

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ja

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Kaasasündinud munandite laskumise häire pärilikud tegurid

Magistritöö

30 EAP

Galina Belova

Juhendajad:

Maris Laan, PhD

Inimese geneetika professor

Bio- ja siirdemeditsiini instituut, Tartu Ülikool

Laura Kasak, PhD

Inimese geneetika lektor

Bio- ja siirdemeditsiini instituut, Tartu Ülikool

Anna-Grete Juchnewitsch, MSc

Arstiteaduse doktorant

Bio- ja siirdemeditsiini instituut, Tartu Ülikool

TARTU 2022

INFOLEHT

„Kaasasündinud munandite laskumise häire pärilikud tegurid“

Munandite laskumatus ehk krüptorhism on sageli esinev kaasasündinud arenguhäire vastasündinud poistel, mille korral on munandikotis puudu vähemalt üks munand. Krüptorhism võib esineda mõne arengugeneetilise sündroomi raames või isoleeritult. Mittesündroomse krüptorhismiga seostuvaid geneetilisi variante on peamiselt seostatud *INSL3*, *RXFP2* (*INSL3* retseptor) ja *Androgeeni retseptori* geenidega. Eksoomi sekveneerimine (ES) on laialdaselt kasutatav tehnoloogia tänapäeva personaalmeditsiinis, mida saab rakendada haigusseoseliste geenivariantide avastamisel. Käesoleva magistritöö esimeseks eesmärgiks oli koostada teaduskirjanduse põhjal krüptorhismi kandidaatgeenide nimekiri. Teiseks eesmärgiks oli teostada ES andmete alusel kandidaatgeenide uuring, et tuvastada haigusseoselisi geenivariante krüptorhismi ja sellega kaasneva spermatogeneesihäire diagnoosiga meestel.

Märksõnad: eksoomi sekveneerimine, krüptorhism, munandite laskumise häire, SNV

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika; B450 Arengubioloogia, teratoloogia, ontogenees, (inim)embrüoloogia; B790 Kliiniline geneetika

„Hereditary factors of congenital undescended testes“

Cryptorchidism, is a common congenital malformation in newborn boys in which at least one testicle is missing from the scrotum. This condition may occur either in the context of a developmental disorder or in an isolated form. Non-syndromic cryptorchidism has been linked to pathogenic variants in the *INSL3*, *RXFP2* (receptor of *INSL3*) and *Androgen receptor* genes. Exome sequencing (ES) is a widely used technology in personal medicine to discover pathogenic variant causative to genetic disorders. The first aim of this study was to compile a list of candidate genes for cryptorchidism using scientific literature. The second aim was to carry out candidate gene analysis using ES dataset of patients diagnosed with cryptorchidism accompanied by spermatogenic failure.

Keywords: cryptorchidism, exome sequencing, SNV, undescended testes

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics; B450 Development biology, teratology, ontogeny, embryology (human); B790 Clinical genetics

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Krüptorhism	8
1.1.1. Normaalne munandite laskumine	8
1.1.1.1. Anatoomiline mudel	8
1.1.1.2. Hormonaalne kontroll	10
1.1.1.3. Munandite laskumise olulisus.....	12
1.1.2. Krüptorhismi klassifikatsioon.....	12
1.1.3. Krüptorhismi epidemioloogia ja patogenees	13
1.1.3.1. Krüptorhismi riskitegurid	14
1.1.4. Võimalikud krüptorhismiga kaasuvad haigused.....	15
1.1.4.1. Munandivähk	15
1.1.4.2. Meeste viljatus	16
1.2. Krüptorhismi geneetiline taust.....	17
1.2.1. Krüptorhismi perekondlik eelsoodumus.....	17
1.2.2. Olulisemad munandite laskumisega seotud geenid	17
1.2.2.1. Insuliinilaadne peptiid 3 ja relaksiin perekonna valk 2	17
1.2.2.2. Androgeeni retseptor.....	18
1.2.3. Teised võimalikud geenid.....	19
1.2.3.1. Soo arengu häireid põhjustavad geenid	19
1.2.3.2. Ras-mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi signaalraja geenid	22
1.3. Eksoomi sekveneerimine	23
1.3.1. Diagnostiline saagis eksoomi sekveneerimisel.....	23
1.3.2. Haigusseoselisuse hindamine	24
1.3.3. Eksoomi analüüsi kasutamine haigusseoseliste variantide tuvastamiseks	25
1.3.4. Eksoomi analüüsimisel kasutatavad andmebaasid.....	26
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	29
2.1. Töö eesmärgid.....	29

2.2. Materjal ja metoodika	30
2.2.1. Eetikakomitee luba	30
2.2.2. Valim	31
2.2.3. Eksoomi sekveneermise andmed	31
2.2.4. Uurimistöös kasutatud andmebaasid	32
2.2.5. Analüüsitavad kandidaatgeenid ja nendes esinevate variantide hindamine	34
2.2.5.1. Kandidaatgeenide nimekirja koostamine	34
2.2.5.2. Kandidaatgeenides esinevate variantide filtreerimine	34
2.2.5.3. Kandidaatgeenides esinevate variantide patogeensuse hindamine	35
2.2.5.4. Variantide kontrollimine	35
2.2.6. Sanger sekveneerimine leitud geenivariantide kinnitamiseks	35
2.2.6.1. Praimerite disainimine	35
2.2.6.2. PCR reaktsioon	36
2.2.7. Andmete analüüs	36
2.3. Tulemused	37
2.3.1. Krüptorhismiga seotud geenide nimekiri	37
2.3.2. Geenivariantide filtreerimine	41
2.3.3. Krüptorhismiga indiviidide potentsiaalselt haigusseoselised leiud	42
2.4. Arutelu	45
2.4.1. Potentsiaalselt haigusseoseliste leidude sisuline analüüs	45
KOKKUVÕTE	50
SUMMARY	51
TÄNUSÕNAD	53
KASUTATUD KIRJANDUS	54
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	67
LISAD	68
Lisa 1. Patogeensete ja healoomuliste variantide klassifitseerimise kriteeriumid	68
Lisa 2. Lisainformatsioon kandidaatgeenide kohta	69
Lisa 3. Kasutatud PCR programmid	71
Lisa 4. Amplifitseeritud PCR produktide geelelektrofores	72
LIHTLITSENTS	73

KASUTATUD LÜHENDID

ACMG	Ameerika Meditsiinigeneetika ja -genoomika Kolleegium (<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>)
AIS	Androgeeni puudulikkuse sündroom (<i>androgen insensitivity syndrome</i>)
AMH	Anti-Mülleri hormoon
AMP	Molekulaarpatoloogia Assotsiatsioon (<i>Association of Molecular Pathology</i>)
CADD	Geenivariandi patogeensust määrav skoor (<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>)
CGRP	Kaltsitoniini geeniga seotud peptiid (<i>calcitonin gene-related peptide</i>)
ES	Eksoomi sekveneerimine
FIMM	Helsinki Ülikooli Molekulaarmeditsiini instituut (<i>Institute for Molecular Medicine of Finland</i>)
FSH	Folliikuleid stimuleeriv hormoon
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
HPA	<i>Human Protein Atlas</i>
HPO	<i>Human Phenotype Ontology</i>
IGV	Genoomiandmeid visualiseeriv genoomibrauser (<i>Integrative Genomics Viewer</i>)
LH	Luteiniseeriv hormoon
MAF	Minoorse alleeli sagedus (<i>minor allele frequency</i>)
MAPK	Mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas
MGI	Hiire genoomi andmebaas (<i>Mouse Genome Informatics</i>)

NGS	Uue põlvkonna sekveneerimine (<i>new generation sequencing</i>)
NS	Noonani sündroom
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAIS	Osaline androgeeni puudulikkuse sündroom (<i>partial androgen insensitivity syndrome</i>)
SNV	Ühenukleotiidne variatsioon (<i>single nucleotide variation</i>)
TGCT	Munandi sugurakkude kasvaja (<i>testicular germ cell tumor</i>)
TÜ BSMI	Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituut
VCF	<i>Variant Call Format</i>
VUS	Ebaselge tähendusega variant (<i>variant of uncertain significance</i>)

SISSEJUHATUS

Munandite laskumatus ehk krüptorhism on üks sageli esinev kaasasündinud arenguhäire eelkõige enneaegselt sündinud poistel (Elamo *et al.*, 2022), mis õigeaegse kirurgilise sekkumiseta võib raskematel juhtudel anda aluse nii munandivähi arengule kui ka meeste viljatusele (Bitran *et al.*, 2020). Krüptorhismi patogeneesi riskiteguriteks peetakse nii keskkonnast tingitud kui ka geneetilisi põhjusi (eelkõige sündroomse krüptorhismi korral). Varasemate perekondlike uuringute põhjal on teada, et ühe või mõlema munandi laskumatus pärandub järgmise põlvkonna pereliikmetele (Jensen *et al.*, 2010; Schnack *et al.*, 2008). Samas jääb mittesündroomse ehk isoleeritud krüptorhismi geneetika teadmistest tänapäeval ikkagi puudu (Elamo *et al.*, 2022).

Eksoomi sekveneerimist (ES) peetakse kliinilises praktikas siiaani üheks efektiivseimaks diagnostiliseks meetodiks tuvastamaks monogeensete haiguste geneetilisi põhjusi. ES-i lähenemisviis keskendub genoomis olevatele konkreetsetele piirkondadele ehk eksonitele ja nendes esinevatele geneetilistele variantidele, mis lihtsustab oluliselt andmete analüüsimist. Lisaks annab ES palju kõrgema diagnostilise saagise (20-50%), võrreldes mitmete teiste geneetiliste meetoditega (Suwinski *et al.*, 2019).

Antud magistritöö kirjanduse osas antakse ülevaade normaalsest munandite laskumisest ning põhjalikumalt keskendutakse selle protsessi häirumisele ehk krüptorhismile, selle epidemioloogiale, võimalikele kaasuvatele haigustele ning geneetilisele taustale. Lisaks on kirjeldatud eksoomi sekveneerimist, kui üht tõhusaimat molekulaardiagnostilist meetodit, tuvastamaks patogeenseid geneetilisi variante. Samuti on toodud välja juhend hindamaks eksoomi sekveneerimise järgselt saadud geenivariantide haigusseoselisust.

Antud töö üldeesmärgiks oli uurida võimalikke haigusseoselisi variante krüptorhismi kandidaatgeenides idiopaatilise munandi laskumishäirega meespatsientide valimis rakendades eksoomi sekveneerimise tehnoloogiat.

Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi (TÜ BSMI) inimese geneetika õppetoolis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Krüptorhism

Krüptorhism ehk munandi laskumishäire on poistel üks sagedasemaid kaasasündinud urogenitaaltrakti väärarenguid, mille korral puudub munandikotist vähemalt üks munand (Leslie *et al.*, 2020). Antud väärareng võib esineda nii isoleeritud kujul kui ka eraldi komponendina 46,XY soo arengu häirete (García-Acero *et al.*, 2020) ja kaasasündinud sündroomide (näiteks Noonani, MIM: 610733) korral (Hebron *et al.*, 2022).

Krüptorhism on eelkõige iseloomulik enneaegselt (enne 37. rasedusnädalat) sündinud poisslaste seas ja selle esinemise osakaal on umbes 30% (Bartz *et al.*, 2020). Eestis on munandi laskumishäirega sündinud poiste sagedus umbes 2,1% kõikidest vastsündinutest. Esimeseks eluaastaks on munandite iseeneslik laskumine täheldatud 62% krüptorhismiga sündinud eelkõige enneaegselt ja väikesekaalulistel poisslastel (Kübarsepp *et al.*, 2022).

1.1.1. Normaalne munandite laskumine

Kümnendal nädalal pärast viljastumist alustavad munandid oma liikumist munandikotti, mis on alguse saanud loote neljandal arengunädalal labioskrotaalsest turses ning sopistub välja umbes 12. gestatsiooninädalaks (Agrawal, 2017; Garcia ja Sajjad, 2020). Normaalne munandite laskumise protsess on kontrollitud nii anatoomiliste kui ka hormonaalsete faktorite poolt (Rodprasert *et al.*, 2020).

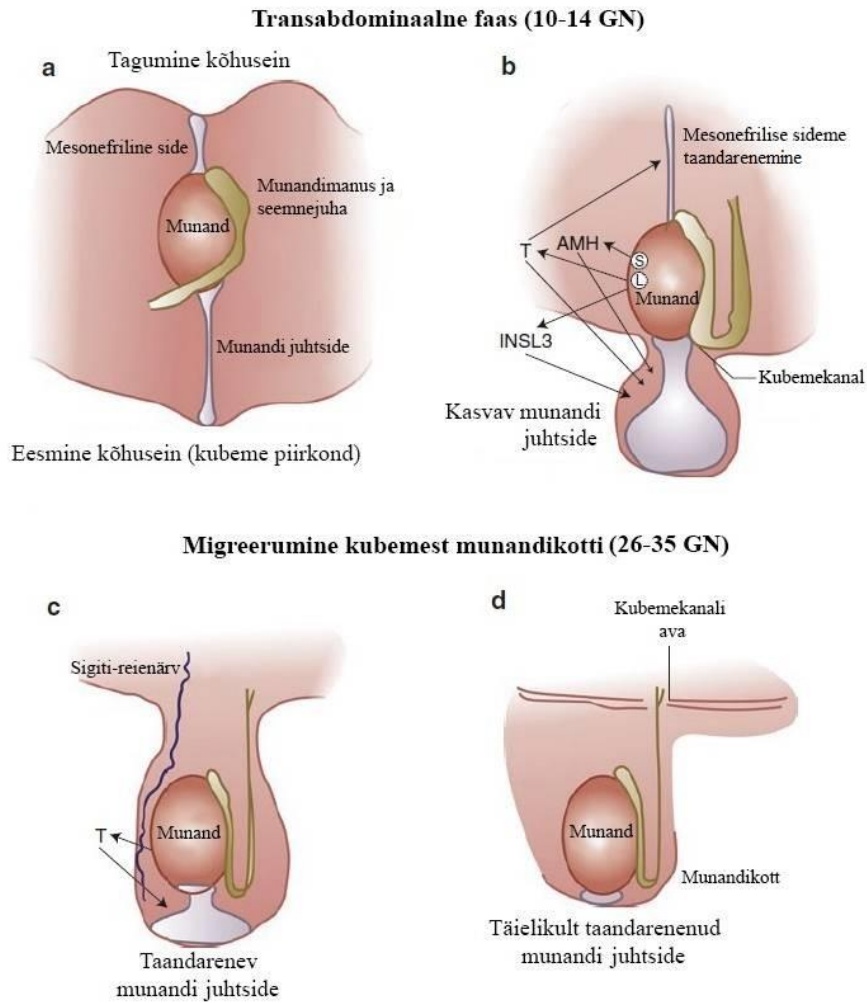
1.1.1.1. Anatoomiline mudel

Munandite laskumine on embrüonaalse arengu käigus erinevatel ajahetkedel toimuv kahe-etapiline protsess, mille eesmärgiks on munandite liikumine oma esialgselt asukohast munandikotti (Titi-Lartey ja Khan, 2020). Esmases ehk transabdominaalses munandite laskumisetapis hakkab tagumise kõhuseina küljele kinnitatud munand liikuma kubeme piirkonna suunas. Antud protsess algab 10. gestatsiooninädalal ja kestab umbes viis nädalat (Bitran *et al.*, 2020; Titi-Lartey ja Khan, 2020). Selles etapis on eriti oluline roll munandi juhtsidemel (*gubernaculum Hunteri*), mis moodustub enne munandite laskumisprotsessi algust (Mäkelä *et al.*, 2019; Rodprasert *et al.*, 2020).

Munandi juhtside on mesenhümaalne struktuur, mis asub munandi ja kubeme piirkonna vahel (Joonis 1a) (Mäkelä *et al.*, 2019). Munandi juhtside ei ole proksimaalselt munandiga seotud,

vaid on kinnitatud Wolff'i juha või munandimanuse kaudaalse poolusega (Hadziselimovic, 2017). Munandi juhtsideme distaalne ots paisub läbi rakkude jagunemise ning hüaluroonhappe kuhjumise ekstratsellulaarse maatriksi, mille abil moodustub nn munandi juhtsideme sibul (*gubernacular bulb*) (Joonis 1b) (Rodprasert *et al.*, 2020; Titi-Lartey ja Khan, 2020). Samal ajal kraniaalselt munanditega seotud mesonefrilise sideme (*cranial suspensory ligament*) taandarenemine aitab aga hilisemale munandite laskumisele (Titi-Lartey ja Khan, 2020). Kubemekanal moodustub loote varases arengujärgus ning munandi juhtsideme paisumise tõttu toimub kubemekanali laienemine, mis samamoodi hõlbustab munandite laskumise hilisemat etappi (Rodprasert *et al.*, 2020). Munandid jõuavad kubeme piirkonnas areneva sisemise kubemekanali avani (*internal inguinal ring*) umbes 12. loote arengunädalaks. Kubemekanali ava juures paigal hoidmine on tagatud munandi juhtsideme proksimaalse otsa lühenemise ja munandi juhtsideme sibula järk-järgulise kasvamisega (Rodprasert *et al.*, 2020; Titi-Lartey ja Khan, 2020).

Pärast esimest munandite laskumisetappi jäävad munandid umbes 12 nädalaks paigale. 26. nädalal pärast viljastumist leiab aset munandite migreerumise teine faas, mille korral jõuavad munandid oma sihtkohta (Joonis 1c) (Mäkelä *et al.*, 2019). Antud faasis on võtmeroll ventraalsel evagineerumisel (*processus vaginalis*), mis leiab aset kõhukelme mõlemal pool. Selline evagineerumine järgib kaudaalselt pikeneva munandi juhtsideme suunda (Titi-Lartey ja Khan, 2020). Munandi juhtside omakorda pikeneb sigiti-reienärvilt vabastatud kaltsitoniini geeniga seotud peptiidi tõttu (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*) (Bitran *et al.*, 2020; Elamo *et al.*, 2022). Munand koos munandimanuse ja munandi juhtsidemega migreeruvad mööda laienuvad kubemekanalit välimisest kubemekanali avast (*external inguinal ring*) ja jõuavad munandikotti kõhu seest tekkiva rõhu tõttu (Joonis 1d) (Mäkelä *et al.*, 2019; Titi-Lartey ja Khan, 2020). Munandite laskumise lõppemisel hakkavad mõlemad munandi juhtsidemed tõmbuma kokku ja evagineerumise protsessi käigus tekkinud süvend sulgub. Tavaliselt peavad munandid olema täielikult munandikotti laskunud enne sündi ehk umbes 35. gestatsiooninädalaks (Mäkelä *et al.*, 2019).



Joonis 1. Munandite laskumise protsess. Munandite laskumine toimub kaheetapiselt. Transabdominaalne faas (a, b) toimub 10-14. gestatsiooninädalal (GN), mil munandi juhtsideme paisumist mõjutavad Leydigi rakkude (L) poolt produtseeritud INSL3 ning Sertoli rakkude (S) poolt toodetud anti-Mülleri hormoon (AMH). Testosteron (T) kontrollib mesonefrilise sideme taandarenemist. AMH ja T koos INSL3-ga annavad aluse munandi juhtsideme paisumisele (b). Munandi migreerumine kubeme piirkonnast munandikotti toimub 26-35 gestatsiooninädala vahemikus (c, d). Munandi juhtsideme suunas evagineerumise ja kõhuõõne poolt tekitatud rõhu tõttu jõuab munand kubemekanali avast munandikotti. Munandi juhtsideme taandarenemisele aitab kaasa T (c) (Kohandatud Bitran *et al.*, 2020 järgi).

1.1.1.2. Hormonaalne kontroll

Munandite migratsiooni kõhuõõnest munandikotti kontrollitakse erinevate hormonaalsete faktorite poolt. Tähtsamad nendest on insuliinilaadne peptiid 3 (INSL3, *insuline-like peptide 3*) ja androgeenid, aga ka anti-Mülleri hormoon (AMH) (Rodprasert *et al.*, 2020).

Transabdominaalse munandite laskumise faasi algatamine on võimalik INSL3 sekretsiooni tõttu Leydigi rakkudest, mis paiknevad munandites. INSL3 on väike peptiidhormoon, mis

struktuuri poolest väga sarnane kasvufaktoritega ning mille sekretsiooni reguleerivad platsentaarne inimese kooriongonadotropiin ja luteiniseeriv hormoon (LH). Antud peptiidhormooni peamiseks ülesandeks on munandi juhtsideme kasvu ja paisumise stimuleerimine (Kuiri-Hänninen *et al.*, 2019; Rodprasert *et al.*, 2020). Seda teostab INSL3 läbi munandi juhtsideme pinnal oleva relaksiin perekonna valk 2 (RXFP2) retseptoriga seondumise (Bitran *et al.*, 2020). Hiiremudelitel on näidatud, et *Insl3* geeni vaigistamisel munandi juhtside ei paisu. Selle tagajärjeks on kahepoolsed abdominaalselt paiknevad munandid (Nef ja Parada, 1999).

Munandite laskumise teine etapp sõltub aga enamasti ainult androgeenidest. Selles arengujärgus vastutavad androgeenide sünteesimisprotsessi eest samuti Leydigi rakud, mille stimuleerimine saavutatakse loote LH ja folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) kõrgema produktsiooni tõttu. Nii testosteroon kui ka 5α -dihüdrotestosteroon mõjutavad munandi juhtsidet läbi androgeeni retseptorite. On näidatud, et androgeenide puudulikul aktiivsusel või androgeeni retseptorite funktsioneerimist häirivate geenivariantide korral jäävad 46,XY lootel munandid kõhuõõnest laskumata (Kuiri-Hänninen *et al.*, 2019).

Arvatakse, et munandite Sertoli rakkudest pärit AMH-1 on samamoodi oma kindel ülesanne munandite laskumise edendamises, täpsemalt osaleb antud hormoon munandi juhtsideme lühikesena säilitamises (Mäkelä *et al.*, 2019). Samuti vastutab AMH Mülleri juhade taandarenemise eest (Elamo *et al.*, 2022). Normaalses 46,XY lootes on AMH tase üpris kõrge, seega muutused *AMH* geenis võivad olla nii püsiva Mülleri juha sündroomi (*persistent Müllerian duct syndrome*) kui ka kõhuõõnesiseste munandite põhjuseks (Bitran *et al.*, 2020; Rodprasert *et al.*, 2020).

Sünnijärgselt ilma komplikatsioonideta munandikotti migreerunud munandite korral on vastsündinu nabaväädivere LH ja FSH tasemed üpris madalad platsenta hormoonide kõrge kontsentratsiooni tõttu (Renault *et al.*, 2020). Gonadotropiinide väärtused suurenevad märkimisväärselt enne kuuendat elukuud, kui toimub hüpotaalamuse-hüpofüüsi-gonaadide telje aktiveerumine ehk minipuberteet (Lanciotti *et al.*, 2018; Renault *et al.*, 2020). Kuni esimese eluaastani jäävad INSL3, inhibiin B, AMH ja testosterooni kontsentratsioonid madalaks, mis viitab normaalsele Leydigi ning Sertoli rakkude funktsioneerimisele (Fénichel *et al.*, 2015). Üheaastastel poistel, kellel esineb madal INSL3 ja testosterooni tase, võib

põhjuseks olla krüptorhism (Rodprasert *et al.*, 2020). Kaasasündinud krüptorhismi korral on täheldatud, et testosterooni tase puberteedi ajal ei kõrgene. Lisaks on kahepoolsele krüptorhismile iseloomulik kõrge seerumi FSH ja LH ning madal inhibiin B tase, mida peetakse Sertoli rakkude funktsiooni häirumise tunnuseks (Rodprasert *et al.*, 2020; Rohayem *et al.*, 2017).

1.1.1.3. Munandite laskumise olulisus

Munandite üks peamisi funktsioone on seemnerakkude tootmine. Eluvõimeliste seemnerakkude valmimine nõuab kindlaid tingimusi, mis tagatakse just munandite laskumisega munandikotti (Titi-Lartey ja Khan, 2020).

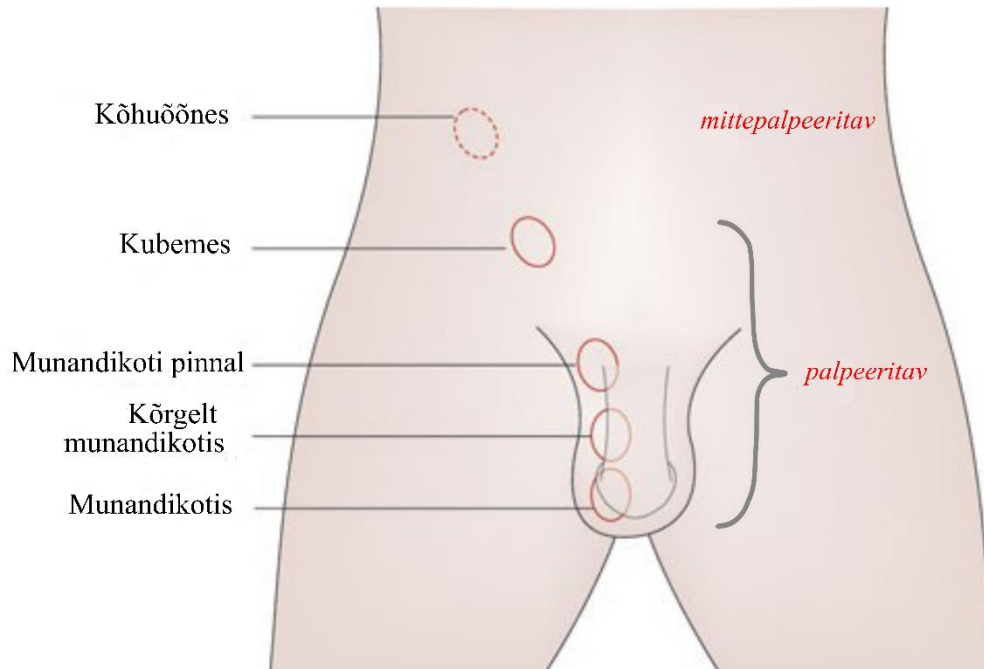
Efektiivse spermatogeneesi toimumiseks peavad munandid paiknema kehatemperatuurist 2-6 kraadi võrra madalamas keskkonnas (Titi-Lartey ja Khan, 2020). Juhul, kui munandid jäävad munandikotti laskumata ja neid ümbritseb normaalse spermatogeneesi toimumiseks ebasoodne temperatuur, siis 46,XY loote primaarsed sugurakud ei diferentseeru spermatogoonideks ning enamik rakke läheb apoptoosi. Mida vähem jääb alles spermatogoone, seda vähem tekib ka puberteedijärgseks spermatogeneesiks tüvirakke, mis lõpuks põhjustab viljatust. Diferentseerumata primaarsed sugurakud annavad aga aluse pahaloomuliste kasvajate tekkeks pärast puberteediea saavutamist. Seega on munandite laskumisel munandikotti tähtis eesmärk mehe reproduktiivtervise säilitamises (Bitran *et al.*, 2020).

1.1.2. Krüptorhismi klassifikatsioon

Munandi laskumishäiret saab jaotada vastavalt erinevatele kliinilistele tunnustele. Enamik laskumata munandite juhtumeid tuvastatakse sündimisel, millest tuleneb ka nimetus „kaasasündinud“ krüptorhism. Sünnimomendiks normaalselt laskunud munanditega poistel võib aga testis hilisemas lapsepõlves munandikotist üles tõusta – sellisel juhul on tegemist „omandatud“ või „teisese“ krüptorhismiga (Bitran *et al.*, 2020; Rodprasert *et al.*, 2020).

Eristatakse ka uni- või bilateraalsel krüptorhismi, mis vastavalt tähendab kas ühe või mõlema munandi puudumist munandikotis. Kahepoolseid munandi laskumishäireid esineb märkimisväärselt harvemini kui ühepoolseid (20% vs 80%), bilateraalsel krüptorhismi seostatakse aga kõrgema viljatuse riskiga täiskasvanueas (Barbotin *et al.*, 2019; Bitran *et al.*, 2020).

Munandikotist puuduv munand võib olla käega katsutav või mitte. 80% olukordadest paikneb palpeeritav munand tavaliselt munandi normaalse laskumise teel munandikotis pinnapealselt, vahel ka kubemekanalis (Joonis 2). Mittepalpeeritava munandi tuvastamine ülejäänud 20% juhtudel nõuab aga lisauuringute tegemist, sest munand võib jääda kõhuõõnde nii sees- kui ka väljaspool kinni ning mõningatel juhtudel täielikult puududa (Bitran *et al.*, 2020; Rodprasert *et al.*, 2020; Toliczenko-Bernatowicz *et al.*, 2020).



Joonis 2. Krüptorhismi korral munandi võimalikud asukohad. Tavapäraselt peaks munand paiknema munandikotis. Juhul, kui munand ei ole munandikotis käega katsutav, on tegemist munandi laskumishäirega. Munand võib paikneda normaalsel laskumise teel kas munandikoti keskel, pinnapealselt või kubeme piirkonnas. Mittepalpeeritav munand paikneb tavaliselt kõhuõõnes, harva võib olla tegemist ka puuduva munandiga (Kohandatud Bay *et al.*, 2011 järgi).

1.1.3. Krüptorhismi epidemioloogia ja patogenees

Meeste reproduktiivsüsteemi häirete (sh krüptorhismi) esinemissagedus on viimaste kümnenditega aina tõusnud. Samas on krüptorhismi levimuses näha selget geograafilist varieeruvust, näiteks Taanis sünnib neli korda rohkem krüptorhismi diagnoosiga poisse kui Soomes (Boisen *et al.*, 2004; Gurney *et al.*, 2017). Seega arvatakse, et krüptorhismi esinemissagedus jääb sündimise hetkeks ligikaudu 1,8-8,4% vahemikku. Üheaastaste poiste seas on munandi laskumishäire sagedus 1,5% (Rodprasert *et al.*, 2020; Virtanen ja Toppari, 2008), kuna umbes 50-75% krüptorhismiga sündinud poistel võib laskumata munand esimese kolme elukuu jooksul spontaanselt munandikotti migreeruda. Viimane on võimalik

hüpotaalamuse-hüpofüüsi-gonaadide telje ajutise aktiveerumise ehk minipuberteedi alguse tõttu (Mäkelä *et al.*, 2019; Rodprasert *et al.*, 2020).

Juhul, kui munand pole kuuendaks elukuuks iseseisvalt munandikotti vajunud, kaalutakse orhidopeksia läbiviimist ehk munandi ümberpaigutamist kirurgilisel teel (Leslie *et al.*, 2020). Mida hiljem teostatakse orhidopeksiat, seda suurem on tõenäosus, et Sertoli rakkude areng peatub ja nende arvukus väheneb (Hadziselimovic, 2017; Rodprasert *et al.*, 2020). Antud tähelepanek tuleneb sellest, et esimeseks eluaastaks kitsenevad märkimisväärselt krüptorhismiga poiste munandites seemnetorukeste diameetrid ning nende sees paiknevate sugurakkude arv väheneb (Krishna *et al.*, 2019; Rodprasert *et al.*, 2020). Ühtlasi on täheldatud, et ka Leydigi rakkude puhul esineb hüpoplaasia ja nende funktsioneerimine häirub (Hadziselimovic, 2017).

1.1.3.1. Krüptorhismi riskitegurid

Isoleeritud krüptorhismi käsitletakse tänapäeval kui idiopaatilise taustaga kaasasündinud arenguhäiret, mille patogenees on komplitseeritud (Bitran *et al.*, 2020). Arvatakse, et isoleeritud krüptorhismi põhjuseks võivad olla nii anatoomiliste protsesside anomaaliad kui ka munandite laskumise eest vastutavate hormoonide madalad kontsentratsioonid (Hutson, 2018; Rodprasert *et al.*, 2020). Samas on kirjeldatud, et krüptorhismi esinemist võivad soodustada erinevad riskitegurid (Toliczenko-Bernatowicz *et al.*, 2020). Näiteks kaasasündinud krüptorhismi tõenäosus suureneb enneaegselt sündinud vastsündinutel, kuna munandite laskumine munandikotti toimub tavaliselt kolmanda trimestri lõpus (Kübarsepp *et al.*, 2022; Skakkebaek *et al.*, 2016). Samuti on Kübarsepp *et al.* näidanud seost krüptorhismiga vastsündinute osakaalu ja vastsündinu kaalu vahel – mida väiksem on sünnikaal, seda rohkem on kaasasündinud krüptorhismi juhtumeid. Alla 2500 g sünnikaaluga poisslastel esineb sagedamini kahepoolne (89%) kui ühepoolne (17%) krüptorhism (Kübarsepp *et al.*, 2022). Lisaks seostatakse krüptorhismiga loote kasvupeetust ning äärmuslikult väikesekaalulist platsentat, mis on tingitud platsenta puudulikkusest (Barthold *et al.*, 2016). Mõningad tõendid viitavad sellele, et krüptorhismi teket soodustavad ka erinevad emapoolsed tegurid nagu vanus ja ülekaalulisus (Rodprasert *et al.*, 2020; Toliczenko-Bernatowicz *et al.*, 2020). Suuremat mõju avaldab munandi laskumishäire tekkele raseduse jooksul ebatervislik eluviis, näiteks suitsetamine (Kjersgaard *et al.*, 2018).

Munandi laskumishäiret võivad lisaks esile kutsuda anti-androgeenide ja/või östrogeenide sarnaste kemikaalidega kokkupuutumine raseduse ajal. Dietüülstilbestroolil ehk sünteetisel östrogeenil on otsene toime INSL3 tootmise inhibeerimisele, mistõttu suudab antud aine peatada 7-15 gestatsiooninädalatel toimuvat transabdominaalset munandite laskumise faasi (Skakkebaek *et al.*, 2016). Seda kinnitab ka roti mudeli põhjal tehtud uuring, kus kirjeldati anti-androgeenide tarbimise mõju isasloomade suguorganite kriitilisele arenguperioodile (Welsh *et al.*, 2008).

1.1.4. Võimalikud krüptorhismiga kaasuvad haigused

1.1.4.1. Munandivähk

Munandi pahaloomuline kasvaja on harvaesinev vähivorm, olles meestel 20. kohal kõige levinumate vähkide nimekirjas GLOBOCAN 2020. aasta ülemaailmsete andmete põhjal (<https://gco.iarc.fr/today/home>). Munandivähi esinemissagedus on kasvavas trendis 15-40 aasta vanuste meeste seas, eelkõige geneetiliste ja keskkonnategurite tõttu (Boccellino *et al.*, 2017).

Munandivähk pärineb enamikel juhtudel (95%) diferentseerumata gonotsüütidest, seega nimetatakse munandivähki ka munandi sugurakkude kasvajakaks (TGCT, *testicular germ cell tumor*) (Boccellino *et al.*, 2017). Täpset TGCT tekkimise põhjust pole seni teada, kuid selle patogeneesile võivad kaasa aidata erinevad riskifaktorid, sealhulgas kromosomaalsed kõrvalekalded, epigeneetilised muutused, aga ka emapoolsed riskitegurid raseduse ajal, näiteks ülemäärane östrogeeni tase, suitsetamine ja kõrge vanus (Lobo *et al.*, 2019; Müller *et al.*, 2020).

TGCT esinemise peamiseks riskiteguriks peetakse siiski munandi laskumishäiret, sest krüptorhismiga poistel on kuni viis korda suurem tõenäosus munandivähi tekkeks (Boccellino *et al.*, 2017; Loebenstein *et al.*, 2020). See on põhjustatud eelkõige munandi suhtelisest asukohast, kuna kehatemperatuurist tingitud kuumašokk pärsib vastsündinu gonotsüütide normaalset diferentseerumist A tüüpi spermatogoonideks ja tekitab edasikanduvaid muutusi DNA-s (Echeverría Sepúlveda *et al.*, 2022). Muteerunud gonotsüüte ei kõrvaldata apoptoosiraja inhibeerimise tõttu, mistõttu säilivad sellised rakud peidetuna mitmeid aastaid. Tavaliselt jätkavad kasvajarakud prolifereerumisega hormoonide toimel pärast suguküpsuse saavutamist (Al-Obaidy *et al.*, 2020).

Kuigi orhidopeksiaga suudetakse munandivähi riski taandada, pole seda siiski võimalik täielikult kõrvaldada. Uuringud on näidanud, et mida hiljem orhidopeksiat läbi viiakse, seda suurem on tõenäosus TGCT arenemiseks täiskasvanueas (Osterballe *et al.*, 2017). Petterssoni *et al.* suures kohortuuringus tehti kindlaks, et orhidopeksiat läbinud 13-15-aastastel poistel oli TGCT šansside suhe 2,5 korda kõrgem võrreldes 0-6-aastaste poistega (5,06 vs 2,02) (Pettersson *et al.*, 2007). Seega on operatsioon soovitatav läbi viia hiljemalt 18. elukuuks, et tagada sugurakkude optimaalne areng (Bitran *et al.*, 2020).

1.1.4.2. Meeste viljatus

Viljatus esineb ülemaailmselt kuni 12% paaridest, sealjuures on ~30% juhtumitest põhjustatud mehepoolsete tegurite tõttu (Punjani ja Lamb, 2020). Meeste viljakuse langemist seostatakse kõige enam geneetiliste tegurite, hormonaalsete kõrvalekallete ja elustiiliga (Babakhanzadeh *et al.*, 2020). Ka urogenitaaltrakti kaasasündinud väärarengud (näiteks krüptorhism) võivad põhjustada viljatust (Punjani ja Lamb, 2020). Näiteks Eesti 1737 viljatu meespatsiendi seas on krüptorhismi osakaal viljatuse tekkes umbes 8,2% (Punab *et al.*, 2017).

Nii ühe- kui ka kahepoolse krüptorhismi korral on sünnihetkest alates tegemist kas gonotsüütide ebatäieliku diferentseerumise või apoptoosiga ning seda eelkõige neid ümbritseva kõrgeenenud temperatuuri tõttu (Loebenstein *et al.*, 2020). Sellest tingituna väheneb omakorda spermatogoonide arv (Agrawal, 2018; Hildorf *et al.*, 2020). Väga sageli hilineb vähenenud spermatogoonide arvu tõttu meioosi algus, mis toob omakorda kaasa nii puuduliku spermatogeneesi, vähenenud seemnerakkude kontsentratsiooni ja liikuvuse ejakulaadis kui ka väiksema tõenäosuse lapsi saada (Agrawal, 2018; Loebenstein *et al.*, 2020). Ühepoolse krüptorhismi korral esineb ebanormaalne seemnevedelik 30% meestest, samas kahepoolse krüptorhismi korral 80% meestest (Hanson *et al.*, 2018). Lisaks on Rohayem *et al.* poolt läbiviidud uuringus märgitud, et lapsepõlves laskumata munanditega meestel on võrreldes kontrollrühmaga täiskasvanueas märkimisväärselt madalam munandimaht ja seda eelkõige kahepoolse krüptorhismi korral (Rohayem *et al.*, 2017).

Nii nagu ka munandivähi korral, on orhidopeksial ja selle teostamise ajal võtmeroll meeste viljakuse säilitamises, sest kauemaks laskumata jäänud munand alandab viljakuse määra. Olenemata kirurgiliselt munandi asukoha parandamisest, jääb mõne indiviidi viljakuse määr ainult 20-25% vahemikku, mis viitab sellele, et tegemist ei ole ainult keskkonnafaktoritest, vaid

ka geneetilisest teguritest tingitud väärarenguga (Hildorf *et al.*, 2020; Kuiri-Hänninen *et al.*, 2019; Punjani ja Lamb, 2020). Tõsisemad viljakusprobleemid tekivad bilateraalse krüptorhismi diagnoosiga meestel, kuna nende viljatuse risk on kuus korda kõrgem võrreldes üldise populatsiooniga. Isegi orhidopeksia järel võib viljatus esineda ligikaudu 54% meestest (Barbotin *et al.*, 2019; Loebenstein *et al.*, 2020). Kahepoolse krüptorhismi korral on täheldatud, et azoospermia ehk seemnerakkude täielik puudumine ejakulaadis esineb 89% juhtudest, samas ühepoolse krüptorhismi korral ainult 13% juhtudest (Agrawal, 2018).

1.2. Krüptorhismi geneetiline taust

1.2.1. Krüptorhismi perekondlik eelsoodumus

Krüptorhismi esinemissagedus on üldiselt palju kõrgem järgmiste põlvkondade pereliikmetel, juhul, kui peres on antud väärareng juba varem esinenud (Barthold *et al.*, 2016). Seda tõestab Czeizel *et al.* poolt tehtud suur perekondlik uuring, kus esines suhteliselt kõrge krüptorhismi perekondlik eelsoodumus ($0,67 \pm 0,16$) (Czeizel *et al.*, 1981). Sama tulemust näitasid Schnack *et al.* 2008. aastal oma uuringus, kus krüptorhismi kordumise riskisuhted (*recurrence risk ratio*) olid kõige kõrgemad ühemunakaksikutel (10,1) ja vendadel (3,5) (Schnack *et al.*, 2008). Kõrgemat krüptorhismi esinemise riski on täheldatud nii vendadel kui ka poolvendadel. Samas on emapoolsetel poolvendadel suurem tõenäosus munandi laskumishäire tekkeks kui isapoolsetel (6% vs 3,4%) (Jensen *et al.*, 2010; Skakkebaek *et al.*, 2016). Sellise kahe rühma vahelise erinevuse põhjuseks on asjaolu, et ema võib olla haiguse asümptomaatiline kandja. Kui aga mehel esineb krüptorhism, siis suure tõenäosusega väheneb tal viljakuse määr (Echeverría Sepúlveda *et al.*, 2022).

1.2.2. Olulisemad munandite laskumisega seotud geenid

Munandite laskumise protsess on reguleeritud kindlate geenide poolt (Bitran *et al.*, 2020). Kirjanduses on suuremat tähelepanu pööratud munandite laskumises osalevatele hormoone kodeerivatele geenidele (*INSL3* ja *RXFP2*), millel on selge mõju mõlemale munandite laskumise etapile (Elamo *et al.*, 2022).

1.2.2.1. Insuliinilaadne peptiid 3 ja relaksiin perekonna valk 2

Retsesiivselt päranduvad *INSL3* ja *RXFP2* geenid on mõlemad ekspresseeritud Leydigi rakkudes ja kodeerivad ligand-retseptor süsteemi, mis reguleerib munandite laskumise esimest etapi (Chávez-Saldaña *et al.*, 2018). Vaatamata *INSL3* ja *RXFP2* geenide variantide tugevale

potentsiaalile munandi laskumishäire avaldumises, on patogeensed variandid mõlemas retsessiivselt päranduvas geenis üliharvad (Elamo *et al.*, 2022). Haigusseoseliste variantide osakaal *RXFP2* geenis moodustab kuni 4% ning *INSL3* geenis vaid 1-2% (Kalfa *et al.*, 2019; Toliczenko-Bernatowicz *et al.*, 2020). Näiteks *INSL3* geenivariandid p.Val18Met ja p.Pro49Ser kutsuvad esile muteerunud valgu tootmist, mis ei ole võimeline *RXFP2* retseptorit aktiveerima, p.Arg73* variant aga kutsub esile translatsiooni peatamist (Foresta *et al.*, 2008). Ayers *et al.* 2019. aasta uuringus avastatud *RXFP2* geeni homosügootne variant p.Gly499Glu esines ühest perest pärit mittesündroomse bilateraalse krüptorhismiga neljal poisil, kusjuures vanematel oli antud variant heterosügootne (Ayers *et al.*, 2019). Bilateraalse krüptorhismiga *Insl3* ja *Rxfp2* *knock-out* hiirte puhul on Nguyen *et al.* näidanud, et normaalne spermatogenees saab hiljem toimuda juhul, kui munandid viiakse kirurgiliselt munandikotti kohe sünnijärgselt. Antud tulemus viitab sellele, et *Insl3* ja *Rxfp2* geenide muutused ei mõjuta munandite endokriinseid tunnuseid, vaid ainult nende asukohta (Foresta *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2002).

1.2.2.2. Androgeeni retseptor

Munandi laskumise teises etapis osaleva testosterooni vahendajaks on X-liitelise *AR* geeni poolt kodeeritud androgeeni retseptor. On leitud, et *AR* geeni muutused võivad peatada nii munandi liikumise kubemekanalist munandikotti kui ka meessoole iseloomulike sise- ja välissuguelundite arengut. Sellisel juhul fenotüübiliselt väljenduv krüptorhism tavaliselt moodustab ainult ühe osa kaasasündinud androgeeni puudulikkuse sündroomist (*androgen insensitivity syndrome, AIS*) (MIM: 300068) (Kojima *et al.*, 2009). AIS-ga indiviidide peamiseks fenotüübiliseks tunnuseks on naissoole iseloomulike välissuguelundite olemasolu, kuid munasarjade ja emaka puudumine (Elamo *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2022). On näidatud, et kõige sagedamini põhjustavad AIS-i patogeensed variandid *AR* geeni ligandi siduvas domeenis (eksonid 4-8) (Wang *et al.*, 2019). Juhul, kui androgeenide tundlikkus on osaliselt häirunud, siis tegemist on osalise androgeeni puudulikkuse sündroomiga (*partial androgen insensitivity syndrome, PAIS*). Antud sündroomiga patsientidel esinevad ebamäärased suguelundid nii nais- kui ka meessoost iseloomulike tunnustega – alates klitoromegaaliast kuni mikropeenise ja hüpospaadiani (Elamo *et al.*, 2022; Ovidiu *et al.*, 2021). Nii AIS kui ka PAIS kuuluvad 46,XY soo arengu häirete hulka (Cavadias *et al.*, 2022).

1.2.3. Teised võimalikud geenid

Arvatakse, et krüptorhismi kujunemises võivad osaleda ka munandi laskumist otseselt mittereguleerivad geenid. Nende osalus krüptorhistliku fenotüübi kujunemises on näidatud läbi hiirte mudelite (Foresta *et al.*, 2008). Näiteks *Hox* (*homeobox protein*) geenide perekonda kuuluv *Hoxa10* (*homeobox protein A10*) osaleb varases embrüonaalses arengus ja on valdavalt ekspresseeritud hiire munandi juhtsidemes transkriptsioonifaktorina ning selle geeni vaigistamine põhjustab hiirtel kõhusiseseid munandeid (Massart ja Saggese, 2010; Toliczenko-Bernatowicz *et al.*, 2020). Inimuringu tulemused näitavad, et *HOXA10* geeni esimese eksoni haigusseoselised variandid on sagedasemad laskumata munanditega patsientidel, kuid ei pruugi olla peamiseks krüptorhismi patogeneesi põhjuseks (Cheng *et al.*, 2017; Kolon *et al.*, 1999).

Kuna munandi laskumishäire kujunemisse annab panuse üleliigne östrogenide toime, siis arvatakse üheks kandidaatgeeniks olevat östrogeeni retseptori α -t ($ER\alpha$) kodeeriv *ESR1* (*estrogen receptor 1*) geen, mis mängib ka olulist rolli mehe reproduktiivtervises (Foresta *et al.*, 2008). Cederroth *et al.* uuringus tehti kindlaks, et krüptorhism esines *Esr1 knock-out* isastel hiirtel, kes olid prenataalselt kokku puutunud dietüülbestrooliga (Cederroth *et al.*, 2007). Krüptorhismiga jaapanlastel on leitud *ESR1* geeni 3' regiooni ehk AGATA alleeli ülesindatus (Yoshida *et al.*, 2005), samas kui itaallaste populatsioonis on antud haplotüüp seotud munandi laskumishäire vähenenud riskiga (Galan *et al.*, 2007).

1.2.3.1. Soo arengu häireid põhjustavad geenid

Krüptorhism võib olla soo arengu häirete üheks komponendiks (peatükk 1.1). Soo arengu häired on väga laia ja heterogeensete kliiniliste tunnustega kaasasündinud haigusseisundite grupp, mille korral indiviidi suguelundite fenotüüp ei lange kokku karüotüübi ega sugunäärmete sooga (García-Acero *et al.*, 2020). Soo arengu häirete sagedus üldpopulatsioonis moodustab 1:4500-5000 vastsündinu kohta (Laan *et al.*, 2021a), samas kui võtta arvesse ka krüptorhismi ja hüpospaadia juhtumid, siis esinemissagedus on juba 1:200-300 vastsündinu kohta (García-Acero *et al.*, 2020).

Soo arengu häireid saab eristada karüotüübis olemasolevate sugukromosoomide põhjal (46,XX; 46,XY või muu). Edasi on võimalik jagada mitmeks alamklassiks – kas sugunäärmete ja suguelundite arengu häirete või hormoonide puuduliku toime alusel (Globa *et al.*, 2022; Granada ja Audí, 2021). 46,XY soo arengu häirete alla lähevad sugunäärmete arengu häired,

androgeeni sünteesi ja toime häired, püsiva Mülleri juha sündroom ning klassifitseerimata häired (hüpospaadiad) (Cools *et al.*, 2018).

Enamikul juhtudel (75%) on soo arengu häired diagnoositud 46,XY karüotüübiga meessoost patsientidel (Laan *et al.*, 2021a), kellel esineb osaline gonaadide düsgenees ehk sisemiste ja/või välimiste suguelundite varieeruvus (Elamo *et al.*, 2022). Tänapäevaks on kokku kirjeldatud umbes 60 46,XY soo arengu häireid põhjustavat kandidaatgeeni, millest ~30 on kõige rohkem uuritud.

Ühes suuremas soo arengu häireid ja selle diagnoosimist käsitlevas artiklis oli Eggers *et al.* poolt kirjeldatud 151 unikaalset varianti 28 46,XY soo arengu häiretega seotud geenis, millest kõige rohkem geneetilisi variante esines X-liitelises *AR* geenis (26). *AR* geenis patogeensete variantidega 26 indiviidil oli karüotüübiks 46,XY, kuid esines fenotüübilisi erinevusi – alates hüpospaadiatest kuni naissoole iseloomulike välissuguelunditeni (Eggers *et al.*, 2016). Ka hiljutises Gomes *et al.* uuringus oli 209-st mittesündroomse 46,XY soo arengu häirega patsiendist leitud 20 patogeenset varianti *AR* geenis, kusjuures patsientide diagnoosiks oli pandud kas AIS või PAIS (Gomes *et al.*, 2022).

46,XY soo arengu häiretega patsientidel on samuti kirjeldatud palju patogeenseid variante neerupealiste kui ka munandite arengu eest vastutavas *NR5A1* geenis (Eggers *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2018). Fenotüübi poolest võivad patsiendid olla nii nais- kui ka meessoole iseloomulike tunnustega (Gomes *et al.*, 2022). Laan *et al.* artiklis aga leiti *NR5A1* geeni heterosügootset splaiss-saidi varianti (c.991-1G>C) kahel nōol, kellel esines kahepoolne krüptorhism, hüpospaadia ja azoospermia (Laan *et al.*, 2021b). Ülejäänud sugunäärmete arengu eest vastutavates geenides (*DHH*, *GATA4*, *SOX9*, *WT1* ja teised) olevad patogeensed variandid on üldjuhul harvemad ja 46,XY patsientidel põhjustavad gonaadide düsgeneesi (Nagaraja *et al.*, 2019).

Üks kõige sagedaseim 46,XY soo arengu häirete põhjus on 5- α reduktaas tüüp 2 puudulikus, mida kutsuvad esile mittesünonüümsed ühenukleotiidsed variandid (näiteks p.Glu197Asp, p.Pro212Arg) *SRD5A2* geenis (María Guadalupe *et al.*, 2022). Antud geen on kirjeldatud umbes 60 haigusseoselist varianti, mille tagajärjeks on ebamääraste suguelundite esinemine (Li *et al.*, 2018; María Guadalupe *et al.*, 2022). RNA helikaasi kodeeriv ja munandite arengus osalev *DHX37* geen on aga uusim 46,XY soo arengu häirete raames uuritud geen, mille

patogeenseteks hinnatud variandid esinesid kõige rohkem gonaadide düsgeneesiga patsientidel (McElreavey *et al.*, 2020).

Tabelis 1 on toodud välja 46,XY soo arengu häireid kõige sagedamini põhjustavate geenide nimekiri (Laan *et al.*, 2021a).

Tabel 1. 46,XY soo arengu häireid kõige sagedamini põhjustavad geenid

Geen	Geeni MIM kood	Geeni pärilikkus	Kliiniline diagnoos/fenotüüp	Viited
<i>Meessoost sugunäärmete arengu eest vastutavad geenid</i>				
DHH	605423	AR	Täielik või osaline gonaadide düsgenees	Elzaiat <i>et al.</i> , 2022
GATA4	600576	AD	Gonaadide düsgenees, kaasasündinud südamehäired	van den Bergen <i>et al.</i> , 2020
NR5A1	184757	AD	Täielik või osaline gonaadide düsgenees, krüptorhism, hüpospaadia, mikropeenise	Laan <i>et al.</i> , 2021; Song <i>et al.</i> , 2018
SOX9	608160	AD	Täielik või osaline gonaadide düsgenees	Audí <i>et al.</i> , 2018
WT1	607102	AD	Osaline gonaadide düsgenees, Wilmsi tuumor, Denys-Drash sündroom	Ferrari <i>et al.</i> , 2022; Gomes <i>et al.</i> , 2022
ZFPM2	603693	AD	Täielik või osaline gonaadide düsgenees	Audí <i>et al.</i> , 2018
<i>Meessoost sugunäärmete diferentseerumise eest vastutavad geenid</i>				
AR	313700	XLR	Androgeeni puudulikkuse sündroom (täielik või osaline)	Gomes <i>et al.</i> , 2022
ARX	300382	XL	Osaline gonaadide düsgenees	Audí <i>et al.</i> , 2018
ATRX	300032	XLD	Osaline gonaadide düsgenees	Audí <i>et al.</i> , 2018; Elzaiat <i>et al.</i> , 2022
CYP11A1	118485	NA	Täielik või osaline soo pöördumine, neerupearaliste puudulikkus	Yatsenko ja Witchel, 2017
DHX37	617362	AD	Täielik või osaline gonaadide düsgenees	McElreavey <i>et al.</i> , 2020
HSD17B3	605573	AR	17 β -hüdroksüsterooid dehüdrogenaasi tüüp 3 puudulikkus	Gomes <i>et al.</i> , 2022
POR	124015	AR	P450-oksüdüreduktaasi puudulikkus	Eggers <i>et al.</i> , 2016
SRD5A2	607306	AR	5- α reduktaasi tüüp 2 puudulikkus, ebamäärased suguelundid, krüptorhism, mikropeenise	Gomes <i>et al.</i> , 2022; María Guadalupe <i>et al.</i> , 2022

AD – autosoom-dominantne, AR – autosoom-retsessiivne; NA – info puudub; XL – X-liiteline; XLR – X-liiteline retsessiivne

Tabelis on toodud välja 14 kõige sagedasemat 46,XY soo arengu häireid põhjustavat geeni 60-st (Laan, *et al.*, 2021a), mis on jaotatud kahte rühma vastavalt geenide osalemisele meessoost sugunäärmete arengus ja diferentseerumises.

Geenide asukohad, MIM koodid ja pärilikkus pärinevad OMIM andmebaasist (<https://www.omim.org/>).

1.2.3.2. Ras-mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi signaalraja geenid

Isoleeritud krüptorhismi esinemise põhjuse üheks hüpoteesiks on pakutud välja haigusseoselised variandid Ras-mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi (MAPK) signaalraja geenides (Laan *et al.*, 2021b; Rodríguez *et al.*, 2018). Ras-MAPK signaalraja geenid (Tabel 2) osalevad nii rakutsükli reguleerimises ja rakkude kasvus, diferentseerumises kui ka vananemises. Kõik need protsessid on üliolulised organismi normaalseks arenguks, seega defektid antud signaalrajas võivad mõjutada nii embrüonaalset kui ka hilisemate etappide arengut. On kindlaks tehtud, et häired antud signaalraja komponentides põhjustavad inimestel erinevaid sündroome, mis kannavad üldnimetust „RASopaatiad“. RASopaatiad on üldjuhul autosoom-dominantselt päranduvad haigused ja sinna alla kuuluvad näiteks Noonani sündroom (NS) (MIM: 163950), Costello sündroom (MIM: 218040) ja LEOPARD-i sündroom (MIM: 151100) (Hebron *et al.*, 2022).

Tabel 2. Ras-mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi signaalraja tähtsamad geenid.

Geen	Geeni MIM kood	Geeni pärilikkus	Kodeeritav valk	Kliiniline sündroom (MIM kood)
<i>BRAF</i>	164757	AD	BRAF	NS tüüp 7 (613706)
<i>KRAS</i>	190070	AD	KRAS	NS tüüp 3 (609942) Südame-, näo- ja nahasündroom 2 (615278)
<i>LZTR1</i>	600574	AR AD	LZTR1	NS tüüp 2 (605275) NS tüüp 10 (616564)
<i>HRAS</i>	190020	AD	HRAS	Costello sündroom (218040) Südame-, näo- ja nahasündroom 3 (615279)
<i>MAP2K1</i>	176872	AD	MEK1	Südame-, näo- ja nahasündroom 3 (615279)
<i>MAP3K1</i>	600982	AD	MEKK1	NS koos 46,XY gonaadide düsgeneesiga (613762)
<i>NRAS</i>	164790	AD	NRAS	NS tüüp 6 (613224)
<i>PPP1CB</i>	600590	AD	PPP1CB	NS-ile sarnane häire koos lahtiste anageensete juustega (617506)
<i>PTPN11</i>	176876	AD	SHP2	LEOPARD sündroom 1 (151100) NS tüüp 1 (163950)
<i>RAF1</i>	164760	AD	RAF1	NS tüüp 5 (611553) LEOPARD sündroom 2 (611554)
<i>RIT1</i>	609591	AD	RIT1	NS tüüp 8 (615355)
<i>RRAS2</i>	600098	AD	R-RAS2	NS tüüp 12 (618624)
<i>SOS1</i>	182530	AD	SOS1	NS tüüp 4 (610733)
<i>SOS2</i>	601247	AD	SOS2	NS tüüp 9 (616559)

AD – autosoom-dominantne, NS – Noonani sündroom.

Geenide asukohad, MIM koodid ja pärilikkus pärinevad OMIM andmebaasist (<https://www.omim.org/>). Geenide poolt kodeerivate valkude nimetused võetud UniProt andmebaasist.

NS on üks sagedasemaid RASopaatiid, mille korral on umbes 60-77% meessoost patsientidel täheldatud ka munandite laskumise häire esinemist (Hebron *et al.*, 2022). Rodríguez *et al.* poolt tehtud uuringus osalesid Tšiilist pärit isoleeritud krüptorhismiga 273 patsienti ja nendest viiel tuvastati neli mittesünonüümset muutust (*SOSI* p.Arg497Gln, *BRAF* p.Phe595Leu, *NRAS* p.Thr50Ile ja *MAP2K2* p.Tyr134Cys variandid), kusjuures kontrollrühmal (n=100) antud geenivariante ei esinenud (Rodríguez *et al.*, 2018). Eesti päritolu perekonna uuring eesmärgiga leida osalise gonaadide düsgeneesi geneetiline põhjus näitas, et ühel patsiendil, kelle fenotüübiks oli bilateraalne krüptorhism ja krüptozoospermia, esineb *SOSI* geenis varem kirjeldamata heterosügootne ja tõenäoliselt patogeenne variant p.Tyr136His. Vastavalt leiule võib oletada, et spermatogeneesi käigus spermatogoonides tekkinud *de novo* geenivariandid Ras-MAPK signaalrajas võivad anda aluse nii krüptozoospermiale kui ka sporaadilisele krüptorhismile (Laan *et al.*, 2021b).

1.3. Eksoomi sekveneerimine

Uue põlvkonna sekveneerimise (*next generation sequencing*, NGS) tehnoloogiate juurutamine kliinilisse praktikasse tõi kaasa laialdast genoomsete andmete kasutamist nii personaliseeritud meditsiini raames kui ka harvaesinevate haiguste diagnoosimises (Suwinski *et al.*, 2019). Vaatamata sellele, et valke kodeerivate alade (eksonite) osakaal moodustab kogu genoomist vaid ~1%, siis enamik teadaolevaid monogeenseid haiguseid (~95%) põhjustavaid geenivariante esinevad just eksonites (Posey, 2019; Ross *et al.*, 2020). Lisaks on enamik pärilike haiguste põhjuseks eelkõige just muutused genoomi valke kodeerivates alades – 80% kõikidest ClinVar-is raporteeritud variantidest ning ligi 90% teadaolevatest patogeensetest variantidest asuvad genoomi eksoonsetes piirkondades (Barbitoff *et al.*, 2020). Seega on kasutusele võetud eksoomi sekveneerimine (ES), mis võimaldab üheaegselt uurida ~20 000 valku kodeerivat inimese geeni ja nende kodeerivates alades esinevaid haigusseoselisi ühenukleotiidseid variatsioone (SNV, *single nucleotide variation*) kui ka väiksemaid (kuni 1000 bp) insertioone ja deletsioone (Posey, 2019; Suwinski *et al.*, 2019).

1.3.1. Diagnostiline saagis eksoomi sekveneerimisel

Tänu ulatuslikule rakendamisele kahtlustatavate geneetiliste haiguste suhtes jääb ES-i diagnostiline saagis keskmiselt vahemikku 20-50% (Deelen *et al.*, 2019; Posey, 2019), mis on kõrgem kui teistel geneetilistel testidel nagu karüotüüpiseerimine (5-15%) ja kromosomaalne

mikrokiibi analüüs (15-20%) (Yang *et al.*, 2013). ES-i diagnostilise saagise väärtus võib kõikuda sõltuvalt uuringus osalevate indiviidide arvust kui ka fenotüüpidest (Seo *et al.*, 2020). Võttes arvesse lapseas avalduvaid geneetilisi haigusi, on kõige väiksem ES-i diagnostiline saagis kirjeldatud autismi (8,4%) ja kaasasündinud sündroomsete südame arenguhäirete korral (9,7%) (Wright *et al.*, 2018), samas ulatub diagnostiline saagis kõrgemale näiteks hingamisteede ripsmete düskineesia (76%) ning epileptilise entsefalopaatia (70%) korral (Wright *et al.*, 2018). Mõõdukat diagnostilist saagist võib märkida nii vereloomega seotud geneetiliste häirete (27-46%) (Wright *et al.*, 2018) kui ka soo arengu häirete korral (20-45%) (O'Connell *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2019).

1.3.2. Haigusseoselisuse hindamine

2015. aastal andsid Ameerika Meditsiinigeneetika ja -genoomika Kolleegium (*American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG) koostöös Molekulaarpatoloogia Assotsiatsiooniga (*Association of Molecular Pathology*, AMP) välja mendeliaarsete haigusseoseliste geenivariantide kliinilise tõlgendamise juhendi. Selle juhendi kohaselt jaotuvad geenivariandid vastavalt healoomulisteks, tõenäoliselt healoomulisteks, ebaselge tähendusega, patogeenseteks ja tõenäoliselt patogeenseteks (Richards *et al.*, 2015). Kirjeldamiseks geenivariante on kasutusel 28-st kriteeriumist koosnev süsteem (Lisa 1), mis hõlmab endas populatsiooni, funktsionaalsuse ja segregatsiooni andmeid (Li ja Wang, 2017). Kriteeriumid jaotuvad kahte suurde rühma – 16 kriteeriumit kasutatakse patogeensete ja tõenäoliselt patogeensete variantide kirjeldamiseks, ülejäänud 12 põhjal klassifitseeritakse healoomulisi ja tõenäoliselt healoomulisi geenivariante. Ebaselge tähendusega (VUS, *variant of uncertain significance*) nimetatakse varianti, mille puhul kõik eelnimetatud 28 kriteeriumit on vastuolus ja/või ei ole täidetud (Li ja Wang, 2017; Richards *et al.*, 2015).

Geeni nullvariant (näiteks raaminihe või enneaegne stoppkoodon) iseloomustab suure tõenäosusega patogeensust, mille puhul geeni funktsiooni kadu on otseses seoses haiguse tekkimisega. Juhul kui on tegemist varasemalt teadaoleva patogeense variandiga ja samas positsioonis teine nukleotiidne muutus annab samasuguse aminohappe (näiteks c.34G>C (p.Val12Leu) ja c.34G>T (p.Val12Leu)), siis on eeldatavalt viimane variant samuti patogeenne. Lisaks viitavad patogeensusele *de novo* variant, funktsionaalsete uuringutega kinnitatud kahjustav toime geeni produktile ning haigetel laialdasem variandi levimus kui kontrollgrupil. Healoomulisi variante liigitatakse järgmiste peamiste kriteeriumite alusel: alleeli

esinemissagedus on üle 5%, uuringutega ei ole leitud kahjustavat toimet valgu funktsioneerimisele ning segregatsiooni puudumine haigetel perekonnaliikmetel (Richards *et al.*, 2015).

1.3.3. Eksoomi analüüsi kasutamine haigusseoseliste variantide tuvastamiseks

ES-i kasutamine eesmärgil tuvastada haigust tekitavaid geenivariante annab aluse veel ühele suuremale kliinilise praktika väljakutsele, sest ühe sekveneeritud eksoomi kohta saadakse kuni 20 000 varianti, millest ainult 5-10 on tõeliselt patogeensed (Posey, 2019). Selleks, et õige patogeense variandini jõuda, tuleb saadud algandmeid etapiviisiliselt töödelda (Ergun *et al.*, 2017).

ES-i andmete analüüsimine kujutab endast variantide filtreerimist, kus potentsiaalsete patogeensete variantide nimekirja kitsenemisele aitab oluliselt kaasa üldpopulatsioonis levinud ja sünonüümsete variantide elimineerimine (Ergun *et al.*, 2017). Variantide annoteerimise käigus kogutakse informatsiooni iga variandi genoomse asukoha, populatsiooni esinemissageduse ja kliinilise seose kohta, mille abil on variante võimalik edaspidi lihtsamini klassifitseerida ja prioritseerida. Variantide annoteerimine teostatakse tavaliselt tarkvarade või andmebaaside abil, mis on avalikult kättesaadavad (Salgado *et al.*, 2016). Kui eesmärgiks on tuvastada haigusseoseline variant, siis enim kasutatavad *in silico* tööriistad Polyphen-2 (Adzhubei *et al.*, 2013), MutationTaster (Schwarz *et al.*, 2010) ja SIFT (Vaser *et al.*, 2016) on võimelised ennustama variandi patogeensust valgulise funktsiooni suhtes (Li ja Wang, 2017). Lisaks saab rakendada CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) skoori algoritmi, mille ennustatav väärtus (1-99) näitab ühenukleotiidsete muutuste kahjulikkust. Mida kõrgem on C-skoor, seda kahjulikum toime ennustatakse ühenukleotiidsel muutusele. Tavaliselt on kahjuliku variandi piirväärtuseks C-skoor üle 15-20 (Rentzsch *et al.*, 2019; <https://cadd.gs.washington.edu/info>).

Vaatamata esmase filtreerimise käigus haigusseoseliste kandidaatvariantide arvu koondamisele, võib lõplik nimekiri sisaldada mitusada võimalikku varianti. Seetõttu on kirjeldatud täiendavaid lähenemisviise, kuidas õige patogeense variandini jõuda. Näiteks harvaesineva monogeense haigusega peres mitme perekonnaliikme ES-i teostamine võib oluliselt kaasa aidata patogeense variandi leidmisele. Väga heterogeensete geneetiliste haiguste korral võib meioosi käigus suurendada *de novo* variantide tekke tõenäosus, mille tuvastamiseks

tavaliselt teostatakse trio ES. Samuti aitab kaasa patsiendi ja vanemate ES-i teostamine retsessiivselt päranduvate haiguste puhul. Pereliikmete eksoomi andmestiku puudumisel saab prioritseerida põhjuslikke variante lähtudes haigusliku fenotüübiga seotud geenidest (Gilissen *et al.*, 2012).

1.3.4. Eksoomi analüüsimisel kasutatavad andmebaasid

Eksoomi sekveneerimisandmete analüüsimisel ning variantide tõlgendamisel aitavad oluliselt kaasa erinevad bioinformaatilised andmebaasid (Tabel 3).

Tabel 3. Eksoomi analüüsimisel ja variantide tõlgendamisel kasutatavate andmebaaside kirjeldused

Andmebaasi nimetus	Lühikirjeldus	Veebiaadress
<i>Kliinilised andmebaasid</i>		
ClinVar	Tõlgendab inimese geneetilisi variante erinevate haiguste kontekstis.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Online Mendelian Inheritance in Man	Keskendub inimese geneetikale, geneetilistele fenotüüpidele ning ka geneetilistele haigustele ja nende	https://www.omim.org/
ClinGen	Autoriteetne infoallikas, mis annab kliinilisi tõlgendusi geenidele ja variantidele.	https://clinicalgenome.org/
Human Gene Mutation Database	Kogub endas kõiki teadaolevaid geenides esinevaid variante, mis põhjustavad pärilikke haigusi.	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
<i>Populatsioonis variantide alleelisagedusi hõlmavad andmebaasid</i>		
gnomAD	Hõlmab nii eksoomide kui ka genoomide sekveneerimisandmeid mitmetest sekveneerimisprojektidest.	https://gnomad.broadinstitute.org/
dbSNP	Sisaldab inimese erinevate geneetiliste variantide kohta populatsiooni sageduse infot.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
<i>In silico patogeensust ennustatavaid tööriistasid sisaldavad andmebaasid</i>		
Franklin	Hindab geneetiliste variantide patogeensust, tuginedes ACMG juhistele.	https://franklin.genomex.com/clinical-db/home
VarSome	Annab geneetilistele variantidele hinnangu patogeensuse suhtes, tuginedes ACMG juhistele.	https://varsome.com/
<i>Teised andmebaasid</i>		
Mouse Genome Informatics	Rahvusvaheline hiirte andmebaas, mis hõlmab laborihiirte genoomi andmeid, alleelivariante kui ka fenotüüpe.	http://www.informatics.jax.org/
Human Phenotype Ontology	Annab informatsiooni inimese haigustega seotud fenotüübiliste kõrvalakallete osas.	http://www.informatics.jax.org/

Üheks selliseks andmebaasiks on näiteks ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (Landrum *et al.*, 2020). 2022. aastaks on ClinVar-i kogutud ~1 200 000 unikaalset varianti, millest suurem osa moodustavad väikesed variandid, nagu SNV-d ning lühikesed insertioonid ja deletsioonid (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submitters/>). ClinVar-is peaks iga esitatud variant omama geneetilist kirjeldust, millise haiguse suhtes on variant tõlgendatav ja kliinilist tähendust võttes aluseks ACMG juhiseid (peatükk 1.3.2.1) (Landrum *et al.*, 2020). Siiski võib ühel geenivariandil esineda korraga nii healoomulisi kui ka patogeenseid hinnanguid, mis põhjustavad vastuolusid variandi-haiguse vahelise seose tõlgendamises. Juhul, kui patsiendil on leitud vastuolulise tõlgendusega variant, on vaja pöörata erilist tähelepanu patsiendi fenotüübile ja võrrelda seda antud variandiga seostuvate haiguste fenotüüpidega. Lisaks võib vastuolulise patogeensusega variandile lahenduse leida ekspertide paneeli poolt väljatoodud tõlgenduste abil (Landrum ja Kattman, 2018).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://www.omim.org/>) on 50 aasta jooksul olnud üks peamisi kliinilisi andmebaase, kuhu on kogutud informatsioon nii monogeensetest haigustest kui ka ligikaudu 16 000 inimese geeni kohta. 2022. aastaks on statistiliste andmete kohaselt OMIM-is üle 7000 fenotüübi, mille molekulaarne alus ehk haigusseoseline geen on teada. Haigusi avaldavaid geenivariante on kirjeldatud praeguseks hetkeks üle 4500. OMIM-i ajakohasuse ja autoriteetsuse tõttu jääb see peamiseks teabeallikaks geenide ja haiguste vaheliste seoste kirjeldamisel (Amberger *et al.*, 2019).

Patogeensete variantide tuvastamisel on ülioluline arvestada huvipakkuva variandi üldpopulatsiooni sagedusega, kuna haigusseoselised variandid on üldjuhul vähem levinud. Eesmärgiga ühtlustada eksoomi ja genoomi sekveneerimisandmeid ning tagada teadusringkonnale teavet variantide sagedustest, on Broad Instituudi (USA) poolt loodud *Genome Aggregation Database* (gnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Andmebaasis toodud informatsioon on loodud klinitsistide abil ja tuginedes teaduskirjandusele (Gudmundsson *et al.*, 2021).

Franklin (franklin.genoox.com/clinical-db/home) ja *VarSome* (varsome.com) on veebipõhised otsingumootorid, kuhu on koondatud informatsioon inimese geenivariantide kohta genoomi kontekstis muudest andmebaasidest. Lisaks on otsingumootoritesse sisse programmeeritud geenivariantide automaatne patogeensuse hindamine vastavalt ACMG juhistele. Viimane

omadus on abistavaks tööriistaks eelkõige varem kirjeldamata geenivariantide puhul, kuna patogeensuse hindamisel võetakse arvesse kõiki ACMG juhiste kriteeriume (Kopanos *et al.*, 2019).

Human Phenotype Ontology (HPO) (<https://hpo.jax.org>) on alates 2008. aastast avalikult kättesaadav andmebaas, mis kirjeldab üle 15 000 päriliku haiguse (Köhler *et al.*, 2021). HPO andmebaas on ülesehitatud nii, et kõik haiguslikud fenotüübid on esitatud annotatsioonide kujul (nn HPO terminid) ning on jaotatud rühmadesse nende sarnasuse põhjal, kuna enamik geneetiliselt päranduvaid haigusi omavad ühiseid fenotüübilisi tunnuseid (Köhler *et al.*, 2019). HPO-ga on võimalik haigusseoselisi kliinilisi omadusi omavahel võrrelda ning kinnitada patsiendi kliinilist fenotüüpi või leida geenide ja haiguste vahelisi seoseid (Köhler *et al.*, 2019, 2021). Seega on HPO kasutamine nüüdseks tavapärane ES andmete analüüsimisel (Köhler *et al.*, 2019). Rääkides HPO eelistest on sellel palju sügavam ja laiaulatuslikum fenotüüpide kattuvus, kui teistel kliinilistel andmebaasidel ning HPO põhjal tehtud *in silico* haigusmudeleid saab kasutada peaaegu kõikides genoomi uurivates tarkvarades (Köhler *et al.*, 2021).

Inimese tervist ja pärilikke haigusi käsitlevates teadusuuringutes on olnud võtmeroll hiirtel, kelle genoom sarnaneb suures osas inimese genoomiga. Alates 1989. aastast on võetud kasutusele hiire genoomi andmebaas *Mouse Genome Informatics* (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>), mis hõlmab endas nii hiire geenide kirjeldusi, genoomi sekveneerimisandmeid, fenotüüpe kui ka allelele (<http://www.informatics.jax.org/>; Eppig *et al.*, 2015). MGI loomise peamine eesmärk oli nii hiirte kui ka inimese haigusmudelite kasutamise hõlbustamine, selleks et paremini mõista haigusi põhjustavaid geneetilisi tegureid. Lähitulevikus on MGI konsortsiumi poolt plaanitud hiirtel põhinevate inimhaiguste mudelite laiendamine ning ka inimese ja hiire võrdleva genoomika värskendamine (Blake *et al.*, 2021).

2. EKSPERIMENTAALOSA

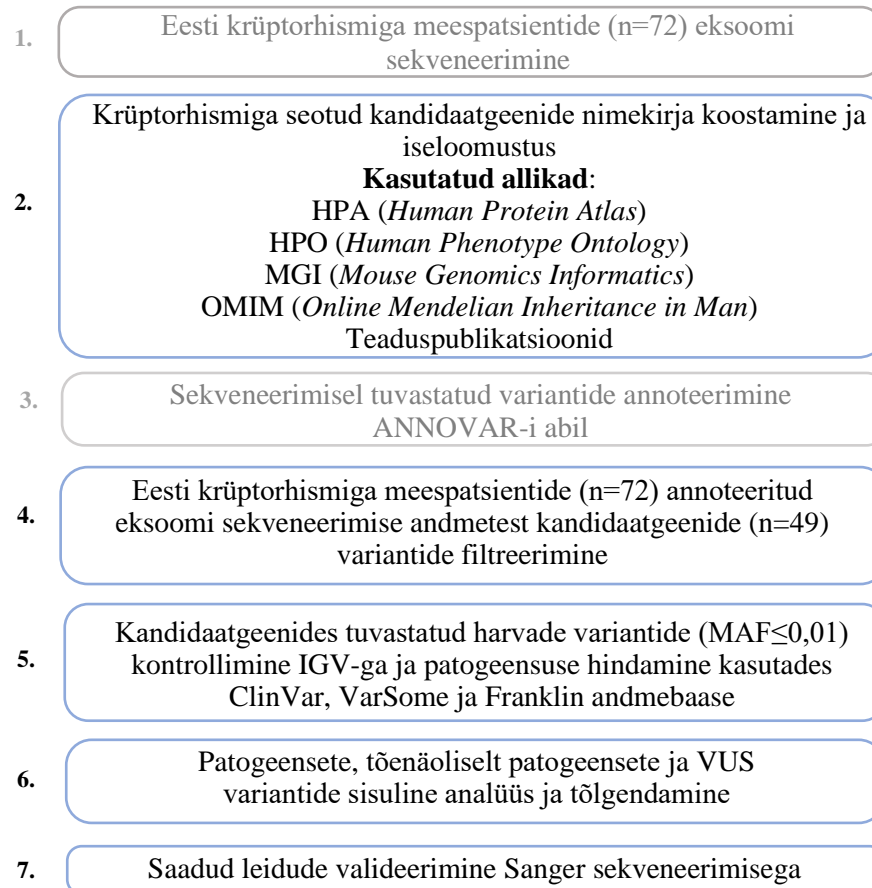
2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö uuringu eesmärgid olid järgmised:

- 1) anda põhjalik ülevaade krüptorhismist kui mittesündroomsest kaasasündinud arenguhäirest ning selle geneetilisest taustast;
- 2) koostada krüptorhismi kandidaatgeenide nimekiri, kasutades teaduspublikatsioone ja bioinformaatilisi andmebaase;
- 3) tuvastada eksoomi sekveneerimise andmestikust kandidaatgeenide alusel krüptorhismiga seostuvaid harvaesinevaid mittesünonüümseid geenivariante ja hinnata nende patogeensust.

Joonisel 3 on välja toodud antud magistritöö eksperimentaalosa läbiviimise skeem etappide kaupa.

Käesolev magistritöö on läbi viidud ETAG rühmagrandi PRG1021 raames "Meeste viljatuse mono- ja digeensed põhjused: uued leiud eksoomi sekveneerimise ajastul, nende pleiotroopsed mõjud ja kliiniline kasu" (1.01.2021–31.12.2025; vastutav täitja: Maris Laan, TÜ BSMI).



Joonis 3. Käesoleva magistritöö eksperimentaalosa töövooskeem. Eesti krüptorhismiga meespatsientide (n=72) vereproovid koguti SA Tartu Ülikooli Kliinikumi androloogiakeskuses (uuringu koordinaator prof. Margus Punab). Patsientide eksoomi sekveneerimine viidi läbi Helsingi Molekulaarmeditsiini Instituudi (*Institute for Molecular Medicine of Finland, FIMM*) sekveneerimise tuumiklaboris. Sekveneerimisel saadud variantide VCF-failide annoteerimine ANNOVAR-iga (Yang ja Wang, 2015) teostas magistritöö juhendaja Anna-Grete Juchnewitsch. Harvad variandid klassifitseeriti minoorse alleeli sageduse (MAF, *minor allele frequency*) alusel. Kandidaatgeenidest filtreeritud variantide olemasolu kontrolliti sekveneerimise lugemite joondustel kasutades *Integrative Genomics Viewer* (IGV) tarkvara, millega on võimalik huvipakkuvaid genoomseid piirkondi visualiseerida. Sanger sekveneerimine viidi läbi Tartu Ülikooli genoomika instituudi sekveneerimise tuumiklaboris. Käesolevas magistritöös autori poolt teostatud etapid on märgitud sinist värvi kastidega.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Eetikakomitee luba

Uuringu läbiviimiseks on TÜ inimuuringute eetikakomitee load 286/M-18 (Maris Laan) ja 288/M-13 (TÜ BSMI inimese geneetika õppetooli kliiniline koostöö partner prof. Margus Punab; PRG1021 põhitäitja). Kaasatud patsiendid on andnud oma informeeritud nõusoleku uuringus osalemiseks.

2.2.2. Valim

Käesolevas töös kasutatud patsiendid kaasati SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Meestekliinikus (prof. Margus Punab, dr. Stanislav Tjagur, dr. Olev Poolamets, dr. Kristjan Pomm, dr. Vladimir Vihljajev, dr. Sven Tennisberg, dr. Viljo Kübarsepp). Uuringu disaini ja valimi koostasid prof. Margus Punab ja prof. Maris Laan. Valim koosneb 72 Eesti meespatsiendist, kellel on diagnoositud idiopaatiline uni- või bilateraalne krüptorhism ning spermatogeneesihäire. Kõik 72 meest on läbinud tavapärase kliinilise androloogide poolt läbivaatuse (Tabel 4). Nendest 58 patsiendil määrati 46,XY karüotüüp. Kokku 14 mehel ei olnud karüotüüpiseerimist läbi viidud, aga 46,XY karüotüüp kinnitati eksoomi sekveneerimise andmete alusel (Dr. Avirup Dutta, teadur, inimese geneetika õppetool, BSMI; suuline kommunikatsioon). Genoomne DNA eraldati TÜ BSMI inimese geneetika õppetoolis spetsialistide poolt.

Tabel 4. Valimi kliinilised parameetrid.

Krüptorhismiga indiviidid (n=72)			
Parameetrid	Mediaanväärtused	Vahemik (min-max)	Referentsväärtused
Vanus	32,0	20,0-47,8	-
KMI ¹	26,5	18,7-47,9	18,5-24,9
FSH (IU/L)	22,7	8,3-126,3	1,0-12,0
LH (IU/L) ²	9,8	3,6-41,1	0,8-7,0
Testosteroon (nmol/L) ²	13,3	0,3-33,0	8,0-30,0
Parem munand (ml) ²	12,0	0,0-24,0	>20,0
Vasak munand (ml) ²	11,0	0,0-27,0	>20,0
Seemnerakkude arv ejakulaadis (mln)	0,0	0,0-8,5	>39,0

KMI – kehamassiindeks

¹ Põhineb 55 indiviidi andmetel

² Põhineb 71 indiviidi andmetel

FSH, LH ja testosterooni referentsväärtused on võetud SYNLAB laboriteatmiku referentsväärtuste tabelist (<https://synlab.ee/arstile/laboriteatmik/referentsvaartused/>); munandimahu referentsväärtused Tartu Ülikooli Kliinikumi Meestekliiniku koduleheküljelt (<https://www.kliinikum.ee/meestekliinik/uuringud-meestehaiguste-korral/>); seemnerakkude arv ejakulaadis Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) inimese seemnevedeliku analüüsimise juhendi kuuendast väljaandest (aasta 2021).

2.2.3. Eksoomi sekveneerimise andmed

Eksoomi sekveneerimiseks saadeti BSMI inimese geneetika õppetoolis eraldatud ja nõuetekohaselt ettevalmistatud DNA-d (laborant Eve Laasik, prof. Maris Laan) Helsingi

Ülikooli Molekulaarmeditsiini Instituudi (*Institute for Molecular Medicine of Finland*, FIMM) sekveneerimise tuumiklaborisse. Eksoomi rikastamine viidi läbi rakendades SeqCap EZ MedExome Target Enrichment Kit-i (Roche NimbleGen, Madison, WI) järgides tootjapoolset protokollit. SeqCAP EZ MedExome Kit keskendub inimese eksoomile ja selle eeliseks on ühtlasem meditsiiniliselt oluliste geenide katvus, millega on võimalik paremini tuvastada haigusseoselisi geenivariante (<https://www.genomeweb.com/resources/new-product/roche-nimblegen-seqcap-ez-medexome-target-enrichment-kit>). ES teostati Illumina HiSeq 2500 sekveneerimisplatvormil (San Diego, CA, USA). Primaarse järjestuse analüüsimiseks ja variantide määramiseks kasutati Variant Calling Pipeline (VCP3.7) (Sulonen *et al.*, 2011). Illumina paarisotsa lugemid olid eemaldatud rakendades Trimmomatic (versioon 0.36) (Bolger *et al.*, 2014) ning sekveneeritud lugemeid joondati Burrows-Wheeler joondaja (BWA, versioon 0.6.2) abil GRCh37/hg19 inimese referentsgenoomi vastu. Peale joondamist olid PCR reaktsiooni duplikaatjärjestused eemaldatud kasutades Picard MarkDuplicates (versioon 2.9.0). SNV-d koos insertioonide ja deletsioonidega olid esile kutsutud vastavalt SAMtools (versioon 1.4) ja Pindel (versioon 0.2.5b8) (Ye *et al.*, 2009) programmidega. VCF (*Variant Call Format*) failis koondatud sekveneerimisjärgselt tuvastatud ühenukleotiidsed variandid ning kuni 1000 bp insertioonid ja deletsioonid annoteeriti ANNOVAR-iga (*ANNOtate VARIation*) (annovar.openbioinformatics.org) magistritöö juhendaja Anna-Grete Juchnewitschi poolt.

2.2.4. Uurimistöös kasutatud andmebaasid

Antud uuringu raames tulemusteni jõudmiseks kasutati erinevaid andmebaase, otsingumootoreid ja programme, mille lühikirjeldused on toodud välja Tabelis 5.

Tabel 5. Kasutatud andmebaasid, otsingumootorid ja programmid

Andmebaasi, otsingumootori või programmi nimetus	Lühikirjeldus	Veebiaadress
ANNOtate VARIation (ANNOVAR)	Kogub värsket informatsiooni geenivariantide kohta nende funktsionaalseks annoteerimiseks.	https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/
ClinVar	Tõlgendab inimese geneetilisi variante erinevate haiguste kontekstis.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Franklin	Hindab geneetiliste variantide patogeensust, tuginedes ACMG juhistele.	https://franklin.genoox.com/clinical-db/home
GenomeTester	Kontrollib PCR praimerite eeldatavat produktide ning seondumiskohtade arvu.	https://bioinfo.ut.ee/genometester/
gnomAD	Hõlmab nii eksoomide kui ka genoomide sekveneerimisandmeid mitmetest sekveneerimisprojektidest.	https://gnomad.broadinstitute.org/
Human Protein Atlas (HPA)	Kaardistab valguekspressiooni inimese rakkude, kudede ja ka elundite tasemel.	https://www.proteinatlas.org/
Human Protein Ontology (HPO)	Annab informatsiooni inimese haigustega seotud fenotüübiliste kõrvalakallete osas.	http://www.informatics.jax.org/
Integrative Genome Viewer (IGV)	Genoomset andmestikku visualiseeriv tarkvara.	https://software.broadinstitute.org/software/igv/
Mouse Genome Informatics (MGI)	Rahvusvaheline hiirte andmebaas, mis hõlmab laborihiirte genoomi andmeid, alleelivariante kui ka fenotüüpe.	http://www.informatics.jax.org/
National Centre of Biotechnology Information (NCBI)	Kogub endas molekulaarbioloogilisi andmeid.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Online Mendelian Inheritance of Man (OMIM)	Keskendub inimese geneetikale, geneetilistele fenotüüpidele ning ka geneetilistele haigustele ja nende omavahelistele seostele.	https://www.omim.org/
Primer-BLAST	Disainib PCR praimereid ning annab informatsiooni teiste võimalike produktide tekkimise kohta.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primer3web	PCR praimerite disainimise tööriist.	https://primer3.ut.ee/
PubMed	Sisaldab üle 33 miljoni artikli biomeditsiini, tervise ning ka teiste teaduste valdkondadest.	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
UCSC Genome Browser	Sisaldab andmeid inimese referentsgenoomist, mida saab visualiseerida.	https://genome.ucsc.edu/
UniProt	Keskendub valkude järjestustele ning funktsionaalsusele.	https://www.uniprot.org/
VarSome	Annab geneetilistele variantidele hinnangu patogeensuse suhtes, tuginedes ACMG juhistele.	https://varsome.com/

2.2.5. Analüüsitavad kandidaatgeenid ja nendes esinevate variantide hindamine

2.2.5.1. Kandidaatgeenide nimekirja koostamine

Krüptorhismi kandidaatgeenide nimekirja koostamisel kasutati peamiselt kolme teadusinfoallikat: *Human Phenotype Ontology* (HPO) (<https://hpo.jax.org/app/>), *Mouse Genomics Informatics* (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>) ja Eggers *et al.* 2016. aasta artiklit. Viimane valiti põhjusel, kuna on suurim rahvusvaheline soo arengu häirete geneetikat ja selle diagnoosimist käsitlev artikkel. HPO ja MGI andmebaasides krüptorhismiga seotud geenide otsimiseks kasutas autor märksõnu „*cryptorchidism*“, „*unilateral AND/OR bilateral cryptorchidism*“, „*non-syndromic cryptorchidism*“ ning „*undescended testis (testes)*“. Kandidaatgeenide loetellu kuulusid geenid, millel oli leitud seos meessoost gonaadide diferentseerumise või 46,XY soo arengu häiretega (peatükk 1.2.3.1) (Tabel 1). Krüptorhismi kandidaatgeenideks valitud geenide täpsemate kirjelduste jaoks otsiti lisainformatsiooni teaduspublikatsioonidest ning *National Centre of Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Online Mendelian Inheritance of Man* (OMIM) (<https://www.omim.org/>), *Human Protein Atlas* (HPA) (<https://www.proteinatlas.org/>) ja UniProt (<https://www.uniprot.org/>) andmebaasidest.

Võttes aluseks peatükis 1.2.3.2. kirjeldatud geneetilised leiud Ras-MAPK signaalrajas munandi laskumise häirega patsientidel (Laan *et al.*, 2021b), püstitati juhendajate poolt hüpotees Ras-MAPK signaalraja geenide seosest krüptorhismiga. Käesoleva magistritöö raames koostati selle bioloogilise raja geenide nimekiri (Tabel 2). Ras-MAPK signaalrajasse kuuluvate geenide leidmiseks võeti arvesse Hebron *et al.* 2022. aasta artiklis välja toodud geene (Hebron *et al.*, 2022) ning ClinGen-i (<https://clinicalgenome.org/>) RASopaatiatega seotud geenide ekspertpaneeli hinnangud. Ras-MAPK signaalraja geenide kohta täiendav informatsioon võeti OMIM (<https://www.omim.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), MedlinePlus (<https://medlineplus.gov>) andmebaasidest.

2.2.5.2. Kandidaatgeenides esinevate variantide filtreerimine

Annoteeritud eksoomandmestikust võeti edasisse analüüsi ainult krüptorhismi kandidaatgeenides olevad variandid. Geenivariante valiti järgmiste kriteeriumite põhjal:

- 1) asuvad eksonites või ekson-intron piiril (splaiiss-variandid);

- 2) mittesünonüümsed, raaminihkega, raaminihketa või funktsioonikaoga (stoppvariandid, splaiss-saidi variandid, insertioonid ja deletsioonid) variandid;
- 3) harvad variandid (minoorse alleeli esinemissagedus gnomAD andmebaasi järgi $\leq 0,01$) või uued variandid (ei esinenud gnomAD andmebaasis).

2.2.5.3. Kandidaatgeenides esinevate variantide patogeensuse hindamine

Geenivariantide patogeensuse määramisel olid arvesse võetud järgmised kriteeriumid:

- 1) ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) andmebaasi ning VarSome (<https://varsome.com/>) ja Franklin (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>) (peatükk 1.3.4.) otsingumootorite patogeensuse suhtes hinnangud või
- 2) Autori poolt iseseisev patogeensuse hindamine ACMG juhistest (peatükk 1.3.2.) (Lisa 1) lähtudes ning
- 3) Annotatsioonifailis ühenukleotiidsete muutuste kahjulikkust ennustatav CADD skoori väärtus >20 (peatükk 1.3.3.).

2.2.5.4. Variantide kontrollimine

Esmase filtreerimise järgselt jäänud variante uuriti genoomibrauser *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (versioon 2.12.2) (Robinson *et al.*, 2011) tööriistaga, mille abil saadakse ülevaade huvipakkuvast geeni alast ning millega on võimalik kontrollida järjestuse lugemite kvaliteeti. Heterosügootsete geenivariantide puhul olid edasisse analüüsimisse kaasatud need geenivariandid, mille alternatiivse alleeli protsendiline väärtus oli vähemalt 30% kogu lugemite arvust (vaikimisi on IGV programmis piirväärtuseks pandud 20%).

2.2.6. Sanger sekveneerimine leitud geenivariantide kinnitamiseks

2.2.6.1. Praimerite disainimine

Veebibrauseri Primer3web (versioon 4.1.0) (Kõressaar *et al.*, 2018) abil disainis autor praimerid, mida kasutati PCR reaktsioonil. Praimerite spetsiifilisust ning seondumiskohtade ja produktide arvu kontrolliti vastavalt veebilehtede Primer-Blast (Ye *et al.*, 2012) ja GenomeTester 1.3 (Andreson *et al.*, 2006) abil. Praimerite disainimisel olid arvesse võetud järgmised tingimused: 1) praimeripaari sulamistemperatuuri erinevus ei tohi olla rohkem kui 2 kraadi, 2) produkt peab olema üks ja vähemalt 400 bp pikk; 3) uuritavat geenivarianti peaks mõlemalt poolt ümbritsema vähemalt 50 aluspaari. Disainitud praimerite järjestused viie geenivariandi jaoks on toodud välja Tabelis 6.

Tabel 6. Viie geenivariandi valideerimiseks disainitud praimerite järjestused

Geen	Variant	Forward praimer (5'→3')	Reverse praimer (5'→3')
<i>AR</i>	c.C1723G p.L575V	ACCTGAGACTTCACTTGCCT	GGACCACCTTCACTGCCTAA
<i>INSL3</i>	c.C278T p.P93L	CATCTGTGAAAGCGGGGATC	GCATGTCCTCTGTTCGTTCC
<i>MAP2K1</i>	c.G880A p.G294R	CAGGAGGCCAAATTCAAGAGG	CTGGAGACCCTTGCTGCTT
<i>NR5A1</i>	c.C334T p.Q112X	CACCTGGTCCTCATCCGG	TATGAGGGGTGGCCGGAA
<i>PTPN11</i>	c.A1510G p.M504V	GTTGGCAAGTGAGGGAATCC	CCAAGAGGCCTAGCAAGAGA

2.2.6.2. PCR reaktsioon

PCR-i reaktsioonisegu valmistati iga uuritava geenivariandi jaoks mahuga 25 µl, mis sisaldas 14,3 µl destilleeritud H₂O, 2,5 µl 10X B2 puhvrit (Solis Biodyne), 2,5 µl 2,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 2,5 M dNTP segu (Solis Biodyne), 1 µl PCR *forward* (10 µM) ja 1 µl *reverse* (10 µM) praimerit (Microsynth) (Tabel 3), 0,2 µl 5U/µl HOT FIREPol DNA polümeraasi (Solis Biodyne) ja 1 µl 100-250 ng/µl genoomset DNA-d. PCR reaktsiooni viidi läbi Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 masinaga. Erinevate geenivariantide PCR reaktsioonideks vajalikud programmid on toodud välja Lisa 3 tabelis. Amplifitseeritud PCR produktide olemasolu kontrollimiseks viidi läbi geelelektroforees 2% agarosgeelil (0,5x TBE) 100 V juures 1 h. Saadud produktide suuruste võrdlemiseks oli kasutatud 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne) marker.

Tõenäoliselt haigusseoseliste geenivariantide valideerimiseks viidi läbi Sanger sekveneerimist Tartu Ülikooli genoomika instituudi sekveneerimise tuumiklaboris.

2.2.7. Andmete analüüs

Patsientidelt saadud eksoomiandmestiku kandidaatgeenides esinevate harvade variantide analüüsi teostas autor MS Office Excel programmis. Sanger sekveneerimise tulemuste visualiseerimiseks kasutati SnapGene Viewer (versioon 6.0.3) tarkvara.

2.3. Tulemused

2.3.1. Krüptorhismiga seotud geenide nimekiri

Kasutades erinevaid andmebaase ja teaduskirjandust, koostati krüptorhismiga seotud kandidaatgeenide nimekiri (Tabel 7). Välja valitud geenid jaotati kolme erinevasse gruppi. „Krüptorhismiga seotud geenide“ hulka kuulub kaks peamist krüptorhismi patogeneesis osalevat geeni (*INSL3* ja *RXFP2*). „Soo arengu häirete geenide“ hulka kuuluvad geenid (n=33), mille funktsioon on seotud 46,XY indiviididel gonaadide diferentseerumisega ja enamik kirjeldatud patogeenseid ühenukleotiidsid geenivariante annavad aluse soo arengu häiretele (Gomes *et al.*, 2022). Eraldi sai koostatud „Ras-MAPK signaalraja geenide“ loetelu (n=14) nagu oli kirjeldatud peatükis 2.2.5.1. Kokkuvõttes jäi lõplikku nimekirja 49 geeni. Täiendav informatsioon kandidaatgeenide kohta on toodud välja Lisa 2 tabelis.

Tabel 7. Nimekiri krüptorhismi kandidaatgeenidest

Geen	Geeni kirjeldus	Kaasasündinud häire	Haiguse MIM kood ja pärilikkus
Krüptorhismiga seotud geenid			
<i>INSL3</i>	Kodeerib insuliin-relaksiin perekonna peptiidhormooni.	Krüptorhism, uni- või bilateraalne	219050; AD
<i>RFXP2</i>	Kodeerib insuliin-relaksiin perekonna peptiidhormooni jaoks G-valgu seoselist retseptorvalku.	Krüptorhism, uni- või bilateraalne	219050; AD
Soo arengu häire geenid			
<i>Transkriptsioonifaktorid ja -regulaatorid</i>			
<i>ARX</i>	Kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis on oluline normaalseks aju arenguks.	Gonaadide diferentseerumine (androgeeni sünteesi ja toime puudulikkus); epilepsia, vaimne alaareng	300068; XLR 300215; XL
<i>ATRX</i>	Kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis osaleb kromatiini remodelleerimises ning hõlblustab DNA replitseerumist.	46,XY DSD koos alfa-talasseemia X-liitelise vaimse alaarengu sündroomiga	301040; XLD
<i>CBX2</i>	Kodeerib polükomb valgu kompleksi komponenti, mis vastutab paljude geenide transkriptsiooni repressioonist eest.	Täielik gonaadide düsgenees	613080; AR
<i>DMRT1</i>	Kodeerib munandite arengut kontrollivat transkriptsioonifaktorit, mis osaleb meessoos determinatsioonis ja diferentseerumises.	46,XY DSD	154230; AD
<i>MAMLD1</i>	Kodeerib transkriptsiooni koaktivaatorit, mille ekspressioon on kõige suurem munandites ja munasarjas.	Hüpospaadiad	613762; XLR
<i>NR5A1</i>	Kodeerib transkriptsiooni aktivaatorit, mis osaleb soo määramises ning steroidogeensete kudede moodustamises.	46,XY soo pöördumine tüüp 3	612965; AD
<i>SOX9</i>	Kodeerib valku, mis osaleb AMH geeni transkriptsiooni reguleerimises.	46,XY gonaadide düsgenees ja kampomeelne düsplaasia	114290; AD
<i>SRY</i>	Kodeerib HMG perekonna transkriptsiooni regulaatorit, mis kontrollib meessoos arengut.	45,X/46,XY segunenud gonaadide arenguhäire	400044; YL
<i>Ensüümid</i>			
<i>AKR1C2</i>	Kodeerib aldo-keto reduktaasi, mis osaleb aldehydide ja ketoonide katalüüsides.	Gonaadide diferentseerumine (androgeeni sünteesi ja toime puudulikkus); 46,XY soo pöördumine	614279; AR
<i>AKR1C4</i>			
<i>CYP11A1</i>	Kodeerib tsütokroom P450 liiget, mis osaleb ravimite metabolismis ning lipiidide sünteesis.	46,XY soo pöördumine (osaline või täielik) koos neerupealiste puudulikkusega	613743; NA
<i>CYP11B1</i>		Kaasasündinud neerupealiste puudulikkus steroid 11-beeta hüdroksülaasi puudulikkuse tõttu	202010; AR
<i>CYP17A1</i>	Kodeerib steroid-17-alfa-hüdroksülaasi, mis reguleerib 17,20-lüaasi aktiivsust.	46,XY DSD; kaasasündinud neerupealiste puudulikkus 17,20-lüaasi puudulikkuse tõttu	202110; AR
<i>CYP19A1</i>	Kodeerib tsütokroom P450 liiget, mis osaleb ravimite metabolismis ning lipiidide sünteesis.	46,XY DSD – aromataasi puudulikkus	613546; AR

<i>HSD17B3</i>	Kodeerib 17-beeta-hüdroksüsteroid dehüdrogenaasi isovormi, mis on ekspresseeritud ainult munandites.	46,XY DSD 17-beeta-hüdroksüsteroid dehüdrogenaas III puudulikkuse tõttu	264300; AR
<i>HSD3B2</i>	Kodeerib 3-beeta-hüdroksüsteroid dehüdrogenaasi, mis osaleb kõikide steroidhormoonide biosünteesis.	46,XY DSD ja 46,XX DSD 3-beeta hüdroksüsteroid dehüdrogenaasi puudulikkuse tõttu	201810; AR
<i>POR</i>	Kodeerib endoplasmaatilise retiikulumi oksüdoreduktaasi, mis on oluline mitmetes ainevahetusprotsessides.	Tsütokroom P450 oksüdoreduktaasi puudulikkus	613571; AR
<i>SRD5A2</i>	Kodeerib steroid-5-alfa-reduktaasi, mis osaleb testosterooni katalüüsimises dihidrotestosterooniks.	46,XY DSD steroid 5-alfa-reduktaasi puudulikkuse tõttu	264600; AR
<i>Retseptorid</i>			
<i>AMHR2</i>	Kodeerib anti-Müller hormooni retseptorit.	Püsiv Mülleri juha sündroom tüüp 2	261550; AR
<i>AR</i>	Kodeerib androgeeni retseptorit, mis seob steroidhormoone.	Gonaadide diferentseerumine (androgeeni sünteesi ja toime puudulikkus)	300068; XLR
<i>LHCGR</i>	Kodeerib G-valgu seoselist retseptorit nii LH kui ka kooriongonadotropiini jaoks.	46,XY DSD Leydigi rakkude hüpoplaasia tõttu	238320; AR
<i>Muud valgud</i>			
<i>AMH</i>	Kodeerib TGF-beeta valgu ligandi, mis seob TGF-beeta retseptoreid.	Püsiv Mülleri juha sündroom tüüp 2	261550; AR
<i>CDKN1C</i>	Kodeerib G1-Cdk kompleksi inhibiitorit ja raku proliferatsiooni negatiivset regulaatorit.	Gonaadide diferentseerumine (androgeeni sünteesi ja toime puudulikkus)	614732; AD
<i>CYB5A</i>	Kodeerib membraaniga seotud tsütokroomi, mis osaleb raudhemoglobiini redutseerimises.	46,XY DSD	250790; AR
<i>DHH</i>	Kodeerib <i>Hedgehog</i> perekonna liiget, mis vabastab morfogeneesi reguleerimise jaoks signaalmolekuli.	46,XY osaline või täielik gonaadide düsgenees	233420; AR
<i>DHX37</i>	Kodeerib ATP-siduvat RNA helikaasi, mis mängib olulist rolli varases munandite arengus.	46,XY soo pöördumine tüüp 11	273250; AD
<i>GATA4</i>	Kodeerib GATA-seoselist valku, mis osaleb embrüogeneesi reguleerimises kui ka südamelihase arengus.	46,XY DSD; munandite anomaaliad koos või ilma kaasasündinud südamehäirega	615542; AD
<i>PPP1R12A</i>	Kodeerib PPP1C valgu regulaatorit ja vahendab müosiiniga seondumist.	Urogenitaaltrakti ja/või aju väärarengu sündroom	618820; AD
<i>STAR</i>	Kodeerib valku, mis reguleerib pregnenolooni sünteesimist kolesteroolist.	46,XY DSD kolesterool desmolaas puudulikkuse tõttu	201710; AR
<i>TSPYL1</i>	Kodeerib tuumakeses paiknevat valku, mis on spetsiifiliselt munandites ekspresseeritud.	46,XY DSD koos imikute äkksurma sündroomiga	608800; AR
<i>WDR37</i>	Kodeerib WD kordustega valku, mis osaleb mitmetes raku protsessides.	Neurookulokardiourogenitaalne sündroom	618652; AD
<i>WT1</i>	Kodeerib nelja tsink-sõrme motiivi C terminuses ning proliini ja glutamiini sisaldava DNA siduvat N terminust, millel on oluline roll urogenitaalsüsteemi arengus.	Frasier sündroom; Denys-Drash sündroom; 46, XY osaline gonaadide düsgenees (HPO)	194080; AD
<i>ZFPM2</i>	Kodeerib tsink-sõrme valku, mis osaleb GATA valkude sihtmärkgeenide üles- ja allareguleerimises.	46,XY gonaadide düsgenees	616067; AD

RAS-MAPK signaalraja geenid

<i>BRAF</i>	Kodeerib valku, mis osaleb mitogeensete signaalide ülekandumises rakumembraanist rakutuuma.	Noonani sündroom tüüp 7	613706; AD
<i>KRAS</i>	Kodeerib Ras klassi kuuluvat valku, mis osaleb Ras valkude signaali ülekandumise aktiveerumises.	Noonani sündroom tüüp 3	609942; AD
<i>LZTR1</i>	Kodeerib BCR E3 ubikvitiin valgu ligaasi kompleksi, mis reguleerib Ras valkude ubikvitineerimist.	Noonani sündroom tüübid 2 ja 10	605275; AR 616564; AD
<i>MAP2K1</i>	Kodeerivad MAPK signaalraja komponenti, mis teiste valkudega interakteerudes vahendab mitmeid rakulisi protsesse.	Südame-, näo- ja nahasündroom 3	615279; AD
<i>MAP3K1</i>		46,XY gonaadide düsgenees, Noonani sündroom	613762; AD
<i>MRAS</i>	Kodeerivad Ras klassi kuuluvat valku, mis osaleb Ras valkude signaali ülekandumise aktiveerumises.	Noonani sündroom tüüp 11	618499; AD
<i>NRAS</i>		Noonani sündroom tüüp 6	613224; AD
<i>PPP1CB</i>	Kodeerib seriin-treoniin spetsiifilist fosfataasi, mis osaleb paljude valkude defosforüleerimises.	Noonani sündroomile sarnane häire koos lahtiste anageensete juustega	617506; AD
<i>PTPN11</i>	Kodeerib valku, mis osaleb nii valkude defosforüülimises kui ka signaali ülekandumises rakupinnalt tuuma.	Noonani sündroom tüüp 1	163950; AD
<i>RAF1</i>	Kodeerib seriin-treoniin proteiinkinaasi, mis on Ras GTPaasi ja MAPK kaskaadi vahelüli.	Noonani sündroom tüüp 5	611553; AD
<i>RIT1</i>	Kodeerib Ras GTPaasi perekonna valku, mis reguleerib p38 MAPK-sõltuva signaliseerimiskaskaadi rakulise stressi puhul.	Noonani sündroom tüüp 8	615355; AD
<i>RRAS2</i>	Kodeerib Ras klassi kuuluvat valku, mis osaleb rakkudevahelise adhesiooni moodustumises.	Noonani sündroom tüüp 12	618624; AD
<i>SOS1</i>	Kodeerib guaniin-nukleotiidi vahetusfaktori RAS valkude jaoks ja reguleerib neid.	Noonani sündroom tüüp 4	610733; AD
<i>SOS2</i>	Kodeerib valku, mis osaleb Ras valkude reguleerimises.	Noonani sündroom tüüp 9	616559; AD

AD – autosoom-dominantne; AR – autosoom-retsessiivne; DSD – soo arengu häire; NA – info puudub; XL – X-liiteline; XLD – X-liiteline dominantne; XLR – X-liiteline retsessiivne; YL – Y-liiteline.

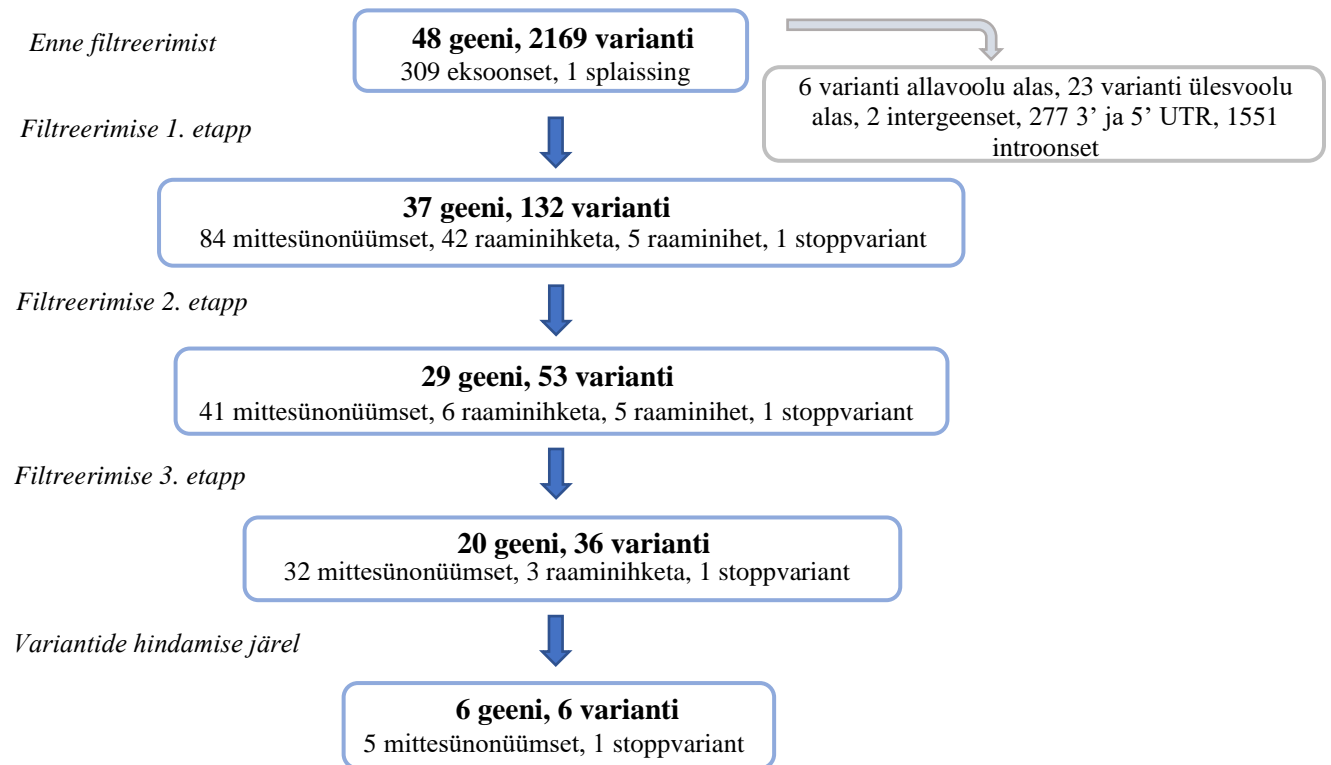
Tabeli koostamiseks on aluseks võetud geenid Tabelist 1 ja Tabelist 2. „Soo arengu häirete“ geenide alajaotus on tehtud vastavalt geenide poolt kodeeritud valguproduktide funktsioonile.

Geeni asukoht ja nimetus on võetud NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) andmebaasist ning geeniga seotud haigused ja nende pärilikkus on OMIM (<https://www.omim.org/>) andmebaasi alusel.

2.3.2. Geenivariantide filtreerimine

Krüptorhismiga patsientide (n=72) eksoomiantmete analüüsimise aluseks olid annoteeritud failist võetud kõik kandidaatgeenid, milles mingis positsioonis erines DNA järjestus inimese genoomi referentsjärjestusest (GRCh37/hg19). *SRY* geenis ei esinenud ühtegi varianti, mistõttu jäi antud geen edasisest analüüsist välja. Antud tulemust võib selgitada asjaolu, et *SRY* on lühike geen – 900 bp pikk ja sisaldab ainult ühte eksonit. Lisaks on antud geenis varasemalt kirjeldatud enamik patogeenseteks hinnatud variante seotud väga ekstreemsete fenotüüpidega nagu 46,XY soo pöördumine naistel või täielik gonaadide düsgenees (ClinVar, OMIM). Variantide filtreerimise alguseks oli seega 48 geeni, milles esines 2169 varianti.

Fookuse alla jäid ainult eksoonsed (309) ja splaiss-saidi variant (1). Eksoonsete ja splaiss-saidi variantide filtreerimisel olid edasisest analüüsist välja jäänud sünonüümsed variandid, mille tulemusena jäi alles 132 geenivarianti. Võttes lisaks arvesse ka annoteeritud tabelist geenivariantide minoorse alleeli sagedust (harvad ($\leq 0,01$) või uued, gnomAD andmebaasis puuduvad variandid) jäi analüüsi 29 geeni koos 53 variandiga. Kolmandas filtreerimisetapis kontrolliti kõik sõelale jäänud variandid üle IGV-ga ning ühtlasi vaadati üle nende sagedused uuritavatel patsientidel, et välistada sageli esinevaid variante. Selle tulemusena jäi analüüsi 36 geenivarianti. Lisaks arvestati analüüsis geenide pärandumisviisiga – juhul, kui tegemist oli retsessiivselt päranduvate geenidega, siis geenivariantide lõplikku nimekirja jäämise eritingimuseks oli indiviidil homosügootse geenivariandi või samas geenis kahe heterosügootse variandi olemasolu. Suurem osa analüüsis käsitlevaid geenivariante aga esinesid dominantsetl päranduvates geenides ja heterosügootses olekus. Joonis 4 illustreerib filtreerimise tulemusena etapijärgselt koondatud geenivariante.



Joonis 4. Kandidaatgeenides esinevate variantide filtreerimise tulemused. Kandidaatgeenide (n=48) 2169 variandist jäid edasise vaatluse alla ainult eksoonsed ja ekson-intron piiril olevad variandid (310). Esimese filtreerimise tulemusena välistati sünonüümset variandid, mille järel jäi analüüsi 37 geeni 132 variandiga. Teises variantide filtreerimise etapis võeti arvesse variantide MAF ($\leq 0,01$ või puudub). Viimane filtreerimisetapp seisnes sõelale jäänud 53 variandi valimis sageduste ning IGV-ga kontrollimises. Mitmeetapilise filtreerimise tulemusena hinnati patogeensust 36 geenivariandil. Kokkuvõtlikult esineb kuues geenis kuus tõenäoliselt haigusseoselist varianti. UTR – mittetransleeritavad alad.

2.3.3. Krüptorhismiga indiviidide potentsiaalselt haigusseoselised leiud

Eksoomi sekveneerimisandmete analüüsimise järgselt oli 36 varianti hinnatud patogeensuse suhtes, millest kuus varianti hinnati healoomuliseks, 10 tõenäoliselt healoomuliseks ning 14 VUS-iks. 72-st patsiendist viiel indiviidil tuvastati viis potentsiaalselt haigusseoselist geenivarianti (2 tõenäoliselt patogeenset ja 3 patogeenset) ning ühel meespatsiendil üks VUS, millel on potentsiaal tõusta tõenäoliselt patogeenseks (Tabel 8).

Tabel 8. Krüptorhismiga patsientidel leitud geneetilised variandid.

Geen	Transkript (Ensembl)	cDNA muutus	AH muutus	Rs number	CADD skoor	Sagedus (kõik) ³	Sagedus (Est) ⁴	ClinVar hinnang (haigus)	VarSome/Franklin hinnangud	Lõplik hinnang (ACMG juhiste põhjal)
<i>AR</i> ¹	ENST00000374690.3	c.C1723G	p.Leu575Val	rs376443652	23,9	7,1x10 ⁻⁵	0	VUS (NA)	TP/TP	VUS/TP
<i>INSL3</i>	ENST00000317306.7	c.C278T	p.Pro93Leu	rs104894697	11,92 ²	3,5x10 ⁻⁴	0	P (krüptorhism)	VUS/VUS	P
<i>NR5A1</i>	ENST00000373588.4	c.C334T	p.Gln112*	rs1832456567	36	NA	NA	P (46,XY soo arengu häire; spermatogeneesi puudulikkus)	P/P	P
<i>MAP2K1</i>	ENST00000307102.5	c.G880A	p.Gly294Arg	rs1205783274	23,4	3,9x10 ⁻⁶	0	NA	P/VUS	TP
<i>PTPN11</i>	ENST00000351677.2	c.A1510G	p.Met504Val	rs397507547	26,8	3,9x10 ⁻⁶	0	P (Noonani sündroom)	P/P	P
<i>WT1</i>	ENST00000332351.3	c.T1244A	p.Met415Lys	NA	27,5	NA	NA	NA	VUS/VUS	TP

AH – aminohape; Est – eestlased; NA – info puudub; P – patogeenne; TP – tõenäoliselt patogeenne; VUS – ebaselge tähendusega variant.

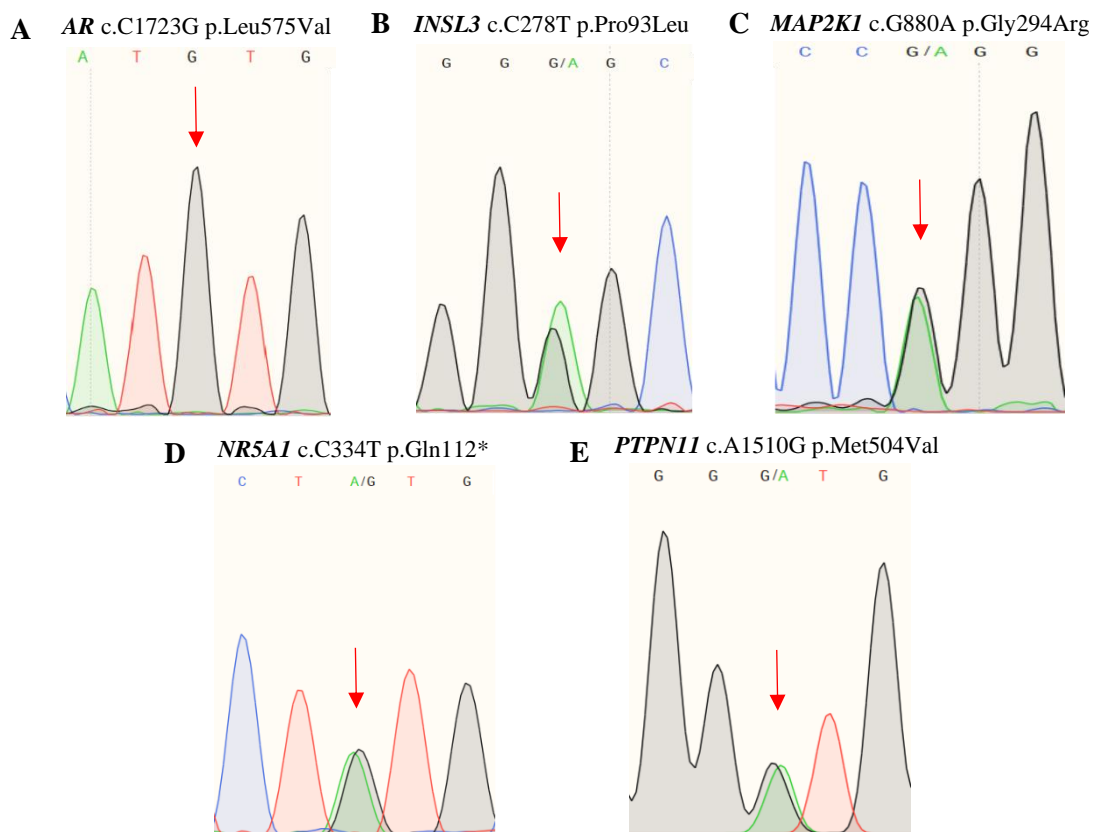
¹ – X-liiteline geen

² – antud geenivariandi CADD skoor on <20, kuid variant on hinnatud patogeenseks (selgitus peatükis 2.4.1)

³ – minoorse alleeli sagedus kõikides populatsioonides gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) andmebaasi põhjal

⁴ – minoorse alleeli sagedus eestlaste populatsioonis gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org) andmebaasi põhjal

Sõelale jäänud kuuest geenivariandist viis olid mittesünonüümsed variandid ja üks stoppvariant. Kasutades ClinVar andmebaasi ning VarSome ja Franklin otsingumootoreid, hinnati *NR5A1* geeni c.C334T (p.Gln112*) ja *PTPN11* geeni c.A1510G (p.Met504Val) heterosügootsed variandid patogeenseteks (P). *INSL3* geeni c.C278T (p.Pro93Leu) variant oli samuti hinnatud patogeenseks (P), vaatamata CADD skoori madalale väärtusele (11,92) (selgitus on antud peatükis 2.4.1). *MAP2K1* geeni heterosügootne variant c.G880A (p.Gly294Arg) ja *WT1* geeni heterosügootne variant c.T1244A (p.Met415Lys) klassifitseeriti ACMG juhiste põhjal tõenäoliselt patogeenseteks (TP) variantideks. VUS tuvastati X-liitelises *AR* geenis (c.C1723G (p.Leu575Val)). Viis geenivarianti sisaldavat genoomset piirkonda kuuest amplifitseeriti PCR reaktsiooniga (Lisa 4) ning seejärel valideeriti Sanger sekveneerimisega (Joonis 5). 11. kromosoomil paikneva *WT1* geeni c.T1244A (p.Met415Lys) varianti ei ole ClinVar-is kirjeldatud. See kinnitati Sanger sekveneerimisega inimese geneetika uurimisrühma teiste liikmete poolt. Eksoomi sekveneerimise andmete analüüsimise järel on sõelale jäänud kuus potentsiaalselt haigusseoselist geenivarianti kuuel patsiendil 72-st, seega diagnostiline saagis moodustab ~8,3%.



Joonis 5. Sanger sekveneerimisega kinnitatud viis potentsiaalselt seotud geenivarianti, mis tuvastati krüptorhismiga patsientidel.

2.4. Arutelu

Käesoleva magistr töö eesmärgiks oli anda põhjalik ülevaade krüptorhismist ja selle geneetilisest taustast ning uurimuse raames koostada krüptorhismi kandidaatgeenide nimekiri, mille põhjal saaks eksoomi sekveneerimisandmestiku põhjal tuvastada võimalikke haigusseoselisi geneetilisi variante munandi laskumise häirega patsientide valimis.

Antud töös saadud diagnostiline saagis (8,3%) on palju madalam võrreldes kirjanduses välja toodud diagnostilise saagisega, näiteks ekstreemsete soo arengu häirete puhul (20-45%) (O'Connell *et al.*, 2021). Diagnostilise saagisega kirjeldatakse kindlaid haigusseoselisi leide ning suuremas osas sõltub tulemus valimi suurusest ning analüüsitava haigusliku fenotüübi geneetilise tausta teadmistest (Seo *et al.*, 2020). Samuti on oluline märkida, et soo arengu häiretega 46,XY indiviidide fenotüübid on väga laia spektriga (García-Acero *et al.*, 2020), mistõttu saab uuringutesse kaasata indiviide vähemalt ühe soo arengu häirele iseloomuliku omadusega. Sellest tulenevalt kasvab nii valimi suurus kui ka võimalik diagnostiline saagis. Antud töös jäi aga fookuse alla üks kindel tunnus – munandite laskumatus.

Käesoleva töö raames sai patogeensuse suhtes hinnatud 36 geenivarianti, millest 14 on ClinVar-i andmete põhjal kirjeldatud vähemalt kahe erineva haiguse korral. Seetõttu sai enamik selliseid variante ebaselge tähenduse (VUS) hinnangu, mida käesolevas töös ei kajastatud. VUS-iks nimetatakse varianti, mille haiguspõhjuslikkust ei ole võimalik hetkel kinnitada täiendavate teadmiste ja tõendite puudumise tõttu (Richards *et al.*, 2015). See tähendab, et ühe ja sama eksoomi sekveneerimisandmete kordusanalüüsimisel on tulevikus võimalik ümber hinnata VUS-e ja tõenäoliselt tõsta diagnostilist saagist.

2.4.1. Potentsiaalselt haigusseoseliste leidude sisuline analüüs

Antud magistr töö oli patogeenseks hinnatud c.C378T (p.Pro93Leu) variant insuliin-relaksiin perekonna valku kodeerivas geenis (*INSL3*) (Joonis 5B), milles varem kirjeldatud haigusseoselised geenivariandid esinevad üksnes krüptorhismiga patsientidel (peatükk 1.2.2.1.). Geenivariantide tõenäoliselt patogeenseteks ja patogeenseteks hindamisel oli toetavaks tingimuseks CADD skoor, mille väärtus peaks olema vähemalt 20 (peatükk 2.2.5.3.). Vaatamata variandi küllaltki madalale CADD skoorile (11,92), võrreldes teiste patogeenseteks või tõenäoliselt patogeenseteks määratud variantidega, on antud variant hinnatud siiski patogeenseks (ClinVar) ja on kindel haigusseoseline leid, kuna tegemist on krüptorhismiga

patsientidel esineva ja varasemalt Ferlin *et al.* artiklis kirjeldatud variandiga (Ferlin *et al.*, 2003). Ferlin *et al.*, 2003 artikkel on ainus teadaolev *INSL3* geenis c.C378T (p.Pro93Leu) varianti käsitlev artikkel, kus antud geenivarianti leiti heterosügootses olekus unilateraalse krüptorhismi, kuid normozoospermia ning normaalsete hormonaalsete tasemetega meespatsiendil. Samas on oluline mainida, et *INSL3* geeni p.Pro93Leu variandiga patsiendi emal esines samasugune geenivariant ning patsiendi isapoolisel nõol oli bilateraalne munandite laskumatus. Valgulise struktuuri poolest jääb 93. positsioonis asuv proliin C peptiidi konserveerunud järjestuse (QPLPQ) alla ning p.Pro93Leu variant põhjustab valgu sekundaarse struktuuri ebastabiilsust koos kogu α -heeliksi kadumisega (Ferlin *et al.*, 2003).

Käesoleva magistritöö uuritud valimis *INSL3* geeni c.C378T (p.Pro93Leu) varianti kandva meespatsiendi kliiniline pilt erines kirjanduses välja toodud meespatsiendi fenotüübist – kõrge FSH (16,8 IU/L), munandi kogumaht 29 ml ning raske oligospermia (1,2 mln seemnerakku) (referentsväärtused on toodud Tabelis 4). Lisaks pole uuringu raames meespatsientide lähisugulaste geneetilisi andmeid käsitletud. Tulevikus on esimese sammuna vaja kindlasti saada lisainformatsiooni antud geenivariandiga patsiendi perest varasemate krüptorhismi juhtumite esinemiste kohta.

Androgeeni retseptorit kodeerivas geenis (*AR*) kirjeldatud variandid on enamikul juhtudest patogeensed ja annavad aluse AIS-le või PAIS-le (Elamo *et al.*, 2022). Mõlemad sündroomid on X-liitelised retsessiivsed haigused, mille puhul 46,XY meesindiviididel võivad olla nii naiskui ka meessoole iseloomulikud tunnused (OMIM). Kuna androgeenidel on oluline roll munandite laskumises, siis muutused *AR* valgus võivad olla krüptorhismi põhjuseks. Küll aga suurem osa isoleeritud krüptorhismi uurivaid artikleid keskenduvad *AR* geenis olevatele trinukleotiidsetele kordustele (CAG ja GGC kordused esimeses eksonis) ning SNV-sid on isoleeritud krüptorhismiga seoses vähe kirjeldatud (Landro-Huerta *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2018). Käesolevas magistritöös leiti *AR* geeni c.C1723G (p.Leu575Val) variant (Joonis 5A) munandite ageneesiga (ehk täieliku puudumisega) meespatsiendil, kellel olid kõrged FSH ja LH tasemed (vastavalt 29,5 IU/L ja 25,89 IU/L). p.Leu575Val variant ei ole varem teaduspublikatsioonides raporteeritud. Küll aga on ClinVar-is antud variant toodud välja kui ebaselge tähendusega variant ilma fenotüüpi kirjelduseta. Lisaks on ClinVar andmete põhjal teada, et 172-st kirjeldatud *AR* geeni mittesünonüümsest variandist on rohkem kui pool (~66%) kas patogeense (80) või tõenäoliselt patogeense (34) hinnanguga. PubMed-i otsingu tulemusena

on välja toodud piiratud arv munandite ageneesi uurivaid artikleid, mis keskenduvad geneetikale. Võttes kokku andmed *AR* geeni kohta, on käesolevas uuringus tuvastatud variant p.Leu575Val hinnatud VUS-iks, millel on potentsiaal tõusta patogeenseks. Selleks on vaja saada täiendavaid kliinilisi andmeid patsiendi kohta.

Enneaegset stoppkoodonit põhjustav *NR5A1* geeni heterosügootne variant c.C334T (p.Gln112*) (Joonis 5D) on ClinVar andmebaasis kirjeldatud oligosünaptilise viljatuse ehk spermatogeneesi puudulikkusega 46,XY patsiendil. *NR5A1* geen vastutab soo määramises osaleva transkriptsiooni aktivaatori kodeerimise eest ning antud geenis kirjeldatud variante seostatakse 46,XY indiviididel soo pöördumise, gonaadide düsgeneesi, spermatogeneesi puudulikkuse ning primaarse neerupealiste puudulikkusega (OMIM). Heterosügootsete stoppvariantidega 46,XY indiviididel *NR5A1* geenis on 15% juhtumitest kirjeldatud munandite düsgeneesi ning vähenenud androgeenide tootmist, fenotüübiliselt võivad indiviidid olla nii 46,XY naised kui ka hüpospaadia või laskumata munanditega mehed (Achermann *et al.*, 2017), kusjuures neerupealiste puudulikkust neil ei esine (Fabbri *et al.*, 2016; Köhler *et al.*, 2008). Viimast selgitab asjaolu, et *NR5A1* on doositundlik geen ning heterosügootse enneaegse stoppvariandi olemasolu põhjustab suure tõenäosusega antud geeni poolt kodeeritud valguga SF1 (*steroidogenic factor 1*) haplopuudulikkust. Kui normaalse alleeli aktiivsus vastab vähemalt 50% annusele, on see piisav neerupealiste, kuid mitte sugunäärmete normaalseks arenguks (Fabbri *et al.*, 2016). Antud magistritöös uuritud valimis esines variant c.C334T (p.Gln112*) parempoolse munandi ageneesi ja azoospermiaga indiviidil, mis võib iseloomustada antud patsiendi fenotüüpi, kuid vajalik on lisainformatsioon patsiendi kliiniliste andmete kohta.

WT1 geeni poolt kodeeritav transkriptsioonifaktor on oluline gonaadide kui ka neerude arengus ning samuti vastutab see embrüo meessoole iseloomulike tunnuste väljakujunemise eest (Arya *et al.*, 2021). Enamik teadaolevaid haigusseoselisi heterosügootseid *WT1* geeni variante põhjustavad Wilmsi tuumorit ja Frasier või Denys-Drash sündroomi (Ferrari *et al.*, 2022, OMIM). Samas on teaduskirjanduses kajastatud gonaadide düsgeneesi ja 46,XY soo arengu häireid põhjustavaid *WT1* geeni patogeensed variandid (Arya *et al.*, 2021; Eggers *et al.*, 2016). Näiteks Arya *et al.* artiklis on leitud patogeensed *WT1* geeni variandid (p.Arg462Trp ja p.Arg458Gln) atüüpiliste suguelundite ja munandi laskumise häirega neljal 46,XY patsiendil, kusjuures ühel patsiendil esines hilise algusega nefropaatia. Mittesünonüümsed ja stoppvariandid *WT1* geeni esimeses viies eksonis võivad tavaliselt anda aluse osalisele

gonaadide düsgeneesile ja Wilmsi tuumorile, kuid mitte nefropaatiale. Seevastu 6-9 eksonites olevad mittesünonüümsed ja stoppvariandid põhjustavad nii osalist gonaadide düsgeneesi kui ka nefropaatiat (Köhler *et al.*, 2011). Antud magistritöös oli leitud *WT1* geeni kuuendas eksonis paiknev tõenäoliselt patogeenne c.T1244A (p.Met415Lys) variant, mis oli varasemalt valideeritud Sanger sekveneerimisega inimese geneetika uurimisrühma teiste liikmete poolt. Patsiendi täiendava kliinilise informatsiooni saamise järel selgus, et patsiendil esines ühe neeru arenguhäire. Antud tulemus viitab sellele, et tegelikult ei ole tegemist munandi laskumise häire põhjusliku variandiga.

Potentsiaalselt haigusseoseliste leidude seast on lisaks kirjeldatud kahte varianti geenides *PTPN11* ja *MAP2K1*, mis kuuluvad Ras-MAPK signaalrajasse (Hebron *et al.*, 2022). *PTPN11* geeni poolt kodeeritud produkt kuulub proteiin türosiin fosfataasi perekonda, mis reguleerib rakkude kasvu ja diferentseerumist (NCBI). *PTPN11* geenis leitud heterosügootne c.A1510G (p.Met504Val) variant (Joonis 5E) on ClinVar-i andmebaasi ekspertpaneelist lähtudes hinnatud patogeenseks variandiks Noonani sündroomi (NS) korral. Näiteks Hiina päritolu heterosügootset c.A1510G (p.Met504Val) varianti kandval 46,XY patsiendil esinesid tüüpilised NS-i näo tunnused (madala asetusega kõrvad, silmade hüpertelorism), südamekodade ning vatsakeste vaheseina defektid, neerude häire, väike kasv ja krüptorhism, kusjuures antud variant oli pärandunud isalt (Koh *et al.*, 2019). Selles magistritöös käsitletud valimi sama varianti kandva patsiendi kohta on teada ainult tema reproduktiivne fenotüüp – munandi kogumaht moodustab 26 ml, esineb azoospermia ning ülikõrge FSH tase (46 IU/L) (referentsväärtused Tabelis 4), kuid ülejäänud tervises seisundi ning pere anamneesi kohta kliinilised andmed puuduvad.

Teine Ras-MAPK signaalrajasse kuuluv *MAP2K1* geen osaleb biokeemiliste signaalide ülekandmises ning selle kirjeldatud haiguspõhjuslike variante seostatakse samuti NS-ga (NCBI, OMIM). Leitud heterosügootset varianti c.G880A (p.Gly294Arg) (Joonis 5C) ei ole ClinVar-i andmebaasis hetkel kirjeldatud, mistõttu on raske leida varianti ja fenotüübi vahelist seost. On aga suur tõenäosus, et käesolevas magistritöös tuvastatud patogeensel variandil on seos patsiendi munandi laskumise häirega. Kuigi varasemalt on Rodríguez *et al.* näidanud, et osadel isoleeritud krüptorhismiga indiviididel esinevad RASopaatiaga seostuvad patogeensed geenivariandid Ras-MAPK signaalraja geenides (peatükk 1.2.3.2) (Rodríguez *et al.*, 2018), siis võttes arvesse käesoleva töö kahe leiu kohta saadud andmeid, on mõlema patsiendi puhul vaja

siiski läbi viia täiendavad arstlikud läbivaatused, et välistada RASopaatiat ja sellega kaasnevate muude terviserikete esinemist.

Kokkuvõttes annab magistritöö raames tehtud uuring uusi teadmisi krüptorhismi geneetikast, mida eelnevalt pole lähemalt uuritud. Potentsiaalselt haigusseoseliste leidudega patsientidelt peaks saama juurde täiendavaid kliinilisi andmeid, kuna teadusuuringutes esinevad teadaolevad tõendid variantide kohta viitavad ka muudele, reproduktiivtervisega mitte seotud tervisehäiretele. Käesolev töö toetas TÜ BSMI inimese geneetika uurimisrühmas varasemate teadustööde andmetele tuginedes (Laan *et al.*, 2021b; Rodríguez *et al.*, 2018) püstitatud hüpoteesi, et Ras-MAPK signaalraja geenide variandid võivad panustada munandite laskumise häire avaldumisse.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö kirjanduse osas on antud põhjalik ülevaade munandi laskumise häirest ehk krüptorhismist ning samuti on esile toodud praegused teadmised krüptorhismi geneetikast. Lisaks käsitleb teoreetiline osa eksoomi sekveneerimist ja sellest saadud andmete analüüsimist, et tuvastada haigusseoselised geenivariandid.

Uuringu üldine eesmärk seisnes krüptorhismiga seotud kandidaatgeenidest harvaesinevate geneetiliste variantide tuvastamises ning nende patogeensuse hindamises. Antud eesmärgi saavutamiseks koostati mittesündroomse krüptorhismi kandidaatgeenide nimekiri, kasutades selleks erinevaid teabeallikaid. Krüptorhismiga seostuvate harvaesinevate ($MAF \leq 0,01$) patogeensete geenivariantide leidmiseks oli uuringusse kaasatud prof. Maris Laane ja prof. Margus Punabi poolt koostatud meespatsientide valim ($n=72$), kelle diagnoosiks oli idiopaatiline uni- või bilateraalne krüptorhism koos spermatogeneesihäirega.

Patsientide ($n=72$) eksoomi sekveneerimisandmetest tuvastatud variantidest jäi sõelale kuus tõenäoliselt haigusseoselist varianti, millest viis valideeriti Sanger sekveneerimisega käesolevas töös. Patogeenseteks hinnati kolm varianti: *NR5A1* c.C334T (p.Gln112*), *PTPN11* c.A1510G (p.Met504Val), ja *INSL3* c.C278T (p.Pro93Leu), kusjuures viimane on kirjeldatud ainult krüptorhismi diagnoosiga patsientide seas (Ferlin *et al.*, 2003). *MAP2K1* geeni c.G880A (p.Gly294Arg) ja *WT1* geeni c.T1244A (p.Met415Lys) variante hinnati erinevaid bioinformaatilisi andmebaase ja otsingumootoreid rakendades tõenäoliselt patogeenseteks. Kõik patsiendid olid antud variantide suhtes heterosügootsed. X-liiteliselt päranduv *AR* geeni c.C1723G (p.Leu575Val) variant on praeguste andmete põhjal ebaselge tähendusega variant, kuid täiendavate uuringute läbiviimisel on see võimalik ümber hinnata patogeenseks.

Analüüsidest saadud tulemusi selgus, et idiopaatilise krüptorhismiga patsientidel esinevad haigusseoselised ühenukleotiidsed variandid geenides, mis osalevad nii meessoos gonaadide diferentseerumise reguleerimises kui ka kuuluvad 46,XY soo arengu häirete geenide nimekirja (Gomes *et al.*, 2022). Lisaks on käesolev töö toetanud hüpoteesi, et Ras-MAPK geenide variandid võivad osadel indiviididel põhjustada munandi laskumise häiret.

Hereditary factors of congenital undescended testes

Galina Belova

SUMMARY

Undescended testis (testes), or cryptorchidism, is a common developmental anomaly in newborn boys which can occur in isolated form or be a part of other congenital syndromes. Normally, testes descent within two phases at different stages of embryonic development which are regulated by hormones like INSL3, AMH and testosterone. In case of cryptorchidism, one testicle or both testes can be stuck somewhere in the middle of the normal pathway of descent, either in inguinal region or abdominal cavity. The known risk factors for cryptorchidism are environmental factors, as well as maternal behaviour during pregnancy. The inheritance of non-syndromic cryptorchidism is still under investigations, because as for now only *INSL3* and *RXFP2* have been linked to cryptorchidism, with pathogenic variants in these genes describing 1-2% and 4% of all cryptorchidism cases, respectively. Recent studies on cryptorchidism have been focusing on a wider range of genes that regulate both gonadal differentiation and give rise to disorders of sex development. In addition, two patient-oriented studies by Laan *et al.* in 2021 and Rodríguez *et al.* in 2018 have shown that some cases of non-syndromic cryptorchidism can be explained by pathogenic variants in the RAS-MAPK signalling pathway genes commonly associated with Noonan syndrome (NS).

Exome sequencing (ES) is a part of next generation sequencing (NGS) methods and is a widely used approach in molecular genetics to investigate protein-coding regions in the genome. Even though the exome makes up only 1% of the total genome, the causes of rare Mendelian or monogenic diseases are mostly found in protein-coding and therefore, ES is much more used for this aim. In order to determine the causality of the disorder, an assessment of pathogenicity of the genetic variant is required. This assessment is based on a guideline assembled by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), which consists of 28 criteria. Genetic variants can be classified for pathogenicity between five different classes – benign, likely benign, variant of uncertain significance (VUS), likely pathogenic or pathogenic.

The overall aim of this master's thesis was to find rare genetic variants in new candidate genes that contribute to non-syndromic cryptorchidism and assess their pathogenicity using different

biological databases. To achieve this goal, firstly, the data from various scientific papers was used to compile a list of candidate genes for non-syndromic cryptorchidism. Next, for the purpose of finding rare ($MAF \leq 0,01$) pathogenic genetic variants associated with non-syndromic cryptorchidism, the experimental part of the study involved a sample set of male patients ($n=72$) with idiopathic unilateral or bilateral cryptorchidism coupled with a disorder of spermatogenesis. The sample set was prepared and designed by prof. Maris Laan and prof. Margus Punab in collaboration with doctors of the Tartu University Hospital. After a multi-step filtration, the initial number of 2169 genetic variants narrowed down to 36 and were further assessed for pathogenicity.

As a result of filtering the candidate gene variants from exome sequencing data of 72 patients, five individuals had five potential disease-related genetic variants and one patient had a variant, which was assessed as a VUS. Five variants out of six were validated by Sanger sequencing. *WT1* c.T1244A (p.Met415Lys) variant was previously confirmed by other members of the Human Genetics research group. Three variants in heterozygous state were assessed as pathogenic – *NR5A1* c.C334T (p.Gln112*), *PTPN11* c.A1510G (p.Met504Val) and *INSL3* c.C278T (p.Pro93Leu), the latter being found in patients with cryptorchidism (Ferlin *et al.*, 2003). The heterozygous variants *MAP2K1* c.G880A (p.Gly294Arg) and *WT1* c.T1244A (p.Met415Lys) were rated as likely pathogenic based on various biological databases. One X-linked *AR* variant c.C1723G (p.Leu575Val) is currently classified as a VUS but assessment may be reevaluated upon further investigations.

The results of this master's thesis revealed that patients who are diagnosed with idiopathic non-syndromic cryptorchidism may have disease-related single nucleotide variants in genes that are involved in both the regulation of male gonadal differentiation and the pathogenesis of disorders of sex development. In addition, this work supported the hypothesis of our research group in the field of genetic research in male reproductive health, that variants in the Ras-MAPK signalling pathway may be the cause of undescended testes in some individuals.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada magistritöö juhendajaid, Maris Laant ja Laura Kasakut, võimaluse eest antud teemal magistritööd kirjutada ning asjalike märkuste ja nõuannete eest. Erilised tänusõnad lähevad magistritöö juhendajale Anna-Grete Juchnewitschile, kes oli igati abivalmis ja toetav kogu magistritöö valmimise vältel. Suur tänu Tartu Ülikooli Kliinikumi Meestekliiniku androloogidele, kelle abil said uuringusse kaasatud patsiendid. Samuti ei oleks võimalik antud magistritööd teha ilma ETAG rühmagrandi PRG1021 "Meeste viljatuse mono- ja digeensed põhjused: uued leiud eksoomi sekveneerimise ajastul, nende pleiotroopsed mõjud ja kliiniline kasu" (1.01.2021–31.12.2025; vastutav täitja: Maris Laan, TÜ BSMI) rahastuseta.

KASUTATUD KIRJANDUS

Achermann, J. C., Schwabe, J., Fairall, L., & Chatterjee, K. (2017). Genetic disorders of nuclear receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(4), 1181–1192.

Andreson, R., Reppo, E., Kaplinski, L., & Remm, M. (2006). GENOMEMASKER package for designing unique genomic PCR primers. *BMC Bioinformatics*, *7*, 172.

Adzhubei, I., Jordan, D. M., Sunyaev, S. R. (2013). Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, *76*(1), 7.20.1-7.20.41.

Agrawal, S. (2017). Testicular descend, how and why: A review Article. *International Journal of Medical Reviews and Case Reports*, *1*(2), 1.

Agrawal, S. N. (2018). Cryptorchidism: Its influence on male fertility and the risk of the testicular tumor. *International Surgery Journal*, *5*(10), 3453.

Al-Obaidy, K. I., Chovanec, M., Cheng, L. (2020). Molecular characteristics of testicular germ cell tumors: Pathogenesis and mechanisms of therapy resistance. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *20*(2), 75–79.

Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Scott, A. F., & Hamosh, A. (2019). OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype–gene relationships. *Nucleic Acids Research*, *47*(Database issue), D1038–D1043.

Arya, S., Kumar, S., Lila, A. R., Sarathi, V., Memon, S. S., Barnabas, R., Thakkar, H., Patil, V. A., Shah, N. S., & Bandgar, T. R. (2021). Exonic WT1 pathogenic variants in 46,XY DSD associated with gonadoblastoma. *Endocrine Connections*, *10*(12), 1522–1530.

Audí, L., Ahmed, S. F., Krone, N., ... McGowan, R. (2018). GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 ‘DSDnet’. *European Journal of Endocrinology*, *179*(4), R197–R206.

Ayers, K., Kumar, R., Robevska, G., Bruell, S., Bell, K., Malik, M. A., Bathgate, R. A., Sinclair, A. (2019). Familial bilateral cryptorchidism is caused by recessive variants in RXFP2. *J Med Genet*, *56*, 727–733.

- Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., Khodadadian, A. (2020). Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *International Journal of General Medicine*, Volume 13, 29–41.
- Baetens, D., Verdin, H., De Baere, E., Cools, M. (2019). Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(3), 101271.
- Barbitoff, Y. A., Polev, D. E., Glotov, A. S., Serebryakova, E. A., Shcherbakova, I. V., Kiselev, A. M., Kostareva, A. A., Glotov, O. S., & Predeus, A. V. (2020). Systematic dissection of biases in whole-exome and whole-genome sequencing reveals major determinants of coding sequence coverage. *Scientific Reports*, 10(1), 2057.
- Barbotin, A.-L., Dauvergne, A., Dumont, A., Ramdane, N., Mitchell, V., Rigot, J.-M., Boitrelle, F., Robin, G. (2019). Bilateral versus unilateral cryptorchidism in nonobstructive azoospermia: Testicular sperm extraction outcomes. *Asian Journal of Andrology*, 21(5), 445.
- Barthold, J. S., Reinhardt, S., Thorup, J. (2016). Genetic, Maternal, and Environmental Risk Factors for Cryptorchidism: An Update. *Eur J Pediatr Surg: Official Journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*, 26(5), 399–408.
- Bartz, S., Chambers, C., Chan, C. M., Cree-Green, M., Davis, S., Hsu, S. (2020). Endocrine Disorders. In W. W. Hay Jr., M. J. Levin, M. J. Abzug, & M. Bunik (Eds.), *Current Diagnosis & Treatment: Pediatrics* (25th ed.). McGraw-Hill Education.
- Bay, K., Main, K. M., Toppari, J., Skakkebaek, N. E. (2011). Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. *Nature Reviews Urology*, 8(4), 187–196.
- Bitran, J., Dadoun, S., Ramasamy, R. (2020). Infertility and Cryptorchidism. M. Arafa, H. Elbardisi, A. Majzoub, ja A. Agarwal (Eds.), *Genetics of Male Infertility*, 245–255. Springer International Publishing.
- Blake, J. A., Baldarelli, R., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Smith, C. L., Bult, C. J., the Mouse Genome Database Group. (2021). Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse–human comparative biology. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D981–D987.
- Boccellino, M., Vanacore, D., Zappavigna, S., ... Facchini, G. (2017). Testicular cancer from diagnosis to epigenetic factors. *Oncotarget*, 8(61), 104654–104663.

- Boisen, K. A., Kaleva, M., Main, K. M., Virtanen, H. E., ... Toppari, J. (2004). Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet (London, England)*, *363*(9417), 1264–1269.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120.
- Cavadias, I., Touraine, P., & Ahmed, S. F. (2022). Differences or Disorders of sex development in Boys: Impact on fertility. *Annales d'Endocrinologie*.
- Cederroth, C. R., Schaad, O., Descombes, P., Chambon, P., Vassalli, J.-D., Nef, S. (2007). Estrogen Receptor α Is a Major Contributor to Estrogen-Mediated Fetal Testis Dysgenesis and Cryptorchidism. *Endocrinology*, *148*(11), 5507–5519.
- Chávez-Saldaña, M., Viguera-Villaseñor, R. M., Yokoyama-Rebollar, E., Landero-Huerta, D. A., Rojas-Castañeda, J. C., Taja-Chayeb, L., Cuevas-Alpuche, J. O., & Zambrano, E. (2018). Single nucleotide polymorphisms associated with nonsyndromic cryptorchidism in Mexican patients. *Andrologia*, *50*(1), e12788.
- Cheng, Z., Wang, M., Xu, C., Pei, Y., Liu, J. C., Huang, H., He, D., & Lu, P. (2017). Mutational analysis of HOXA10 gene in Chinese patients with cryptorchidism. *Andrologia*, *49*(1), e12592.
- Cools, M., Nordenström, A., Robeva, R., ... & COST Action BM1303 working group 1 (2018). Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): a Consensus Statement. *Nature reviews. Endocrinology*, *14*(7), 415–429.
- Czeizel, A., Erödi, E., Tóth, J. (1981). Genetics of undescended testis. *The Journal of Urology*, *126*(4), 528–529.
- Deelen, P., van Dam, S., Herkert, J. C., ... Franke, L. (2019). Improving the diagnostic yield of exome-sequencing by predicting gene–phenotype associations using large-scale gene expression analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 2837.
- Délot, E.C., and Vilain, E. (2021). Towards improved genetic diagnosis of human differences of sex development. *Nat Rev Genet* *22*, 588–602.

- Echeverría Sepúlveda, M. P., Yankovic Barceló, F., & Lopez Egaña, P.-J. (2022). The undescended testis in children and adolescents. Part 1: Pathophysiology, classification, and fertility- and cancer-related controversies. *Pediatric Surgery International*, *38*(6), 781–787.
- Eggers, S., Sadedin, S., van den Bergen, J. A., ... Sinclair, A. H. (2016). Disorders of sex development: Insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biology*, *17*(1), 243.
- Elamo, H. P., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2022). Genetics of cryptorchidism and testicular regression. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101619.
- Elzaiat, M., McElreavey, K., & Bashamboo, A. (2022). Genetics of 46,XY gonadal dysgenesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *36*(1), 101633.
- Eppig, J. T., Richardson, J. E., Kadin, J. A., Ringwald, M., Blake, J. A., Bult, C. J. (2015). Mouse Genome Informatics (MGI): Reflecting on 25 years. *Mammalian Genome*, *26*(7–8), 272–284.
- Ergun, M. A., Unal, A., Ergun, S. G., Percin, E. F. (2017). A new method for analysis of whole exome sequencing data (SELIM) depending on variant prioritization. *Informatics in Medicine Unlocked*, *8*, 51–53.
- Fabbri, H. C., Ribeiro de Andrade, J. G., Maciel-Guerra, A. T., Guerra-Júnior, G., & de Mello, M. P. (2016). *NR5A1* Loss-of-Function Mutations Lead to 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Phenotype: Report of Three Novel Mutations. *Sexual Development*, *10*(4), 191–199.
- Fénichel, P., Lahlou, N., Coquillard, P., Panaïa-Ferrari, P., Wagner-Mahler, K., Brucker-Davis, F. (2015). Cord blood insulin-like peptide 3 (INSL3) but not testosterone is reduced in idiopathic cryptorchidism. *Clinical Endocrinology*, *82*(2), 242–247.
- Ferlin, A., Simonato, M., Bartoloni, L., Rizzo, G., Bettella, A., Dottorini, T., Dallapiccola, B., & Foresta, C. (2003). The INSL3-LGR8/GREAT Ligand-Receptor Pair in Human Cryptorchidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(9), 4273–4279.
- Ferrari, M. T. M., Watanabe, A., da Silva, T. E., ... Domenice, S. (2022). WT1 Pathogenic Variants are Associated with a Broad Spectrum of Differences in Sex Development Phenotypes and Heterogeneous Progression of Renal Disease. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, *16*(1), 46–54.

- Flück, C. E., Audí, L., Fernández-Cancio, M., Sauter, K.-S., Martínez de LaPiscina, I., Castaño, L., Esteva, I., & Camats, N. (2019). Broad Phenotypes of Disorders/Differences of Sex Development in MAMLD1 Patients Through Oligogenic Disease. *Frontiers in Genetics*, *10*.
- Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, A., Ferlin, A. (2008). Role of Hormones, Genes, and Environment in Human Cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, *29*(5), 560–580.
- Galan, J. J., Guarducci, E., Nuti, F., Gonzalez, A., Ruiz, M., Ruiz, A., Krausz, C. (2007). Molecular analysis of estrogen receptor alpha gene AGATA haplotype and SNP12 in European populations: Potential protective effect for cryptorchidism and lack of association with male infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *22*(2), 444–449.
- García-Acero, M., Moreno-Niño, O., Suárez-Obando, F., Molina, M., Manotas, M. C., Prieto, J. C., Forero, C., Céspedes, C., Pérez, J., Fernandez, N., & Rojas, A. (2020). Disorders of sex development: Genetic characterization of a patient cohort. *Molecular Medicine Reports*, *21*(1), 97–106.
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G., & Veltman, J. A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European Journal of Human Genetics*, *20*(5), 490–497.
- Globa, E., Zelinska, N., Shcherbak, Y., Bignon-Topalovic, J., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2022). Disorders of Sex Development in a Large Ukrainian Cohort: Clinical Diversity and Genetic Findings. *Frontiers in Endocrinology*, *13*.
- Gomes, N. L., Batista, R. L., Nishi, M. Y., ... & Mendonca, B. B. (2022). Contribution of Clinical and Genetic Approaches for Diagnosing 209 Index Cases With 46,XY Differences of Sex Development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *107*(5), e1797–e1806.
- Granada, M. L., & Audí, L. (2021). The laboratory in the multidisciplinary diagnosis of differences or disorders of sex development (DSD): I) Physiology, classification, approach, and methodology II) Biochemical and genetic markers in 46,XX DSD. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio*, *2*(4), 468–480.
- Grinspon, R. P., Bergadá, I., Rey, R. A. (2020). Male Hypogonadism and Disorders of Sex Development. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 211.
- Gudmundsson, S., Singer-Berk, M., Watts, N. A., Phu, W., Goodrich, J. K., Solomonson, M., Genome Aggregation Database Consortium, Rehm, H. L., MacArthur, D. G., & O'Donnell-Luria,

- A. (2021). Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation*.
- Gurney, J. K., McGlynn, K. A., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., Edwards, R., Richiardi, L., Hutson, J., and Sarfati, D. (2017). Risk factors for cryptorchidism. *Nature Reviews Urology*, *14*(9), 534–548.
- Hadziselimovic, F. (2017). On the descent of the epididymo-testicular unit, cryptorchidism, and prevention of infertility. *Basic and Clinical Andrology*, *27*(1), 21.
- Hanson, B. M., Eisenberg, M. L., & Hotaling, J. M. (2018). Male infertility: A biomarker of individual and familial cancer risk. *Fertility and Sterility*, *109*(1), 6–19.
- Hebron, K. E., Hernandez, E. R., & Yohe, M. E. (2022). The RASopathies: From pathogenetics to therapeutics. *Disease Models & Mechanisms*, *15*(2), dmm049107.
- Hildorf, S., Clasen-Linde, E., Cortes, D., Fossum, M., Thorup, J. (2020). Fertility Potential is Compromised in 20% to 25% of Boys with Nonsyndromic Cryptorchidism despite Orchiopexy within the First Year of Life. *Journal of Urology*, *203*(4), 832–840.
- Jensen, M. S., Toft, G., Thulstrup, A. M., Henriksen, T. B., Olsen, J., Christensen, K., & Bonde, J. P. (2010). Cryptorchidism concordance in monozygotic and dizygotic twin brothers, full brothers, and half-brothers. *Fertility and Sterility*, *93*(1), 124–129.
- Kalfa, N., Gaspari, L., Ollivier, M., Philibert, P., Bergougnoux, A., Paris, F., & Sultan, C. (2019). Molecular genetics of hypospadias and cryptorchidism recent developments. *Clinical Genetics*, *95*(1), 122–131.
- Kjersgaard, C., Arendt, L. H., Ernst, A., Lindhard, M. S., Olsen, J., Henriksen, T. B., Strandberg-Larsen, K., & Ramlau-Hansen, C. H. (2018). Lifestyle in pregnancy and cryptorchidism in sons: A study within two large Danish birth cohorts. *Clinical Epidemiology*, *10*, 311–322.
- Koh, A., Tan, E., Brett, M. S., Lai, A. H. M., Jamuar, S. S., Ng, I., & Tan, E. (2019). The spectrum of genetic variants and phenotypic features of Southeast Asian patients with Noonan syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *7*(4), e00581.
- Kojima, Y., Mizuno, K., Kohri, K., Hayashi, Y. (2009). Advances in Molecular Genetics of Cryptorchidism. *Urology*, *74*(3), 571–578.

- Kolon, T. F., Wiener, J. S., Lewitton, M., Roth, D. R., Gonzales, E. T., Lamb, D. J. (1999). Analysis of homeobox gene HOXA10 mutations in cryptorchidism. *The Journal of Urology*, *161*(1), 275–280.
- Kopanos, C., Tsiolkas, V., Kouris, A., Chapple, C. E., Albarca Aguilera, M., Meyer, R., & Massouras, A. (2019). VarSome: The human genomic variant search engine. *Bioinformatics*, *35*(11), 1978–1980.
- Krishna, O. H. R., Kotaiah, M. T., K., G., Kiran G., S., P., S. R., Kota, R. R. (2019). Cryptorchidism and its Effects on Histomorphology of Testis in Paediatric Age Group. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, *8*(31), 2480–2484.
- Kuri-Hänninen, T., Koskenniemi, J., Dunkel, L., Toppari, J., Sankilampi, U. (2019). Postnatal Testicular Activity in Healthy Boys and Boys With Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 489.
- Köressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3_masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *34*(11), 1937–1938.
- Köhler, B., Biebermann, H., Friedsam, V., Gellermann, J., Maier, R. F., Pohl, M., Wieacker, P., Hiort, O., Grüters, A., & Krude, H. (2011). Analysis of the Wilms' Tumor Suppressor Gene (WT1) in Patients 46,XY Disorders of Sex Development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *96*(7), E1131–E1136.
- Köhler, B., Lin, L., Ferraz-de-Souza, B., Wieacker, P., Heidemann, P., Schröder, V., Biebermann, H., Schnabel, D., Grüters, A., & Ackermann, J. C. (2008). Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Human Mutation*, *29*(1), 59–64.
- Köhler, S., Carmody, L., Vasilevsky, N., ... Robinson, P. N. (2019). Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D1018–D1027.
- Köhler, S., Gargano, M., Matentzoglou, N., ... Robinson, P. N. (2021). The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1207–D1217.

- Kübarsepp, V., Varik, K., Varendi, H., Antson, A., Veinla, M., Nellis, G., Merila, M., Salundi, U., Astover, V., & Punab, M. (2022). Prevalence of congenital cryptorchidism in Estonia. *Andrology*, *10*(2), 303–309.
- Laan, M., Kasak, L., & Punab, M. (2021a). Translational aspects of novel findings in genetics of male infertility—Status quo 2021. *British Medical Bulletin*, *140*(1), 5.
- Laan, M., Kasak, L., Timinskas, K., Grigorova, M., Venclovas, Č., Renaux, A., Lenaerts, T., & Punab, M. (2021b). *NR5A1* c.991-1G > C splice-site variant causes familial 46,XY partial gonadal dysgenesis with incomplete penetrance. *Clinical Endocrinology*, *94*(4), 656–666.
- Lanciotti, L., Cofini, M., Leonardi, A., Penta, L., Esposito, S. (2018). Up-To-Date Review About Minipuberty and Overview on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Activation in Fetal and Neonatal Life. *Frontiers in Endocrinology*, *9*.
- Landero-Huerta, D. A., Viguera-Villaseñor, R. M., Taja-Chayeb, L., García-Andrade, F., Aréchaga-Ocampo, E., Yokoyama-Rebollar, E., Díaz-Chávez, J., Herrera, L. A., & Chávez-Saldaña, M. D. (2021). Analysis of the CAG tract length in the Androgen Receptor gene in Mexican patients with nonsyndromic cryptorchidism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *34*(7), 843–849.
- Landrum, M. J., Chitipiralla, S., Brown, G. R., ... Kattman, B. L. (2020). ClinVar: Improvements to accessing data. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D835–D844.
- Landrum, M. J., & Kattman, B. L. (2018). ClinVar at five years: Delivering on the promise. *Human Mutation*, *39*(11), 1623–1630.
- Li, S.-P., Li, L.-W., Sun, M.-X., ... Dou, X.-W. (2018). Identification of a novel mutation in the *SRD5A2* gene of one patient with 46,XY disorder of sex development. *Asian Journal of Andrology*, *20*(5), 518–519.
- Li, Q., & Wang, K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *The American Journal of Human Genetics*, *100*(2), 267–280.
- Lobo, J., Gillis, A. J. M., Jerónimo, C., Henrique, R., Looijenga, L. H. J. (2019). Human Germ Cell Tumors are Developmental Cancers: Impact of Epigenetics on Pathobiology and Clinic. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2).

- Loebenstein, M., Thorup, J., Cortes, D., Clasen-Linde, E., Hutson, J. M., Li, R. (2020). Cryptorchidism, gonocyte development, and the risks of germ cell malignancy and infertility: A systematic review. *Journal of Pediatric Surgery*, *55*(7), 1201–1210.
- María Guadalupe, O. L., Katy, S. P., Charmina, A. A., Vihko, P., & Marta, M. (2022). Molecular Characterization of Two Known SRD5A2 Gene Variants in Mexican Patients With Disorder of Sexual Development. *Frontiers in Genetics*, *12*, 794476.
- Massart, F., Saggese, G. (2010). Morphogenetic Targets and Genetics of Undescended Testis. *Sexual Development*, *4*(6), 326–335.
- McElreavey, K., Jorgensen, A., Eozenou, C., ... & Bashamboo, A. (2020). Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome. *Genetics in Medicine*, *22*(1), 150–159.
- Mäkelä, J.-A., Koskenniemi, J. J., Virtanen, H. E., Toppari, J. (2019). Testis Development. *Endocrine Reviews*, *40*(4), 857–905.
- Müller, M. R., Skowron, M. A., Albers, P., Nettersheim, D. (2020). Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors. *Asian Journal of Urology*.
- Nagaraja, M., Gubbala, S. P., Delphine Silvia, C. R. W., & Amanchy, R. (2019). Molecular diagnostics of disorders of sexual development: An Indian survey and systems biology perspective. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *65*(2), 105–120.
- Nef, S., Parada, L. F. (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nature Genetics*, *22*(3), 295–299.
- Nguyen, M. T., Showalter, P. R., Timmons, C. F., Nef, S., Parada, L. F., Baker, L. A. (2002). Effects of Orchiopexy on Congenitally Cryptorchid Insulin-3 Knockout Mice. *Journal of Urology*, *168*(4), 1779–1783.
- Nguyen, T. H., Nguyen, D. Q., Kim, L. N. T., Thi, T. N. N., Nguyen, T. P. M., Tran, N. D., & Nguyen, H. H. (2022). Four novel mutations in the androgen receptor gene from Vietnamese patients with androgen insensitivity syndrome. *Genes & Genomics*.
- O’Connell, M. A., Atlas, G., Ayers, K., & Sinclair, A. (2021). Establishing a molecular genetic diagnosis in children with Differences of Sex Development—A clinical approach. *Hormone Research in Paediatrics*.

- Osterballe, L., Clasen-Linde, E., Cortes, D., Engholm, G., Hertzum-Larsen, R., Reinhardt, S., Thorup, J. (2017). The diagnostic impact of testicular biopsies for intratubular germ cell neoplasia in cryptorchid boys and the subsequent risk of testicular cancer in men with prepubertal surgery for syndromic or non-syndromic cryptorchidism. *Journal of Pediatric Surgery*, *52*(4), 587–592.
- Ovidiu, B., Marcu, D., Mischianu, D., Poiana, C., Diaconu, C., Bungau, S., Tit, D., Cumpănas, A., & Bohiltea, R. (2021). The challenges of androgen insensitivity syndrome. *Archives of Medical Science*.
- Pettersson, A., Richiardi, L., Nordenskjöld, A., Kaijser, M., Akre, O. (2007). Age at Surgery for Undescended Testis and Risk of Testicular Cancer. *New England Journal of Medicine*, *356*(18), 1835–1841.
- Posey, J. E. (2019). Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *14*.
- Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., Korrovits, P., Laan, M. (2017). Causes of male infertility: A 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *32*(1), 18–31.
- Punjani, N., Lamb, D. J. (2020). Male infertility and genitourinary birth defects: There is more than meets the eye. *Fertility and Sterility*, *114*(2), 209–218.
- Renault, C., Aksglaede, L., Wøjdemann, D., Berg Hansen, A., Jensen, R., Juul, A. (2020). Minipuberty of human infancy – A window of opportunity to evaluate hypogonadism and differences of sex development? *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, *25*, 84–91.
- Rentsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., Kircher, M. (2019). CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D886–D894.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(5), 405–424.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, *29*(1), 24–26.

- Rodprasert, W., Virtanen, H. E., Mäkelä, J.-A., Toppari, J. (2020). Hypogonadism and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 906.
- Rodríguez, F., Vallejos, C., Giraudo, F., ... Cassorla, F. (2017). Copy number variants of Ras/MAPK pathway genes in patients with isolated cryptorchidism. *Andrology*, *5*(5), 923–930.
- Rodríguez, F., Vallejos, C., Ponce, D., Unanue, N., Hernández, M. I., Célis, S., Arcos, K., Belmar, F., López, M. T., & Cassorla, F. (2018). Study of Ras/MAPK pathway gene variants in Chilean patients with Cryptorchidism. *Andrology*, *6*(4), 579–584.
- Rohayem, J., Luberto, A., Nieschlag, E., Zitzmann, M., Kliesch, S. (2017). Delayed treatment of undescended testes may promote hypogonadism and infertility. *Endocrine*, *55*(3), 914–924.
- Ross, J. P., Dion, P. A., Rouleau, G. A. (2020). Exome sequencing in genetic disease: Recent advances and considerations. *F1000Research*, *9*, 336.
- Salgado, D., Bellgard, M. I., Desvignes, J.-P., Bérout, C. (2016). How to Identify Pathogenic Mutations among All Those Variations: Variant Annotation and Filtration in the Genome Sequencing Era. *Human Mutation*, *37*(12), 1272–1282.
- Schnack, T. H., Zdravkovic, S., Myrup, C., Westergaard, T., Wohlfahrt, J., Melbye, M. (2008). Familial aggregation of cryptorchidism — A nationwide cohort study. *American Journal of Epidemiology*, *167*(12), 1453–1457.
- Schwarz, J. M., Rödelberger, C., Schuelke, M., Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods*, *7*(8), 575–576.
- Seo, G. H., Kim, T., Choi, I. H., ... Lee, B. H. (2020). Diagnostic yield and clinical utility of whole exome sequencing using an automated variant prioritization system, EVIDENCE. *Clinical Genetics*, *98*(6), 562–570.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., ... Juul, A. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiological Reviews*, *96*(1), 55–97.
- Song, Y., Fan, L., & Gong, C. (2018). Phenotype and Molecular Characterizations of 30 Children From China With NR5A1 Mutations. *Frontiers in Pharmacology*, *9*.

- Sulonen, A.-M., Ellonen, P., Almusa, H., ... Saarela, J. (2011). Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome Biology*, *12*(9), R94.
- Suwinski, P., Ong, C., Ling, M. H. T., Poh, Y. M., Khan, A. M., Ong, H. S. (2019). Advancing Personalized Medicine Through the Application of Whole Exome Sequencing and Big Data Analytics. *Frontiers in Genetics*, *10*, 49.
- Toliczenko-Bernatowicz, D., Matuszczak, E., Komarowska, M., Hermanowicz, A., Dębek, W. (2020). Epidemiology, pathophysiology, and pathogenesis of cryptorchidism. Evaluation and treatment of undescended testicle. *Pediatrics Polska*, *95*(1), 37–43.
- van den Bergen, J. A., Robevska, G., Eggers, ... Ayers, K. L. (2020). Analysis of variants in GATA4 and FOG2/ZFPM2 demonstrates benign contribution to 46,XY disorders of sex development. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *8*(3), e1095.
- Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S. N., Sikic, M., & Ng, P. C. (2016). SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols*, *11*(1), 1–9.
- Virtanen, H. E., Toppari, J. (2008). Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Human Reproduction Update*, *14*(1), 49–58.
- Wang, H., Zhu, H., Wang, N., Cheng, T., Han, B., Zhao, S., Song, H., Cheng, K., Liu, Y., & Qiao, J. (2019). Somatic mosaicism of androgen receptor gene in an androgen insensitivity syndrome patient conceived through assisted reproduction technique. *Molecular genetics & genomic medicine*, *7*(10), e00906.
- Wang, Y., Wei, Y., Tang, X., Liu, B., Shen, L., Long, C., Lin, T., He, D., Wu, S., & Wei, G. (2018). Association between androgen receptor polymorphic CAG and GGC repeat lengths and cryptorchidism: A meta-analysis of case-control studies. *Journal of Pediatric Urology*, *14*(5), 432.e1-432.e9.
- Welsh, M., Saunders, P. T. K., Fiskens, M., Scott, H. M., Hutchison, G. R., Smith, L. B., Sharpe, R. M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(4), 1479–1490.
- World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (6th ed). World Health Organization.

- Wright, C. F., FitzPatrick, D. R., & Firth, H. V. (2018). Paediatric genomics: Diagnosing rare disease in children. *Nature Reviews Genetics*, *19*(5), 253–268.
- Yang, Y., Muzny, D. M., Reid, J. G., ... Eng, C. M. (2013). Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *The New England Journal of Medicine*, *369*(16), 1502–1511.
- Yang, H., & Wang, K. (2015). Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature Protocols*, *10*(10), 1556–1566.
- Yoshida, R., Fukami, M., Sasagawa, I., Hasegawa, T., Kamatani, N., Ogata, T. (2005). Association of Cryptorchidism with a Specific Haplotype of the Estrogen Receptor α Gene: Implication for the Susceptibility to Estrogenic Environmental Endocrine Disruptors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(8), 4716–4721.
- Xu, Y., Wang, Y., Li, N., ... Wang, J. (2019). New insights from unbiased panel and whole-exome sequencing in a large Chinese cohort with disorders of sex development. *European Journal of Endocrinology*, *181*(3), 311–323.
- Yatsenko, S. A., & Witchel, S. F. (2017). Genetic approach to ambiguous genitalia and disorders of sex development: What clinicians need to know. *Seminars in Perinatology*, *41*(4), 232–243.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134.
- Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R., & Ning, Z. (2009). Pindel: A pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics*, *25*(21), 2865–2871.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Leslie, S. W., Sajjad, H., Villanueva, C. A. (2020). Cryptorchidism. StatPearls Publishing. Kasutatud 15.02.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470270/>

Titi-Lartey, O. A., Khan, Y. S. (2020). Embryology, Testicle. StatPearls Publishing. Kasutatud 21.02.2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557763/>

Garcia, R. A., Sajjad, H. (2020). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Scrotum. StatPearls Publishing. Kasutatud 23.02.2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549893/>

Hutson, J. M. (2018). Cryptorchidism and Hypospadias. In Endotext [Internet]. MDText.com, Inc. Kasutatud 29.03.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279106/>

<https://geo.iarc.fr/today/home> - kasutatud 19.03.2021

<https://www.omim.org/> - kasutatud 29.03.2021

<http://www.informatics.jax.org/> - kasutatud 05.05.2021

<https://hpo.jax.org/app/> - kasutatud 05.05.2021

<https://www.proteinatlas.org/> - kasutatud 20.09.2021

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - kasutatud 20.09.2021

<https://www.uniprot.org/> - kasutatud 20.09.2021

<https://clinicalgenome.org/> - kasutatud 20.09.2021

<https://medlineplus.gov> – kasutatud 20.09.2021

<https://bioinfo.ut.ee/primer3/> - kasutatud 23.01.2022

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> - kasutatud 23.01.2022

<https://bioinfo.ut.ee/genometester/> - kasutatud 23.01.2022

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> - kasutatud 01.02.2022

<https://varsome.com/> - kasutatud 01.02.2022

<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home> - kasutatud 01.02.2022

<https://gnomad.broadinstitute.org/> - kasutatud 01.02.2022

<https://www.genomeweb.com/resources/new-product/roche-nimblegen-seqcap-ez-medexome-target-enrichment-kit> - kasutatud 02.05.2022

<https://cadd.gs.washington.edu/info> - kasutatud 25.05.2022

<https://synlab.ee/arstile/laboriteatmik/referentsvaartused/> - kasutatud 25.05.2022

<https://www.kliinikum.ee/meestekliinik/uuringud-meestehaiguste-korral> - kasutatud 25.05.2022

LISAD

Lisa 1. Patogeensete ja healoomuliste variantide klassifitseerimise kriteeriumid

Kriteeriumid patogeensuse poolt		Kriteeriumid healoomulisuse poolt	
<i>Väga tugev seos patogeensusega</i>		<i>Eraldi seisev tõend healoomulisuse poolt</i>	
PVS1	Nullvariant (nonsenss, raaminihe, ühe või mitme eksoni deletsioon) geenis, kus funktsiooni kadu (<i>loss-of-function</i> , LOF) on haiguse teadaolev mehhanism	BA1	Alleelisagedus >5%
<i>Tugev seos patogeensusega</i>		<i>Tugev seos healoomulisusega</i>	
PS1	Variant põhjustab sama aminohappe muutus, mis on varem kindlaks tehtud	BS1	Haiguse alleelisagedus on oodatust kõrgem
PS2	<i>De novo</i> variant patsiendil, kusjuures vanemate genotüübid on kinnitatud	BS2	Täheldatud tervel isikul täieliku penetrantsusega
PS3	<i>In vitro</i> või <i>in vivo</i> funktsionaalsed katsed, mis toetavad geeniproducti kahjustatavat toimet	BS3	<i>In vitro</i> või <i>in vivo</i> funktsionaalsed uuringud ei näita kahjulikku mõju valgu funktsioneerimisele
PS4	Variandi sagedus haigetel isikutel on oluliselt suurem võrreldes sagedusega kontrollrühmades	BS4	Pereliikmetel haiguse segregatsioon puudub
<i>Mõõdukas seos patogeensusega</i>		<i>Toetab healoomulisust</i>	
PM1	Variant asub kriitilises ja hästi uuritud funktsionaalses domeenis	BP1	Tähendusmuutus geenis, kus ainult kärbimine põhjustab haigust
PM2	Variant puudub populatsiooni sageduste andmebaasidest	BP2	Variant on täheldatud dominantse variandiga <i>trans</i> asendis või patogeense variandiga <i>cis</i> asendis
PM3	Retsessiivsete haiguste korral, kui variant on leitud <i>trans</i> asendis patogeense variandiga	BP3	Raamisisesed insertioonid ja deletsioonid korduvjärjestustes, mille funktsiooni ei ole teada
PM4	Valgu pikkust mõjutav variant	BP4	<i>In silico</i> tööriistad ei ennusta kahjustatavat toimet geeni või geeni produkti suhtes
PM5	Uus mittesünonüümne variant aminohappejärgis, milles varasemalt on leitud patogeenne variant	BP5	Variant leitud juhtumist, millel on haiguse teine molekulaarne alus
PM6	Ennustatav <i>de novo</i> variant, kuid ilma vanemate genotüüpide kinnitusega	BP6	Usaldusväärse andmebaasi kohaselt on tegemist healoomulise variandiga
<i>Toetab patogeensust</i>		BP7	Vaikiv variant ilma splaiss-saidi mõjuta
PP1	Haiguse kosegregatsioon pereliikmetel teadaolevas haigusseoselises geenis		
PP2	Mittesünonüümne variant geenis, milles esineb vähe healoomulisi variante		
PP3	<i>In silico</i> tööriistad ennustavad kahjustavat toimet geeni või geeni produkti suhtes		
PP4	Patsiendi fenotüüp või pere ajalugu liiga spetsiifiline geeni jaoks		
PP5	Usaldusväärse andmebaasi kohaselt on tegemist patogeense variandiga		

Tabel kohandatud Richards *et al.*, 2015 järgi.

Lisa 2. Lisainformatsioon kandidaatgeenide kohta

Geen	Geeni asukoht	Geeni nimetus	Viide
<i>AKRIC2</i>	10p15.1	<i>Aldo-keto reductase family 1 member C2</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016, HPO, OMIM
<i>AKRIC4</i>	10p15.1	<i>Aldo-keto reductase family 1 member C4</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016, HPO, OMIM
<i>AMH</i>	19p13.3	<i>Anti-Mullerian hormone</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; MGI (<i>Amh</i>); HPO; OMIM
<i>AMHR2</i>	12q13.13	<i>Anti-Mullerian hormone type II receptor</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO
<i>AR</i>	Xq12	<i>Androgen receptor</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; MGI (<i>Ar</i>), OMIM
<i>ARX</i>	Xp21.3	<i>Aristaless related homeobox</i>	Audí <i>et al.</i> , 2018; Eggers <i>et al.</i> , 2016; UniProt, OMIM
<i>ATRX</i>	Xq21.1	<i>ATRX chromatin remodeler</i>	Audí <i>et al.</i> , 2018; Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; UniProt, OMIM
<i>BRAF</i>	7q34	<i>B-Raf proto-oncogene</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2018; HPO; NCBI; OMIM; ClinGen; MedlinePlus
<i>CBX2</i>	17q25.3	<i>Chromobox 2</i>	Audí <i>et al.</i> , 2018; HPO; UniProt; OMIM
<i>CDKN1C</i>	11p15.4	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1C</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>CYB5A</i>	18q22.3	<i>Cytochrome b5 type A</i>	Audí <i>et al.</i> , 2018; Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>CYP11A1</i>	15q24.1	<i>Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1</i>	Audí <i>et al.</i> , 2018; Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>CYP11B1</i>	8q24.3	<i>Cytochrome P450 subfamily XIB polypeptide 1</i>	Audí <i>et al.</i> , 2018; Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>CYP17A1</i>	10q24.32	<i>Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>CYP19A1</i>	15q21.2	<i>Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>DHH</i>	12q13.12	<i>Desert hedgehog signaling molecule</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; MGI (<i>Dhh</i>); OMIM
<i>DHX37</i>	12q24.31	<i>DEAH-box helicase 37</i>	Délot ja Vilain, 2021; McElreavey <i>et al.</i> , 2020; UniProt; OMIM
<i>DMRT1</i>	9p24.3	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>	Baetens <i>et al.</i> , 2019; Eggers <i>et al.</i> , 2016; OMIM; UniProt
<i>GATA4</i>	8p23.1	<i>GATA binding protein 4</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM
<i>HSD17B3</i>	9q22.32	<i>Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM
<i>HSD3B2</i>	1p12	<i>Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM
<i>INSL3</i>	19p13.11	<i>Insulin like 3</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; MGI (<i>Insl3</i>); HPO; NCBI; OMIM

<i>KRAS</i>	12p12.1	<i>KRAS proto-oncogene</i>	OMIM; HPO, UniProt; ClinGen; MedlinePlus
<i>LHCGR</i>	2p16.3	<i>Luteinizing hormone receptor</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; MGI (<i>Lhcgr</i>); OMIM
<i>LZTR1</i>	22q11.21	<i>Leucine zipper like transcription regulator 1</i>	OMIM; UniProt; ClinGen
<i>MAMLD1</i>	Xq28	<i>Mastermind like domain containing 1</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; Flück <i>et al.</i> , 2019
<i>MAP2K1</i>	15q22.31	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	ClinGen, MedlinePlus
<i>MAP3K1</i>	5q11.2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM; ClinGen; MedlinePlus
<i>MRAS</i>	3q22.3	<i>Muscle RAS oncogene homolog</i>	ClinGen; HPO; NCBI; OMIM; UniProt
<i>NR5A1</i>	9q33.3	<i>Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; MGI (<i>Nr5a1</i>)
<i>NRAS</i>	1p13.2	<i>NRAS proto-oncogene</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2018; ClinGen; OMIM
<i>POR</i>	7q11.23	<i>Cytochrome p450 oxidoreductase</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI
<i>PPP1CB</i>	2p23.2	<i>Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta</i>	ClinGen; OMIM; UniProt
<i>PPP1R12A</i>	12q21.2-q21.31	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A</i>	Délot ja Vilain, 2021; OMIM; UniProt
<i>PTPN11</i>	12q24.13	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>	Délot ja Vilain, 2021; ClinGen; OMIM; MedlinePlus
<i>RAF1</i>	3p25.2	<i>Raf-1 proto-oncogene</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2017; ClinGen; MedlinePlus; OMIM
<i>RIT1</i>	1q22	<i>Ras like without CAAX 1</i>	ClinGen; OMIM; MedlinePlus
<i>RRAS2</i>	11p15.2	<i>RAS related 2</i>	ClinGen; OMIM
<i>RXFP2</i>	13q13.1	<i>Relaxin family peptide receptor 2</i>	Ayers <i>et al.</i> , 2019; Eggers <i>et al.</i> , 2016; OMIM
<i>SOS1</i>	2p22.1	<i>SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1</i>	Laan <i>et al.</i> , 2021; Rodríguez <i>et al.</i> , 2018; ClinGen; OMIM; MedlinePlus
<i>SOS2</i>	14q21.3	<i>SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2</i>	ClinGen; OMIM
<i>SOX9</i>	17q24.3	<i>SRY-box transcription factor 9</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; MGI (<i>Sox9</i>); OMIM
<i>SRD5A2</i>	2p23.1	<i>Steroid 5 alpha-reductase 2</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM
<i>SRY</i>	Yp11.2	<i>Sex determining region Y protein</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM; UniProt
<i>STAR</i>	8p11.23	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM
<i>TSPYL1</i>	6q22.1	<i>TSPY like 1</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM

<i>WDR37</i>	10p15.3	<i>WD repeat-containing protein 37</i>	HPO; OMIM
<i>WT1</i>	11p13	<i>WT1 transcription factor</i>	Délot ja Vilain, 2021; Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; OMIM
<i>ZFPM2</i>	8q23.1	<i>Zinc finger protein, FOG family member 2</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2016; HPO; NCBI; OMIM

Lisa 3. Kasutatud PCR programmid

A. *AR* c.C1723G geenivariandi amplifitseerimiseks

Algne denaturatsioon	96°C	15 min	} 35 tsüklit
Denaturatsioon	96°C	45 sek	
Praimerite seondumine	58.8°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	45 sek	
Inkubatsioon	72°C	10 min	
Säilitamine	4°C	∞	

B. *INSL3* c.C278T ja *PTPN11* c.A1510G geenivariantide amplifitseerimiseks

Algne denaturatsioon	96°C	15 min	} 10 tsüklit
Denaturatsioon	96°C	45 sek	
Praimerite seondumine	60°C*	30 sek	
Ekstensioon	72°C	45 sek	
Denaturatsioon	96°C	45 sek	} 25 tsüklit
Praimerite seondumine	50°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	45 sek	
Inkubatsioon	72°C	10 min	
Säilitamine	4°C	∞	

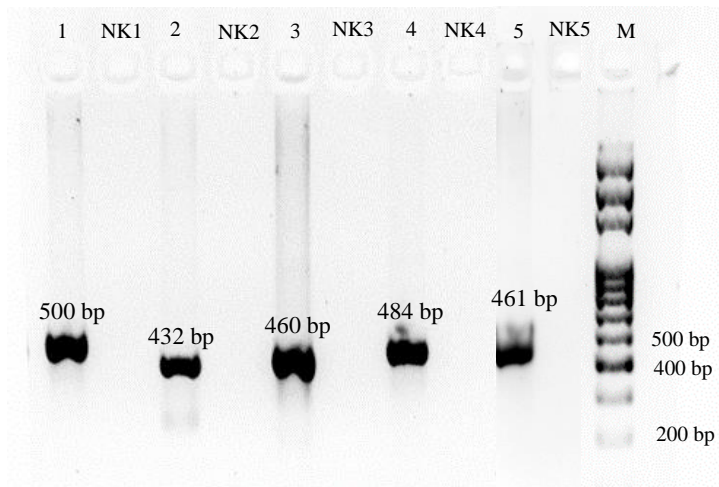
*-1 °C iga järgneva tsükli kohta

C. *MAP2K1* c.G880A ja *NR5A1* c.C334T geenivariantide amplifitseerimiseks

Algne denaturatsioon	96°C	15 min	} 10 tsükli
Denaturatsioon	96°C	45 sek	
Praimerite seondumine	70°C*	30 sek	
Ekstensioon	72°C	45 sek	
Denaturatsioon	96°C	45 sek	} 25 tsükli
Praimerite seondumine	60°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	45 sek	
Inkubatsioon	72°C	10 min	
Säilitamine	4°C	∞	

*-1°C iga järgneva tsükli kohta

Lisa 4. Amplifitseeritud PCR produktide geelelektroforees



1 – *MAP2K1*;
 NK1 – negatiivne kontroll (*MAP2K1* praimerid);
 2 – *PTPN11*;
 NK2 – negatiivne kontroll (*PTPN11* praimerid);
 3 – *NR5A1*;
 NK3 – negatiivne kontroll (*NR5A1* praimerid);
 4 – *INSL3*;
 NK4 – negatiivne kontroll (*INSL3* praimerid);
 5 – *AR*;
 NK5 – negatiivne kontroll (*AR* praimerid);
 M – marker

LIHTLITSENTS

Mina, Galina Belova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Kaasasündinud munandite laskumise häire pärilikud tegurid“, mille juhendajad on Maris Laan, Laura Kasak ja Anna-Grete Juchnewitsch, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **06.06.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Galina Belova

30.05.2022