsiooni tõusuga kaasneva spermatogeneesi

initsiatsiooniga. Esimese ilminguna poisslaste puberteedi saabumisest hakkab suurenema munandimaht *gonadarche* käigus 9-14. eluaastal. Hiljem kui 14-aastaselt suurenema hakkavad munandid diagnoositakse hiliseks puberteediks. *Gonadarche* on tagajärg hüpotalamus-ajuripatsi talituse tärkamisele (Feldman Witchel ja Plant, 2009). Sootunnuste arengut hinnatakse 5-palli süsteemis Tanneri skaala järgi. Hinnatakse suguelundite ja häbemekarvade arengut (Tabel 1).

Tabel 1. Sootunnuste arengu hindamine Tanneri skaalal.

Faas	Gonadarche	Adrenarche	
	Suguelundite areng	Munandimaht (ml)	Häbemekarvade areng
1	Prepubertaalne peenis	< 3	Karvkate puudub
2	Peenise kasvu algus, munandikoti pigmenteerumine	3 – 8	Üksikud, vähe pigmenteerunud karvad peenise juurel
3	Peenise kasv läbimõõdus	10 – 15	Hõre, pigmenteerunud karvkate üle häbemeliiduse
4	Peenise kasv pikkuses / läbimõõdus	15 – 20	Lokkis, pigmenteerunud karvkate üle häbemeliiduse ja munandikotil
5	Täiskasvanule omane peenis	> 25	Tihe, lokkis, pigmenteerunud täiskasvanule omane karvkate

Tabel: (Feldman Witchel ja Plant, 2009)

1.2 Meeste reproduktiivfüsioloogia

Hüpotalamuse, ajuripatsi ja munandite endokrinoloogiline funktsioon on tagada mehe normaalne seksuaalne areng embrüonaalsel, puberteedi ja täiskasvanu perioodil. See hõlmab meessuguhormoonide ja kompetentsete seemnerakkude tootmise tagamist. Seega on nimetatud organite süsteemne talitus tähtis nii indiviidi tervise kui inimkonna säilimise seisukohast. Väärtalitused võivad kaasa tuua suguelundite väärarenguid, puberteedi viibmist, saavutamata suguküpsust, seemnerakkude kahjustusi, suguhormoonide piisamatut tootmist jne. Lisaks võib reproduktiivhormoonide vaegus põhjustada kiiremat vananemist, halvenenud paranemist rasketest haigustest, vistseraalset rasvumist ja insuliini resistentsust (Liu ja Veldhuis, 2009).

Soolise arengu ja viljastusvõime probleemide puhul on tõenäoliselt häiritud sugunäärmete reproduktiivfüsioloogilised talitused. Sugunäärmete funktsionaalse aktiivsuse vähenemine ehk hüpogonadism võib olla põhjustatud gonaadide talituslikes häiretest (hüpergonadotroopne) või hüpotalamuse ja ajuripatsi endokrinoloogilise signaali puudumisest (hüpogonadotroopne).

GnRH signaali puudumisel hüpotalamuses on äärmiselt tõsised tagajärjed organismi arengule. Isoleeritud GnRH defitsiit (ingl. *Isolated GnRH deficiency*, IGD) on mendellikult päritavate talitushäirete perekond, mille fenotüübiks on idiopaatiline hüpogonadotroopne hüpogonadism (ingl. *Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism*, IHH), mis väljendub hüpotalamuse või nääreajuripatsi talituslike häirete tagajärjel gonadotropiinide ning meessuguhormoonide vaegnõrituse tõttu põhjustatud seksuaalse küpsemise peetusena ja isegi viljatusena (Balasubramanian jt., 2010). Kuid GnRH on vaid üks hormoon reproduktiivsüsteemis, mis hõlmab enda alla arvukaid signaalmolekule ning nende retseptoreid. Endokriinsete signaalide ülekandeks vajalike lülide tootmise ja talituse eest vastutavad reproduktiivhormoone kodeerivad geenid ning nende aktiivsust reguleerivad tegurid. Mutatsioonid nendes geenides võivad häirida terve signaaliahela toimimist ning seeläbi organismi soolist arengut. Seetõttu on inimese reproduktiivfüsioloogia uurimisel tähtis mõista ka pärilikkuse rolli ning näha geneetilisi seoseid organismis toimuvate muutustega.

1.2.1 Hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg

Mehe reproduktiivsüsteemi telje moodustavad hüpotalamus, ajuripats ning munandid (ingl. *Hypothalamic-pituitary-gonadal axis*, HPG). Telje talituse tagavad mitmed hormonaalsed signaalid, nende regulatsiooni- ja tagasisidesüsteemid ning retseptorid, mis ekspresseeritakse aju erinevates piirkondades ja sugunäärmetes (Meethal ja Atwood, 2005). Ühe hormooni kontsentratsiooni muutus häirib kõigi HPG telje hormoonide ning retseptorite ekspressioonimustreid (Ascoli ja Puett, 2009). Seetõttu on raske hinnata iga üksiku hormooni või retseptori mõju suguküpsuse saavutamisele ja säilitamisele.

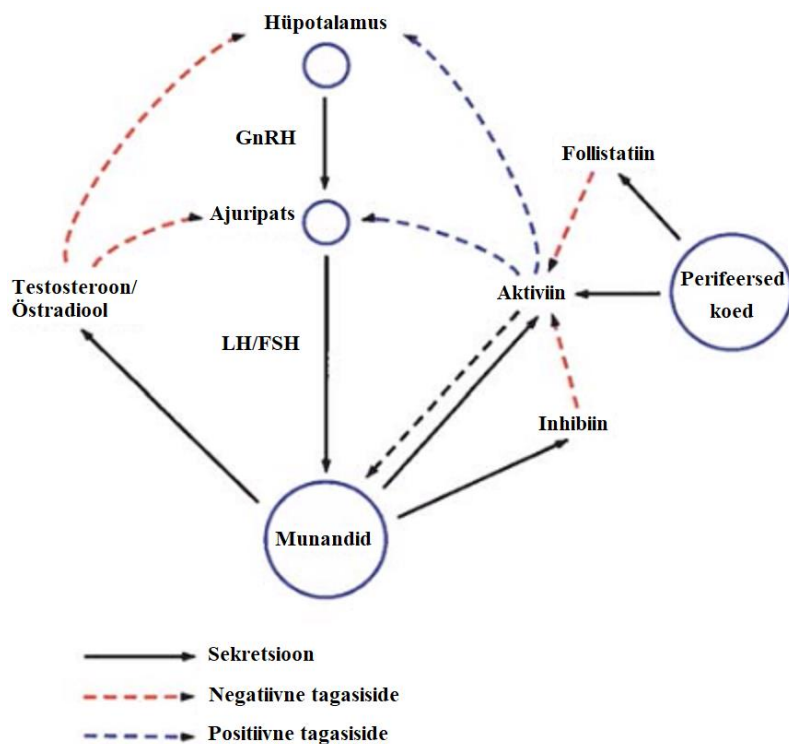
Hüpotalamus on vaheaju alumine osa ning ajutüve retikulaarse võrgustiku (ingl. *Brain stem reticular formation*, RF) ühenduste pikendus rostraalsel teljel. Hüpotalamuses paiknevate

neuronite aksonid kanduvad ventraalsel küljel olevasse *median eminence* (ME) kühmu. ME on vere-aju barjäärita piirkond, kus neurosekretoorsed aksonid ühinevad verekapillaaridega ning toimub hormoonide kandumine vereringesse. Allapoole ahenedes moodustab hüpotalamus leetri, mille küljes asub hüpofüüs ehk ajuripats. Ajuripats on ühenduses vaheaju alumise osaga ning koosneb ees-, kesk- ja tagasagarast. Mõned hüpotalamuse neuronite aksonid kanduvad ajuripatsi ventraalsesse piirkonda ehk nääreaajuripatsisse (ingl. *Anterior pituitary*), kus asuvad gonadotroopsed rakud. Gonadotroopsetel rakkudel on hästi arenenud karedapinnaline endoplasmaatiline retiikulum (rER) ja Golgi kompleks ning sisaldavad suurel hulgal sekretoorseid graanuleid (Weinbauer jt., 2010).

HPG hormoonid jagunevad tsentraalseteks ning perifeerseteks. Tsentraalsed hormoonid sel teljel on GnRH ning gonadotropiinid – folliikuleid stimuleeriv hormoon (ingl. *Follicle-stimulating hormone*, FSH) ja luteiniseeriv hormoon (ingl. *Luteinizing hormone*, LH). GnRH ekspresseerub hüpotalamuses ja reguleerib gonadotropiinide FSH ja LH sekretsiooni nääreaajuripatsis, mis on munandite tegevuse põhilised reguleerijad, kontrollides spermat- ja steroidogeneesi (Weinbauer jt., 2010). Signaaliahelal GnRH-st „ülesvoolu“ jääv kisspeptiin ei kuulu traditsiooniliste HPG telje hormoonide hulka, kuid indutseerib GnRH neuroneid ning reguleerib seeläbi telje ekspressiooni. Perifeerselt lisanduvad peamiselt testistes ekspresseeruvad androgeenid, östradiool ja inhibiin B. Lisaks mitmel pool kudedes ekspresseeruvad aktiviin ning follistatiin. HPG hormoonide taset reguleerivad kaskaadne „allavoolu“ signaal ning kompleksne tagasiside süsteem (Joonis 1). HPG telje hormoonide sekretsioon kõigub mitmete füsioloogiliste perioodide vältel mehe elu jooksul, seda reguleerivad arvukad tagasiside mehhanismid ning seetõttu on arengulisi ja talituslikke mõjusid inimesele keeruline uurida vaid üksikut hormooni jälgides.

Aktiviinid kuuluvad kasvufaktor β perekonda (ingl. *Growth factor- β superfamily*). Aktiviinid seonduvad retseptoritega ajus paiknevatel neuronitel, stimuleerides GnRH ning gonadotropiinide sekretsiooni (Weinbauer jt., 2010). Aktiviini signaali inhibeerivad kaks mehhanismi – inhibiin B konkureerib aktiviiniga seondudes ise aktiviini retseptoritele, samas kui follistatiin seondub aktiviiniga ning blokeerib selle seondumise retseptoriga (Gray jt., 2002). Aktiviin ja inhibiin on struktuurselt sarnased valgud – meestes esinev inhibiin B on heterodimeer α ja β B subühikutest, aktiviin aga homodimeer β A või β B subühikutest. Aktiviinidel on lisaks suur roll aju võimel muuta oma funktsiooni ja struktuuri vastuseks erinevatele stiimulitele – β A aktiviini

ekspressioon tõuseb sünaptiliste reaktsioonide tagajärjel, võimaldades luua uusi ühendusi aju efektiivsuse arenguks, kasvuks ja paranemiseks vigastustest (Andreasson ja Worley, 1995). Aktiviin seostatakse erinevate kudede diferentseerumise ning struktuurse arengu regulatsiooniga (Roberts jt., 1996). Testosteroon, DHT ja E2 inhibeervad kisspeptiini sekretsiooni, seondudes kisspeptiini neuronite pinnal olevatele AR ja ER retseptoritega (Hayes ja Crowley, 1998). E2 võib kisspeptiini sekretsiooni ka võimendada transkriptsioonifaktor Sp1 vahendusel (Li jt., 2007).



Joonis 1. HPG telje hormoonide regulatsioon. Hüpotalamuses toimub kisspeptiinide poolt indutseeritud GnRH sekretsioon, mis omakorda stimuleerib FSH ja LH produktsiooni ning sekretsiooni ajuripatsis. Vabanenud gonadotropiinid indutseerivad endokriinselt suguhormoonide, aktiviini ja inhibiini B produktsiooni munandites. GnRH sekretsiooni mõjutab testosteroon läbi negatiivse tagasiside hüpotalamuse ja ajuripatsi talitusele. Inhibeervalt mõjuvad ka testosterooni derivaadid DHT ning E₂. Gonadotropiinide sekretsiooni stimuleerib aktiviin. Aktiviini signaali inhibeervad inhibiin ja follistatiin. Joonis: (Meethala ja Atwood, 2005).

1.2.2 Kisspeptiin

Kisspeptiinid on *KISS1* (MIM: 603286) geeni poolt kodeeritud amiiditud peptiidide rühm, mida ekspresseerivad kisspeptiini neuronid hüpotalamuses vastuseks erinevatele hormonaalsetele ja füsioloogilistele signaalidele (Tassigny ja Colledge, 2010). Kisspeptiinid seonduvad *KISS1R* (MIM: 604161) geeni poolt kodeeritud retseptoritega GnRH neuronitel ning moduleerivad GnRH pulsseeruvat vabanemist, mis on hädavajalik puberteedi initsieerimiseks, viljastusvõime saavutamiseks ning säilitamiseks (Ramaswamy jt., 2008). Kisspeptiini retseptorit ekspresseerivad enamik GnRH neuronitest (Messenger jt., 2005). Puberteedi saabudes tõuseb kisspeptiini signaalile vastavate GnRH neuronite arv (Han jt., 2005). Kisspeptiini mõju gonadotropiinide sekretsioonile on tugevalt positiivne, teraapia võimendab LH, FSH ja testosterooni taset vereseerumis (Dhillon jt., 2005; Chan jt., 2011).

Inimestel koosneb *KISS1* geen vähemalt ühest mittekodeerivast ning kahest allavoolu jäävast kodeerivast eksonist. Translatsiooni produkt koosneb 138 aminohappest, millest lõigatakse proteolüütiliselt 54-aminohappeline peptiid Kp54. Leitud on ka lühemad bioloogilise aktiivsuse säilitanud Kp14 ja Kp13 (Tassigny ja Colledge, 2010). Kisspeptiinide kümme C-terminaalset aminohapet on väga konserveerunud ning muutused selles piirkonnas inhibeervad seondumist kisspeptiini retseptoriga (Gutierrez-Pascual jt., 2009; Orsini jt., 2007; Topaloglu jt., 2012).

Kisspeptiinide tähtsust reproduktiivfüsioloogia reguleerimisel ilmestavad geneetilised uuringud loomudelitega ning haruldase fenotüübiga patsientidega. *Kiss1* või *Kiss1r* geeni vaigistamine põhjustab hiirtel sootunnuste arengupeatust, gametogeneesi häireid, puberteedi ärajäämist ning viljatust (Tassigny jt., 2007; Dungan jt., 2007; Funes jt., 2003). Nimetatud fenotüüpe põhjustab kisspeptiini signaali puudumisest tingitud gonadotropiinide ja suguhormoonide vaegus (Seminara jt., 2003; Lapatto jt., 2007). *KISS1* puhul on kirjeldatud kahte fenotüübiga seostatud varianti. Perekonna haiguslugu uurides tuvastati IHH põdevatel pereliikmetel homosügootne asendus c.C339G (MIM: 603286.0001; rs587777835), põhjustades p.Asn113Lys asenduse Kp54 konserveerunud C-terminaalses otsas ning vaigistades seeläbi kisspeptiini talitusliku toime (Topaloglu jt., 2012). Patsientide vanemad olid mutatsiooni kandjad, ilmestades asjaolu, et vähemasti üks talituslik kisspeptiini koopia on piisav HPG telje initsieerimiseks.

Enneaegse puberteediga patsiendil tuvastati c.C369T (MIM: 603286.0002; rs587777843) asendus kolmandas eksonis, mille tagajärjel oli LH ja testosterooni tase veres püsivalt kõrge (Silveira jt., 2010). Põhjustades p.Pro74Ser asendust kisspeptiini N-terminaalses PEST järjestuses, mis reguleerib valgu suunamist degrageerumisele, võib kõnealune variant mõjutada kisspeptiini eluiga vereringluses ning seeläbi reproduktiivhormoonide sekretsiooni (Harms jt., 2003). Kirjeldatud reproduktiivfüsioloogilised häired on otseselt sõltuvad kisspeptiini signaalist hüpotalamuses, mis mõjutab gonadotropiinide taset vereringluses. Seda arusaama toetavad ka arvukad kisspeptiini teraapia uuringud inimestega (Dhillon jt., 2007), hiirtega (Gottsch jt., 2004), primaatidega (Plant jt., 2006), lammastega (Caraty jt., 2007) jne.

1.2.3 Gonadotropiine vabastav hormoon

Gonadotropiine vabastavad hormoonid on kõrgelt konserveerunud neuropeptiidide rühm (Lee jt., 2008). Inimeses on leitud GnRH kahel kujul, GnRH-I ja GnRH-II, kodeerituna kahe erineva geeni poolt. Kuigi tegemist on struktuurilt sarnaste molekulidega, ekspresseeruvad need erinevates kudedes ning regulatsioonide järgi (Cheng ja Leung, 2005). Gonadotropiinide regulatsioonis osalev GnRH-I (GnRH) on hüpotalamuses samanimeliste neuronite neuronite poolt sünteesitud decapeptiid. Embrüonaalse arengu käigus diferentseeruvad GnRH neuronite alged neuraalharjast, paljunevad haistepiteeli plakoodil (ingl. *Olfactory placode*) ja migreeruvad hüpotalamusse, kus nad lõplikult diferentseeruvad (Forni jt., 2011).

GnRH kodeeriva *GNRH1* (MIM: 152760) geeni produkt on 92-aminohappeline prekursor prepro-GnRH, mis koosneb lisaks 24-aminohappelisest signaalpeptiidist ning 56-aminohappelisest GAP-ist (ingl. *GnRH-associated peptide*). Signaalpeptiid vastutab valgu kotranslatsioonilise seostumise eest rER-iga, mida vahendab signaaliäratundja partikkel (ingl. *Signal-recognition particle*, SRP). RER-is ja Golgi kompleksis lõigatakse prekursori N-terminusest signaalpeptiid ja C-terminusest GAP koos signaaliidesega (Ascoli ja Puett, 2009). Küps GnRH on 10-aminohappeline peptiidhormoon (Millar jt., 2008). GnRH molekulid pakitakse graanulitesse ning transporditakse mööda aksoneid ajuveresoonkonda (ingl. *Hypophyseal portal system*), mis kannab hormooni hüpotalamusest hüpofüüsi eessagarasse ehk nääreajuripatsisse (Ascoli ja Puett, 2009). Graanulid sekreteeritakse pulsseeruvalt iga 30-120 minuti möödudes (Millar jt., 2004). GnRH

indutseeritud signaaliradade aktivatsioon sõltub suuresti sekretsiooni pulsi sagedusest ja magnituudist – madalamatel sagedustel on aktiivsem FSH, kõrgematel LH süntees (Clifton ja Steiner, 2009). GnRH toime avaldumist vahendavad *GNRHR* (MIM: 138850) geeni poolt kodeeritud G-alkudega seotud retseptorid (ingl. *G-protein-coupled receptors*, GPCR), millele on iseloomulik seitsme transmembraanse domääni ning kõrge afiinsusega rakuvälise domääni olemasolu. GnRHR ekspresseeritakse vaid nääreajuripatsi gonadotroopsetes rakkudes, seostumisel ligandiga moodustub hormooni-retseptori kompleks, mis aktiveerib G-valgu ja toob kaasa Ca-ioonide sissevoolu rakku ning gonadotropiinide vabanemise (Weinbauer jt., 2010).

Aastakümneid on peetud reproduktiivfüsioloogiliste hädade näiliseks põhjustajaks *GNRH1* geeni. Seda arusaama toetas autosomaalse retsessiivse hüpogonadaalse *hpg* hiirmudeli välja arendamine, mõistmaks paremini IGD geneetilist ning endokriinilist tausta. *Hpg* hiirtel täheldati sootunnuste arengupeatust, gametogeneesi häireid ning GnRH ja gonadotropiinide vaegust, põhjuseks peeti ristamiste käigus tekkinud *GNRH1* mutatsiooni (Cattanach jt., 1977). Hiljem viidi kõnealuse hiiretüve genoomi *Gnrh1* sisaldav transgeen ning raviti loom terveks, tuvastades ühtlasi IHH põhjustaja ning luues pretsedent imetajate geeniteraapias (Mason jt., 1986). Tegelikult on *GNRH1* mutatsioonid haruharva IHH monogeenseks põhjustajaks, teadaolevalt esimesed IHH-ga seostatud variandid kirjeldati alles hiljuti ning mõlemal juhul on tegemist GnRH sünteesi halvava mutatsiooniga, mistõttu vaigistub organismis gonadotropiine vabastav signaal (Tabel 2) (Bouligand jt., 2009; Chan jt., 2009). Kuid GnRH aktiivsust ja taset vereringluses võivad mõjutada korraga mitu geneetilist tegurit. IHH patsiendil avastati heterosügootne asendus c.91C>T (Tabel 2), mis põhjustab GnRH afiinsuse 100-kordse languse retseptoriga seondumisel *in vitro*. Sama uuringu raames tehtud katsed aga kinnitavad, et olenemata talituslikest häiretest ei sega muteerunud hormooni juuresolek metsiktüüpi hormooni signaali ning kirjeldatud variandi dominantse mõju avaldumist ei seleta seega *in vitro* katsed (Maione jt., 2013). Hilinenud puberteedi geenimarkereid uurides on kirjeldatud heterosügootse c.52C>T (Tabel 2) variandi koosesinemist teiste variantidega *GNRH1* transkriptsiooni reguleerivates geenides (Chan jt., 2009). Seejuures on hinnanguliselt kuni 15% IHH patsientide perekonnaliikmete puhul täheldatud hilinenud puberteeti (Sedlmeyer jt., 2005), viidates variantide kandjate hilise puberteedi soodumusele. Tabelis 2 on välja toodud kindla fenotüübiga seostatud *GNRH1* ja *GNRHR* variandid OMIM andmebaasi põhjal (<https://www.omim.org/>).

Tabel 2. Fenotüübiga seostatud *GNRH1* ja *GNRHR* variandid.

Geen	Transkript ^a	Variant		CDS ^c	Asendus	Seostatud fenotüüp
		OMIM ^b	rs ID		Valk	
<i>GNRH1</i>	ENST00000276414.4	152760.0001	rs587777758	c.18dupA	p.Leu7Thrfs	IHH
		152760.0002	rs587777859	c.87delA	p.Leu30Cysfs	
		COSM1456266	c.91C>T	p.Arg31Cys		
			rs749443966	c.52G>A	p.Val18Met	Hiline puberteet
<i>GNRHR</i>	ENST00000226413.4	138850.0001	rs104893836	c.317A>G	p.Gln106Arg	IHH
		138850.0002	rs104893837	c.785G>A	p.Arg262Gln	
		138850.0005	rs104893839	c.651C>A	p.Ser217Arg	
		138850.0003	rs28933074	c.851A>G	p.Tyr284Cys	
		138850.0004	rs104893838	c.386C>A	p.Ala129Asp	
		138850.0006	rs104893840	c.504T>A	p.Ser168Arg	
		138850.0007	rs104893841	c.941T>A	p.Leu314Ter	
		138850.0008	rs104893842	c.416G>A	p.Arg139His	
		138850.0009	rs104893843	c.30T>A	p.Asn10Lys	
		138850.0010	rs104893844	c.268G>A	p.Glu90Lys	
		138850.0011	rs797044452	c.523_742del		
		138850.0012	rs74452732	c.511G>A	p.Ala171Thr	
		138850.0013	rs281865427	c.30TC>AA	p.Asn10Lys p.Gln11Lys	
		138850.0014	rs104893847	c.959C>T	p.Pro320Leu	

^a transkripti kood Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi.

^b Variandi kood OMIM andmebaasi järgi

^c CDS – nukleotiidne asendus kodeerivas järjestuses loetuna startkoodoni algusest Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi.

GnRH on reproduktiivfüsioloogias keskse tähtsusega hormoon, mida peeti aastakümneid HPG telje ainsaks regulaatoriks. Sajandi algul eraldati põldvuttidest gonadotropiinide sünteesi inhibeeriv neuropeptiid, millele omistati reproduktiivtelje talitust mõjutav toime (Tsutsui jt., 2000), hiljem eraldati sama peptiid lindudest ning imetajatest (Kriegsfeld jt., 2006; Ubuka jt., 2008). Praeguseks on teada, et sarnaselt GnRH neuronitele asuvad imetajate hüpotalamuses ka gonadotropiine inhibeeriva hormooni (ingl. *Gonadotrophin-inhibitory hormone*, GnIH) neuronid, mis sekreteerivad samanimelist hormooni, konkureerides seeläbi GnRH signaaliga. NPVF (MIM: 616984) geeni poolt kodeeritud prekursorist lõigatakse välja kolm peptiidi (RFRP 1-3), millest RFRP-3 on GnIH funktsionaalne ortoloog imetajates (Kriegsfeld jt., 2006). GnIH teraapia põhjustab GnRH neuronite aktiivsuse langust (Anderson jt., 2009). Sellest tulenevalt langeb oluliselt ka LH tase vereseerumis (Pineda jt., 2010).

GnIH toime avaldub *NPFFR1* (MIM: 607448) geeni poolt kodeeritud retseptoriga seondudes. GnIHR on struktuurilt 7 transmembraanse domääniga retseptor, mis ekspresseeritakse GnRH neuronites ja gonadotroopsetes rakkudes (Ubuka jt., 2009). GnRH ja GnIH neuronite aksonite interakteerumine on näidatud lindude ja imetajate peal (Kriegsfeld jt., 2006; Ubuka jt., 2008). GnIH vaigistab gonadotropiinide sünteesi ja sekretsiooni läbi kahe mehhanismi: inhibeerides GnRH neuronite aktiivsust hüpotalamuses ning gonadotroopsete rakkude aktiivsust nääreajuripatsis (Clarke jt., 2008; Ubuka jt., 2009; Lima jt., 2014). Lisaks sellele on tuvastatud GnIH/GnIHR ekspressioon imetajate munandites, viidates võimalikule parakriinsele toimele mõjutamaks spermatogeneesi (Zhao jt., 2010).

Gonadotropiine vabastavate ja inhibeerivate hormoonide sekretsioon toimub lähestikku ning GnIH seondub retseptoritega kas GnRH neuronites või gonadotroopsetes rakkudes. Seetõttu on peetud tõenäoliseks, et GnIH/GnIHR tandemil on oma roll enneaegse puberteedi pidurdamisel läbi gonadotropiinide sünteesi vaigistamise (Lima jt., 2014). GnIH mehhanismi mõju meeste reproduktiivsetele parameetritele on vähe uuritud, palju pole teada GnIH/GnIHR mehhanismi toimimise muutlikusest suguküpsuse saavutamisel, mil gonadotropiinide süntees vallandab HPG telje iseregulatsiooni.

1.2.4 Gonadotropiinid

Sugunäärmete talitust vahendavad nääreajuripatsis ekspresseeruvad gonadotroopsed hormoonid FSH ja LH. Üheskoos platsentas ekspresseeruva koorioni gonadotropiiniga (ingl. *Human chorionic gonadotropin*, hCG) reguleerivad need kolm hormooni inimese reproduktiivset endokrinoloogiat – suguhormoonide tootmist, gametogeneesi, puberteedi saabumist, ovulatsiooni ning raseduse säilitamist esimestel nädalatel (Ascoli ja Puett, 2009).

Gonadotropiinid on struktuurilt heterodimeersed glükoproteiinid, mille α ja β subühikud on omavahel mittekovalentselt seotud. Gonadotropiinide α subühik (ingl. *α Gonadotropin subunit*, α -GSU) on ühine, erinevused ilmnevad *LHB* (MIM: 152780) ja *FSHB* (MIM: 136530) geenide poolt kodeeritud homoloogsete β subühikute vahel. Subühikute liitumiseks, sekreteerimiseks, retseptoritega seondumiseks ning lagunemise aeglustamiseks on vajalik translatsioonijärgne N-seoseline glükosüleerimine Golgi kompleksi läbides. Erinev glükosüleerimine toob kaasa varieeruva eluea – LH hormoonil esineb hulgaliselt N-atsetüül glükoosamiinsulfaate, millega seonduvad maksa retseptorid puhastavad LH vereringest, FSH molekulid on aga kaetud valdavalt siaalhappega ning seetõttu seondumise eest kaitstud (Weinbauer jt., 2010). Kuigi LH ja FSH sekreteeritakse nääreajuripatsist samaaegselt, on nende eluiga vastavalt 20 minutit ja 2 tundi, mistõttu võimendub näiliselt LH sekretsiooni pulsseeruv olemus (Moyle ja Campbell, 1995). Peale valgusünteesi kogutakse LH ja FSH neuronites olevatesse sekretsiooni graanulitesse, sekretsioon toimub basolateraalsetest pindmistest kihtidest ning seda reguleerib pulsseeruv GnRH, aktiveerides seega nii α ja β subühikute transkriptsiooni kui transleeritud ja modifitseeritud glükoproteiinide sekretsiooni (Bousfield ja Dias, 2011). Terve mehe ajuripatsis leidub umbkaudu 700 IU LH-i ja 200 IU FSH-i (Weinbauer jt., 2010).

Embrüonaalse arengu 10. nädalaks on LH ja FSH ajuripatsi näärmes leitavad. Testosterooni tootmine algab samal ajal ning seda stimuleerivad nii LH kui emapoolne hCG, aktiveerides sama retseptorit (Weinbauer jt., 2010). Looteas on FSH ja LH tase väga madal, arvatavasti tingitud hüpotalamuse tundlikusest testosterooni negatiivse tagasiside suhtes, mis inhibeerib GnRH sekretsiooni läbi kisspeptiini neuronite. Kõrge hCG tase embrüonaalse arengu vältel võib olla tingitud loote aju kiirest arengust, sünnitusjärgselt langeb hCG tase vereseerumis drastiliselt (Lei jt., 2001). Gonadotropiinide pulsseeruv sekretsioon saabub puberteediga.

LH ja hCG retseptorit kodeerib *LHCGR* (MIM: 152790) geen ning FSH retseptorit *FSHR* (MIM: 136435) geen. Meestel ekspresseeritakse FSH retseptorit Sertoli rakkudes munandites. FSH signaali vahendades stimuleerivad retseptorid Sertoli ja sugurakkude proliferatsiooni ning tagavad munandite normaalse arengu puberteedi lõpuni (Ruwanpura jt., 2010). Suguküpsuse saavutamisel lasub FSH signaalil oluline roll selle säilitamisel – kvalitatiivse ja kvantitatiivse spermatogeneesi aktiivsuse ning spermatogoonide tagavara hoidmine (Weinbauer jt., 2010). Vastuseks FSH signaalile hakkab Sertoli rakkudest nõrguma inhibiin B, mis on põhiline HPG telje talitusliku tagasiside signaal testosterooni kõrval. LH retseptorit ekspresseeritakse Leydig'i rakkudes munandites, nende vahendusel reguleerib LH üheskoos kohalike faktoritega steroidogeneesi ning sünteesitud testosterooni vahendusel ka spermatogeneesi, reguleerides parakriinsete faktorite sekreteerimist Sertoli rakkudes (Ramaswamy ja Weinbauer, 2014; Tremblay, 2015). Testosteroon on võimeline spermatogeneesi initsieerima ja osaleb selle hilistes staadiumites, kuid vahepealsetes etappides ning spermatosoidide kontsentratsiooni võimendamiseks on tarvis FSH aktiivsust (Weinbauer jt., 2004; Foresta jt., 2009; Liu ja Veldhuis, 2009).

Hüpotalamuse ja nääreaajuripatsi talituslikest häiretest tulenevad seksuaalse küpsemise peetused on kõige vahetumalt põhjustatud gonadotropiinide ning suguhormoonide vaegnõrituse tõttu. Nende taseme määramine vereringluses peegeldab patsiendi reproduktiivfüsioloogilist olukorda ning on levinud diagnostiline meetod. Bioaktiivsete gonadotropiinide tõhusa tootmise kiirust piirav staadium on *FSHB* ja *LHB* transkriptsioon (McNeilly jt., 2003). Talitusliku funktsiooni täitmiseks on möödapääsmatu veel ka *FSHR* ja *LHR* kodeeritud retseptorite olemasolu ning hormooniga seundumine (Ascoli ja Puett, 2009). Gonadotropiinide signaali efektiivseks edastamiseks on seega tähtis nimetatud geenide aktiivsus, mida on demonstreeritud ka loomsete uuringute käigus. *Fshb* või *Fshr* knock-out hiirtel peatuvad gameto- ja steroidogenees, ilmnevad sugutunnuste arengupeatused, puberteedi ärajäämine ning viljatus (Huhtaniemi jt., 2006). Seejuures vaigistatud *Fshb* geeniga isased hiired säilitavad viljastusvõime vaatamata vähenenud munandimahule, spermatosoidide arvule ning liikuvusele – spermatogeneesi kahjustus, mida põhjustab Sertoli rakkude puudus. Retseptori puudumisel on lisaks häiritud veel steroidogenees, tulenevalt väiksest Leydig'i rakkude kolooniast (Wreford jt., 2001; Baker jt., 2003). Seevastu *Fshr* võimendavad mutatsioonid põhjustavad retseptori pidevalt singaali edastava oleku vaatamata ligandi juuresolekule, tuues kaasa gonadotropiinidest sõltumatu gametogeneesi ületalituse nii emas- kui isasloomadel (Allan jt., 2009; Peltoketo jt., 2010).

Inimese puhul on teadaolevalt kirjeldatud viit *FSHB* avaldumist vaigistavat mutatsiooni geeni kodeerivas alas, põhjustades kõik soolise arengu peetust ning viljatust (Nagirnaja jt., 2010). Meestel põhjustab *FSHB* vaigistamine täieliku spermatooside puudumise ehk azoospermia (Ramaswamy ja Weinbauer, 2014). Tabelis 3 on välja toodud kindla fenotüübiga seostatud *FSHB* geenivariandid OMIM andmebaasi põhjal (<https://www.omim.org/>). Lisaks leidub FSH taset vereringluses mõjutavaid polümorfisme, sealjuures regulatoorne variant -211G/T (rs10835638) transkriptsiooni algussaidist “ülesvoolu” jäävas promootoralas. Nimetatud varianti on uuritud Eesti noorte meeste seas ning leitud seos FSH vaegusega – minoorse alleeli kandjatel on FSH tase madalam (Grigorova jt., 2008). Hilisemad uuringud viljatute meeste (Grigorova jt., 2010) ning Saksa meeste (Tüttelmann jt., 2012) seas kinnitasid variandi minoorse alleeli seost madalama FSH tasemega. Tegemist on teadaolevalt ainsa kirjeldatud *FSHB* variandiga, mille otsene seos FSH kontsentratsiooniga inimese vereringluses on tõestatud. Lisaks on nimetatud uuringutes leitud kokkulangevaid seoseid -211G/T variandi ning spermatooside madalama üldarvu ning kontsentratsiooniga, viidates spermatogeneesi langusele.

FSHR avaldumist vaigistavad mutatsioonid kahjustavad naistel ovogeneesi ning meestel spermatogeneesi (Lalioi, 2011). 5' UTR alas paiknev regulatoorne variant -29G/A (rs1394205) põhjustab *FSHR* transkriptsiooni langust, tuues kaasa retseptori puudulikkuse üheskoos munasarjade signaalitundlikkuse vähenemisega (Desai jt., 2011). Kaks levinud polümorfismi c.A919G (p.Ala307Thr; rs6165) ja c.2039A>G (p.Ser680Asn; rs6166) asuvad mõlemad geeni kümnendas eksonis aheldatud lookustes ning esinevad koos c.G919-G2039 või c.A919-A2039 variantidena (Loutradis jt., 2008). Kirjeldatud on variantide c.A919-A2039 seost kõrgema FSH kontsentratsiooniga vereringluses ja retseptori signaali tugevusega munasarjades (Yao jt., 2011).

Uuritud on ka *FSHB* (-211G/T) ja *FSHR* (c.A2039G) variantide koosmõju meestele. Retseptorite kõrgem tundlikkus AA homosügootidel võib mingil määral kompenseerida -211G/T T-alleeli põhjustatud FSH transkriptsiooni languse, seejuures retseptorgeeni GG variant avaldab märkimisväärset mõju vaid -211G/T minoorse alleeli kandjate seas (Tüttelmann jt., 2012).

Lhb knock-out hiirte prenataalne sooline diferentseerumine toimub tavapäraselt, sugunäärmete arengus ilmnevad peetused – munandid on väiksemad ning sisaldavad vähem Leydig'i rakke, munasarjades puudub kollaskeha (Narayan, 2015). Viljatus kujuneb välja puberteediga, kui LH tase vereringluses jääb alla avastamispääri ning suguhormoonide tase on drastiliselt langenud, põhjustades gametogeneesi seiskumise hilistes staadiumites (Narayan, 2015).

Lhcgr knock-out hiirtel ilmnevad samuti arengupeetustega sootunnused, gonadotropiinide sekretsioonist hoolimata püsib suguhormoonide tase väga madal (Lei jt., 2001). Isastel hiirtel esineb krüptorhism ja väike munandimaht, kahjustunud on testosterooni tootmine, Leydig'i rakkude areng ning spermatogenees (Narayan, 2015).

Inimese puhul on kirjeldatud teadaolevalt kaheksa *LHB* variandi seost kindla fenotüübiga (Tabel 3) OMIM andmebaasi põhjal (<https://www.omim.org/>). LH puudulikkusest põhjustatud IHH kujuneb suguküpsuse saavutamisel, kui ilmnevad hiline puberteet ja spermatogeneesi seiskumine ning azoospermia (Lofrano-Porto jt., 2008). Seejuures läbitakse loote normaalne areng, sugunäärmete moodustumist ning suguhormoonide tootmist reguleerivad kaks kompenseerivat signaali – ajuripatsi päritolu LH ning platsenta päritolu hCG. Kõige paremini uuritud LH polümorfism Euroopa populatsioonis on *LHB* geeni variatsioon kombineerituna variantidest c.82T>C (p.Trp28Arg; rs34349826) ja c.104T>C (p.Ile35Thr; rs1800447), põhjustades β subühiku liigse glükosüleerimissaidi vabastamise (Suganuma jt., 1996). Nimetatud funktsionaalse Variantse luteiniseeriva hormooni ehk V-LH puhul on kirjeldatud hormooni bioaktiivsuse tõusu ja eluaja lühenemist (Manna jt., 2002;), teisalt viitavad mitme uuringu tulemused asjaolule, et V-LH talituslik aktiivsus ei ületa metsiktüüpi hormooni ning püsib vereringluses kauem (Nagirnaja jt., 2010; Wide jt., 2010). Eestis on läbi viidud uuring Balti noorte meeste ning Eesti idiopaatiliselt viljatute meeste valimis üheskoos reproduktiivsete hormoonide ja parameetrite põhjaliku andmestikuga. Seejuures genotüpiseeriti üle 1500 patsiendi V-LH suhtes, uuringu tulemused seostavad variantset hormooni kõrgema LH tasemega vereseerumis nii noorte kui viljatute meeste seas (Punab jt., 2015).

Tabel 3. Fenotüübiga seostatud *FSHB* ja *LHB* variandid.

Geen	Transkript ^a	Variant		Asendus		Seostatud fenotüüp
		OMIM ^b	rs ID	CDS ^c	Valk	
<i>FSHB</i>	ENST00000254122.7	136530.0001	rs5030646	c.236_237del	p.Val79Glu	IHH
		136530.0002	rs5030776	c.205T>G	p.Cys69Gly	
		136530.0005	rs121909666	c.282C>A	p.Tyr94Ter	
		136530.0006	rs5030777	c.298T>C	p.Cys100Arg	
<i>LHB</i>	ENST00000221421.6	152780.0001	rs5030773	c.221A>G	p.Gln74Arg	
		152780.0004	rs121912517	c.167G>A	p.Gly56Asp	
		152780.0005	rs786204822	c.183+1G>C		
		152780.0006	rs786204823	c.88_96del	p.His30_Ile32del	
		152780.0007	rs769066903	c.28_39del	p.Leu10_Leu13del	
		152780.0008	rs786204822	c.183+1G>T		
		152780.0003	rs5030774	c.364G>A	p.Gly122Ser	
		152780.0002	rs34349826	c.104T>C	p.Ile35Thr	
			rs1800447	c.82T>C	p.Trp28Arg	

^a transkripti kood Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi.

^b Variandi kood OMIM andmebaasi järgi

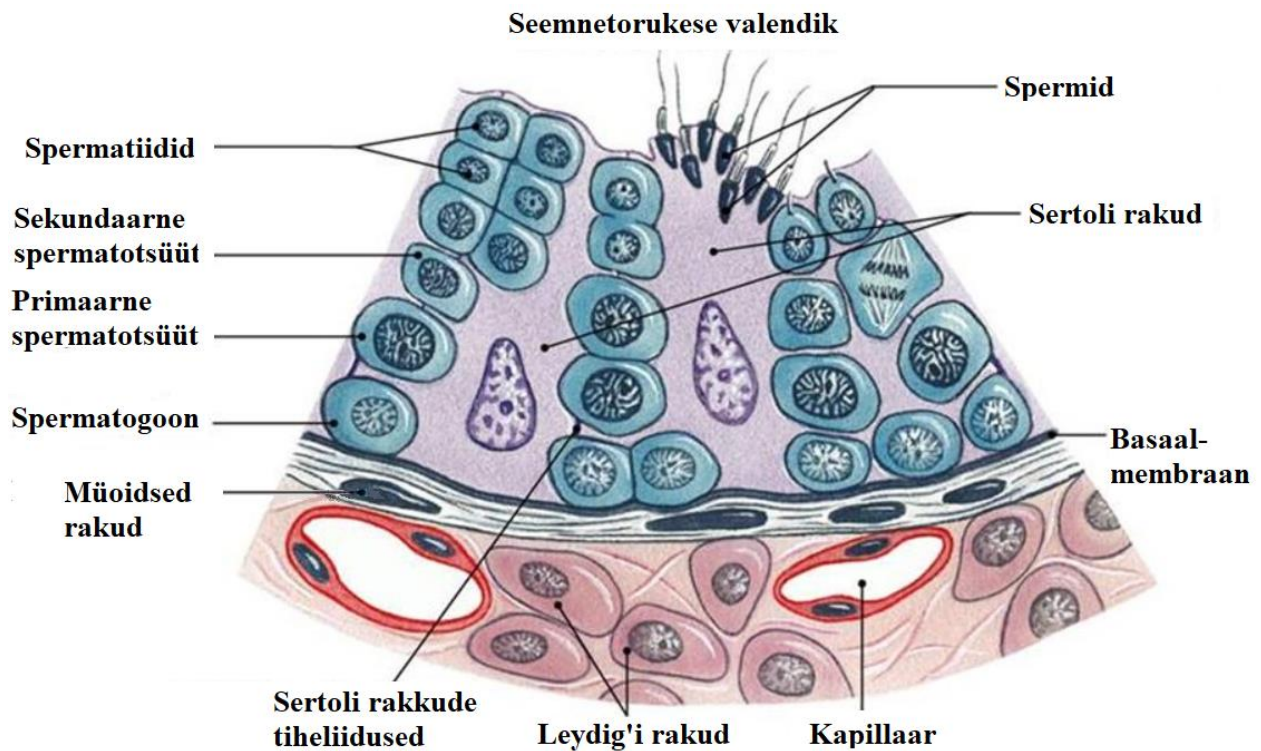
^c CDS – nukleotiidne asendus kodeerivas järjestuses loetuna startkoodoni algusest Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi.

1.2.5 Steroidogenees ja spermatogenees

Munandikotis asuvates munandites toimub steroido- ja spermatogenees – morfoloogiliselt ja funktsionaalselt erinevates rakkudes toimuvad protsessid, mis vastutavad seemnerakkude tootmist ning arengut stimuleerivate hormoonide eest. Munandid koosnevad enamjaolt kahest struktuursest komponendist – väänilistest seemnetorukestest ja sidekoelisest vaheruumist. Munandite talitus sõltub hüpotalamuse-ajuripatsi endokriinsest regulatsioonist, mida moduleerivad lokaalsed parakriinsed mehhanismid (Weinbauer jt., 2010).

Spermatogenees leiab aset väänilistes seemnetorukestes, mis moodustavad 60 – 80% munandite ruumalast ja koosnevad Sertoli ja müoidsetest rakkudest. Sertoli rakud kinnituvad seemnetorukese basaalmembraanile ning pikenevad valendiku suunas (Joonis 2). Sertoli rakud vahendavad androgeenide signaale ning sekreteerivad suurel hulgal lokaalseid faktoreid – kogu rakukeha ulatuses toimub morfoloogiline ja füsioloogiline kontakt erinevates paljunemise, diferentseerumise, kasvamise ja küpsemise etappides olevate seemnerakkudega. (Weinbauer jt., 2010). Spermatogenees algab ürgseemnerakkude ehk spermatogoonide mitootilise jagunemisega, millest osa diferentseeruvad primaarseteks spermatotsüütideks (Ehmcke ja Schlatt, 2006). Algab seemnerakkude küpsemine – primaarsed spermatotsüüdid läbivad esimese meiotilise jagunemise, mille käigus toimub geneetilise materjali crossingover homoloogiliste kromosoomide vahel. Moodustunud sekundaarsed spermatotsüüdid läbivad meioosi teise jagunemise, mille käigus tekivad haploidsed ümarad spermatiidid. Järelküpsemise käigus läbivad spermatiidid põhjaliku diferentseerumise spermideks – fagotsütoosi teel eraldub üleliigne tsütoplasma koos organellidega ning moodustuvad vibur ja lüütiliste ensüümidega akrosoom. Spermid vabanevad seemnetorukese valendikku (Weinbauer jt., 2010).

Steroidogenees toimub seemnetorukeste ümber paiknevates Leydig'i rakkudes, protsessi reguleerivad LH ja lokaalsed faktorid. Sughormoonid on rasvlahustuvad kolesterooli derivaadid, mis pääsevad tänu lipiidsele struktuurile kergesti läbi rakumembraani, seondudes AR või ER retseptoritega (Strauss, 2009). Kolesterool pääseb Leydig'i rakkudesse madala tihedusega lipoproteiinide (ingl. *Low-density lipoprotein*, LDL) koosseisus või sünteesituna kohapeal atsetüül-CoA-st (Weinbauer jt., 2010). Hiljutiste uuringute valguses algab sughormoonide tootmine inimeses kaks nädalat varem seni arvatust – steroidogeneesi ensüümide ekspressioon tõuseb järsult embrüonaalse arengu 53. päeval (Mamsen jt., 2017).



Joonis 2. Väänilise seemnetorukese sektorlõige. Spermatogenees leiab aset väänilistes seemnetoruketes, mis koosnevad Sertoli ja peritubulaarsetest müoidsetest rakkudest. Sertoli rakud kinnituvad seemnetorukese basaalmembraanile ning pikenevad valendiku suunas. Seemnetoruketes võib leida erinevates etappides seemnerakke, alates spermatogoonidest kuni küpsete spermideni, mis sekreteeritakse seemnetorukese valendikku. Joonis: (Martini, 2004).

Testosteroon on meestes tähtsaim ja enim produtseeritud androgeen, munandites sünteesitakse 6 – 7 mg testosterooni päevas (Weinbauer jt., 2010). Testosteroon on prekursoriks kahele tugeva bioloogilise aktiivsusega hormoonile: DHT ja E_2 . Vabal kujul esineb meeste vereringluses testosterooni vaid 2% (Weinbauer jt., 2010). 65% testosteroonist ja 30% E_2 -st on inaktiivses olekus seotud suguhormoone siduva globuliiniga (ingl. *Sex hormone-binding globulin*, SHBG), difundeerudes kompleksi küljest lahti sihtmärkkoe ni jõudes (Strauss, 2009). Ülejäänud on seotud albumiiniga, mille afiinsus testosterooni suhtes on 100 korda väiksem kui SHBG-l (Weinbauer jt., 2010). Albumiiniga seostunud testosteroon säilitab oma bioloogilise aktiivsuse ning on defineeritav bioaktiivse testosteroonina (BioT).

1.3 Kandidaatgeenide assotsiatsiooniuringud

Inimese geneetilise varieeruvuse üheks põhiliseks avaldumisviisiks on üksiknukleotiidsete geneetiliste variantide ilmnemine. Kogu inimese genoomi ulatuses esineb umbkaudu 3,7 miljonit SNV-d (Lam jt., 2011). Seetõttu on nad sobilikud geneetilised markerid assotsiatsiooniuringuteks, mille käigus võrreldakse haigeid (juhte) ja terveid (kontrolle) indiviide levinud geenivariantide suhtes leidmaks seoseid mingi kindla fenotüübiga. Mastaapseim analüütiline meetod siinkohal on ülegenoomne assotsiatsiooniuring (ingl. *genome-wide association study*, GWAS), mille puhul on uurimise all arvukad SNV-d kogu genoomi ulatuses ning fookus peamiselt seoste leidmisel laialt levinud haigustega. Seejuures tuvastatakse küll seos variatsiooni ja fenotüübi vahel, kuid kindlat järeldust haigust põhjustavate geenide kohta teha veel ei saa. Assotsiatsiooniuringuid võib läbi viia ka konkreetsetemalt, kandidaadipõhiste uuringute näol, mis keskenduvad väiksemale DNA regioonile või geenile. Sellisel juhul määratletakse huvipakkuvad kandidaatgeenid toetudes teadmistele geeni funktsiooni ja mõju kohta uuritava fenotüübi suhtes.

Käesoleva uuringus keskendutakse reproduktiifüsioloogia seisukohast möödapääsmatu tähtsusega HPG telje signaali ülekande eest vastutavatele geenidele. Toetudes varem avaldatud uuringute tulemustele on põhjust kõnealuste geenide variantidele omistada pärilik roll reproduktiivsüsteemi haiguste tekkimisel, mistõttu kuuluvad need uuringu fookuses olevate kandidaatgeenide hulka. HPG telje hormoonide ja nende retseptorite funktsioone ning nende signaali puudumisel põhjustatud korvamatut kahju organismile ilmestavad uuringud vaigistatud geenidega loomudelitel (Tabel 4). Lisaks on huvipakkuvad GnIH ja selle retseptorit kodeerivad geenid, mille mutatsioone veel kindla tunnusega seostatud ei ole, kuid seniste uuringute valguses on põhjust oletada kõnealuse tandemi mõju gonadotropiinide sekretsioonile (Anderson jt., 2009; Pineda jt., 2010; Lima jt., 2014) ning võimalikku osalust spermatogeneesil (Zhao jt., 2010).

Uuringu valimiks on noored Balti mehed, kelle mõõdetud reproduktiivsete parameetrite seas puuduvad viljatusele viitavad väärtused. Sellegipoolest on võrdlus hilinenud puberteedi ja IHH patsientidega autori silmis asjakohane, sest aitab heita valgust HPG telje talituslike häirete patogeneesile. Soolised väärarengud üheskoos viljatusega on selle resoluutseim vorm, mida põhjustavad enamasti üksikud haruldased mutatsioonid. Reproduktiivsete parameetrite kõikumist võivad soodustada ka vähem penetrantsed pärilikud muutused, mis on populatsioonides sagedamini esinevad ning korraga avaldudes võivad üksteise toimet võimendada.

Tabel 4. HPG telje geenide mõju uuringud *knock-out* hiirtega.

Geen	Humoraalne muutus	Fenotüübiline muutus	Allikas
<i>Kiss1</i>	FSH↓	Sugutunnuste arengupeetus	Tassigny jt., 2007
	LH↓	Spermatogenees peatub	
	Testosteroon puudub	Puberteet ei saabu	
<i>Kiss1r</i>	FSH↓	Sugutunnuste arengupeetus	Lapatto jt., 2007
	LH↓	Spermatogenees peatub	
	Testosteroon ↓	Viljatus	
<i>Gnrh1</i>	GnRH ↓	Sugutunnuste arengupeetus	Cattanach jt., 1977
	FSH↓	Spermatogenees peatub	
	LH↓	Puberteet ei saabu	
<i>Fshb</i>	FSH↓	Munandite arengupeetus	Kumar jt., 1997
		Spermatogenees langeb	
<i>Fshr</i>	Testosteroon ↓	Munandite arengupeetus	Baker jt., 2003
		Puberteet ei saabu	
<i>Lhb</i>	LH↓	Munandite arengupeetus	Ma jt., 2004
	Testosteroon ↓	Spermatogenees peatub	
		Viljatus	
<i>Lhr</i>	Testosteroon ↓	Sugutunnuste arengupeetus	Zhang jt., 2001
		Spermatogenees peatub	

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on kirjeldada geneetilist varieeruvust inimese reproduktiivtelje hormone ning nende retseptoreid kodeerivate geenides (*KISS1*, *KISS1R*, *GNRH1*, *GNRHR*, *FSHB*, *FSHR*, *LHB*, *LHCGR*, *NPVF*, *NPPFR1*, *INHA* ja *INHBB*), skriinida ja genotüpiseerida variandid, mis võiksid potentiaalselt mõjutada reproduktiivsete hormoonide taset veres, munandimahtu ja spermatogeneesi ning esineda Balti noorte meeste valimis.

Töö täpsemad eesmärgid:

1. Mehe reproduktiivtelje hormone ja nende retseptoreid ekspresseerivate geenide talitusliku funktsiooni kirjeldamine ning variantide skriinimine ja potentsiaalselt funktsionaalsete SNV-de genotüpiseerimine Balti noorte meeste valimis (n = 982).
2. Balti noorte meeste valimi assotsiatsiooniuuring genotüpiseerimise andmetega leidmaks seoseid reproduktiivhormoonide (FSH, LH, SHBG, inhibiin B, E₂, testosteroon ja selle derivaadid) tasemega vereseerumis, sugutunnusega (munandimaht) ning sperma parameetritega (ejakulaadi maht, spermatosoidide kontsentratsioon, -üldhulk, -morfoloogia ja -liikuvus).

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Valim

Uuringus kasutati Tartu Ülikooli Androloogiakeskuse, *Riga Family and Sexual Problems Centre* ning *Institute of Endocrinology of Kaunas University of Medicine* poolt paralleelselt kogutud kohortvalimit Balti noortest meestest. Valimi kogumine oli osa Euroopa Liidu teadus- ja arendustegevuse 6. raamprogrammist QLRT-2001-02911 (ingl. *European Union Sixth Framework Project*). Valim koosneb Eesti (n = 502), Läti (n = 216) ja Leedu (n = 264) ajateenistusse astunud kutsealustest, uuringu tunnistasid sobilikuks Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komitee (27.01.2003), Riia Stradiņši Ülikooli Eetika Komitee (23.04.2003) ja Kaunase Regionaaleetika Komitee (nõusoleku nr 13, 2003) (Punab jt., 2015).

Katsealuste kaasamine, kliiniliste parameetrite ning vere- ja seemneproovide kogumine toimus kolmes keskuses identse protokollil alusel (Punab jt., 2002). Kõik katsealused olid sündinud ning elasid andmete kogumise hetkel samas riigis vastavalt keskusele. Kliiniliste andmete ja füsioloogiliste proovide kogumine viidi läbi kolme keskuse töötajate poolt ajavahemikus mai 2003 kuni juuni 2004. Uuringus osalemine oli vabatahtlik ning kõigilt katsealustelt võeti kirjalik informeeritud nõusolek.

Kõigilt katsealustelt võeti ajavahemikus 8:00 – 13:00 kubitaalveeni kaudu vereproov. DNA eraldamine viidi läbi soolamise meetodil Inimese geneetika uurimisgrupi liikmete poolt. Reproduktiivsete hormoonide tase määrati eraldatud vereseerumis Kopenhaageni Riigihaigla Kasvu- ja Reproduktiivsuskonnas, kasutades aeg-resolutsiooniga immuunofluoromeetrilist testi (TR-IFMA; Delfia, Wallac, Turku, Soome), aeg-resolutsiooniga fluoroimmuunanalüüsi (TR-FIA; Delfia, Wallac), radioimmuunanalüüsi (RIA; Pantex, Santa Monica, CA, USA) ning kahesaidilist ensüüm-immunomeetria analüüsi (EIMA; Serotec, Oxford, UK).

Sõltuvate parameetrite (BioT ja FT) väärtused tuletati vereseerumis määratud testosterooni ja SHBG väärtuste põhjal kasutades Vermeulen'i valemit (Vermeulen jt., 1999). Vaba androgeeni indeksi (ingl. *Free androgen index*, FAI) arvutamisel kasutati valemit: testosteroon (nmol/L) : SHBG (nmol/L) x 100. Sõltuvat parameetrite väärtused on varasemalt välja arvutatud Inimese geneetika uurimisgrupi liikmete poolt.

Katsealused kogusid seemneproovi masturbatsiooni teel labori lähedal asuvas privaatses ruumis, ejakulatsioon koguti eelkaalutud steriilsesse nõusse. Pärast ejakulatsiooni inkubeeriti seemneproove 37° C 30-40 minutit. Spermaanalüüs viidi läbi varasema protokollil alusel (Punab jt., 2002). Ejakulaadi mahtu hinnati kaalumise teel, lahutades kaalutisest kogumisnõu kaal ning eeldades, et 1g = 1ml. Spermatooside kontsentratsiooni määramiseks kasutati Neubaueri hemotsütoomeetrit, munandimahu määramiseks orhidomeetrit (Pharmacia & Upjohn, Kopenhaagen, Taani). Spermatooside liikuvuse hindamiseks kasutati WHO hindamissüsteemi, mille kohaselt progressiivsed ehk edasiliikuvad spermatoosid klassifitseeritakse kui “AB” ning mitteprogressiivsed ehk paigal liikuvad spermatoosid kui “C”. Väljendatud on spermatooside klassi osakaalu protsentides.

Käesolevas geneetilise assotsiatsiooni uuringus kasutati 1040 (545 Eesti, 272 Läti ja 223 Leedu) indiviidi kliinilisi andmeid ning vereproovidest eraldatud DNA proove. Valimist kõrvaldati 29 katsealust, kelle kohta oli kliinilisi andmeid krüptorhismi, munandite haiguste, azoospermia või anaboolsete steroidide kuritarvitamise kohta. Lisaks kõrvaldati 29 katsealust, kelle puhul osutus eraldatud DNA kogus genotüüpiseerimiseks piisamatuks.

Lõplikult kasutati uuringus 982 Balti noore mehe (Eesti n = 502, Läti n = 216 ja Leedu n = 264 DNA-d ja kliinilisi andmeid (Tabel 5). Töö autor kasutas Inimese geneetika uurimisgrupi liikmete poolt varasemalt katsealuste vereseerumist eraldatud DNA proove indiviidide genotüüpiseerimiseks ning analüüsis geneetilisi seoseid kohandatud valimi andmetega.

Tabel 5. Balti noorte meeste kliinilised andmed.

Parameeter (ühik)	Balti noorte meeste uuringugrupp (n = 982)	
	Keskmine $\pm$ SD	Mediaan (p5 – p95)
Vanus (aastat)	20,2 $\pm$ 2,04	19,8 (17,4 – 24,1)
Kehamassiindeks (kg/m ²)	22,3 $\pm$ 2,56	22,1 (18,8 – 27,1)
Vereproovi võtmine (minutit peale 8:00)	147,6 $\pm$ 75,7	130 (40 – 295)
Suguline karskus (tundi)	107,5 $\pm$ 62,8	86 (48 – 227)
FSH (IU/L)	3,06 $\pm$ 1,63	2,73 (1,16 – 6,25)
LH (IU/L)	4,03 $\pm$ 1,64	3,82 (1,81 – 6,94)
Testosteroon (nmol/L)	27,5 $\pm$ 9,06	26,6 (14,7 – 44)
E ₂ (pmol/L)	94 $\pm$ 25,5	90 (59 – 141)
SHBG (nmol/L)	34,5 $\pm$ 13,9	32 (17 – 58)
FT (nmol/L)	0,63 $\pm$ 0,22	0,6 (0,33 – 1,01)
BioT (nmol/L)	14,8 $\pm$ 5,27	14 (7,74 – 23,8)
Inhibiin B (ng/L)	228 $\pm$ 78,5	219 (114 – 371)
FAI (%)	87,1 $\pm$ 34,2	80,7 (45,6 – 144,2)
Munandimaht (ml)	49,3 $\pm$ 10,5	50 (33 – 70)
Ejakulaadi maht (ml)	3,5 $\pm$ 1,62	3,26 (1,3 – 6,4)
Spermatooside kontsentratsioon (mln/ml)	80,2 $\pm$ 73,6	62,8 (9,08 – 207,1)
Spermatooside üldhulk ejakulaadis (mln)	271,5 $\pm$ 275,2	206,7 (18,4 – 736,5)
Normaalse kujuga spermatoosidid (%)	11,8 $\pm$ 4,87	12 (4 – 19)
Spermatooside liikuvus AB ^a (%)	57 $\pm$ 13,5	58 (34 – 76,3)
Spermatooside liikuvus AB + C ^b (%)	71,3 $\pm$ 12,1	73 (50,7 – 86,7)

FT – vaba testosteroon, ringleb veres valkudega sidumata kujul.

BioT – bioaktiivne testosteroon, ringleb veres sidumata või albumiiniga seotud kujul.

FAI – vaba androgeeni indeks, bioloogiliselt aktiivse (FT + BioT) testosterooni osakaal.

^a progressiivsete ehk edasiliikuvate spermatooside (AB) osakaal.

^b mitteprogressiivsete ehk kohapeal liikuvate spermatooside (C) osakaal.

2.2.2 Geneetiliste variantide leidmine

Käesolevas uuringus pöörati tähelepanu HPG telje hormoone ning nende retseptoreid kodeerivates geenides esinevatele üksiknukleotiidsetele geneetilistele variatsioonidele. Uuringu eesmärgiks oli leida geeni avaldumist potentsiaalselt mõjutavaid variante, millel võib olla seos reproduktiivsete parameetritega noore mehe organismis. Geneetilise varieeruvuse analüüsimisel kasutati ExAC konsortsiumi andmebaasi, kuhu on talletatud enam kui 60 000 indiviidi täiseksoomi sekveneerimise andmed (<http://exac.broadinstitute.org/>). Tähelepanu all olid *KISS1*, *KISS1R*, *GNRH1*, *GNRHR*, *FSHB*, *FSHR*, *LHB*, *LHCGR*, *NPVF*, *NPFFR1*, *INHA* ja *INHBB* geenid, ühtekokku 1495 SNV skriinimine toimus järgnevate kriteeriumite alusel:

1. SNV asub kodeerivas või reguleerivas piirkonnas ning põhjustab transkriptsiooni käigus aminohappe asendumise (ingl. *Missense*), lugemisraami nihke (ingl. *Frameshift*), stoppkoodoni kadumise (ingl. *Stop lost*), startkoodoni kadumise (ingl. *Start lost*), stoppkoodoni tekkimise (ingl. *Stop gained*), deletsiooni (ingl. *Deletion*), insertiooni (ingl. *Insertion*) või häiritud splaissimise (ingl. *Splice donor/acceptor*).
2. SNV minoorse alleeli sagedus (ingl. *Minor allele frequency, MAF*) Euroopa populatsioonis vähemalt 5% ehk $MAF = 0,05$.
3. SNV mõju valgu funktsioonile on eelistatult vähemalt ühe annotatsiooni tarkvara (SIFT või PolyPhen-2) poolt hinnatud kahjulikuks.
4. SNV-d sisaldav geeni isovorm ekspresseerub HPG telje moodustavate näärmete kudedes.

Kriteeriumitele 1 ja 2 vastavate SNV-de puhul hinnati nende asukoha konserveeritust. Mõned valkude koosseisus olevad aminohapped varieeruvad liikide vahel väga vähe, kõrge konserveeritus kindlas positsioonis viitab aminohappe vajalikule rollile valgu struktuuri ja funktsiooni tagamisel ning mutatsioonidel neis positsioonides on tõenäoliselt kahjulik mõju. Täpsemalt lähtuti tarkvarade SIFT ja PolyPhen-2 annotatsioonidest, mis ennustavad ühenukleotiidse variandi tagajärjel asenduva aminohappe potentsiaalset mõju valgu funktsioonile (Kumar jt., 2009; Adzhubei jt., 2013). Mõju suurust hinnatakse skooriga, mille arvutavad

algoritmid valgu struktuuri ning aminohappe konserveerituse põhjal antud positsioonis valgu ortoloogide seas (Tabel 6). Huvi pakkuvad SNV-d hinnati eelistatult vähemalt ühe tarkvara poolt patogeenseks või tõenäoliselt patogeenseks.

Tabel 6. SIFT ja PolyPhen-2 annotatsiooni skoorid.

Tarkvara	SNV ennustatav mõju			Koduleht
	Patogeenne	Tõenäoliselt patogeenne	Healoomuline	
SIFT	0 – 0,05		0,05 - 1	http://sift.bii.a-star.edu.sg/
PolyPhen2	1 – 0,85	0,85 – 0,15	0,15 - 0	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2

Annotatsiooni skooride piirväärtused on 0 – 1.

Paljude eukarüootsete geenide puhul toimub transkriptsioonijärgne mRNA alternatiivne splaissing (ingl. *Alternative splicing*), mille käigus kombineeritakse mitmel viisil sama geeni eksoneid, saades erinevaid valgu isovorme (ingl. *Isoform*). Tavaliselt toimub alternatiivne splaissing koospetsiifiliselt. Geeniekspressiooni kvantitatiivne hindamine erinevates kudedes on tänu RNA sekveneerimisele (ingl. *RNA sequencing*) muutunud täpseks ning võimaldanud luua andmebaase uurimaks geenivariatsioonide seoseid ekspressiooniga (Wang jt., 2016) (Yalamanchili jt., 2014). Käesoleva uuringu raames on oluline, et uuritav SNV kuuluks nende isovormide koosseisu, mis ekspresseeruvad HPG telje moodustavate näärmete kudedes. Õige ekspressiooni hindamiseks kasutati GTEx andmebaasi, kuhu on talletatud postuumselt 449 indiviidi RNA sekveneerimise andmed 44 erinevas koes (<https://www.gtexportal.org/home/>). Lõplikku valikusse kaasatud SNV-de võimalikke tagajärgi modelleeriti *in silico*. Selleks kasutati mitmeid andmebaase ja tarkvarasid ühendavat platvormi HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>), mis analüüsib aminohappelise muutuse potentsiaalset mõju valgu struktuurile ning talitusele (Venselaar jt., 2010).

2.2.3 Genotüpeerimine

Genotüpeerimiseks kasutati RT-PCR meetodit ning *TaqMan SNP* genotüpeerimise reagente (Applied Biosystems, USA). RT-PCR meetod võimaldab proove amplifitseerida ning tulemusi jälgida reaajas. TaqMan SNP genotüpeerimine põhineb DNA polümeraasi 5'-3' nukleaassel aktiivsusel. Genotüpeerimiseks kasutati Applied Biosystems-i poolt eelnevalt disainitud *SNP Genotyping Assay*'d (Tabel 7).

Tabel 7. Genotüpeerimiseks kasutatud *SNP Genotyping Assay*'d.

Geen	rs ID	Assay number
<i>KISS1</i>	rs4889	C__8758863_10
<i>KISS1</i>	rs12998	C__11457992_10
<i>GNRH1</i>	rs6185	C__1529427_1_
<i>NPFFR1</i>	rs3812694	C__1775467_10

Genotüpeerimiseks valmistati iga indiviidi DNA proovist alikvoot kontsentratsiooniga 10 ng/μl (± 3 ng/μl) ning lõppruumalaga 35 μl. Alikvootide kontsentratsiooni kontrolliti NanoDrop T042 Technical Bulletin spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR reaktsiooniks kulus 2 μl DNA alikvooti (~ 20 ng), kasutati *Dry-down* DNA meetodit, mille puhul plaadile pipeteeritud DNA-d kuivatati üleöö steriilsetes tingimustes. Seejärel lisati 5 μl eelnevalt valmis segatud reaktsioonisegu ühe proovi kohta. Iga plaadi kohta tehti kolm nullproovi (ingl. *No template control*, NTC) kontrollimaks analüüsi puhtust ja võimalikku valepositiivsust. Reaktsioonisegu koosnes järgmistest komponentidest:

0,25 μl	TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems)
1 μl	5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Eesti)
3,75 μl	MQ deioniseeritud H ₂ O

RT-PCR-i reaktsiooni läbiviimiseks kasutati reaalaja termotsüklereid AB7900HT või QuantStudio 12K Flex (mõlemad Thermo Fisher Scientific). PCR plaadi lugemiseks ja tulemuste analüüsimisel kasutati tarkvara SDS 2.4 (Thermo Fisher Scientific). Polümerisatsiooni ahelreaktsiooni tingimused olid järgmised:

Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 40 tsüklit
Seondumine/elongatsioon	60 °C	1 min	
Inaktivatsioon	-	2 min	

2.2.4 Statistiline analüüs

Uuringus osalenud indiviidide kliiniliste parameetrite sagedusjaotust visualiseeriti histogrammidena, kus X-teljel on tunnuste väärtused ühikutes ning Y-teljel indiviidide sagedus protsentides. Parameetrite väärtuste jaotust iseloomustab valimi modaalklass (ingl. *Modal class*), kuhu kuulub enim indiviide. Normaalkotuse puhul langeb valimi modaalklass kokku valimi keskmise väärtusega. Väärtuste sagedusjaotuse vastavust normaaljaotusele kirjeldab arvuliselt Kolmogorov-Smirnov test, mis võrdleb väljapakutud jaotuvust teoreetilise normaaljaotusega ning kahe jaotusfunktsiooni kokkulangevus avaldub *P*-väärtusena. Väärtuste jaotus antud valimis kaldus normaaljaotusest kõrvale põhiliselt modaalklassi ja keskmise väärtuse erine misest ning üksikute suurte väärtuste poolt põhjustatud „sabadest“.

Valimi reproduktiivsete parameetrite statistiliseks analüüsiks kasutati tarkvara Stata® (versioon 13 SE, StataCorp LP, Texas, USA). Valimi genotüüpide jaotust hinnati χ^2 testiga ning kontrolliti Hardy-Weinbergi tasakaalu suhtes. Kõiki uuritavaid SNV-e eraldi arvesse võttes jagati indiviidid kolme rühma vastavalt genotüübile, iga rühma tunnuste kohta arvutati aritmeetiline keskmine, standardhälve, mediaan ning 5 % ja 95 % protsentiilid.

Geneetilise markeri kandjate ja mitte kandjate grupi reproduktiivsete parameetrite võrdlemiseks kasutati Mann-Whitney U testi, minoorse alleeli homosügootide võrdlemiseks teiste genotüüpidega kasutati Kruskal-Wallis testi. Need mitte-parameetrilised analüüsid on sobilikud võrdlemaks erinevate proovide arvuga gruppe, võttes arvesse väärtuste mediaani ning jaotuvust. Analüüsid tehakse teisendamata andmetega ning võtmata arvesse kofaktoreid. Analüüside

väljundiks on P -väärtused, mille puhul tehti parandus Bonferroni meetodil. Statistiliselt oluliseks P -väärtuseks hinnati Mann-Whitney testi puhul $0,05/3 = 0,0167$ (analüüsitud parameeter ja 2 genotüüpi) ning Kruskal-Wallise testi puhul $0,05/4 = 0,0125$ (analüüsitud parameeter ja 3 genotüüpi).

Geneetiliste markerite ja reproduktiivsete parameetrite vaheliseks assotsiatsioonianalüüsiks kasutati tarkvara PLINK (versioon 1.07) (Purcell jt., 2007). See võtab arvesse kofaktorid ning arvutab välja regressiooni koefitsendi β ehk geenivariandi alleeli mõju parameetri väärtusele selle ühikutes. Kofaktoritena võeti arvesse vanust, kehamassiindeksit ja suitsetamist, lisaks verevõtmise kellaaega või sugulist karskust, vastavalt hormoonide taseme ning spermatunnuste analüüsil. Korrektsema analüüsi eelduseks peavad parameetrite väärtused jääma normaaljaotuse lähedale. Väärtuste sagedusjaotust saab parandada tunnuste tranformeermise läbi, mis aitab neid rohkem keskväärtuse lähedale kokku tuua, selleks kasutati naturaallogaritmimist. Transformeeritud andmetega teostatud analüüsi regressiooni koefitsent teisendati algskaalale tagasi. Väärtusi ei teisendatud munandimahu, normaalse kujuga spermide ning spermide liikuvuse AB ja liikuvuse ABC puhul. Nimetatud parameetrite puhul ei toonud naturaallogaritmimine väärtusi normaaljaotusele lähemale, mistõttu kasutati transformeerimata andmeid. Teisendamise tulemusel paranesid Kologorov-Smirnovi testi P -väärtused, väljaarvatud nelja parameetri puhul: spermide liikuvus AB, liikuvus ABC, normaalse kujuga spermatosoidid ja munandimaht (Lisa 1). Tunnuste vaheliste seoste kirjeldamisel kasutati lineaarse regressioonanalüüsi aditiivset ja retsessiivset mudelit. Retsessiivse mudeli puhul võtab algortim arvesse, et analüüsitava SNV minoorne alleel avaldub retsessiivselt (mõju avaldub vaid homosügootide seas, AA/Aa – aa). Alleeliefekti tugevust hinnati regressiooni koefitsendi β ja P -väärtuse abil. P -väärtuse põhjal järeldusi tehes võeti arvesse Bonferroni parandust mitme tunnuse testimise suhtes (2 mudelit x 11 parameetrit). Statistiliselt oluliseks P -väärtuseks loeti $0,05/22 = 2,27 \times 10^{-3}$. Lisaks leiti valimi usaldusintervallid 5 % ja 95 % ning standardviga (ingl. *Standard error*).

2.3 Tulemused

2.3.2 Geneetiliste variantide valik

Reproduktiivsete hormoonide taset ja spermatogeneesi mõjutavate geneetiliste variantide leidmiseks uuriti HPG telje hormone ja retseptoreid ekspresseerivate geenide variante. Uuritavad geenid olid *KISS1*, *FSHR*, *LHCGR*, *INHA*, *INHBB*, *GNRHR*, *NPVF*, *GNRH1*, *NPFFR1*, *FSHB*, *KISS1R* ja *LHB*. 1495 geenivariandi seast sõeluti kõigepealt välja variandid, mis vastasid esimesele kriteeriumile (mittesünonüümne asendus kodeerivas või regulatoorses alas). Assotsiatsiooni uuringute seisukohast on tähtis variandi esinemine piisavalt suure hulga indiviidide seas valimis, mistõttu kitsendati valikut 21 variandini, mille minoorse alleeli sagedus Euroopa populatsioonis ExAC konsortsiumi andmebaasis olemasoleva informatsiooni põhjal on vähemalt 5% (Tabel 8).

SNV-de seas järgneva kitsendava valiku tegemisel lähtuti tarkvarade SIFT ja PolyPhen-2 annotatsioonidest. Selliste tööriistade kasutamine lihtsustab uurijate tööd, kuid omab mõningaid puudujääke – regulatoorses või posttranslatsiooniliselt äralõigatud järjestuses paiknevad SNV-d ei pruugi kajastuda tarkvara skooris. Näiteks hindavad SIFT ja PolyPhen-2 *GNRH1* signaalpeptiidis asuva rs6185 tagajärgi skooriga 0, seejuures võib antud skoori tõlgendada vastavalt tarkvarale kas väga kahjulikuks või täiesti ohutuks. Annotatsiooni tarkvarad hindasid kahjulikuks või tõenäoliselt kahjulikuks 5 SNV-d. Lisaks esines insertiooni, deletsiooni, raaminihet ning aminohappe asendumist signaalpeptiidis põhjustavat varianti. Lõpliku valiku tegemisel kontrolliti transkripti ekspresseerumist HPG telje näärmete kudedes ning arvestati annotatsioonitarkvarade ennustatud skoori tugevusega ja *in silico* modelleeritud tagajärgi. Edasi uuriti nelja geneetilist varianti, mis võiksid potentiaalselt mõjutada reproduktiivsete hormoonide taset veres ja spermatogeneesi ning esineda Balti noorte meeste valimis (Tabel 9).

Tabel 8. HPG teljele kuuluvate geenide SNV-d.

Geen		Geneetilised variandid		Geeniproducti kirjeldus		
Nimi ^a	Genoomsed koordinaadid ^b	Transkript ^c	Kõik ^d	Kriteerium		
				1*	2*	
<i>KISS1</i>	1: 204 190 341 – 204 196 486	ENST00000367194.4	152	60	5	Kisspeptiin
<i>KISS1R</i>	19: 917 342 – 921 015	ENST00000234371.9	166	96	1	Kisspeptiini retseptor
<i>GNRH1</i>	8: 25 419 262 – 25 424 654	ENST00000276414.4 ENST00000421054.6	93	44	1	Gonadotropiini vabastav hormoon
<i>GNRHR</i>	4: 67 739 328 – 67 754 360	ENST00000226413.4	209	134	-	Gonadotropiini vabastava hormooni retseptor
<i>NPVF</i>	7: 25 224 570 – 25 228 486	ENST00000222674.2	159	82	3	Gonadotropiini inhibeeriv hormoon**
<i>NPFFR1</i>	10: 70 247 329 – 70 283 676	ENST00000277942.6	260	130	2	Gonadotropiini inhibeeriva hormooni retseptor**
<i>FSHB</i>	11: 30 231 016 – 30 235 261	ENST00000254122.7	96	46	-	Folliikuleid stimuleeriva hormooni β -subühik
<i>FSHR</i>	2: 48 962 157 – 49 154 537	ENST00000406846.6 ENST00000304421.8	645	306	2	Folliikuleid stimuleeriva hormooni retseptor
<i>LHB</i>	19: 49 015 980 – 49 017 081	ENST00000221421.6	455	91	1	Luteiniseeriva hormooni β -subühik
<i>LHCGR</i>	2: 48 686 775 – 48 755 693	ENST00000294954.11	878	268	5	Luteiniseeriva hormooni retseptor
<i>INHA</i>	2: 219 572 195 – 219 575 713	ENST00000243786.2	806	133	-	Inhibiini α -subühik
<i>INHBB</i>	2: 120 346 143 – 120 351 808	ENST00000295228.3	211	105	1	Inhibiini β -subühik

^ageeni nimi HGNC klassifikatsiooni järgi.

^bgenoomsed koordinaadid GRCh38/hg38 genoomi versiooni järgi.

^ctranskripti kood Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi.

^dgeneetilised variandid ExAC eksoomi andmebaasist: *1 (mittesünonüümne asendus kodeerivas või reguleerivas alas).

*2 (minoorse alleeli sagedus Euroopa populatsioonist vähemalt 5%).

** Homoloog imetajates (Ubuka jt., 2009).

Tabel 9. Välja valitud SNV-d.

SNV					Asendus ^c		Annotatsioon		MAF ^e (%)
rs ID	Asukoht			Transkript ^b	CDS	Valk	SIFT	PolyPhen-2	
	Genoom ^a	Geen	Ekson						
rs12998	1:204 192 819	<i>KISS1</i>	2	ENST00000367194.4	c.58C>T	p.Glu20Lys	0,003	0,372	6
rs4889	1:204 190 659	<i>KISS1</i>	3	ENST00000367194.4	c.242G>C	p.Pro81Arg	0,28	0,205	33
rs6185	8:25 423 034	<i>GNRH1</i>	1	ENST00000276414.4	c.47C>G	p.Trp16Ser	0	0,001	25
			2	ENST00000421054.6	c.47C>G	p.Trp16Ser	0	0,001	25
rs3812694	10:70 255 817	<i>NPFFR1</i>	4	ENST00000277942.6	c.433T>G	p.Ile145Leu	0	0,998	8

^a genoomne koordinaat GRCh38/hg38 genoomi versiooni järgi.

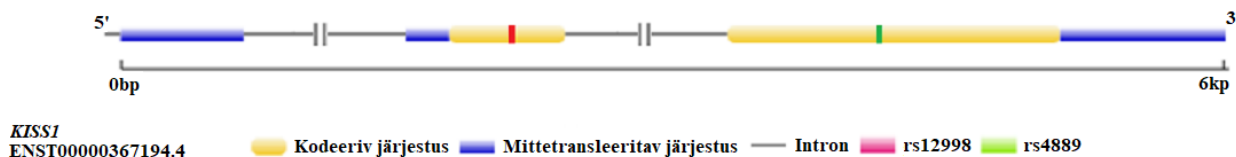
^b transkripti kood Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi.

^c Nukleotiidne/aminohappeline asendus Ensembl GRCh38.p12 genoomi versiooni järgi

CDS – Nukleotiidi asukoht kodeerivas järjestuses loetuna startkoodoni algusest (ENST00000367194.4; ENST00000276414.4; ENST00000277942.6).

^e MAF – minoorse alleeli sagedus Euroopa populatsioonis ExAC konsortsiumi andmebaasi järgi.

KISS1 transkript ENST00000367194.4 on GTEx andmebaasi põhjal enim ekspresseerunud testistes, ajuripatsis, basaalganglias ja väikeajus. *KISS1* geenis esineb üksiknukleotiidseid geneetilisi variante ExAC eksoomi andmebaasi põhjal keskmiselt iga 40 aluspaari kohta (Tabel 8). Käesolevas uuringus on tähelepanu all *KISS1* variandid rs12998 (c.58C>T) ja rs4889 (c.G242C) geeni teise ja kolmanda eksoni kodeerivas alas (Joonis 3).

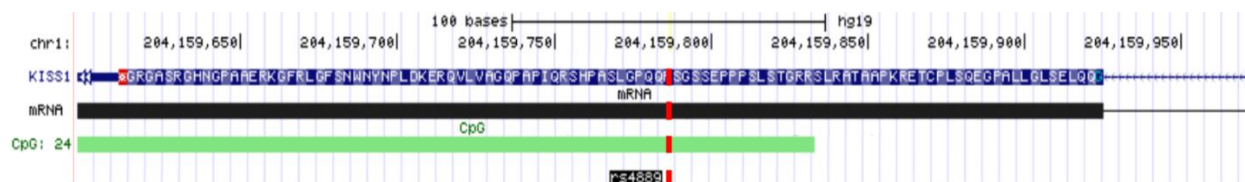


Joonis 3. *KISS1* rs12998 (c.58C>T) ja rs4889 (c.242G>C) asukohad geenis.

Rs12998 (c.58C>T, p.Glu20Lys) paikneb transleeruva kisspeptiini N-terminaalses signaalpeptiidis, mis vastutab kotranslatsioonilise seondumise ees rER-iga. Negatiivse laenguga glutamiinhappe asendamine aluselise ja mõõtmel suurema lüsiinijäägiga võib kaasa tuua häiringuid kisspeptiini posttranslatsioonilisel töötlemisel.

Rs4889 (c.242G>C, p.Pro81Arg) paikneb Kp54 N-terminaalses PEST järjestuses, mis reguleerib valgu suunamist degradeerumisele. Kp54 koosseisus asendatakse proliin, mille kõrvalahel moodustab tsükli ning omab fikseeritud valentsnurkasid (Morris jt., 1992), võimaldades sekundaarstruktuuri moodustumisel peptiidahela pöördeid.

KISS1 kolmanda eksoni GC sisaldus (70 %) on märgatavalt kõrgem võrreldes geeni üldise GC sisaldusega (52 %). Enamik kolmanda eksoni G ja C aluspaarid on dipletsed, moodustades metüülitava CpG rikka piirkonna ehk CpG-saarekese (ingl. *CpG island*) (Joonis 4).



Joonis 4. CpG saareke ja rs4889 asukoht *KISS1* 3. eksonis.

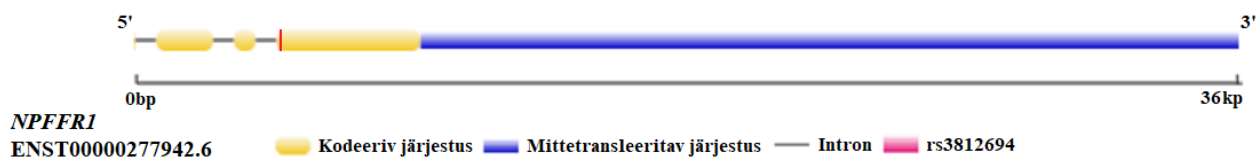
Joonis: UCSC genoomi brauser (GRCh37/hg19)

GNRH1 transkript ENST00000276414.4 on GTEx andmebaasi põhjal ekspresseerunud vastavalt väikeajus, väikeaju poolkerades, ajuripatsis ja testistes. *GNRH1* transkript ENST00000421054.6 on ekspresseerunud basaalganglias ja hüpotalamuses. Rs6185 (c.47C>G, p.Trp16Ser) asub geeni transleeruva prepro-GnRH N-terminaalses signaaljärjestuses koosseisu, mis vastutab kotranslatsioonilise seondumise ees rER-iga (Joonis 5).



Joonis 5. *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) asukoht geenis.

NPFFR1 transkript ENST00000277942.6 on on GTEx andmebaasi põhjal ekspresseerunud väikeajus ja selle poolkerades ning hüpotalamuses ja testistes. Rs3812694 asub geeni kolmandas eksonis (Joonis 6).



Joonis 6. *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) asukoht geenis.

2.3.3 Genotüpiseerimise tulemuste kvaliteedikontroll

Huvipakkuvad SNV-d genotüpiseeriti *TaqMan*'i meetodil, seejuures oli võimalik koguda indiviidide geneetilised andmed kolme SNV kohta – rs4889 genotüpiseerimisel osutus *output* lugematuks (Lisa 2). Valimi genotüpiseerimise andmetega teostati kvaliteedikontroll (Tabel 10). Minoorse alleeli sagedused kahe SNV puhul (rs1998 ja rs3812694) olid 1-2 % madalamad Euroopa populatsioonidest võrreldes ExAC eksoomi brauseri andmetega (Tabel 8). Valimi genotüüpide jaotused on χ^2 testi põhjal usaldusväärsed ning alluvad Hardy-Weinbergi seadusele.

Tabel 10. Genotüpiseerimise tulemuste kvaliteedikontroll.

rs ID	Edukusmäär	Alternatiivsed alleelid ^a	Genotüüp ^b	MAF (%)	HWE <i>P</i> -väärtus	χ^2
			AA / Aa / aa			
rs6185	99,28 %	C>G	544 / 353 / 63	25	0,605	0,314
rs12998	97,07 %	C>T	842 / 94 / 1	5	0,507	0,962
rs3812694	99,19 %	T>G	839 / 117 / 2	6	0,579	0,989

^a SNV alternatiivsed alleelid (metsiktüüp > minoorne)

^b genotüüpide jaotuvus vastavalt alleelidele (A – metsiktüüp; a – minoorne)

MAF – minoorse alleeli sagedus valimis.

HWE – Hardy-Weinbergi seadus.

χ^2 testi puhul on vabadusastmete arv 2.

2.3.4 Geneetiliste variantide assotsiatsioonianalüüs

Balti noored mehed grupeeriti kolme rühma vastavalt *KISS1* rs12998, *GNRH1* rs6185 ja *NPFFR1* rs3812694 genotüübile, indiviidid grupeeriti iga variandi suhtes eraldi. *KISS1* geenivariandi (rs12998) puhul leidus valimis vaid üks minoorse alleeli homosügoot, mistõttu tuleb väärtuste analüüsimisel tehtud järeldustes arvestada võimaliku juhuslikkusega. Genotüüpide vahel jaotunud reproduktiivsete parameetrite väärtused on välja toodud lisades 3 ja 4.

Tabelites 11 ja 12 on esitatud *GNRH1* rs6185 ja *NPFFR1* rs3812694 variandi statistiliselt olulised seosed reproduktiivsete parameetritega ning väärtuste jaotused genotüüpide vahel. Regressioonianalüüsi tulemuste esitamisel tabelis 11 ja 12 on esile tõstetud mitmese testimise suhtes parandamata (jämedas kirjas) ning parandatud (jämedas kirjas ja allajoonitud) statistiliselt olulised p -väärtused. Alleeliefekti tugevust hinnati regressiooni koefitsendi β järgi. Regressioonianalüüsi käigus ei tuvastatud *KISS1* variandi rs12998 statistiliselt olulist seost ühegi reproduktiivse parameetriga. Ülevaade kõigist regressioonianalüüsi tulemustest on toodud lisades 5 ja 6.

Tabel 11. Geneetilise markeri *GNRH1* (rs6185) ja reproduktiivsete parameetrite regressioonianalüüs.

Parameeter	GNRH1 rs6185 (c.47C>G)			Additiivne mudel		Retsessiivne mudel	
	CC	CG	GG	P-väärtus	G-alleeli efekt	P-väärtus	G-alleeli efekt
Indiviidide arv	544	353	63				
Testosteroon (nmol/L)							
keskmine ± SD	28 ± 9,11	26,9 ± 8,73	26,4 ± 9,78	0,033	-1,01	0,325	-1,16
mediaan (5% – 95%)	26,9 (14,7 – 44)	26,2 (15,0 – 42,9)	26 (13,7 – 38,5)				
BioT (nmol/L)							
keskmine ± SD	15,1 ± 5,36	14,5 ± 5,20	13,7 ± 5,70	0,031	-1,60	0,106	-1,71
mediaan (5% – 95%)	14,3 (7,97 – 24,5)	13,7 (7,58 – 23,8)	13,3 (7,11 – 22,1)				
FAI (%)							
keskmine ± SD	89,2 ± 35,8	86,2 ± 34,9	78,5 ± 27,0	0,047	-9,10	0,048	-10,5
mediaan (5% – 95%)	82,3 (46,6 – 146)	79,6 (45,7 – 143)	75 (40 – 127)				
Inhibiin B (ng/L)							
keskmine ± SD	224 ± 79,5	229 ± 78,4	248 ± 69,4	0,069	-6,53	0,043	20,7
mediaan (5% – 95%)	214 (114 – 379)	221 (106 – 369)	241 (162 – 399)				
Sperm. konts. (mln/ml)							
keskmine ± SD	83,9 ± 77,7	76,4 ± 70,2	71,3 ± 54	0,05	-10,1	0,366	-6,68
mediaan (5% – 95%)	65,3 (11,2 – 214)	60,2 (6,12 – 211)	52 (8,16 – 184)				

Alleeli efekt: β koefitsent.

Esile on tõstetud **statistiliselt olulised** ning mitmese testimise vastu parandatud statistiliselt olulised *P*-väärtused.

Tabel 12. Geneetilise markeri *NPFFR1* (rs3812694) ja reproduktiivsete parameetrite regressioonianalüüs.

Parameeter	NPFFR1 rs3812694 (c.433T>G)			Additiivne mudel		Retsessiivne mudel	
	TT	TG	GG	P-väärtus	G-alleeli efekt	P-väärtus	G-alleeli efekt
Indiviidide arv	842	117	2				
Testosteroon (nmol/L)							
keskmine ± SD	27,3 ± 8,82	29 ± 10,2	41,4 ± 10,4	0,010	0,43	0,032	10,9
mediaan (5% – 95%)	26,4 (14,4 – 43,1)	27,8 (16,1 – 49,8)	41,4 (34 – 48,7)				
BioT (nmol/L)							
keskmine ± SD	14,7 ± 5,18	16 ± 6,38	21,1 ± 5,80	0,002	0,48	0,092	3,81
mediaan (5% – 95%)	13,9 (7,73 – 23,3)	15,3 (8,49 – 28,1)	21,1 (17,0 – 25,2)				
FAI (%)							
keskmine ± SD	86,2 ± 33,4	96,7 ± 45,9	94,4 ± 16,2	0,001	3,55	0,759	-0,51
mediaan (5% – 95%)	79,6 (45,6 – 142)	89,4 (45,2 – 186)	94,4 (82,9 – 106)				
E2 (pmol/L)							
keskmine ± SD	93,6 ± 25,2	96,1 ± 25,8	171 ± 12,7	0,027	-1,55	0,00001	59
mediaan (5% – 95%)	90 (59 – 140)	91,5 (58 – 145)	171 (162 – 180)				

Alleeli efekt: β koefitsent.

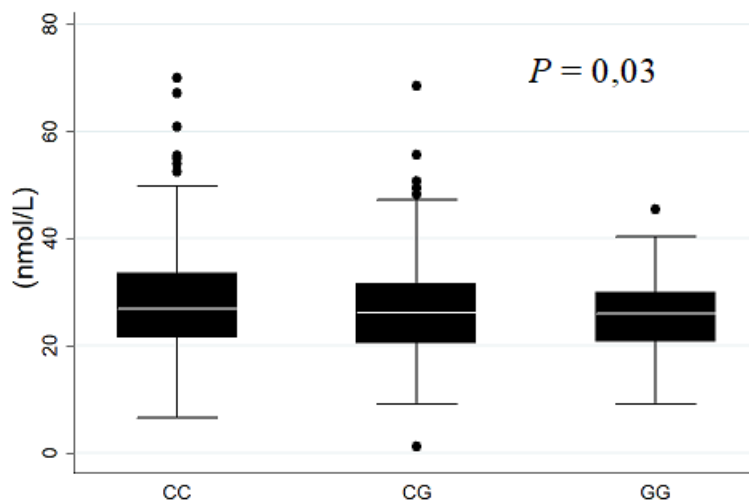
Esile on tõstetud **statistiliselt olulised** ning mitmese testimise vastu parandatud statistiliselt olulised *P*-väärtused.

2.3.5 *GNRH1* variant rs6185 mõjutab testosterooni taset vereseerumis

Gonadotropiini vabastava hormooni geneetiline variant rs6185 mõjutab negatiivselt üldise- ($P = 0,03$; alleeli efekt = $-1,01$ nmol/L) ja bioaktiivse ($P = 0,03$; alleeli efekt = $-1,60$ nmol/L) testosterooni taset vereseerumis ning spermatooside kontsentratsiooni ($P = 0,05$; alleeli efekt = $-10,1$ mln/ml) ejakulaadis (Tabel 11). Geenivariant mõjutab negatiivselt ka vaba androgeeni indeksit ($P = 0,05$; alleeli efekt = $-9,1$ %) ning see mõju suureneb homosügootide puhul ($P = 0,05$; genotüübi efekt = $-10,5$ %) (Tabel 11). Homosügootide seas avaldub markeri positiivne mõju inhibiini B tasemele ($P = 0,04$; alleeli efekt = $20,7$ ng/L) (Tabel 11). *GNRH1* rs6185 GG genotüübiga indiviide üldise testosterooni tase vereseerumis langenud võrreldes CC ja CG genotüüpidega (28 vs 26,9 vs 26,4 nmol/L) (Lisa 3; Joonis 7)

Markeri kandjate seas on langenud üld- (28 vs 26,8 nmol/L) ja bioaktiivse (15,1 vs 14,4 nmol/L) testosterooni keskmine tase vereseerumis ning keskmine spermide kontsentratsioon (83,9 vs 75,6 mln/ml) ejakulaadis võrreldes CC homosügootidega. Geenivariandi homosügootide seas on inhibiini B keskmine tase vereseerumis tõusnud (224 vs 248 ng/L) võrreldes mittekandjatega.

GNRH1 rs6185 ei avalda statistiliselt olulist mõju gonadotropiinide, E_2 , SHBG ning vaba testosterooni tasemele vereseerumis. Lisaks ei tuvastatud seoseid munandite- ja ejakulaadimahu, sperma üldhulga, morfoloogia ning liikuvuse muutustega.



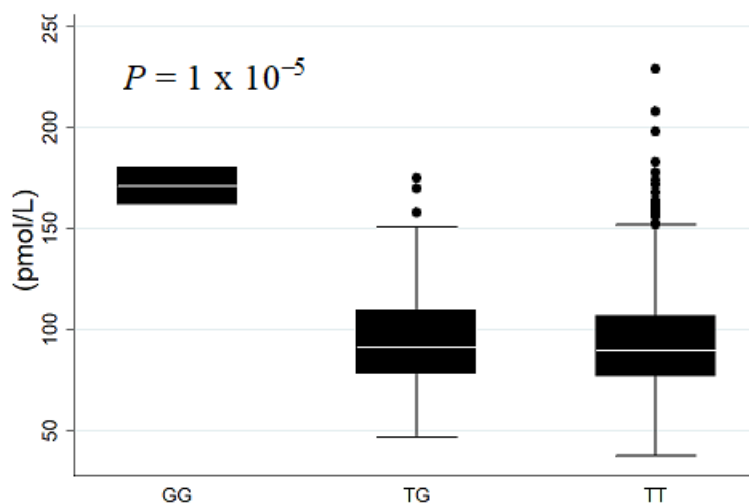
Joonis 7. Karpdiagramm testosterooni taseme väärtuste jaotuvuse kohta *GNRH1* rs6185 genotüüpide vahel. P -väärtus (Tabel 11).

2.3.6 *NPFFR1* variant rs3812694 mõjutab E₂ taset vereseerumis

Gonadotropiini inhibeeriva hormooni retseptori geneetilisel variandil rs3812694 on positiivne homosügootne mõju östradiooli ($P = 1 \times 10^{-5}$; genotüübi efekt = 59 pmol/L) ja testosterooni ($P = 0,03$; genotüübi efekt = 10,9 nmol/L) tasemele vereseerumis (Tabel 12). Lisaks avaldub markeri positiivne mõju üld- ($P = 0,01$; genotüübi efekt = 0,43 nmol/L) ja bioaktiivse ($P = 0,002$; genotüübi efekt = 0,48 nmol/L) testosterooni tasemele vereseerumis ning vaba androgeeni indeksile ($P = 0,001$; genotüübi efekt = 3,55 %) (Tabel 12). Mõju E₂ ja BioT tasemele ning vaba androgeeni indeksile püsib statistiliselt olulisena ka pärast Bonferroni parandust mitmese testimise suhtes.

NPFFR1 rs3812694 GG genotüübiga indiviidide keskmine E₂ tase vereseerumis on tõusnud võrreldes TT ja TG genotüüpidega (93,6 vs 96,1 vs 171 pmol/L) (Lisa 3; Joonis 8). Geenivariandi kandjate seas on tõusnud üld- (27,3 vs 29,2 nmol/L) ja bioaktiivse (14,6 vs 16,1 nmol/L) testosterooni keskmine tase vereseerumis ning FAI (86,2 vs 96,7 %). Geenivariandi homosügootide seas on tõusnud E₂ (27,3 vs 29,2 nmol/L) ja testosterooni (27,3 vs 29,2 nmol/L) tase vereseerumis võrreldes mittekandjatega.

NPFFR1 rs3812694 ei avalda statistiliselt olulist mõju gonadotropiinide, SHBG, FT ning inhibiin B tasemele vereseerumis Balti noorte meeste seas. Lisaks puuduvad statistiliselt olulised seosed munandite suuruse ning sperma parameetritega.



Joonis 8. Karpdiagramm testosterooni taseme väärtuste jaotuvuse kohta *NPFFR1* rs3812694 genotüüpide vahel. *P*-väärtus (Tabel 12).

2.3.7 *KISS1* variant rs12998 ei mõjuta noorte meeste reproduktiivparameetreid

Kisspeptiini geneetilisel variandi rs12998 suhtes leidis valimis vaid üks homosügoot. Kõnealune geenivariant ei avalda statistiliselt olulist mõju ühegi reproduktiivse parameetri suhtes.

Reproduktiivsete parameetrite väärtuste hindamisel arvestati protsentiilide vahemikke mittekandjate ning heterosügootide rühmades. Geenivariandi homosügooti puhul olid suured erinevused võrreldes teiste rühmade keskmistega, kuid väärtused jäid enamasti 5 % ja 95 % protsentiilide vahemikku, mistõttu ei olnud tegemist märkimisväärse kõrvalekaldega.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö fookuses on reproduktiivhormoonide ja nende retseptorite geneetilise varieeruvuse kirjeldamisele ning *KISS1* rs12998 (p.Glu20Lys), *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) ja *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) mõju hindamine reproduktiivsetele hormoonidele, munandimahule ja sperma parameetritele Balti noorte meeste seas (mediaanvanus 19,8 aastat).

Mõju hindamiseks läbiviidud geneetiliste variantide assotsiatsiooniuuringud olid kandidaadipõhised, valiku tegemisel lähtuti HPG telje signaali ülekande eest vastutavate geenide funktsiooni kohta avaldatud uuringute tulemustest ning annotatsioonitööriistade hinnangule. Toetudes kirjandusele on põhjust kõnealuste geenide (*KISS1*, *KISS1R*, *GNRH1*, *GNRHR*, *FSHB*, *FSHR*, *LHB*, *LHCGR*, *NPVF*, *NPFFR1*) variantidele omistada potentsiaalne pärilik mõju reproduktiivfüsioloogiliste häirete tekkimisel. Kandidaatgeenide variantide mõju analüüsi eesmärgiga tuvastada Balti noorte meeste reproduktiivseid parameetreid mõjutavaid geneetilisi markereid. Antud uuringu eeliseks on suure hulga indiviidide (n=982) geneetiliste- ja terviseandmete olemasolu, võimaldades geenimarkerite assotsiatsioonianalüüsi hoolikalt koostatud homogeenses valimis mitme olulise reproduktiivse parameetri suhtes. Indiviidide reproduktiivsete parameetrite seas puuduvad viljatusele viitavad väärtused, lisaks kõrvaldati valimist reproduktiivfüsioloogiliste kahjustustega fenotüübid (krüptorhism, azoospermia, munandite haigused).

Potentsiaalselt funktsionaalseid variante otsides jäid lõplikku valikusse GnRH sekretsiooni ning talitusliku aktiivsuse eest vastuvates geenides (*KISS1*, *GNRH1*, *NPFFR1*) paiknevad SNV-d. *KISS1* ja *GNRH1* kuuluvad seejuures viimaste kümnendite jooksul IGD-ga enim seostatud kandidaatgeenide hulka (Stamou jt., 2016). Paratamatult tuleb mõnda, et andmed GnRH taseme kohta kliinilises andmestikus puuduvad ning seetõttu on geenivariantide otsest mõju hormooni tasemele raske hinnata. Seevastu on võimalik hinnata mõju FSH ja LH tasemele ning gonadotropiinidest vallanduvate signaalide tagajärgi steroido- ja spermatogeneesile, mida on võimalik hinnata kogutud reproduktiivsete parameetrite valguses.

Käesolev magistritöö on valminud Inimese geneetika uurimisgrupis, mis on edukalt tegelenud muuhulgas Balti meeste reproduktiivfüsioloogia geneetiliste faktorite kirjeldamisega, viimastel aastatel on fookuses olnud mitmed olulised kohalikus populatsioonis levinud geenivariandid. *FSHB* ja *FSHR* geenides esinevad kolm geneetilist varianti (*FSHB* -211G>T, *FSHR* -29G>A ja *FSHR* c.2039A>G) määravad üheskoos vastavalt kuni 2,3%; 1,4%; 1,0% ja 1,1% FSH, inhibiin B, testosterooni taseme ja munandimahu normaalsest varieeruvusest meeste seas (Grigorova jt., 2014). Seejuures avaldab *FSHB* rs10835638 (-211G>T) variant noorte meeste valimis negatiivset mõju FSH, inhibiin B ja testosterooni tasemele (Grigorova jt., 2011). Naiste seas aga positiivset mõju gonadotropiinide tasemele (Rull jt., 2018). Noorte meeste seas avaldab funktsionaalne variant *SHBG* rs6258 (Pro185Leu) tugevalt negatiivset, *SHBG* rs1799941 (-68G>A) aga positiivset mõju testosterooni ja *SHBG* tasemele (Grigorova jt., 2017). *LHB* rs34349826 (Trp28Arg) ja *LHB* rs1800447 (Ile35Thr) variantide koosmõju uuringud aheldunud lookustes demonstreerisid V-LH positiivset mõju LH tasemele noorte ning viljatute meeste seas (Punab jt., 2015). Viimaste aastate ning vanemate tulemuste valguses saavutatud märkimisväärne ülevaade meeste reproduktiivfüsioloogiat mõjutavatest *FSHB*, *FSHR*, *SHBG* ja *LHB* pärilikest faktoritest.

Käesolev magistritöö on ühtlasi pilootprojekt tuvastamaks uusi funktsionaalseid HPG telje hormone kodeerivate geenide variante, mis mõjutavad meeste reproduktiivseid parameetreid. *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) ja *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) varjantide mõju testosterooni, BioT, E₂ ja inhibiin B tasemele ning spermatooside kontsentratsioonile (Tabel 11 ja 12) noorte meeste valimis on seejuures huvipakkuv. Andmete valideerimiseks on planeeritud replikatiivne uuring, mille fookuses on viljatud mehed üheskoos analoogse kliinilise andmestikuga. Viljatute

meeste valimi lisamine assotsiatsiooniuuringusse võimaldab koguda rohkem informatsiooni kõnealuste variantide mõju kohta meeste reproduktiivsetele parameetritele. Olulisi erinevusi noorte ning viljatute meeste vahel on täheldatud varemgi – *FSHR* rs1394205 (-29G>A) variant seostub kõrgema FSH tasemega noorte meeste seas, kuid viljatute meeste seas mõju puudub (Grigороva jt., 2014). Lisaks võib *KISS1* rs12998 (p.Glu20Lys) variandi esinemissagedus olla viljatute meeste seas kõrgem.

Levinud arusaama järgi on iga variandi mõju penetrantsus haiguse suhtes väike, kui haiguse põhjustajaks on hulk populatsioonis levinud variatsioone (Bush ja Moore, 2012). Reproduktiivsete hormoonide tootvate geenide talitust mõjutavad mitmed pärilikud tegurid, mistõttu iga üksiku variandi mõju reproduktiivsetele parameetritele võib kumuleeruda. Sellest tulenevalt ei ole välistatud käesolevas töös uuritud variantide koostoimel mõne varasemalt kirjeldatud variandiga tuvastada veel tugevam mõju reproduktiivsetele parameetritele Balti noorte meeste valimis. Kahe variandi kumulatiivset toimet on varasemalt demonstreeritud – *FSHR* rs1394205 (-29G>A) ja rs6166 (c.2039A>G) variantide homosügootide negatiivne koosmõju FSH tasemele ja munandimahule võimendub, seejuures mõlema variandi metsiktüübi homosügootsuse seostub suurema munandimahuga (Grigороva jt., 2014). Seejuures on võimalik kumulatiivse mõju hindamiseks noorte meeste valimis kasutada Inimese geneetika uurimisgrupi poolt varasemalt genotüpiseeritud andmeid.

Kisspeptiini geenivariantide mõju meeste reproduktiivsetele parameetritele teadaolevalt varem uuritud ei ole. Seejuures *KISS1* rs4889 (c.242G>C) mõju hindamine sai genotüpiseerimise käigus tagasilöögi tulenevalt *Assay* (C__8758863_10) lugematust *output*'ist. Siinkohal võib spekuloida, kas *Functionally Tested* kvaliteedimärgistusega *assay* ei ole piisavalt töökindel, või takistas SNV asukoht CpG saarekeses *TaqMan*'i geeniproovi hübriidumist DNA-ga (Joonis 4). *KISS1* rs12998 (p.Glu20Lys) variandi puhul osutus minoorse alleeli sagedus Balti noorte meeste valimis oodatust madalamaks ning statistiliselt oluliste seoste tuvastamiseks ei piisanud vaid ühest homosügootist.

NPFFR1 geenivariante ei ole teadaolevalt ühegi fenotüübiga seostatud, lisaks on vähe uuritud mõju kohta inimese reproduktiivsetele parameetritele. Käesolevas uuringus tuvastati *NPFFR1* rs3812694 (c.433T>G; p.Ile145Leu) variandi tugev positiivne homosügootne mõju E₂ ja testosterooni tasemele vereseerumis (Tabel 12). GnIH signaali ülekanne sõltub suuresti retseptori aktiivsusest, mis võib funktsionaalse variandi puhul väheneda. Arvukate uuringute valguses levinud arusaama järgi interakteeruvad GnIH fiibrid GnRH neuronitega hüpotalamuses ning vaigistavad gonadotropiinide, eelkõige LH vabanemist, mille tulemusena langeb suguhormoonide tase vereringluses (Kim jt., 2016). Võrreldes metsiktüübi homosügootidega (TT) on minoorse alleeli homosügootidel (GG) märgatavalt tõusnud LH keskmine tase vereseerumis (4 vs 5,94 IU/L; Lisa 3). Suguhormoonide tootmist inhibeerivat GnIH signaali edastatakse ka gonadotropiinidest sõltumatult – GnIHR ekspresseerub munandites, vahendades gonadotropiinidega konkureerivaid endo- ja parakriinseid signaale vaigistamaks munandite füsioloogilist aktiivsust, sealhulgas steroidogeneesi Leydig'i rakkudes (Ubuka jt., 2014; Tsutsui jt., 2015). Annotatsioonitarkvarade poolt patogeenseks hinnatud *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) variandi esinemissagedus GnRH signaali üle- või alatalitusest põhjustatud enneaegse puberteedi ja IHH patsientide vahel on sarnane (Lima jt., 2014). Siinkohal võib spekuloida kõnealuse variandi kumuleeruva mõju üle retseptori aktiivsusele, mida varjutab või kompenseerib mõni tugevam endokriinne signaaliahel.

GNRH1 rs6185 (c.47C>G; p.Trp16Ser) mõjutab negatiivselt testosterooni ja BioT taset vereseerumis ning spermatosoidide kontsentratsiooni ejakulaadis (Tabel 11). Geenivariant mõjutab negatiivselt ka vaba androgeeni indeksit ning see mõju suureneb homosügootide (GG) puhul (Tabel 11). Lisaks avaldub homosügootide (GG) seas markeri positiivne mõju inhibiini B tasemele. Tulenevalt asukohast prepro-GnRH N-terminaalses piirkonnas, mis vastutab kotranslatsioonilise seondumise eest rER-iga, on kõnealusel variandil potentsiaalne mõju valgu bioaktiivse vormi saavutamisele. Seda on peetud piisavalt oluliseks asjaoluks, et uurida variandi mõju testosterooni tasemele antiandrogeeniravi (ingl. *Androgen deprivation therapy*, ADT) käigus eesnäärmevähiga patsientide seas. Sedapuhku ei täheldatud statistiliselt olulist mõju, minoorse alleeli homosügootide (GG) testosterooni tase võrreldes metsiktüübiga (CC) oli siiski madalam (12,7 ng/dl vs 10,5 ng/dl) (Shiota jt., 2018).

Magistritöös kirjeldatud *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) variandi negatiivne mõju noorte meeste üldise ja bioaktiivse testosterooni tasemele vereseerumis ning spermatoosidide kontsentratsioonile ejakulaadis on kooskõlas kirjanduse ülevaates kirjeldatud GnRH talitusliku aktiivsuse langemisega ning varasemate uuringute tulemustega. *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) variandi tugev positiivne homosügootne mõju hindamisel E_2 tasemele ($P = 1 \times 10^{-5}$; genotüübi efekt = 59 pmol/L) tuleb arvestada juhuslikkuse rolli, tulenevalt homosügootide väiksest arvust ($n=2$). Replikatiivsete uuringute valguse tuleks silmas pidada E_2 reproduktiivfüsioloogilist rolli kisspeptiini ja GnRH neuronite inhibeerimisel, mistõttu võib *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) variant esineda sagedamini viljatute meeste seas. Lisaks sellele on põhjalikult kirjeldamata *KISS1* rs12998 (p.Glu20Lys) ja rs4889 (p.Pro81Arg) variantide mõju meeste reproduktiivsetele hormoonidele. Tulenevalt mõlema SNV asukohast transleeruva kisspeptiini koosseisus võib kõnealustele variantidele omistada funktsionaalse olemuse, mistõttu võib esinemissagedus viljatute meeste seas olla kõrgem.

KOKKUVÕTE

Hüpotalamuse-ajuripatsi-munandite telje endokrinoloogiline funktsioon on tagada mehe normaalne seksuaalne areng embrüonaalsel, puberteedi ja täiskasvanu perioodil. See hõlmab meessuguhormoonide ja kompetentsete seemnerakkude tootmise tagamist. Telje talituse tagavad reproduktiivsete hormoonide signaalid, nende regulatsiooni- ja tagasisidesüsteemid ning retseptorid, mis ekspresseeritakse aju erinevates piirkondades ja sugunäärmetes. Reproduktiivsete hormoonide hulka kuuluvad mitmed signaalhormoonid, gonadotropiinid ja suguhormoonid, mille funktsioon on tagada mehe normaalne seksuaalne areng embrüonaalsel, puberteedi ja täiskasvanu perioodil. Reproduktiivsete hormoonide tootmist ja talitust mõjutavad arvukad pärilikud tegurid läbi vastutavate geenide aktiivsuse regulatsiooni.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli skriinida reproduktiivhormoone ekspresseerivate geenide variante ja valida välja potentsiaalselt funktsionaalsed ehk reproduktiivseid parameetreid mõjutavad variandid. Kasutades ExAC eksoomi brausereid kirjeldati geneetilist varieeruvust HPG telje hormoone tootvates geenides. Ühtekokku leiti 12 geeni seast 4130 SNV-d, millest 1595 on asuvad reproduktiivhormoone ekspresseerivate geenid regulatoorses või kodeerivas alas. Lõpliku valiku tegemisel lähtuti variandi esinemise sagedusest ja võimalikest tagajärgedest. Väljavalitud geenivariantide puhul märgiti nende asukoht kromosoomis ja geenis, kirjeldati nukleotiidsed muutuse olemust ja võimalikke tagajärgi valgu tasandil ning määratleti ekspressioonitase transkriptide koosseisus erinevates kudedes. Põhjaliku kliinilise andmestikuga valim genotüpiseeriti RT-PCR meetodil kasutades *TaqMan*'i *SNP Genotyping Assay* reagente. Geneetiliste andmete kogumine õnnestus kolme väljavalitud SNV puhul neljast. Genotüpiseerimise ja kliiniliste andmete põhjal teostati assotsiatsiooniuuring lineaarset regressioonianalüüsi.

Uuringu tulemusena tuvastati *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) variandi negatiivne mõju üldise ja bioaktiivse testosterooni tasemele vereseerumis ning spermatooside kontsentratsioonile ejakulaadis. Lisaks *NPF1* rs3812694 (p.Ile145Leu) variandi positiivne homosügootne mõju E_2 ja testosterooni tasemele vereseerumis. Andmete valideerimiseks on planeeritud läbi viia replikatiivne uuring viljatute meestega ning assotsiatsiooniuuringud noorte ja viljatute indiviidide vahel leidmaks uusi reproduktiivse tervise häiringutega seostatavaid geneetilisi markereid.

Genetic Component of Male Reproductive Physiology

Jaan Vihalemm

ABSTRACT

The hypothalamic–pituitary–gonadal axis (HPG) plays vital role in sexual development of the embryonic and pubertal stages, followed by maintenance of reproductive system in adulthood. Gonadal secretion of sex steroids, pubertal development, and gametogenesis in both sexes are all controlled by the signaling pathways of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH). In men, the pulsatile secretion of GnRH maintains sex hormone secretion and spermatogenesis in testes. Hypothalamic neurons are producing kisspeptin that stimulates the secretion of GnRH. Mutations in the genes encoding reproductive hormones give rise to impaired signaling of the HPG axis resulting in abnormal sexual development or reproductive system function. However, the genetic causes resulting the aberrant gene expression of these hormones are poorly understood. This study introduces the basic knowledge of the HPG axis and provides information of genetic variants modulating the action of the reproductive hormones and receptors.

The aim of this study was to analyse associations between the *KISS1* rs12998 (p.Glu20Lys), *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) and *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) genetic variants and reproductive parameters. We showed that in healthy young men the *GNRH1* rs6185 (p.Trp16Ser) variant is associated with statistically lower total testosterone (effect -1,01 nmol/L), lower BioT (effect -1,60 nmol/L) and lower sperm concentration (effect -10,1 mln/ml). *NPFFR1* rs3812694 (p.Ile145Leu) variant is associated with statistically higher E₂ (effect 59 pmol/L) and higher total testosterone (effect 10,9 nmol/L) in healthy young men. These results are consistent with the evidence from previous reports and the knowledge of the endocrine signaling of HPG axis.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., Sunyaev, S. R. (2013). Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 76:7. 20.1–20.41.
- Allan, C. M., Lim, P., Robson, M., (2009). Transgenic mutant D567G but not wild-type human FSH receptor overexpression provides FSH-independent and promiscuous glycoprotein hormone Sertoli cell signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1022–E1028.
- Anderson, G. M., Relf, H. L., Rizwan, M. Z., Evans, J. J. (2009). Central and peripheral effects of RFamide- related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* 150, 1834–1840.
- Andreasson, K., Worley, P. F. (1995). Induction of beta-A activin expression by synaptic activity and during neocortical development. *Neuroscience*. 69:781–796.
- Ascoli, M., Puett, D. (2009). The Gonadotropin Hormones and Their Receptors. p. 35-55. *In* J. F. Strauss III and R. L. Barbieri (ed.). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology. Pathophysiology. and Clinical Management* 6th ed. Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Balasubramanian, R., Dwyer, A., Seminara, S. B., Pitteloud, N., Kaiser, U. B., Crowley, W. F. (2010). Human GnRH deficiency: a unique disease model to unravel the ontogeny of GnRH neurons. *Neuro-endocrinology*. 92(2):81-99.
- Baker, P. J., Pakarinen, P., Huhtaniemi, I. T., Abel, M. H., Charlton, H. M., Kumar, T. R., O'Shaughnessy, P. J. (2003). Failure of normal Leydig cell development in follicle-stimulating hormone (FSH) receptor-deficient mice, but not FSH β -deficient mice: role for constitutive FSH receptor activity. *Endocrinology* 144:138–145.
- Barbotin, A. L., Ballot, C., Sigala, J., ... Mitchell, V. (2015). The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur J Endocrinol* 172(6):669-76.
- Bouligand, J., Ghervan, C., Tello, J. A., ... Young, J. (2009). Isolated Familial Hypogonadotropic Hypogonadism and a GNRH1 Mutation. *N Engl J Med*. 360:2742-8.
- Bousfield, G. R., Dias, J. A. (2011). Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. *Rev Endocr Metab Disord* 12(4): 289–302.
- Bush, W. S., Moore, J. H. (2012). Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002822.
- Brennan, J., Cape, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*. 5:509–521.

- Caraty, A., Smith, J. T., Lomet, D., ... Clarke, I. J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclic ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148: 5258–5267.
- Cattanach, B. M., Iddon, C. A., Charlton, H. M., Chiappa, S. A., Fink, G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269:338–340.
- Chan, Y., Butler, J. P., Pinnell, N. E., ... Seminara, S. B. (2011). Kisspeptin Resets the Hypothalamic GnRH Clock in Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(6):908–915.
- Chan, Y., Guillebon, A., Lang-Muritano, M., Seminara, S. B. (2009). GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *PNAS.* 106(28):11703-11708.
- Cheng, C. K., Leung, P. C. (2005). Molecular biology of gonadotropin releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 26:283–306.
- Clarke, I. J., Sari, I. P., Qi, Y., Smith, J. T., Parkington, H. C. (2008) Potent action of RFRP-3 on pituitary gonadotropes indicative of an hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149: 5811–5821.
- Clifton, D. K., Steiner, A. R. (2009). Neuroendocrinology of Reproduction. p. 3-34. *In* J. F. Strauss III and R. L. Barbieri (ed.). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology. Pathophysiology. and Clinical Management* 6th ed. Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Dadfar, M., Ahangarpour, A., Habiby, A., Khazaely, D. (2010). Pre-operative serum level of inhibin B as a predictor of spermatogenesis improvement after varicocelectomy. *Urol J* 7(2):110-4.
- DeFalco, T., Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:457–482.
- Desai, S. S., Achrekar, S. K., Pathak, B. R. (2011). Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2805–2812.
- Dhillon, W. S., Chaudhri, O. B., Patterson, M., ... Bloom, S. R. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 6609–6615.
- Dhillon, W. S., Chaudhri, O. B., Thompson, E. L., ... Bloom, S. R. (2007). Kisspeptin-54 stimulates gonadotrophin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3958–3966.
- Dungan, H. M., Gottsch, M. L., Zeng, H., Gragerov, A., Bergmann, J. E., Vassilatis, D. K., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2007). The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci.* 27:12088–12095.

- Ehmcke, J., Schlatt, S. (2006). A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*. 132:673–680.
- Forni, P. E., Taylor-Burds, C., Melvin, V. S., Williams, T., Wray, S. (2011). Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci*. 31(18):6915–6927.
- Funes, S., Hedrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F. J., Gustafson, E. L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357–1363.
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145: 4073–4077.
- Gray, P. C., Bilizikjian, L. M., Vale, W. (2002) Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. *Mol Cell Endocrinol*. 188:254–260.
- Grigorova, M., Punab, M., Ausmees, K., Laan, M. (2008). FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod*. 23:2160–2166.
- Grigorova, M., Punab, M., Poolamets, O., Kelgo, P., Ausmees, K., Korrovits, P., Vihlajev, V., Laan, M. (2010). Increased prevalence of the –211 Tall ale of follicle stimulating hormone (FSH) subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 95(1):100–108.
- Grigorova, M., Punab, M., Žilaitiene, B., ... Laan, M. (2011). Genetically Determined Dosage of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Affects Male Reproductive Parameters. *J Clin Endocrinol Metab*. 96(9). 1534-1541.
- Grigorova, M., Punab, M., Punab, A. M., Poolamets, O., Vihlajev, V., (2014). Reproductive Physiology in Young Men Is Cumulatively Affected by FSH-Action Modulating Genetic Variants: FSHR - 29G/A and c.2039 A/G, FSHB -211G/T. *PLoS ONE* 9(4): e94244
- Grigorova, M., Punab, M., Poolamets, O., Adler, M., Vihlajev, V., Laan, M. (2017). Genetics of Sex Hormone-Binding Globulin and Testosterone Levels in Fertile and Infertile Men of Reproductive Age. *Journal of the Endocrine Society* 1:6 560–576.
- Gutierrez-Pascual, E., Leprince, J., Martinez-Fuentes, A. J., Segalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., ... Castano, J. P. (2009) In vivo and in vitro

- structure activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Mol Pharmacol.* 76: 58–67.
- Han, S. K., Gottsch, M. L., Lee, K. J., Popa, S. M., Smith, J.T., Jakawich, S. K., Clifton, D. K., Steiner, R. A., Herbison, A. E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 25:11349–11356.
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., ... Wilson. D. I. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development* 91(1-2): 403-407
- Harms, J. F., Welch, D. R., Miele, M. E. (2003). KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis.* 20:11–18
- Hayes, F. J., Crowley, W. F. Jr. (1998) Gonadotropin pulsations across development. *Horm Res.* 49:163–168.
- Hou, H., Uusküla-Reimand, L., Makarem, M., Corre, C., Saleh, S., Metcalf, A., Goldenberg, A., Palmert, M. R., Wilson, M. D. (2017). Gene expression profiling of puberty-associated genes reveals abundant tissue and sex-specific changes across postnatal development. *Hum Mol Genet.* 26(18): 3585-3599.
- Huhtaniemi, I. (2006). Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 254–255:84–90.
- Kim, J. S. (2016). What's in a Name? Roles of RFamide-Related Peptides Beyond Gonadotrophin Inhibition. *J Neuroendocrinol* 28:9.
- Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O. (2006) Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2410–2415.
- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., Matzuk, M. M., (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 15, 201–204.
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, C. P. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols.* 4. 8. 1073-1082.
- Laloti, M. D. (2011). Impact of follicle stimulating hormone receptor variants in fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 23:158–167.
- Lam, H. Y., Clark, M. J., Chen, R., Natsoulis, G., O'Huallachain, M., Dewey, F. E., Habegger, L., Ashley, E. A., Gerstein, M. B. (2011). Performance comparison of whole-genome sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* 30:78-82.

- Lapatto, R., Pallais, J. C., Zhang, D., Chan, Y. M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W. W., Hoffman, G. E., Seminara, S. B. (2007). Kiss1/mice exhibit more variable hypogonadism than gpr54/mice. *Endocrinology* 148: 4927–4936.
- Lee, V. H., Lee, L. T., Chow, B. K. (2008). Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene. *FEBS J.* 275:5458–5478.
- Lei, Z. M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X. (2001). Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:184–200.
- Li, D., Mitchell, D., Luo, J., Yi, Z., Cho, S. G., Guo, J., Li, X., Ning, G., Wu, X., Liu, M. (2007). Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology* 148: 4821–4828.
- Lima, C. J. G., Cardoso, S. C., Lemos, E. F. L., ... Lofrano-Porto, A. (2014). Mutational Analysis of the Genes Encoding RFamide-Related Peptide-3, the Human Orthologue of Gonadotrophin-Inhibitory Hormone, and its Receptor (GPR147) in Patients with Gonadotrophin-Releasing Hormone-Dependent Pubertal Disorders. *J Neuroendocrinol* 26: 817–824.
- Liu, P. Y., Veldhuis, J. D. (2009). The Hypothalamo-Pituitary Unit, Testes, and Male Accessory Organs. p. 283-298. In J. F. Strauss III and R. L. Barbieri (ed.). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology. Pathophysiology. and Clinical Management* 6th ed. Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Lofrano-Porto, A., Casulari, L.A., Nascimento, P.P., Giacomini, L., Naves, L.A., da Motta, L.D., Layman, L.C. (2008). Effects of follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin on gonadal steroidogenesis in two siblings with a follicle-stimulating hormone beta subunit mutation. *Fertil. Steril.* 90, 1169–1174
- Loutradis, D., Vlismas, A., Drakakis, P., Antsaklis, A. (2008). Pharmacogenetics in ovarian stimulation – current concepts, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1127:10–19.
- Maione, L., Albarel, F., Bouchard, P., Gallant, M., Flanagan, C. A. (2013) R31C GNRH1 Mutation and Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *PloS ONE* 8(7)
- Martini, F. H (2004). *Fundamentals of Anatomy & Physiology* 6th ed. Pearson Education, Inc.
- Mason, A. J., Pitts, S. L., Nikolics, K., Szonyi, E., Wilcox, J. N., Seeburg, P. H., Stewart, T. A. (1986). The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234, 1372–1378.
- McNeilly, A. S, Crawford, J. L, Taragnat, C. (2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl* 61:463–476.

- Meethala, S. V., Atwood, C. S. (2005). The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cell Mol Life Sci.* 62:257–270.
- Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Ma, D., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R. R., Malinge, I., Lomet, D., ... Aparicio, S. A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 1761–1766.
- Mieritz, M. G., Rakê, L. L., Hagen, C. P., ... Juul A. (2015). A Longitudinal Study of Growth, Sex Steroids, and IGF-1 in Boys With Physiological Gynecomastia. *J Clin Endocrinol Metab* 100(10):3752-9.
- Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., Maudsley S. R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr. Rev.* 25: 235–275.
- Millar, R. P., Pawson, A. J., Morgan, K., Rissman, E. F., Lu, Z. L. (2008). Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* 29:17–35.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, G. E., Thornton, J. M. (1992). Stereochemical Quality of Protein Structure Coordinates. *Proteins: Structure. Function. and Genetics.* 12: 345-364.
- Mouritsen, A., Aksglaede, L., Soerensen, K., Hagen, C. P., Petersen, J. H., Main, K. M., Juul, A. (2012). The pubertal transition in 179 healthy Danish children: associations between pubarche, adrenarche, gonadarche, and body composition. *Eur J Endocrinol* 168(2):129-36.
- Moyle, W. R., Campbell, R. K. (1995). Gonadotropins. p. 230–241. In DeGroot, J. L., Besser, M., Burger, H. G., Jameson, L. J., Loriaux, D. L., Marshall, J. C., Odell, W. D., Potts, jr J. T., Rubenstein, A. H. (ed.). *Endocrinology*. Saunders. Philadelphia/London.
- Narayan, P. (2015). Genetic Models for the Study of Luteinizing Hormone Receptor Function. *Front Endocrinol (Lausanne)* 29;6:152.
- Nuttall, F. Q., Warriar, R. S., Gannon, M. C. (2015). Gynecomastia and drugs: a critical evaluation of the literature. *Eur J Clin Pharmacol* 71(5):569-78.
- Oh, C. D., Maity, S. N., Lu, J. F., Zhang, J., Liang, S., Coustry, F., de Crombrughe, B., Yasuda, H. (2010). Identification of SOX9 interaction sites in the genome of chondrocytes. *Plos One.* 5(4):e10113
- Orsini, M. J., Klein, M. A., Beavers, M. P., Connolly, P. J., Middleton, S. A., Mayo, K. H. (2007). Metastin (KiSS-1) mimetics identified from peptide structure activity relationship-derived pharmacophores and directed small molecule database screening. *J Med Chem.* 50: 462–471.
- Peltoketo, H., Strauss, L., Karjalainen, R., (2010). Female mice expressing constitutively active mutants of FSH receptor present with a phenotype of premature follicle depletion and estrogen excess. *Endocrinology* 151:1872–1883.

- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M. A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E. (2010). Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299:E39–E46.
- Punab, A. M., Grigorova, M., Punab, M., ... Laan, M. (2015). Carriers of variant luteinizing hormone (V-LH) among 1593 Baltic men have significantly higher serum LH. *Andrology*. 3:512-519.
- Punab, A. M., Grigorova, M., Punab, M., Adler, M., Kuura, T., Poolamets, O., Vihlajev, V., Zilaitiene, B., Erenpreiss, J., Matulevicius, V., Laan, M. (2015). Carriers of variant luteinizing hormone (V-LH) among 1593 Baltic men have significantly higher serum LH *Andrology* 3:512–519
- Punab, M., Žilaitiene, B., Jørgensen, N., Horte, A., Matulevicius, V., Peetsalu, A., Skakkebaek, N. E. (2002). Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *International Journal of Andrology*. 25:243–252.
- Plant, T. M., Ramaswamy, S., Dipietro, M. J. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 147: 1007–1013.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., ... Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*. 81:559-75.
- Ramaswamy, S., Guerriero, K. A., Gibbs, R. B., Plant, T. M. (2008) Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149: 4387–4395.
- Ramaswamy, S., Weinbauer, G. F. (2014) Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone, *Spermatogenesis* 4:2, e996025
- Rhen, T., Cidlowski, J. A. (2009). Steroid Hormone Action. p. 105 - 120. *In* J. F. Strauss III and R. L. Barbieri (ed.). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology. Pathophysiology. and Clinical Management* 6th ed. Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Roberts, V. J., Barth, S. L., Meunier, H., Vale, W. (1996). Hybridization histochemical and immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits and messenger ribonucleic acids in the rat brain. *J Comp Neurol*. 364:473–493.

- Rull, K., Grigorova, M., Ehrenberg, A., Vaas, P., Sekavin, A., Nömmemees, D., Adler, M., Hanson, E., Juhanson, P., Laan, M. (2017). FSHB -211 G>T is a major genetic modulator of reproductive physiology and health in childbearing age women. *Human Reproduction* 1–13.
- Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., Meachem, S. J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 205:117–131.
- Sedlmeyer, I. L., Pearce, C. L., Trueman, J. A., ... J. N., Palmert, M. R. (2005). Determination of Sequence Variation and Haplotype Structure for the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and GnRH Receptor Genes: Investigation of Role in Pubertal Timing. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:1091-9.
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., ... Colledge, W. H. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349: 1614–1627.
- Shaffer, P. L., Jivan, A., Dollins, D. E., Claessens, F., Gewirth, D. T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:4758–4763.
- Shiota, M., Fujimoto, N., Takeuchi, A., ... Eto, M. (2018). The Association of Polymorphisms in the Gene Encoding Gonadotropin-Releasing Hormone with Serum Testosterone Level during Androgen Deprivation Therapy and Prognosis of Metastatic Prostate Cancer. *The J of Urology* 99:734-740.
- Silveira, L. G., Noel, S. D., Silveira-Neto, A. P., ... Latronico, A. C. (2010). Mutations of the KISS1 Gene in Disorders of Puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(5):2276–2280.
- Smith, J. T., Dungan, H. M., Stoll, E. A., Gottsch, M. L., Braun, R. E., Eacker, S. M., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976–2984.
- Stamou, M. I., Cox, K. H., Crowley, W. F. (2016). Discovering Genes Essential to the Hypothalamic Regulation of Human Reproduction Using a Human Disease Model: Adjusting to Life in the “-Omics” Era. *Endocrine Review.* 2016(1):4–22.
- Strauss, J. F. (2009). The Synthesis and Metabolism of Steroid Hormones. p. 79-104. In J. F. Strauss III and R. L. Barbieri (ed.). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology. Pathophysiology. and Clinical Management 6th ed.* Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Suganuma, M., Furui, K., Kikkawa, F., Tomoda, Y., Furuhashi, M. (1996). Effects of mutations (Trp 8 Arg and Ile15 Thr) in human luteinizing hormone (LH) b-subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo. *Endocrinology* 137(3), 831–838.

- Zhang, F. P., Poutanen, M., Wilbertz, J., Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol. Endocrinol.* 15, 172–183.
- Zhao, S., Zhu, E., Yang, C., Bentley, G. E., Tsutsui, K., Kriegsfeld, L. J. (2010). RFamide-related peptide and messenger ribonucleic acid expression in mammalian testis: association with the spermatogenic cycle. *Endocrinology* 151: 617–627.
- Tassigny, X. A., Fagg, L. A., Dixon, J. P., ... Colledge, W. H. (2007) Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:10714–10719.
- Tassigny, X. A., Colledge, W.H. (2010). The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction. *Physiology* 25: 207–217.
- Thompson, I. R., Kaiser, U. B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 385(1-2):28-35.
- Topaloglu, A. K., Tello, J. A., Kotan, L. D., ... Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 366:629-35.
- Tremblay, J. J. (2015). Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103:3-10.
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., Sharp, P.J. (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 661–667.
- Tsutsui K, Ubuka T, Son YL, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. (2015). Contribution of GnIH Research to the Progress of Reproductive Neuroendocrinology. *Front Endocrinol* 6:179.
- Tüttelmann, F., Laan, M., Grigorova, M., Punab, M., Söber, S., and Gromoll, J. (2012). Combined Effects of the Variants FSHB 211G>T and FSHR 2039A>G on Male Reproductive Parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3639–3647.
- Ubuka, T., Morgan, K., Pawson, A. J., Osugi, T., Chowdhury, V. S., Minakata, H., Tsutsui, K., Millar, R. P. and Bentley, E. G. (2009). Identification of Human GnIH Homologs. RFRP-1 and RFRP-3. and the Cognate Receptor. GPR147 in the Human Hypothalamic Pituitary Axis. *Plos One* 4:12. e8400.
- Ubuka. T., Kim. S., Huang. Y. C., Reid. J., Jiang. J. (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology* 149:268–278. Erratum in: *Endocrinology* 149: 4229.

- Ubuka T, Son YL, Tobari Y, Narihiro M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K. (2014). Central and direct regulation of testicular activity by gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:8
- Venselaar, H., te Beek. T. A. H., Kuipers. R. K. P., Hekkelman. M. L., Vriend. G. (2010). Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics*. 11:548.
- Vermeulen, A., Verdonck, L., Kaufman, J. M. (1999). A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 84(10):3666–3672.
- Wang, J., Gamazon. R. E., .. Chen. S. L. (2016). Imputing Gene Expression in Uncollected Tissues Within and Beyond GTEx. *The American Journal of Human Genetics*. 98:697-708.
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. p. 11-60. In Nieschlag, E., Behre, H. M., Nieschlag, S. (ed.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed. Springer. Berlin.
- Werner, R., Holterhus, P. M. (2014). Androgen Action. *Endocr Dev Basel, Karger*. 27:28–40.
- Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P. M., Hall, J. E. (2010). The common genetic variant of luteinizing hormone has a longer serum half-life than the wild type in heterozygous women. *J Clin Endocrinol Metab*. 95:383–389.
- Wreford, N.G., Rajendra Kumar, T., Matzuk, M. M., de Kretser, D.M., (2001). Analysis of the testicular phenotype of the follicle-stimulating hormone beta-subunit knockout and the activin type II receptor knockout mice by stereological analysis. *Endocrinology* 142, 2916–2920.
- Feldman Witchel, S., Plant, M. T. (2009). Puberty: Gonadarche and Adrenarche. p. 395-432. In J. F. Strauss III and R. L. Barbieri (ed.). *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology. Pathophysiology. and Clinical Management* 6th ed. Saunders Elsevier. Philadelphia.
- Yalamanchili, K. H., Li. Z., Wang. P., Wong. M. P., Yao. J., Wang. J. (2014). SpliceNet: recovering splicing isoform-specific differential gene networks from RNA-Seq data of normal and diseased samples. *Nucleic Acids Research*. 42:15. e121.
- Yalti, S., Gürbüz, B., Fişcioglu, C. (2002). Serum levels of inhibin B in men and their relationship with gonadal hormones, testicular volume, testicular biopsy results and sperm parameters. *J Obstet Gynaecol*. 22: 649-54.

- Yamada, G., Suzuki, K., Haraguchi, R., Miyagawa, S., Satoh, Y., Kamimura, M., Nakagata, N., Kataoka, H., Kuroiwa, A., Chen, Y. (2006). Molecular genetic cascades for external genitalia formation: an emerging organogenesis program. *Dev Dyn.* 235:1738–1735.
- Yao, Y., Ma, C. H., Tang, H. L., Hu, Y. F. (2011). Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome: a meta-analysis. *Mol Genet Metab* 103:388–393.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://www.omim.org/>

<http://exac.broadinstitute.org/>

<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<https://genome.ucsc.edu/index.html>

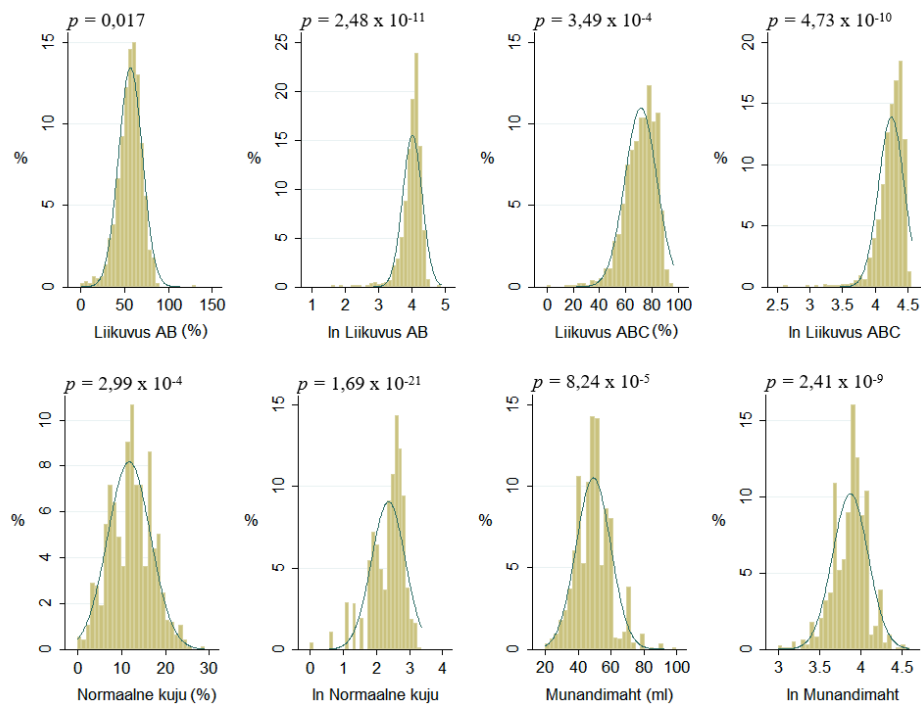
<https://www.gtexportal.org/home/>

<http://www.cmbi.ru.nl/hope>

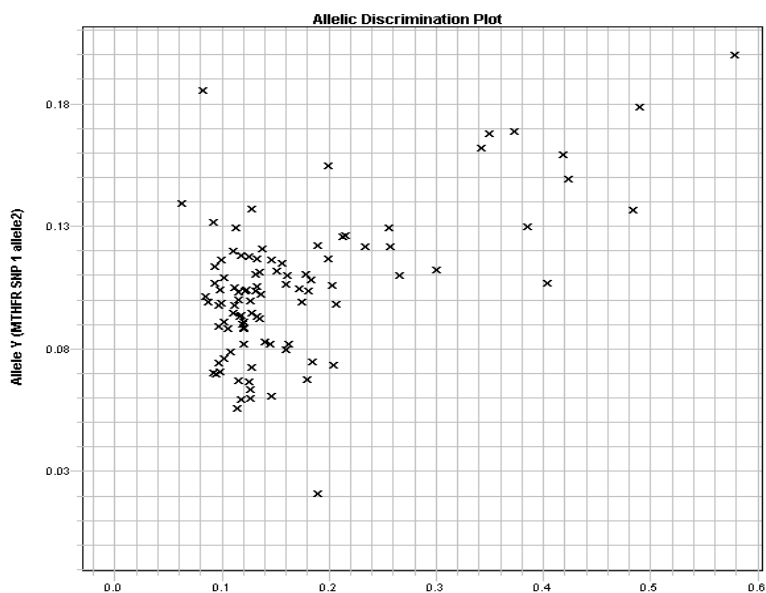
Lisa 1. Reproduktiivsete parameetrite väärtuste sagedusjaotused valimis koos K-S testiga.

Kolmogorov-Smirnovi testi väljundiks normaaljaotuse korral on $p = 1$.

Histogrammid: Stata®



Lisa 2. SNP Genotyping Assay (C__8758863_10, functionally tested) lugematu output.



Lisa 3. Parameetrite jaotuvus vastavalt *GNRH1* (-47 C>G rs6185), *NPFFR1* (433T>G, rs3812694) ja *KISS1* (58C>T, rs12998) genotüüpidele.

	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	Testosteroon (nmol/L)	BioT (nmol/L)	FT (nmol/L)	E ₂ (pmol/L)	SHBG (nmol/L)	FAI (%)
rs6185								
CC	3,01 ± 1,61	4,01 ± 1,66	28 ± 9,11	15,1 ± 5,36	0,64 ± 0,23	95,0 ± 26,3	34,4 ± 13,9	89,2 ± 35,8
n = 544	2,63 (1,17 – 6,25)	3,82 (1,80 – 6,93)	26,9 (14,7 – 44)	14,3 (7,97 – 24,5)	0,61 (0,34 – 1,04)	91 (59 – 142)	32 (17 – 59)	82,3 (46,6 – 146)
CG	3,10 ± 1,62	4,05 ± 1,57	26,9 ± 8,73	14,5 ± 5,20	0,62 ± 0,21	93,2 ± 25,0	34,0 ± 14,1	86,2 ± 34,9
n = 353	2,82 (1,13 – 5,86)	3,81 (1,90 – 7,00)	26,2 (15,0 – 42,9)	13,7 (7,58 – 23,8)	0,58 (0,32 – 1)	89 (59 – 141)	31 (17 – 55)	79,6 (45,7 – 143)
GG	3,30 ± 1,76	4,12 ± 1,87	26,4 ± 9,78	13,7 ± 5,70	0,58 ± 0,24	88,9 ± 20,5	36,1 ± 13,9	78,5 ± 27,0
n = 63	3,24 (1,23 – 6,48)	4,10 (1,70 – 7,42)	26 (13,7 – 38,5)	13,3 (7,11 – 22,1)	0,57 (0,30 – 0,94)	85 (61 – 125)	34 (18 – 65)	75 (40 – 127)
rs381269								
TT	3,06 ± 1,59	4 ± 1,59	27,3 ± 8,82	14,7 ± 5,18	0,62 ± 0,22	93,6 ± 25,2	34,5 ± 13,7	86,2 ± 33,4
n = 839	2,75 (1,19 – 6,11)	3,82 (1,80 – 6,93)	26,4 (14,4 – 43,1)	13,9 (7,73 – 23,3)	0,59 (0,33 – 0,99)	90 (59 – 140)	32 (17 – 58)	79,6 (45,6 – 142)
TG	3,16 ± 1,80	4,27 ± 1,89	29 ± 10,2	16 ± 6,38	0,68 ± 0,27	96,1 ± 25,8	33,7 ± 15,8	96,7 ± 45,9
n = 117	2,63 (1,17 – 6,71)	4,04 (1,79 – 7,41)	27,8 (16,1 – 49,8)	15,3 (8,49 – 28,1)	0,65 (0,36 – 1,20)	91,5 (58 – 142)	31 (17 – 65)	89,4 (45,2 – 186)
GG	1,70 ± 0,43	5,94 ± 1,24	41,4 ± 10,4	21,1 ± 5,80	0,90 ± 0,25	171 ± 12,7	43,5 ± 3,54	94,4 ± 16,2
n = 2	1,70 (1,39 – 2,00)	5,94 (5,06 – 6,81)	41,4 (34 – 48,7)	21,1 (17,0 – 25,2)	0,90 (0,73 – 1,08)	171 (162 – 180)	43,5 (41 – 45)	94,4 (82,9 – 106)
rs12998								
CC	3,06 ± 1,62	4,06 ± 1,65	27,5 ± 8,99	14,8 ± 5,41	0,63 ± 0,23	93,8 ± 25,7	34,5 ± 13,9	87,2 ± 35,5
n = 842	2,72 (1,19 – 6,08)	3,83 (1,82 – 6,94)	26,6 (14,5 – 43,2)	14 (7,73 – 23,8)	0,60 (0,33 – 1,01)	90 (59 – 142)	32 (17 – 58)	80,8 (45 – 143)
CT	3,17 ± 1,65	3,96 ± 1,51	26,9 ± 8,66	14,5 ± 4,29	0,62 ± 0,18	93,2 ± 22,1	33,4 ± 14,3	87,8 ± 29,7
n = 94	2,97 (1,14 – 6,80)	3,94 (1,79 – 7,19)	25,2 (15 – 44,1)	14,1 (8,48 – 22,4)	0,60 (0,36 – 0,95)	90,1 (58 – 142)	30 (17 – 65)	82,3 (49,3 – 151)
TT	1,61	2,52	28	18,1	0,77	121	23	122
n = 1								

keskmine ± SD; mediaan (5 % – 95 % protsentiil).

Lisa 4. Parameetrite jaotuvus vastavalt *GNRH1* (-47 C>G rs6185), *NPFFR1* (433T>G, rs3812694) ja *KISS1* (58C>T, rs12998) genotüüpidele.

	Munandimaht (ml)	Ejakulaat (ml)	Sperm. konts. (mln/ml)	Sperm. üldhulk (mln)	Norm. sperm. (%)	Liikuvus AB (%)	Liikuvus ABC (%)	Inhibiin B (ng/L)
rs6185								
CC	49,5 ± 10,6	3,52 ± 1,66	83,9 ± 77,7	285 ± 300	11,9 ± 4,95	57,2 ± 12,7	71,4 ± 11,7	224 ± 79,5
n = 544	50 (32 – 70)	3,20 (1,30 – 6,40)	65,3 (11,2 – 214)	220 (25,3 – 767)	12 (4 – 20)	58,5 (35 – 76)	72,8 (50,7 – 86,7)	214 (114 – 379)
CG	48,8 ± 10,5	3,63 ± 3,63	76,4 ± 70,2	255 ± 245	11,6 ± 5,10	56,8 ± 14,1	70,9 ± 13,4	229 ± 78,4
n = 353	50 (33 – 70)	3,30 (1,30 – 6,50)	60,2 (6,12 – 211)	183 (16,2 – 722)	12 (3 – 19)	57,7 (33 – 77,7)	72,7 (50 – 87,3)	221 (106 – 369)
GG	48,6 ± 8,63	3,57 ± 1,62	71,3 ± 54	250 ± 207	12,1 ± 4,47	57,2 ± 16,9	72,3 ± 11,1	248 ± 69,4
n = 63	48 (36 – 65)	3,39 (1,40 – 6,50)	52 (8,16 – 184)	187 (18,4 – 692)	12 (6 – 20)	57,5 (34 – 77,3)	74,3 (55,3 – 86)	241 (162 – 399)
rs3812694								
GG	49,3 ± 10,4	3,57 ± 2,67	81,4 ± 76	276 ± 284	11,8 ± 5,07	57 ± 13,5	71,3 ± 12,1	229 ± 78,7
n = 839	50 (33 – 70)	3,30 (1,30 – 6,43)	62,6 (8,16 – 214)	209 (17,2 – 759)	12 (3 – 20)	58 (34 – 77)	72,8 (50,7 – 86,7)	220 (115 – 375)
TG	48 ± 9,57	3,49 ± 1,68	72,8 ± 54,4	242 ± 202	11,4 ± 4,19	56,9 ± 13,6	71,1 ± 13,6	221 ± 78,8
n = 117	50 (32 – 60)	3,10 (1,20 – 6,70)	65,3 (11,2 – 184)	196 (23,9 – 623)	12 (4 – 17)	58,3 (29,3 – 76)	74,3 (49,3 – 86,7)	210 (106 – 378)
GG	58,5 ± 12	3,56 ± 1,90	64,6 ± 82,7	152 ± 172	9 ± 2,83	53,8 ± 0,35	72,2 ± 8,25	231 ± 36,8
n = 2	58,5 (50 – 67)	3,56 (2,22 – 4,90)	64,6 (6,12 – 123)	152 (30 – 273)	9 (7 – 11)	53,8 (53,5 – 54)	72,2 (66,3 – 78)	231 (205 – 257)
rs12998								
CC	49,1 ± 10,5	3,59 ± 2,68	79,1 ± 73,6	269 ± 279	11,8 ± 5,05	57 ± 13,7	71,2 ± 12,4	228 ± 78,6
n = 842	50 (33 – 70)	3,30 (1,30 – 6,50)	62,3 (8,75 – 196)	204 (18,4 – 719)	12 (3 – 20)	58 (34 – 76,7)	73 (50 – 86,7)	219 (114 – 371)
CT	49,2 ± 9,44	3,38 ± 1,58	86,6 ± 76,3	283 ± 240	11,6 ± 4,51	56,1 ± 13	70,4 ± 12,3	219 ± 75,1
n = 94	50 (33 – 60)	3,12 (1 – 6,51)	66,3 (10 – 244)	233 (16,8 – 772)	12 (3 – 18)	57,2 (35,7 – 75)	72,7 (50 – 86)	217 (100 – 369)
TT	52	2,70	216	584	15	62,3	71,7	269
n = 1								

keskmine ± SD; mediaan (5 % – 95 % protsentiilid).

Lisa 5. Geneetiliste markerite (*GNRH1*, rs6185; *NPFFR1*, rs3812694; *KISS1*, rs12998) ja reproduktiivsete parameetrite regressioonianalüüs.

	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	Testosteroon (nmol/L)	E ₂ (pmol/L)	SHBG (nmol/L)	FT (nmol/L)	FT (%)	BioT (nmol/L)	BioT (%)
rs6185									
ADD	0,10 (0,07)	0,05 (0,08)	-1,01 (0,47)	-8,05 (8,79)	-1,66 (3,24)	-0,07 (0,06)	-0,18 (0,24)	-1,60 (1,41)	-4,15 (5,19)
<i>p</i> -väärtus	0,2168	0,607	0,033	0,068	0,979	0,646	0,435	0,031	0,260
REC	0,21 (0,18)	0,01 (0,21)	-1,16 (1,18)	-8,20 (23,4)	0,03 (8,65)	-0,08 (0,17)	-0,08 (-0,18)	-1,71 (3,77)	-3,96 (13,8)
<i>p</i> -väärtus	0,265	0,686	0,325	0,077	0,352	0,615	0,721	0,106	0,163
rs3812694									
ADD	-0,01 (0,13)	0,21 (0,15)	0,43 (4,99)	-1,55 (16,9)	-3,55 (6,19)	0,02 (0,12)	-0,11 (0,45)	0,48 (2,70)	-2,12 (9,92)
<i>p</i> -väärtus	0,682	0,062	0,010	0,027	0,732	0,846	0,836	0,002	0,060
REC	-0,94 (1,13)	1,90 (1,24)	10,9 (65,6)	59 (217)	3,41 (81,7)	0,15 (1,70)	-0,21 (-0,46)	3,81 (35,9)	-10,2 (128)
<i>p</i> -väärtus	0,300	0,129	0,032	0,00001	0,392	0,837	0,901	0,092	0,699
rs12998									
ADD	0,10 (0,15)	-0,16 (0,17)	-2,53 (5,68)	-7,15 (19,1)	-4,02 (7,05)	-0,06 (0,14)	-0,18 (0,52)	-1,27 (3,08)	-3,76 (11,3)
<i>p</i> -väärtus	0,469	0,307	0,570	0,884	0,629	0,601	0,706	0,499	0,506
REC	-1,21 (1,74)	-0,89 (1,88)	5,11 (130)	54,2 (426)	-5,94 (163)	0,43 (3,46)	0,40 (1,19)	9,93 (71,5)	26,2 (252)
<i>p</i> -väärtus	0,321	0,522	0,835	0,298	0,366	0,868	0,896	0,400	0,227

β koefitsent (Standardviga); *p*-väärtus. Testid: PLINK 1.07

Lisa 6. Geneetiliste markerite (*GNRH1*, rs6185; *NPFFR1*, rs3812694; *KISS1*, rs12998) ja reproduktiivsete parameetrite regressioonianalüüs.

	Inhibiin B (ng/L)	FAI (%)	Munandimaht (ml)	Ejakulaat (ml)	Sperm. konts. (mln/ml)	Sperm. hulk (mln)	Norm. sperm. (%)	Liikuvus AB (%)	Liikuvus ABC (%)
rs6185									
ADD	-6,53 (20,7)	-9,10 (7,97)	-3,58 (4,69)	-0,20 (0,33)	-10,1 (6,16)	-30,8 (19,4)	-0,09 (0,27)	-0,29 (0,71)	-0,03 (0,64)
<i>p</i> -väärtus	0,069	0,047	0,325	0,514	0,054	0,082	0,743	0,681	0,963
REC	20,7 (10,2)	-10,5 (21,3)	-2,20 (12,5)	0,02 (0,89)	-6,68 (16,6)	-11,8 (52,6)	0,43 (0,68)	0,03 (1,76)	1,00 (1,60)
<i>p</i> -väärtus	0,043	0,048	0,692	0,781	0,366	0,725	0,529	0,988	0,532
rs3812694									
ADD	-21,1 (39,6)	3,55 (15,3)	-3,57 (8,93)	-0,31 (0,63)	-7,38 (11,8)	-44,9 (25,5)	-0,51 (0,49)	-0,31 (1,30)	-0,42 (1,17)
<i>p</i> -väärtus	0,324	0,001	0,637	0,606	0,156	0,078	0,294	0,811	0,723
REC	-11 (55,2)	-0,51 (199)	0,92 (116)	-0,38 (8,69)	-29,4 (168)	-65,2 (187)	-2,68 (3,53)	-4,28 (9,51)	-0,06 (8,60)
<i>p</i> -väärtus	0,843	0,759	0,171	0,990	0,986	0,728	0,448	0,653	0,995
rs12998									
ADD	-22,2 (44,9)	-5,38 (17,4)	-3,50 (10,2)	-0,39 (0,72)	2,80 (13,5)	28,1 (28,4)	-0,18 (0,54)	-1,20 (1,45)	-1,39 (1,32)
<i>p</i> -väärtus	0,449	0,842	0,836	0,422	0,120	0,324	0,744	0,408	0,292
REC	26,4 (77,8)	43,6 (34,6)	10,8 (228)	0,31 (17,6)	163 (347)	285 (264)	3,38 (5,02)	7,59 (13,5)	3,20 (12,3)
<i>p</i> -väärtus	0,735	0,208	0,849	0,837	0,096	0,281	0,501	0,574	0,227

β koefitsent (Standardviga); *p*-väärtus. Testid: PLINK 1.07

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Jaan Vihalemm

(sünnikuupäev: 23.06.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Meeste reproduktiivfüsioloogia geneetiline komponent

mille juhendajad on Marina Grigorova ja Maris Laan

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.09.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 13.06.2018