TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Telomeeride pikkust mõjutavad geneetilised variandid viljatutel meestel ja nende roll spermatogeneesihäiretes

Magistritöö
30 EAP

Anna-Grete Juchnewitsch

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

TARTU 2021

INFOLEHT

Telomeeride pikkust mõjutavad geneetilised variandid viljatutel meestel ja nende roll spermatogeneesihäiretes

Kromosoomide otstes esinevad telomeersed kordusjärjestused on olulised mitmetes rakulistes protsessides, kaitstes kromosoome kahjustuste eest. Telomeerid lühenevad iga rakujagunemisega enamus rakkudes. Viimastel aastatel on telomeeride pikkuse uurimine erinevate fenotüüpide kontekstis saanud köitvaks teemaks. Ühtlasi on täheldatud, et viljatutel meestel esinevad lühemad telomeerid. Käesolevas töös uuriti, kas telomeeri pikkusega seotud geenides esinevate harvade variantide ning meeste viljatuse vahel esineb seos. Uuritav valim koosnes 85 Eesti meessoost patsiendist, kellel esines idiopaatiline mitte-obstruktiivne azoospermia. Antud 85 viljatu mehe hulgas ei leidunud indiviide, kel oleks tuvastatud põhjuslik seos mitte-obstruktiivse azoospermia ja telomeeride pikkusega seotud geenide harvade haigusseoseliste variantide vahel.

Märksõnad: telomeerid, meeste viljatus, azoospermia

CERCS: B220 geneetika, tsütogeneetika; B570 sünnitusabi, günekoloogia, androloogia, paljunemine, seksuaalsus

Genetic variants modulating telomere length in infertile men and their role in impaired spermatogenesis

Telomeric sequences located at the ends of chromosomes are important factors in several cellular processes, protecting chromosomes from damage. Telomeres shorten with each cell division in most cells. In recent years, the association between telomere length and different phenotypes has become an engrossing topic. Also, it has been noted, that infertile men have shorter leukocyte telomeres. In the current study, association between rare genetic variation in genes linked to telomere length and male infertility was studied. The examined group consisted of 85 Estonian men who were diagnosed with idiopathic non-obstructive azoospermia (NOA). Among these 85 infertile men there were no individuals with a causal association between NOA and rare variants in genes related to telomere length.

Keywords: telomeres, male infertility, azoospermia

CERCS: B220 genetics, cytogenetics; B570 obstetrics, gynaecology, andrology, reproduction, sexuality

SISUKORD

INFOLEHT ... 2
SISUKORD ... 3
KASUTATUD LÜHENDID ... 5
SISSEJUHATUS ... 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE ... 7
1.1. Telomeerid ... 7
1.1.1. Telomeeride olemus ... 7
1.1.2. Telomeeride kaitsev kompleks ja replikatsioonikompleks ... 8
1.1.3. Telomeeride replikatsioon somaatilistes rakkudes ... 9
1.1.4. Telomeeride ning telomeraasi olemus tüvi- ja sugurakkudes ... 10
1.2. Telomeeride pikkuse dünaamika ... 11
1.2.1. Inimestevaheline varieeruvus telomeeride pikkuses ja seda mõjutavad faktorid ... 11
1.2.2. Telomeeride pikkus ja telomeeridega seotud haigused ... 12
1.2.3. Telomeeride pikkuse dünaamika erinevates kasvajatüüpides ... 13
1.3. Geneetilise assotsiatsiooni uuringud telomeeri pikkuse ja geneetiliste variantide vahel ... 15
1.3.1. Läbiviidud kandidaatgeenide põhiste uuringute tulemused ... 15
1.3.2. Läbiviidud ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute tulemused ... 15
1.4. Meeste viljatus ... 18
1.4.1. Meeste viljatuse põhjused, fenotüübiline varieeruvus ja levimus ... 18
1.4.2. Azoospermia erinevad vormid ja nende geneetilised põhjused ... 20
1.5. Telomeeri pikkuse dünaamika spermatogeneesis ... 21
1.5.1. Dünaamika ja selle mõjufaktorid ... 21
1.5.2. Telomeeri pikkus viljatute meeste spermides ... 23
1.6. Geenivariantide patogeensuse hindamise meetodid ... 24
2. UURIMUS ... 26
2.1. Töö eesmärgid ... 26
2.2. Töö ülesehitus ... 27
2.3. Materjalid ja metoodika ... 28
2.3.1. Eetikakommitee luba ... 28
2.3.2. Uuritav kliiniline valim ... 28
2.3.3. Eksoomi sekveneerimise andmed ... 28
2.3.4. Uurimistöös kasutatud andmebaasid ... 29
2.3.5. Käesolevas töös analüüsitavad kandidaatgeenid ... 31
2.3.5.1. Uuritavate geenide valiku kriteeriumid ... 31
2.3.5.2. Kandidaatgeenides esinevate variantide filtreerimine ... 31
2.3.5.3. Geenivariantide patogeensuse hindamine ... 31
2.3.6. Selekteeritud kandidaatgeenide kirjeldamine ja variantide kontrollimine ... 32
2.3.7. Individuaalsete eksoomide analüüs ... 32
2.3.8. Andmete analüüs ... 33
3. TULEMUSED JA ARUTELU ... 34
3.1. Uuringusse valitud kandidaatgeenid ja nende iseloomustus ... 34
3.2. Kandidaatgeenides esinevate varieeruvuste üldine profiil Eesti idiopaatilise MOA valimis ... 35
3.3. Harvade variantide uuring potentsiaalse põhjusliku seose osas idiopaatilise MOA-ga ... 38
3.4. Individuaalsete eksoomide analüüs tuvastamaks idiopaatilise MOA-ga seotud variante ... 42

KOKKUVÕTE 47
SUMMARY 48
TÄNUAVALDUSED 49
KASUTATUD KIRJANDUS 50
KASUTATUD VEEBIAADRESSID 60
LISAD 61
LIHTLITSENTS 64

KASUTATUD LÜHENDID

ACMG – Ameerika meditsiinigeneetika- ja genoomika kolledž *(the American College of Medical Genetics and Genomics)*

ALT – alternatiivne telomeeride pikendamise mehhanism *(alternative lengthening of telomeres)*

AMP – molekulaarse patoloogia ühing (*the Association for Molecular Pathology)*

bp – aluspaar *(base pair)*

CADD – kombineeritud annotatsioonipõhine kahandamine (*Combined Annotation Dependent Depletion)*

ES – ektoplasmaatiline spetsialiseeritus *(ectoplasmic specialization)*

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon *(follicle stimulating hormone)*

GWAS – ülegenoomne assotsiatsiooniuuring *(genome-wide association study)*

HPA – inimvalgu atlas *(Human Protein Atlas)*

HR – homoloogne rekombinatsioon *(homologous recombination)*

kb – tuhat aluspaari *(kilobase)*

LH – luteiniseeriv hormoon *(luteinizing hormone)*

LINC – tuuma- ja tsütoskeleti liitja *(the Lincer of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)*

MAF – minoorse alleeli sagedus *(minor allele frequency)*

MGI – hiiregenoomi informaatika *(Mouse Genome Informatics)*

MOA – mitte-obstruktiivne azoospermia *(non-obstructive azoospermia)*

NCBI – riiklik biotehnoloogia teabekeskus *(National Center for Biotechnology Information)*

NHEJ – mittehomoloogiline DNA-otste ühendamine *(non-homologous end joining)*

PSAP – populatsiooni valimi tõenäosus *(Population Sampling Probability)*

SNP – üksiknukleotiidne polümorfism *(single-nucleotide polymorphism)*

SNV – üksiknukleotiidne variant *(single-nucleotide variant)*

UCSC – California Santa Cruz ülikool *(University of California Santa Cruz)*

SISSEJUHATUS

Imetajate kromosoomide otstes esinevad telomeersed järjestused ning kaitsev kompleks, mis kaitseb kromosoome erinevate kahjustuste eest (Smith jt., 2020). Telomeerid lühenevad iga rakujagunemise korral ning on sealjuures üks vananemisele iseloomulikest tunnustest (Blackburn jt., 2015; Demanelis jt., 2019). Telomeeride pikkuse ning erinevate fenotüüpide vahel on leitud mitmesuguseid seoseid. Sealjuures on täheldatud, et viljatutel meestel esinevad lühemad telomeerid kui viljakatel indiviidel (Darmishonnejad jt., 2020). Eesti spermatogeneesihäiretega patsientide seas on 7,8% juhtudest tingitud geneetilistest põhjustest (Punab jt., 2017). Käesolevas töös uuriti indiviide, kellel esines idiopaatiline mitte-obstruktiivne azoospermia. Mainitud viljatusvormi korral puuduvad ejakulaadis spermatogeneesihäirete tõttu seemnerakud. Küll aga ei ole mitte-obstruktiivse azoospermia monogeensete põhjuste kohta palju teada (Kasak ja Laan, 2021).

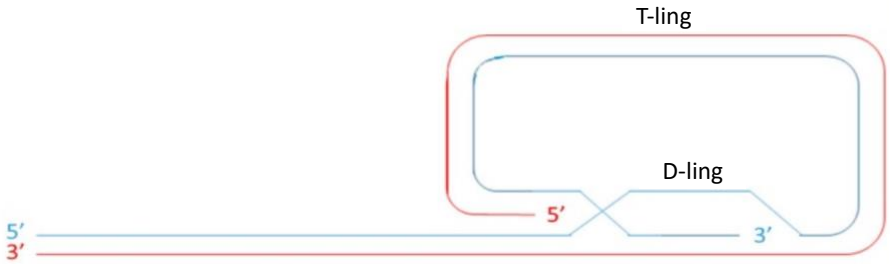
Käesoleva magistritöö teoreetilises osas antakse ülevaade telomeeride olemusest ja iseärasustest erinevates inimeste rakkudes. Ühtlasi tehakse sissevaade telomeeri pikkuse varieeruvusse erinevate fenotüüpide ning haiguste kontekstis. Sealjuures antakse ülevaade meeste viljatuse ning azoospermia erinevatest vormidest ning põhjustest. Magistritöö peamine eesmärk oli kindlaks teha, kas telomeeride pikkusega seotud geenides esinevate harvade variantide ja idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermia vahel esineb põhjuslik seos. Analüüsis kasutati 85 Eesti meessoost patsiendi eksoomiandmeid. Esmalt koostati telomeeride pikkusega seotud kandidaatgeenide nimekiri, mis põhines teaduspublikatsioonidel, ülegenoomsetel assotsiatsiooniuuringutel ning STRING andmebaasil. Järgnevalt analüüsiti kandidaatgeenide harvade variantide varieeruvust ja patogeensust ning otsiti kirjanduse põhjal nende võimalikku seost meeste reproduktiivsüsteemi ja viljatusega. Sellest lähtuvalt teostati individuaalne eksoomianalüüs seitsmele patsiendile, kes kandsid kandidaatgeenide analüüsist tuvastatud võimalikke põhjuslikke variante. Analüüsi eesmärgiks oli kindlaks teha variandid, millel võis esineda põhjuslik seos idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermiaga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Telomeerid

1.1.1. Telomeeride olemus

Telomeerid on valk-DNA kompleksid, mis asuvad lineaarsete eukarüootsete kromosoomide otstes ja koosnevad kaheahelalistest DNA kordusjärjestustest (Smith jt., 2020). Inimese telomeersed järjestused moodustuvad TTAGGG kordustest (Meyne jt., 1989). Need lõppevad üheahelalise G-rikka eendumiga 3' otsas, mis pöördub tagasi ning paardub kaheahelalise telomeerse kordusjärjestusega (Wright jt., 1997; Griffith jt., 1999). Protsessi tulemusel moodustub T-ling, mis kaitseb kromosoomi vaba otsa (Griffith jt., 1999). Ühtlasi moodustub T-lingu sees D-ling (joonis 1) (Greider, 1999).



Joonis 1. Telomeeri T-ling ja D-ling. 3' G rikas eendum (sinine) pöördub tagasi, moodustades T-lingu. Sealjuures tungitakse 5' kaheahelalisse telomeersesse dupleksi ja moodustatakse D-ling (kohandatud, Turner jt., 2019).

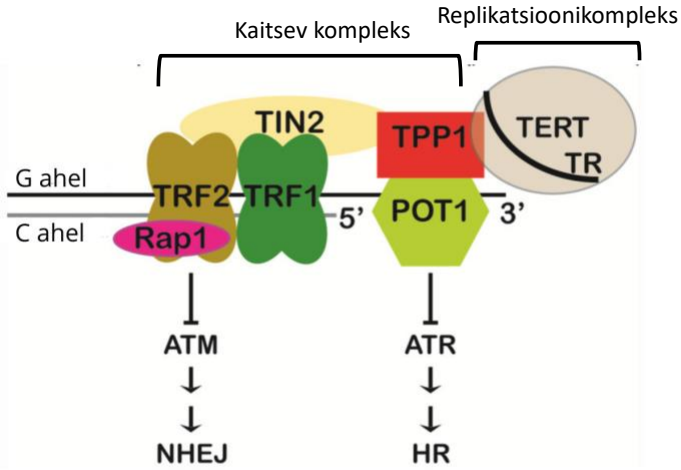
Telomeeridega on seotud kaitsev valgukompleks, mille ülesanne on kaitsta ja säilitada genoomse DNA terviklikkust. Selle saavutamiseks inhibeeritakse nii DNA kahjustustele reageerivaid ensüüme kui ka DNA reparatsioonimehhanisme (de Lange, 2018). Mittehomoloogsete DNA-otste ühendamine ja homoloogne rekombinatsioon on DNA reparatsioonimehhanismid, mis parandavad DNA kaheahelalisi katkeid (Chakraborty jt., 2016; Dahal jt., 2018). DNA reparatsioonimehhanismid aktiveeruvad kriitiliselt lühikeste telomeeride korral, mis ei ole võimelised kaitsvat kompleksi täies ulatuses siduma. Selle tagajärjel toimub apoptoos või pöördumatu rakutsükli peatamine. Ühtlasi häiritakse genoomi stabiilsust ja terviklikkust (Lazzerini-Denchi ja Sfeir, 2016). Lisaks mainitule on kaitsev kompleks vajalik selleks, et mittetäieliku DNA replikatsiooni ajal ei mõjutataks kromosoomi otsade läheduses olevaid geene (Turner jt., 2019).

Telomeeride lühenemine on iseloomulik enamikele inimese rakutüüpidele, tuues kaasa mitmeid rakulisi muutusi. Sealjuures on telomeeride lühenemine seotud nii vananemise, haiguste kui ka üldise suremuse riskiga (Blackburn jt., 2015).

1.1.2. Telomeeride kaitsev kompleks ja replikatsioonikompleks

Telomeeride kaitsev kompleks koosneb kuuest valgust: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1 ning TPP1, mis interakteeruvad telomeersete kordusjärjestustega ning kaitsevad kromosoomi otsasid DNA lagundamise eest (joonis 1) (Smith jt., 2020). Sealjuures seonduvad TRF1 ja TRF2 kaheahelalise telomeerse DNA-ga (Galati jt., 2015). POT1-TTP2 kompleks interakteerub aga üheahelalise G-rikka eendumiga. POT1-TPP1 kompleksi häirete korral mõjutatakse telomeerse eendumi terviklikkust. Samuti võivad esineda pikemad ja hapramad telomeerid, mis toovad kaasa suurema vähiriski (Rice jt., 2017). RAP1 seondub TRF2 valguga (Janoušková jt., 2015). TIN2 (alias TINF2) valk seondub nii TRF1, TRF2 kui ka TPP1-ga, tasakaalustades kaitsvat kompleksi. TIN2 interaktsioonid mainitud valkudega aitavad maha suruda telomeeri kahjustustele vastavaid signaalradasid. TIN2 puudumisel aktiveeritakse DNA reparatsioonimehhanismid (Hu jt., 2017).

Telomeraas on ensüüm, mis lisab kromosoomide 3’ otstesse telomeerseid DNA kordusjärjestusi, tasakaalustades rakujagunemisega kaasnevat kromosoomide otsade lühenemist (Greider ja Blackburn, 1985). Telomeraas kuulub telomeeri replikatsioonikompleksi, koosnedes telomeraasi pöördtranskriptaasist (TERT) ning telomeraasi RNA alaühikust (TR ehk TERC). TERT ülesanne on läbi viia DNA replikatsiooni, lisades kromosoomi otstesse telomeerseid kordusjärjestusi. Seda on võimalik teostada tänu TR-le, mis sisaldab telomeersete korduste lisamiseks sobivat RNA järjestust (joonis 2) (Smith jt., 2020). Ühtlasi kuuluvad telomeraasi juurde mitmed erinevad tegurid, mis seda mõjutavad (Roake ja Artandi, 2020). Nende seas on ka düskeriini kompleks, mis koosneb NHP2 ja NOP10 valkudest ning düskeriinist. Kompleks seondub telomeraasi RNA alaühikuga ning stabiliseerib telomeraasi kompleksi (Nguyen jt., 2018; Shukla jt., 2016).

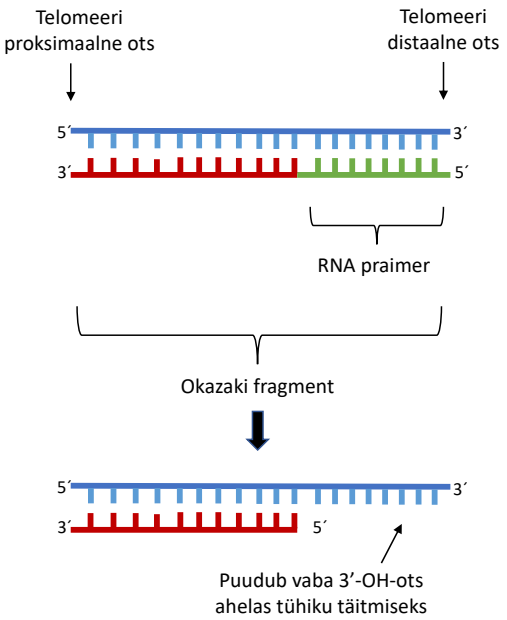


Joonis 2. Telomeeride kaitsev valgukompleks ja replikatsioonikompleks. Kaitsev kompleks koosneb kuuest valgust: TRF2, TRF1, RAP1, TIN2, POT1 ning TPP1. Selle ülesandeks on kaitsta kromosoomi otsasid erinevate DNA reparatsioonimehhanismide, sealhulgas mittehomoloogilise DNA-otste ühendamise (NHEJ) ning homoloogse rekombinatsiooni (HR) eest. Replikatsioonikompleksi kuulub telomeraasi TERT valk ning RNA alaühik TR, mis lisavad kromosoomide 3' otstesse telomeerseid DNA kordusjärjestusi (kohandatud, Smith jt., 2020).

1.1.3. Telomeeride replikatsioon somaatilistes rakkudes

Inimese somaatilised rakud on võimelised jagunema teatud arv kordi, mille järel toimub rakusurm. Rakujagunemise piirarvu nimetatakse teisisõnu Hayflicki piiranguks selle avastaja Leonard Hayflicki järgi, kelle uuringutulemuste põhjal jagunevad somaatilised rakud 40 kuni 60 korda (Hayflick, 1965). Rakujagunemine lõppeb, kui rakk ei ole enam võimeline kromosoomi otsasid replitseerima. Antud nähtust nimetatakse otsa-replikatsiooni probleemiks (joonis 3) (Watson, 1972; Olovnikov, 1973).

DNA polümeraas pole võimeline kromosoomi 3' otsa täielikult sünteesima. DNA replikatsiooni ajal toimub uue DNA süntees 5'-3'suunas. Protsessis osalevad RNA praimerid, mis seonduvad matriitsahelale. RNA praimeritel on vabad OH-rühmad, mis teevad võimalikuks uute nukleotiidide lisamise. Juhtiva ahela süntees on järjepidev ning vajab seetõttu vaid ühte RNA praimerit sünteesi alustamiseks. Viivisahel vajab rohkem praimereid, kuna selle DNA süntees toimub replikatsioonikahvlile vastupidises suunas. Viivisahela RNA praimerid elongeeritakse lühikesteks Okazaki fragmentideks, mis ligeeritakse uue DNA ahela moodustamiseks. Küll aga eemaldatakse RNA praimer viivisahela 5' otsast replikatsiooni lõpus, mistõttu puudub ka vaba 3'-OH-ots uute nukleotiidide lisamiseks (joonis 3) (Turner jt., 2019). Telomeraasi ei ekspresseerita enamikes täiskasvanu rakkudes, mistõttu lühenevad telomeerid iga rakujagunemise korral (Blackburn jt., 2015).



Joonis 3. Telomeeri otsa-replikatsiooni probleem. RNA praimeri vaba 3´-OH-ots on vajalik uue DNA ahela sünteesiks, mis toimub 5'-3' suunas. Selle puudumise korral pole DNA polümeraas võimeline sünteesi täielikult läbi viima, mistõttu jääb kromosoomi 3' otsa replitseerumata eendum (kohandatud, Heinaru, 2012).

1.1.4. Telomeeride ning telomeraasi olemus tüvi- ja sugurakkudes

Tüvirakud on võimelised somaatiliste kudede rakke pidevalt uuendama (Blackburn jt., 2015). See on võimalik tänu telomeraasile, mis lisab kromosoomide otstesse TTAGGG järjestusi (Zhao jt., 2019). Telomeraasi seondumine telomeeridele on kontrollitud spetsiifiliste valkude vaheliste interaktsioonidega (Roake ja Artandi, 2020). Replikatsioonikompleksi seondumine telomeeridele saab alguse TERT ja TPP1 valkude interaktsioonist (joonis 2). TERT valgu N-terminaalne domeen TEN seondub TPP1 valgu TEL laiguga (ing. k. *TEL patch)*, mis muuseas soodustab ka telomeraasi translokatsiooni (Dalby jt., 2015). Bisht jt. on näidanud, et TPP1 mutatsioonid võivad põhjustada TEL laigu aminohapete deformatsioone ning inimese telomeeride lühenemist (Bisht jt., 2016). Telomeraas pikendab telomeeri G-rikast eendumit, kasutades selleks TR-i telomeersete korduste lisamiseks sobivat RNA järjestust (Roake ja Artandi, 2020; Smith jt. 2020). Telomeraasi aktiivsust on võimalik inhibeerida CST kompleksi abil, mis koosneb CTC1, STN1 ja TEN1 valkudest (Chen jt., 2012). Tegu on trimeerse kompleksiga, mis seondub nii telomeersete kui ka mitte-telomeersete G-rikaste järjestustega (Hom ja Wuttke, 2017). Chen jt. 2012. aastal avaldatud uuringutulemustest selgus, et CST kompleks konkureerib POT1 ja TTP1 valkudega, seondudes äsja pikendatud üheahelalisele telomeersele DNA-le. Seega pole telomeraasil võimalik telomeeriga interakteeruda. Sellise

mehhanismiga on võimalik tagada, et iga telomeeri pikendatakse telomeraasi poolt vaid kord rakutsükli jooksul (Chen jt., 2012).

Telomeraas esineb mitmetes inimese tüvirakkude populatsioonides, sealhulgas inimese embrüonaalsetes ning vereloome tüvirakkudes (Rivera jt., 2017; Jose jt., 2018). Inimese embrüonaalsete tüvirakkude uuringust on leitud, et lühikeste telomeeridega tüvirakud ekspresseerisid vähem erinevaid pluripotentsusele omaseid markereid võrreldes nende rakkudega, millel olid pikad telomeerid. Seega on võimalik, et telomeeri pikkus varieerub inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes vastavalt sellele, milline on rakkude pluripotentsuse staadium (Wang jt., 2017). Pluripotentsete tüvirakkude optimaalsed telomeeride pikkused saavutatakse läbi telomeraasi ja telomeeri kärpimismehhanismide vahelise tasakaalu (Rivera jt., 2017).

Telomeraas on aktiivne ka sugurakkude eellasrakkudes. Katsetes hiirtega on näidatud, et väga kõrge telomeraasi ekspressioon esineb mitte-diferentseerunud spermatogoonide korral, mis omakorda annavad aluse meeste iduliini tüvirakkudele (Pech jt., 2015). Telomeerid osalevad gametogeneesi ajal kromosomaalsete liikumiste juures, sealhulgas meioosis ning omavad sugurakkude terviklikkuse seisukohalt väga olulist rolli (Reig-Viader jt., 2016). Meioosi ajal seovad telomeerid kromosoome sisemise tuumamembraaniga, aidates kaasa homoloogsele paardumisele ja geneetilisele ristumisele (Shibuya jt., 2015; Smith jt., 2020). Katsetes hiirte spermatotsüütidega on kirjeldatud, et varajases meioosis toimub kontakt telomeeri kaitsva valgukompleksi ning sisemise tuumamembraani TERB1-TERB2-MAJIN kompleksi vahel. Pärast TERB1-TERB2-MAJIN seondumist telomeersele DNA-le lahutatakse aga kaitsev kompleks moodustunud tervikust. Antud nähtust nimetatakse telomeeri korgivahetuseks, mis leiab aset hilises profaasis. Selle abil on telomeeridel võimalik seonduda sisemise tuumamembraaniga (Shibuya jt., 2015).

1.2. Telomeeride pikkuse dünaamika

1.2.1. Inimestevaheline varieeruvus telomeeride pikkuses ja seda mõjutavad faktorid

Inimese telomeerid on 10-15kb pikad ning lühenevad aastas keskmiselt 48-67 aluspaari (bp) võrra (Smith jt., 2020; Marioni jt., 2016). Telomeeride pikkused võivad inimgruppide vahel suuresti erineda. Indiviiditi esinev varieeruvus tuleneb juba varajasest east, olles mõjutatud nii soost kui ka rahvusest (Ly jt., 2019). Ühtlasi mõjutavad telomeeride pikkuseid erinevad elustiili tegurid, varieerudes koetüübiti ning olles tavaliselt negatiivses korrelatsioonis vanusega. Vananemisega seotud telomeeride lühenemine esineb enamus kudedes, olles ühtlasi üks vananemisele iseloomulikest tunnustest (Demanelis jt., 2019). Daniali jt. 2013. aasta uuringutulemustest lähtuvalt võib väita, et täiskasvanutel lühenevad telomeerid leukotsüütides,

skeletilihastes, nahas ja nahaaluses rasvkoes võrdväärsel määral (Daniali jt., 2013). Telomeeride lühenemise määra abil on võimalik ennustada ka erinevate liikide eluiga. Sealjuures on suurema kehakaaluga liikidel telomeeride lühenemise määr madalam ning eluiga pikem (Whittemore jt., 2019).

Naistel esinevad üldjuhul pikemad telomeerid kui meestel ning vanusegruppide vahelist erinevust antud seose puhul enamjaolt täheldatud ei ole (Gardner jt., 2014). Erinevus võib olla tingitud sellest, et naistel esineb enne menopausi algust kõrgem östrogeeni tase (Shin jt., 2016). Östrogeen mõjutab aga *TERT* promootorit ning aktiveerib telomeraasi (Kyo jt., 1999). Ühtlasi on näidatud, et vähenenud östrogeeni taseme korral esinevad nii menopausieelsetel kui ka -järgsetel naisterahvastel lühemad telomeerid (Shin jt., 2016). Telomeerid on naistel keskmiselt 176 bp võrra pikemad (Gardner jt., 2014). Soost tingitud telomeeride pikkuste erinevused ilmnevad juba varajases eas. Nimelt on vastsündinud tütarlastel pikemad telomeerid kui poisslastel (Factor-Litvak jt., 2016). Samasugune seos esineb ka 4-aastaste laste korral (Ly jt., 2019). Telomeeride pikkused erinevad ka rahvuste vahel ning võivad olla tingitud geneetilistest variatsioonidest. Euroopast pärit lastel on täheldatud lühemaid telomeere kui Maori, Vaikse ookeani piirkonna ning Aasia päritoluga lastel (Ly jt., 2019). Koetüübipõhisest uuringust on selgunud, et Aafrika päritoluga inimestel esinevad pikemad telomeerid võrreldes Euroopa päritoluga inimestega, seda enamus kudedes (Demanelis jt., 2019). Lisaks esinevad lühemad telomeerid suitsetajatel (Latifovic jt., 2016). Märkimisväärselt lühemad leukotsüütide telomeerid on seotud häiritud ööpäevarütmi ning krooniliselt lühema unega (alla 6h ööpäevas) (Wynchank jt., 2019). Lapsepõlves kogetud raskused nagu vägivald, halb sotsiaalmajanduslik seisund või ema depressioon ning nendest tingitud stress võivad samuti mõjutada telomeeride pikkuseid (Coimbra jt., 2017).

1.2.2. Telomeeride pikkus ja telomeeridega seotud haigused

Pikemate telomeeridega inimestel on väiksem ja lühemate telomeeridega indiviididel kõrgem risk haigestuda erinevatesse kroonilistesse haigustesse. Sealjuures on lühikesed telomeerid seotud kardiovaskulaarhaigustega. Chatterjee jt. 2018. aasta uuringutulemustest selgus, et hüpertroofilise kardiomüopaatiaga patsientidel esinesid lühemad leukotsüütide telomeerid võrreldes kontrollgrupi indiviididega. Ühtlasi märgiti, et telomeeri pikkus võib olla seotud obstruktiivse hüpertroofilise kardiomüopaatia raskusastmega (Chatterjee jt., 2018). Sealjuures on haigusega seotud telomeeride lühenemine iseloomulik kardiomüotsüütidele, mis võib olla tingitud rakkudes aset leidvast suuremahulisest DNA kahjustusest. Ühtlasi on täheldatud, et südamepuudulikkusega meestel lühenevad telomeerid kiiremini kui südamepuudulikkusega

naistel (Sharifi-Sanjani jt., 2017). Euroopa päritolu 40 kuni 70-aastastel indiviididel leiti aga olevat väiksem südamereuma risk, kui neil esinesid geneetiliselt pikemad telomeerid (Kuo jt., 2019). Calvete jt. on välja toonud, et kaitsvasse kompleksi kuuluva geeni *POT1* variandid esinevad enamasti südamelihase patoloogiate korral (Calvete jt., 2017).

Lühemad telomeerid esinevad ka inimestel, kellel on diagnoositud reumatoidartriit. Geneetilistelt pikemate telomeeridega indiviididel on aga väiksem risk haigestuda kõnealusesse haigusesse (Zeng jt., 2020). Patogeensed geenivariandid telomeeridele omastes geenides võivad põhjustada monogeenseid haiguseid. Hoyeraal-Hreidarsson sündroom on kaasasündinud düskeratoosi üks kliiniliselt raskemaid vorme, mida muuhulgas iseloomustab ka kriitiliselt lühikeste telomeeride olemaslolu. Inimesel, kellel mainitud haigus esines, leiti olevat mutatsioonid *ACD* geeni poolt kodeeritud TPP1 valgu TEL-laigus, mis häiris telomeraasi seondumist kaitsva kompleksiga (Kocak jt., 2014). Idiopaatilise pulmonaarse kopsufibroosi näol on tegemist raskekujulise kopsuhaigusega, mida sageli iseloomustavad telomeeride geenidega seotud häired. Sealjuures on täheldatud, et *TINF2* geenis esinevad harvad haigusseoselised variandid omavad võimalikku põhjuslikku seost mainitud haigusega (Alder jt., 2015). Ühtlasi on märgatud märkimisväärset korrelatsiooni lühikeste telomeeride ja suhkurtõve vahel (Wang jt., 2016). 2. tüübi diabeedi korral esinevad lühemad telomeerid kõikides inimese kudedes. Sealjuures on kõige lühemad telomeerid pankreases ja pärgarteris (Demanelis jt., 2019). 1. tüüpi diabeeti põdevatel inimestel on aga lühemad telomeerid kui 2. tüübi diabeetikutel (Wang jt., 2016).

Telomeeride pikkust mõjutavad erinevad elustiili ja keskkonna tegurid, nende seas ülekaal ja rasvumine. Kuna rasvumine omab seost oksüdatiivse stressi ning kroonilise põletikuga, võib see aidata kaasa ka telomeeride kiiremale lühenemisele. Gielen jt 2018. aasta metaanalüüsi tulemustest lähtuvalt esinesid kõrgema kehamassiindeksiga täiskasvanud indiviididel lühemad telomeerid. Antud korrelatsioon oli tugevaim just nooremate täiskasvanute seas (Gielen jt., 2018). Ülekaalulistel ja rasvunud lastel ning noorukitel on samuti täheldatud oluliselt lühemaid leukotsüütide telomeere kui nende normaalse kehamassiindeksiga eakaaslastel. Seetõttu võib nooruses esinev suurem kehamassiindeks olla seotud kiirema bioloogilise vananemisega ning avaldada täiskasvanueas tervisele negatiivset mõju (Lamprokostopoulou jt., 2019).

1.2.3. Telomeeride pikkuse dünaamika erinevates kasvajatüüpides

Telomeeride säilitusmehhanismid erinevad normaalsete ja vähirakkude korral (Sung jt., 2020). 85% kasvajarakkudest toimub telomeeride pikenemine telomeraasi abil (Zhao jt., 2019). Vähi arengu ajal reguleeritakse TERT ekspressiooni mitmesuguste mehhanismide abil, et toetada tumorigeneesiga seotud rakkude suurenenud proliferatsiooni (Roake ja Artandi, 2020). 15%

juhtudest puudub telomeraas kasvajarakkudes. Seetõttu aktiveeritakse rakkudes ALT ehk alternatiivne telomeeride pikendamise mehhanism, mis põhineb homoloogsel rekombinatsioonil tütarkromatiidide vahel. ALT mehhanismi iseloomustab muuseas heterogeenne telomeeripikkuste vahemik, mille korral võivad telomeerid inimese rakkudes olla ekstreemselt lühikesed (<1kb) või pikad (>20kb) (Zhao jt., 2019). Ühtlasi on täheldatud, et telomeeride pikenemine ALT mehhanismi läbi on tugevalt seotud rakutsükli ning DNA kontrollpunktidega (Sung jt., 2020). ALT aktiveeritakse mesenhümaalse päritoluga kasvajate korral. Napier jt. on näidanud, et *ATRX* geen on ALT mehhanismi repressor fibroblastides ning selle puudumisel mehhanism aktiveeritakse. Küll aga ei kirjeldatud sarnast efekti epiteliaalsete rakkude korral (Napier jt., 2015). Hoolimata selle olulisusest on ALT aktiveerimise viis ja prognostiliste tulemuste mõjutamine erinevate vähitüüpide korral aga endiselt ebaselge (Sung jt., 2020).

Hiljutises uuringus 31 erineva vähitüübiga leiti, et telomeeride säilitusmehhanismid esinesid kõikide pikkade telomeeridega vähiproovide korral. Mitmed vähitüübid omasid kõrget ALT aktiivsust koos madala või puuduliku telomeraasi ekspressiooniga. Sealjuures oli enam kui 50% sarkoomi proovidest seotud telomeeride pikenemisega (Sung jt., 2020). Sarnast korrelatsiooni täheldasid ka Barthel jt., kelle uuringus 31 vähitüübiga selgus, et sarkoomi, glioomi ja testikulaarsete sugurakkude kasvajate korral esinesid teiste vähitüüpidega võrreldes märkimisväärselt pikemad telomeerid (Barthel jt., 2017).

Pikemad telomeerid võivad suurendada mõnede vähitüüpide riski (Demanelis jt., 2019). Uuringus Euroopa päritolu eakate inimestega leiti, et geneetiliselt pikemate telomeeridega indiviididel esines suurem vähirisk, mis võib olla tingitud asjaolust, et rakud jagunevad rohkem ning muutuvad surematuteks (Kuo jt., 2019; Rode jt., 2016). Sealjuures on täheldatud, et pikemate telomeeride geneetilised determinandid on seotud melanoomi ning kopsuvähi tekkega (Rode jt., 2016). Lisaks võivad pikemad leukotsüütide telomeerid tuua kaasa kõrgenenud kõhunäärmevähi riski (Luu jt., 2019). Pikemate telomeeride seos vähiga takistab aga omakorda inimese eluea edendamist telomeeride pikendamise kaudu (Kuo jt., 2019). Zhu jt 2016. aastal avaldatud uuringutulemused lühikeste telomeeride ning üldise vähiriski vahel arvestatavat seost ei täheldanud. Küll aga leiti, et lühemad telomeerid võivad olla seotud seedetrakti kasvajate ning pea- ja kaelavähi kõrgenenud riskiga (Zhu jt., 2016).

Lisaks esineb telomeeri kaitsva kompleksi geenidel põhjuslik monogeenne seos mitme kasvajatüübiga. Aoude jt. uuringus kirjeldati *ACD* ja *TERF2IP* (alias *RAP1)* geenide variante, mis olid seotud melanoomiga. Ühtlasi esines perekondades, mis antud mutatsioone kandsid, ka teist tüüpi kasvajaid, näitena leukeemia ning munasarjavähk (Aoude jt., 2014). Sealjuures omavad *POT1* variandid seost angiosarkoomiga (Calvete jt., 2017).

1.3. Geneetilise assotsiatsiooni uuringud telomeeri pikkuse ja geneetiliste variantide vahel

1.3.1. Läbiviidud kandidaatgeenide põhiste uuringute tulemused

Käesolevas töös töötati läbi üheksa erinevat teaduspublikatsiooni, et leida telomeeri pikkusega seotud geene. Kõik tuvastatud geenid ning nende kirjeldused on leitavad töö tulemuste osas (ptk 3.1).

ACD geen kuulub telomeeride kaitsvasse kompleksi, kodeerides TPP1 valku. *GAR1, NHP2, NOP10* on aga telomeraasi kompleksi komponendid. *WRN* näol on tegemist helikaasiga, mis osaleb telomeeride replikatsioonis (Robles-Espinoza jt., 2015). Geen *ZBTB48* kodeerib valku TZAP, mis lühendab pikkasid telomeere. Sealjuures seondub TZAP valk telomeeridega iseseisvalt ja ei vaja selleks kaitsva kompleksi abi (Li jt., 2017). Geenid *BUB3* ja *BUB1* moodustavad ühise valgukompleksi BUB3-BUB1, mis on oluline telomeerse DNA replikatsiooni korral. Kompleksi puudumisel esinevad nõrgad ja lühikesed telomeerid (Li jt., 2018). TERB1, TERB2, MAJIN valgud moodustavad aga telomeerse meioosikompleksi (Shibuya jt., 2015). *PARN* geeni patogeenseid variante on seostatud lühikeste telomeeride sündroomidega, sealhulgas kopsufibroosiga (Newton jt., 2016).

Telomeeride pikkusega seotud analüüsidest tuvastati geenid *DDX11* ja *BICD1* (Vasa-Nicotera jt., 2005; Mangino jt., 2008). Autorite sõnul on *DDX11* tugev kandidaatgeen, mille lookusel on seos telomeeride pikkusega (Vasa-Nicotera jt., 2005). *BICD1* geenivariant rs2630578 G>C oli seotud 604 bp võrra lühemate telomeeridega (Mangino jt., 2008). Ühtlasi on täheldatud, et telomeraasi kompleksi kuuluva *TERT* geeni kaks üksiknukleotiidset polümorfismi (SNP) on seotud nii pikemate leukotsüütide telomeeridega kui ka kõrgenenud rinna- ja munasarjavähiriskiga (Bojesen jt., 2013). Koetüübipõhisest uuringust tuvastati aga kaks varianti, mis on seotud *STN1* (alias *OBFC1)* ning *ZNF257* geenidega ja mille korral mõjutatakse telomeeride pikkust erinevates inimkudedes (Demanelis jt., 2019).

1.3.2. Läbiviidud ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute tulemused

Telomeeride pikkusega seotud geenide leidmiseks koondati kokku 13 telomeeride pikkusega seotud ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute tulemused. Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuuringutes testitakse seost sagedaste geneetiliste variantide ehk SNP-de ning uuritava fenotüübi vahel. Käesolevas töös kirjeldatakse ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute põhjal 44 geeni ning 62 varianti, millel on leitud seos telomeeride pikkusega. Kõik tuvastatud geenid ja SNP-d on välja toodud lisas 1.

Telomeeride pikkusega esines kõige tugevam seos geenidel *TERC, TERT, OBFC1, RTEL1, CTC1, POT1* ja *TERF2*, mis omavad varasemalt teadaolevat rolli telomeeride bioloogiaga. Ühtlasi kirjeldati *TERC, OBFC1* ja *RTEL1* geenide variante erinevate ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute põhjal teiste kandidaatgeenidega võrreldes kõige rohkem. Enim variante oli *TERC* (n=8) geenis, mida kirjeldati kaheksas erinevas uuringus. Sealjuures esines rs1317082 A>G kahes erinevas ülegenoomses assotsiatsiooniuuringus, kinnitades selle võimalikku seost telomeeride pikkusega (Mangino jt., 2012; Pooley jt., 2013). *TERT* variant rs7705526 C>A leidis samuti kahekordset kinnitust (Delgado jt., 2018; Li jt., 2020). *OBFC1* varianti rs9419958 C>T kirjeldati aga kolmes ülegenoomses assotsiatsiooniuuringus (Levy jt., 2010; Mangino jt., 2012; Li jt., 2020) (tabel 1).

Codd jt. 2010. aasta uuringust selgus, et mõlemad tuvastatud SNP-d on seotud lühemate telomeeridega. Sealjuures leiti, et rs12696304 C>G minoorse alleeli (G) iga koopia oli seotud umbes 75 bp võrra lühemate telomeeridega. Mõlemad SNP-d asusid 3q26 lookuses, mis hõlmab ka *TERC* geeni. Ühtegi varianti ei tuvastatud *TERC* geeni kodeerimisjärjestusest, küll aga asub rs12696304 *TERC* geenist 1.5kb allavoolu. Autorid spekuleerisid, et *TERC* ekspressioon võib mainitud variantide seost telomeeride pikkusega mõjutada (Codd jt., 2010). 2013. aastal avaldatud uuringus kajastati samuti ühte *TERC* geeni SNP-i (Codd jt., 2013). Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring Bangladeshi täiskasvanutega kirjeldas aga *RTEL1* varianti rs2297439 T>G, mille minoorne alleel (G) on levinud Lõuna-Aasia populatsioonide seas, kuid esineb ka teistes populatsioonides, sealhulgas Põhja-Euroopas. *RTEL1, TERC* ja *TERT* geenides asuvad variandid olid kõik seotud lühemate telomeeridega (Delgado jt., 2018). Walsh jt. 2014. aastal avaldatud uuringutulemused kirjeldasid kahte varianti, mis olid seotud suurenenud glioomiriskiga ning mille riskialleelid on *TERC* ja *TERT* geenide läheduses tugevalt assotsieerunud pikemate leukotsüütide telomeeridega. Viimane viitab omakorda telomeraasi ekspressioonile gliomageneesis. Küll aga oli variandi rs6010620 G>A glioomi riskialleel (G) *RTEL1* geeni juures seotud lühenenud telomeeridega (Walsh jt., 2014). Lisaks on lühemate ning pikemate telomeeridega assotsieerunud *TERC* ja *OBFC1* geenide SNP-e kirjeldatud nii Levy jt. kui ka Pooley jt. avaldatud uuringutes (Levy jt., 2010; Pooley jt., 2013). *CTC1* variant assotsieerus lühemate telomeeride, aga ka *CTC1* geeni madalama ekspressiooniga (Mangino jt., 2012). *POT1* ja *TERF2* variandid tuvastati hiljutisest ülegenoomsest assotsiatsiooniuuringust (Li jt., 2020) (tabel 1).

Tabel 1. Geenid ja variandid, mida on telomeeride pikkusega kõige rohkem seostatud.

Geen	Variant	Allikas
TERC	rs12696304	Codd jt., 2010
	rs16847897	Codd jt., 2010
	rs3772190	Levy jt., 2010
	rs1317082	Mangino jt., 2012; Pooley jt., 2013
	rs10936599	Codd jt., 2013
	rs1920116	Walsh jt., 2014
	rs12638862	Delgado jt., 2018
	rs10936600	Li jt., 2020
OBFC1	rs9420907	Codd jt., 2013
	rs9419958	Levy jt., 2010; Mangino jt., 2012; Li jt., 2020
	rs4387287	Levy jt., 2010
	rs2487999	Pooley jt., 2013
RTEL1	rs6010620	Walsh jt., 2014
	rs2297439	Delgado jt., 2018
	rs75691080	Li jt., 2020
TERT	rs2736100	Codd jt., 2013
	rs7705526	Delgado jt., 2018; Li jt., 2020
CTC1	rs3027234	Mangino jt., 2012
POT1	rs59294613	Li jt., 2020
TERF2	rs3785074	Li jt., 2020

Lisaks on geenides *ACYP2, DCAF4, NAF1, PARP1* ja *PIK3C3* tuvastatud kaks varianti, mis näitasid assotsiatsiooni telomeeride pikkusega (lisa 1). *ACYP2* geen esineb kahes uuringus, sealjuures on üks variant seotud lühemate ning teine pikemate telomeeridega (Codd jt., 2013; Pooley jt., 2013). *DCAF4* geenis oleva variandi minoorne alleel (A) assotsieerus nii lühemate leukotsüütide telomeeridega kui ka vähenenud *DCAF4* ekspressiooniga päikesele eksponeeritud nahas ja lümfoblastoidrakkudes (Mangino jt., 2015). *NAF1* geeni variandi minoorne alleel (A) tõi aga kaasa 89,7 bp võrra lühemad telomeerid (Codd jt., 2013). *DCAF4* ja *NAF1* geenide varieeruvust on kirjeldatud ka Li jt. 2020. aastal avaldatud ülegenoomses assotsiatsiooniuuringus (Li jt., 2020). 18q12.2 lookuses esinevad kaks varianti asusid *PIKC3C* geeniga samas regioonis. Mõlema variandi peamised alleelid olid seotud üle 100 bp võrra lühemate telomeeridega (Mangino jt., 2009) (lisa 1).

Ülejäänud uuringusse kaasatud geenides esines üks variant, mis omas assotsiatsiooni telomeeride pikkusega (lisa 1). Lisaks mainitule täheldasid Levy jt. seost kõnealuse fenotüübiga järgmiste geenide variantidel: *CCBE1, CCDC93, CNTNAP5, DDX18, PODXL* (Levy jt., 2010). *DHX35, KPNA5, PELI2* ja *WDR65* variandid omasid assotsiatsiooni pikemate telomeeridega

kõikides uuritavates populatsioonides. Sealjuures täheldati, et *PELI2* variant oli seotud märkimisväärselt väiksema põievähiriskiga. Antud nähtus oli tingitud pikematest telomeeridest (Gu jt., 2011). Täiendavalt on kirjeldatud seost antud fenotüübiga *ZNF676, PXK, ZNF311, BCL2L1, ASCC2, DKK2, SYT16, TMPRSS7, TRDMT1* ja *TSHZ2* geenide SNP-e korral (Mangino jt., 2012; Pooley jt., 2013; Lee jt., 2014). Ühtlasi leiti, et kõnealuse fenotüübiga seotud varieeruvus esineb geenides *NCR2, ONECUT1* ja *PRR20A* (Delgado jt., 2018). Uuringus afroameerika laste ja noorukitega selgusid *CABLES1*, *TTC37* ning *LRFN5* geenide variandid (Zeiger jt., 2018). Hiljutine ülegenoomne assotsiatsiooniuuring kirjeldas lisaks mainitule järgnevaid geenilookuseid, mis omasid seost telomeeri pikkusega: *SENP7, MOB1B, CARMIL1, RFWD3, ATM, MPHOSPH6, ZNF208.* Ühtlasi pakuti välja, et geneetiliselt lühemad telomeerid on seotud suurema kilpnäärmevähi ja lümfoomiriskiga (Li jt., 2020) (lisa 1).

1.4. Meeste viljatus

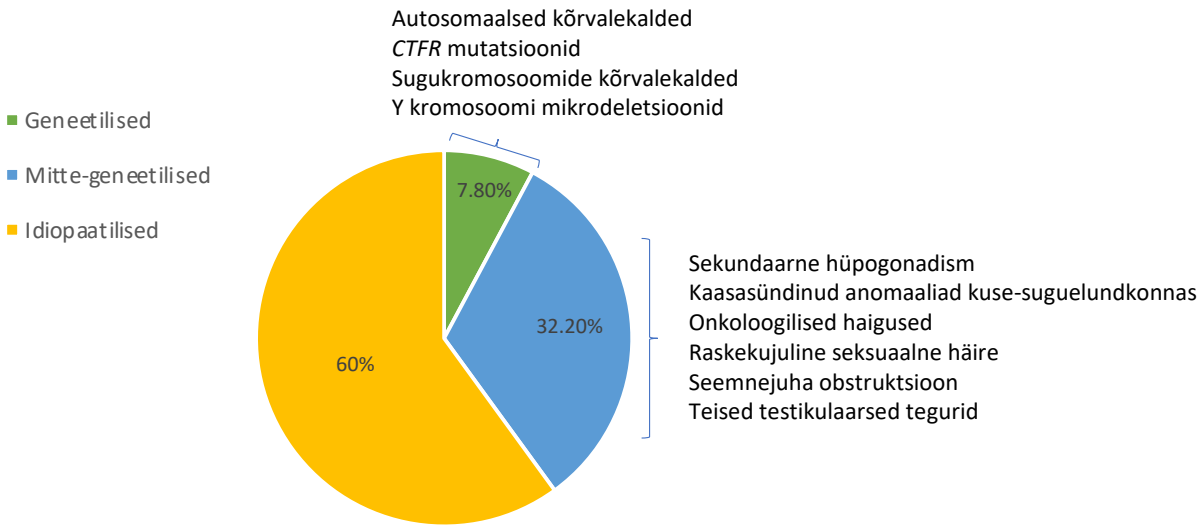
1.4.1. Meeste viljatuse põhjused, fenotüübiline varieeruvus ja levimus

Viljatus on reproduktiivsüsteemi haigus, mille korral ei ole võimalik rasestuda vähemalt 12 kuu jooksul hoolimata regulaarsest kaitsmata seksuaalvahekorrast (WHO, 2020). Globaalselt esineb viljatus 8-12% paaridel. Sealjuures on umbes 50%-l juhtudest peamine või soodustav faktor mehepoolne (Agarwal jt., 2021). Meeste viljatus esineb umbes 7% meessoost elanikkonnast ning seda võivad põhjustada nii kaasasündinud, omandatud kui ka idiopaatilised tegurid (Krausz ja Riera-Escamilla, 2018; Agarwal jt., 2021).

Kaasasündinud tegurite hulka kuuluvad mitmesugused geneetilised ja kromosomaalsed häired, aga ka füsioloogilised erisused (Agarwal jt., 2021). Krüptorhism ehk munandite laskumatus on üks meeste viljatuse riskitegureid (Loebenstein jt., 2020). Kaasasündinud seemnejuha puudulikkusega mehed on peamiselt azoospermikud (Mieusset jt., 2020). Meeste viljatus esineb ka Klinefelteri sündroomi ning Robertsoni translokatsiooni korral (Franik jt., 2018; Sobotka jt., 2015). Omandatud meeste viljatuse tegurite hulka kuuluvad mitmesugused haigused, infektsioonid ning väliskeskkonna mõjutused (Agarwal jt., 2021). Varikotseele näol on tegemist ebanormaalselt laienenud seemneväädi veenidega, mis mõjutab sperma kvaliteeti ning pärsib seemnerakkude funktsiooni (Jensen jt., 2017). Bakteriaalne krooniline prostatiit omab samuti kahjulikku toimet erinevatele spermanäitajatele, mõjutades spermi kontsentratsiooni, elujõulisust ning liikuvust (Condorelli jt., 2017). Munandid on ühed tundlikumad organid vähiravis kasutatava kiiritusravi suhtes. Lisaks on enamik kemoterapeutilisi ravimeid sugunäärmetele toksilised, mõjutades spermatogeneesi ning tuues kaasa kromosomaalseid kõrvalekaldeid (Okada ja Fujisawa, 2019). Meeste viljatus võib olla ka idiopaatiline ehk selle otsene põhjus ei ole teada (Punab jt., 2017). Küll aga on täheldatud, et viljatutel meestel esineb

märkimisväärselt madalam spermakvaliteet, mis on tingitud ülekaalulisusest ja rasvumisest. Ühtlasi leiti, et alkoholi tarbimine võib samuti mõjutada meeste viljakust, olles seotud vähenenud seemnerakkude arvuga ning madalama sperma kontsentratsiooniga (Ehala-Aleksejev, 2019).

Normaalse spermatogeneesiga indiviididel esineb ejakulaadis üle 39 miljoni spermi (WHO, 2010). Sellest madalamate väärtuste korral on tegu spermatogeneesihäiretega, nagu oligo-, krüpto ja azoospermia. Oligozoospermia esineb, kui on alla 39 miljoni spermi ejakulaadis. Krüptozoospermia korral puuduvad spermatosoidid värsketes spermaproovides, kuid esinevad tsentrifuugitud preparaatides. Azoospermia korral ejakulaadis seemnerakke ei leidu (WHO, 2010). Azoospermia, krüptozoospermia ning oligozoospermia moodustavad enamuse meeste viljatusjuhtumitest. Pikaajalised uuringud 1737 viljatu Eesti mehega näitasid, et 67% neist esines oligozoospermia, 22% azoospermia ning 7% krüptozoospermia. Sealjuures täheldati, et 75% kõikidest oligozoospermia juhtumitest olid tingitud idiopaatilisest teguritest. Ühtlasi näitasid tulemused, et 7,8% kõikidest viljatusjuhtumitest omasid geneetilist, 32,2% mitte-geneetilist ning 60% idiopaatilist põhjust (joonis 4). Võrreldes kontrollgrupiga oli suurem osa viljatutest meestest ülekaalulised või rasvunud, lisaks esinesid neil kõrgemad folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja luteiniseeriva hormooni (LH) tasemed (Punab jt., 2017).



Joonis 4. Meeste viljatuse geneetiliste, mitte-geneetilise ja idiopaatilise põhjuste protsentuaalsed osakaalud ning põhjused Eesti viljatute meessoost patsientide seas (n=1737) (joonis põhineb Punab jt., 2017 andmetel).

1.4.2. Azoospermia erinevad vormid ja nende geneetilised põhjused

Azoospermia on meeste viljatuse kõige raskem vorm, mis esineb umbes 1% meessoost elanikkonnast (Kasak ja Laan, 2021). Punab jt. uuringust viljatute Eesti meestega selgus, et umbes 17% azoospermia juhtumitest olid idiopaatilised. Enamus diagnoositud põhjuslikest faktoritest moodustasid mitte-geneetilised tegurid, nagu sekundaarne hüpogonadism ning seemnejuha obstruktsioon. Geneetilised põhjused esinesid aga umbes 26% azoospermiat põdevatest patsientidest, millest enamuse moodustasid sugukromosoomide kõrvalekalded (joonis 5) (Punab jt., 2017).

Joonis 5. Azoospermia geneetilised põhjused Eesti viljatute meessoost patsientide seas (n=388) ning nende protsentuaalsed osakaalud (joonis põhineb Punab jt., 2017 andmetel).

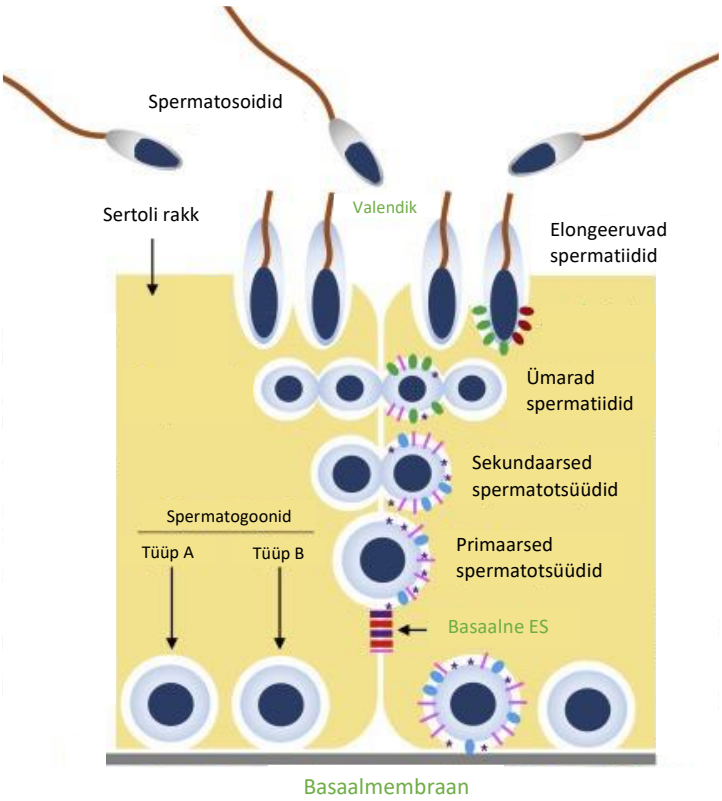
Obstruktiivse azoospermia korral esineb meessuguelundites obstruktsioon, mis võib olla tingitud nii geneetilistest häiretest kui ka elu jooksul kogetud infektsioonidest, traumadest ning düsplaasiatest (Feng jt., 2019; Han jt., 2016). Obstruktiivse azoospermiaga on seotud *CFTR* geen, mille mutatsioonid võivad põhjustada kaasasündinud uni-/bilateraalset seemnejuha puudulikkust (Feng jt., 2019). Mitte-obstruktiivne azoospermia (MOA) on tingitud spermatogeneesihäiretest (Kasak ja Laan, 2021). Sealjuures eristatakse kahte MOA vormi – eel-testikulaarne ning testikulaarne. Eel-testikulaarne azoospermia on seotud hormonaalsete häiretega, nagu hüpogonadotroopne hüpogonadism. Testikulaarse vormi korral esineb probleem munandites, mis pole võimelised tootma normaalseid sperme (Jarvi jt., 2015). Ühtlasi võivad spermatogeneesi häireid põhjustada nii Y-kromosoomi mikrodeletsioonid kui ka spetsiifiliste sündroomide geneetilised iseärasused, sealhulgas Klinefelteri sündroom (Kohn jt., 2019; Zitzmann jt., 2021). Klinefelteri sündroom on levinuim meeste viljatusega seotud kromosomaalne kõrvalekalle, mille korral esineb patsiendil 47,XXY karüotüüp. Sellekõrval iseloomustavad kõnealust sündroomi azoospermia, hüpergonadotroopne hüpogonadism ning väikesed munandid. Klinefelteri sündroomi levimus vastsündinud poisslaste seas on 0,1-0,2% (Zitzmann jt., 2021).

Ehkki MOA monogeensete põhjuste kohta on hetkel veel vähe teada, on kirjanduse ning erinevate andmebaaside abil tuvastatud geenid, millel esineb kindel seos kõnealuse viljatustüübiga. Sealjuures eristatakse kahte MOA vormi: isoleeritud ning sündroomne. Esimese korral muid suuri tervisega seotud probleeme ei esine, teist vormi iseloomustavad aga mitmed samaaegsed kliinilised sümptomid. Isoleeritud MOA-ga on seotud geenid *FANCM, MEI1, MEIOB, STAG3, TEX11, TEX14, TEX15*. Sündroomset vormi mõjutavad aga *NR5A1, SETX* ja *WT1* (Kasak ja Laan, 2021). Näitena on kaks *FANCM* varianti tuvastatud Eesti vendade täiseksoomi sekveneerimisel (Kasak jt., 2018). MOA diagnoosiga meeste seas on leitud *TERB1* ja *MAJIN* geenide harvad variandid, mis on seotud telomeerse meiootilise kompleksiga (TERB1-TERB2-MAJIN) (Salas-Huetos jt., 2021; Shibuya jt., 2015). Katsetes hiirtega on näidatud, et kõigi kolme valgu häirete või puudumise korral esineb nii emastel kui ka isastel hiirtel viljatus (Shibuya jt., 2014; Shibuya jt., 2015). Seega on võimalik, et meiootilisse kompleksi kuuluvate geenide variandid omavad põhjuslikku seost MOA-ga (Salas-Huetos jt., 2021).

1.5. Telomeeri pikkuse dünaamika spermatogeneesis

1.5.1. Dünaamika ja selle mõjufaktorid

Spermatogenees on kolmeetapiline protsess, kus eristatakse mitootilist, meiootilist ning spermiogeneesi staadiumit. Spermatogenees toimub imetajate munandite väänilistes seemnetorukestes ning selle tulemusel valmivad küpsed seemnerakud (joonis 6) (Nishimura ja L'Hernault, 2017). Normaalse spermatogeneesi tagamiseks on olulised testosteroon ning kaks gonadotropiini – LH ning FSH (Oduwole jt., 2018). Seemnerakkude küpsemise protsess kestab umbes 74-120 päeva (Amir jt., 2019).



Joonis 6. Imetajate spermatogenees Sertoli rakkude vahel. Munandite vääniliste torukeste epiteeli basaalmembraan koosneb diferentseerumata spermatogoonidest ehk algseemnerakkudest (tüüp A spermatogoonid) ning tüüp B spermatogoonidest. Proliferatiivses faasis läbivad spermatogoonid mitmeid mitootilisi jagunemisi. Seejärel diferentseeruvad B-tüüpi algseemnerakud primaarseteks spermatotsüütideks, mis läbivad basaalse ektoplasmaatilise spetsialiseerituse (ES). Meiootilises faasis toimub primaarsete spermatotsüütide esimene meiootiline jagunemine, mille tulemusel tekivad sekundaarsed spermatotsüüdid. Teise meioosi järel saavad sekundaarsetest spermatotsüütidest haploidsed, ümarad spermatiidid. Spermiogeneesis toimub spermatiidide muutumine küpseteks sugurakkudeks ehk spermideks. Sealjuures leiab aset mitu morfoloogilist muutust, näitena viburi moodustumine. Spermiogeneesis tekkinud spermatosoidid liiguvad edasi valendikku (kohandatud, Nishimura ja L'Hernault, 2017).

Erinevalt somaatilistest rakkudest ei lühene imetajate spermide telomeerid, vaid pikenevad vanuse kõrgenedes (Allsopp jt., 1992; Ramos-Ibeas jt., 2019). Sealjuures on täheldatud, et vanematel meestel esinevad pikemad spermide telomeerid kui noorematel. Antunes jt. läbi viidud uuringute põhjal võib väita, et üksikute spermide telomeeride pikkus varieerub indiviiditi märkimisväärselt. Sealjuures kirjeldati, et 35-aastastel ja vanematel meestel olid pikemad spermide telomeerid kui alla 35-aastastel. Ühtlasi leiti, et vanematel meesterahvastel esines spermi telomeeri pikkuse suhtes suurem varieeruvus (Antunes jt., 2015). Vanemate meeste järglastel on omakorda pikemad telomeerid. Sealjuures on võimalik, et isa vanus viljastamise ajal aitab säilitada sobivat telomeeri pikkust mitme põlvkonna lõikes (Horvath jt., 2019). Munaraku kehavälise viljastamise uuringutest on selgunud, et spermi telomeeri pikkus

on korrelatsioonis embrüo kvaliteediga ning *in vitro* viljastamisprotseduuride positiivsete tulemustega (Yang jt., 2015). Samas pole liiga pikkade või lühikeste telomeeridega spermid võimelised tagama normaalset ja elujõulist rasedust (Cariati jt., 2016).

Küll aga ei ole täpselt teada, kuidas spermide telomeeride elongatsioon toimub (Amir jt., 2019). Imetajate seemnerakkude telomeerid on teiste spermatogeensete rakkudega võrreldes kõige pikemad, ehkki telomeraasi küpsetes seemnerakkudes ei ekspresseerita. Ühtlasi väheneb telomeraasi ekspressioon järk-järgult, olles kõrgeim spermatogoonides (Achi jt., 2000). Pikaajalised katsed hiirtega lubavad aga spekuleerida, et spermide telomeeride pikenemine vanuse kõrgenedes allub erinevatele mehhanismidele. Sealjuures on võimalik, et meiootilistes ja postmeiootilistes spermatogeensetes rakkudes esineb alternatiivne telomeeride pikenemine. Ühtlasi pakutakse välja, et vanemate meeste munandites jäävad ellu need algseemnerakud, millel on pikemad telomeerid ja mis omakorda annavad aluse küpsete spermide telomeeride pikkusele (Ramos-Ibeas jt., 2019)

1.5.2. Telomeeri pikkus viljatute meeste spermides

Spermi telomeeri pikkus on uurimisteema, mille kohta ei ole veel palju teada. Küll aga pakuvad hiljutised uuringud võimalikke teooriaid meeste reproduktiivsüsteemi erinevate aspektide kohta. Rocca jt. 2016. aastal avaldatud uuringutulemustest selgus, et spermi telomeeri pikkus on seotud seemnevedeliku standardsete kvaliteedinäitajatega. Antud uuringus oli vaatluse all 100 meest, kellel esinesid normaalsed spermaparameetrid. Leiti, et spermi telomeeri pikkus on positiivses korrelatsioonis seemneraku progresseeruva liikuvuse, elujõu ning protamineerumisega. Küll aga esines negatiivne seos DNA fragmentatsiooniga. Sealjuures spekuleeriti, et spermi telomeeri pikkus ning seemneraku liikuvus ja elujõulisus võivad tugineda spermi DNA terviklikkusele. Ühtlasi pakuti välja, et spermi telomeeri pikkust on võimalik kasutada spermatogeneesi häirete markerina (Rocca jt., 2016).

Darmishonnejad jt. uurisid 38 viljatut ja 19 viljakat meest, kelle vanus jäi vahemikku 20 kuni 50 aastat. Selgus, et viljatutel indiviididel esines spermi kontsentratsiooni ja liikuvuse vähenemine. Küll aga oli märkimisväärselt tõusnud ebanormaalse morfoloogiaga seemnerakkude arv. Spermi telomeeri pikkuse ning sperma kontsentratsiooni, DNA fragmentatsiooni ja lipiidide peroksüdatsiooni vahel esines märkimisväärne seos. Lisaks täheldati, et viljatutel meestel olid lühemad telomeerid nii spermides kui ka leukotsüütides (Darmishonnejad jt., 2020). Sarnaseid korrelatsioone kirjeldasid ka Tahamtan jt., kelle uuringus osalesid viljatud varikotseelega mehed. Selgus, et telomeeri pikkust mõjutab ka varikotseele

staadium. Sealhulgas toodi välja, et kõrge lipiidide peroksüdatsiooni tase on seotud lühemate spermi telomeeridega. Lipiidide peroksüdatsioon ja DNA fragmentatsioon on aga oksüdatiivsele stressile iseloomulikud markerid (Tahamtan jt., 2019). Seega võib seemnerakkude suurenenud oksüdatiivse stressi tase olla seotud lühenenud telomeeridega (Darmishonnejad jt., 2020). Ühtlasi on võimalik, et lühenenud telomeeride tõttu väheneb spermide kromatiinne terviklikkus (Tahamtan jt., 2019).

1.6. Geenivariantide patogeensuse hindamise meetodid

Geenivariantide patogeensust hinnatakse standardreeglite alusel, mille toetamiseks on loodud nii andmebaase kui ka automaatseid programme. ACMG *(the American College of Medical Genetics and Genomics)* ja AMP *(the Association for Molecular Pathology)* 2015. aastal välja antud juhendis kirjeldatakse geenivariantide klassifitseerimise ajakohastatud standardeid. Selleks kasutatakse ekspertarvamuse ja empiiriliste andmete põhjal esitatud kriteeriume. Klassifitseerimisel eristatakse viietasemelist terminoloogiasüsteemi: „patogeenne“, „tõenäoliselt patogeenne“, „ebaselge tähendusega“, „tõenäoliselt healoomuline“ ja „healoomuline“. Sealjuures on antud süsteem kohandatud kõikidele Mendeliaalse pärilikkusega geenide variantidele. Ühtlasi eristatakse kahte kriteeriumite komplekti, millest esimene on patogeensete või tõenäoliselt patogeensete variantide klassifitseerimiseks. Iga patogeenne kriteerium võib olla kas väga tugev (PVS1), tugev (PS1-4), mõõdukas (PM1-6) või toetav (PP1-5). Teist komplekti kasutatakse aga healoomuliste või tõenäoliselt healoomuliste variantide liigitamiseks. Iga healoomuline kriteerium võib sealjuures olla eraldiseisev (BA1), tugev (BS1-4) või toetav (BP1-6) (Richards jt., 2015). ACMG ja AMP juhendid põhinevad kokku 28 kriteeriumil. Küll aga võib individuaalsete interpretatsioonide varieeruvus olla suur, kuna variantide tõlgendusteks puuduvad standardalgortimid ning iga kasutaja võib juhistest omamoodi aru saada. Antud probleemide lahendamiseks töötati välja InterVar (Li ja Wang, 2017).

InterVar tööriist aitab tõlgendada variantide kliinilist olulisust, mis koosneb peamiselt kahest suuremast etapist. Esmalt geneeritakse 18 kriteeriumi alusel automatiseeritud variantide tõlgendus. Selleks kasutab InterVar annoteerimise tarkvara (näitena ANNOVAR-i) ning täiendab saadud tulemit InterVar-i sisemise annoteerimise tarkvaraga. Ülejäänud 10 kriteeriumit vajavad manuaalset kasutajapoolset sisestust. Ühtlasi kontrollitakse lõpliku interpretatsiooni saamiseks saadud tulem käsitsi üle (Li ja Wang, 2017).

VarSome on otsingumootor, mida on võimalik kasutada inimese geenivariantide leidmiseks ning tõlgendamiseks. Andmed pärinevad 30 erinevast andmebaasist. Informatsiooni on

võimalik leida nii geenide kui ka variantide kohta. Sealjuures saavad kasutajad ise märkida, mis klassifikatsiooni variant kuulub (Kopanos jt., 2019). Sarnaselt VarSome-ile on ka Franklin veebipõhine otsingumootor, mida on võimalik kasutada inimese geenivariantide leidmiseks ning tõlgendamiseks. Franklin on välja töötatud Genoox tehnoloogiafirma poolt, mis tõlgendab variantide patogeensust vastavalt ACMG kriteeriumitele (franklin.genoox.com).

ClinVar-i näol on tegemist avaliku arhiiviga inimese geneetilistest variantidest ning nende tõlgendustest erinevate haiguste kontekstis. Variantide interpretatsioonid pärinevad nii kliiniliste testide laboritelt kui ka uurimislaboritelt ning arstidelt, patsiendiregistritelt, ekspertpaneelidelt ja muudelt organisatsioonidelt. Iga esitatud kirje koosneb tõlgendatud variandi või variantide komplekti kirjeldusest. Lisaks on juurde märgitud seisund, mille korral varianti interpreteeriti. Ühtlasi sisaldab kirje variandi kliinilise olulisuse interpretatsiooni ning esitaja tõendit antud interpretatsiooni kohta. Sisestatud variantide tõlgendused liidetakse ning tehakse kättesaadavaks ClinVar-i veebisaidil (Landrum jt., 2020).

2. UURIMUS

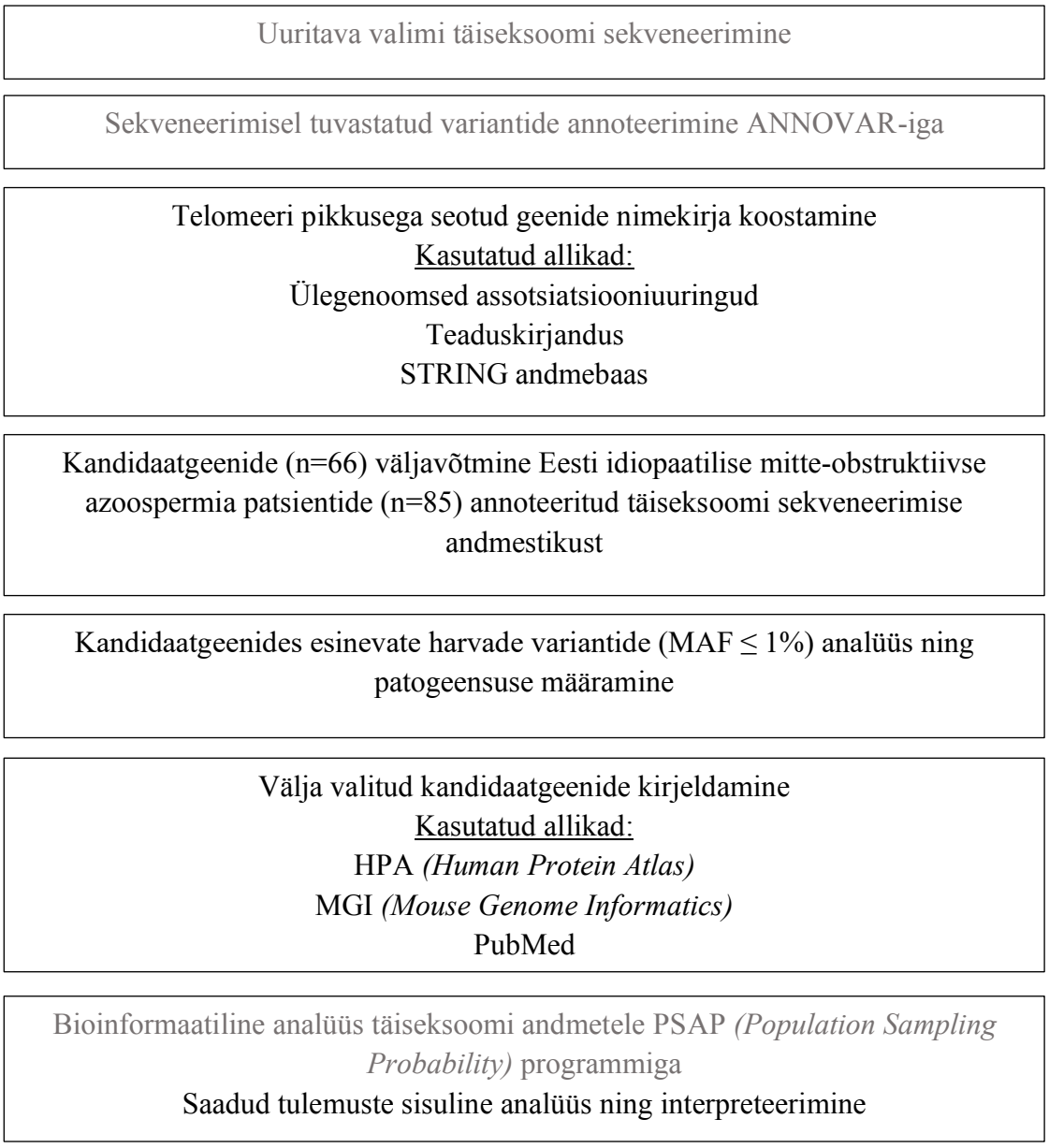
2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks oli:

1) teaduskirjanduse ning teaduslike andmebaaside alusel telomeeri pikkust mõjutavate kandidaatgeenide nimekirja koostamine;
2) Eesti idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermia patsientide täiseksoomi sekveneerimise andmestikust, mis koosnes 85 indiviidist, telomeeri pikkust mõjutavate kandidaatgeenide harvade variantide tuvastamine ning nende võimaliku patogeensuse hindamine;
3) leitud geenivariantide analüüsimine erinevate teabeallikate kontekstis testimaks hüpoteesi nende põhjuslikust seosest idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermiaga.

2.2. Töö ülesehitus

Joonis 7 annab ülevaate käesoleva uurimuse ülesehitusest ja teostatud analüüsidest.



Joonis 7. Käesoleva uurimuse ülesehitus. Halliga on märgitud etapid, mida töö autor ise ei teostanud. Täiseksoomi sekveneerimise andmed pärinevad Washingtoni Ülikooli McDonnell Genoomi instituudist. Sekveneerimisel tuvastatud variandid annoteeriti ANNOVAR-iga *(ANNOtate VARiation)* teadur L. Kasak poolt. Bioinformaatiline analüüs täiseksoomi andmetele PSAP programmiga teostas dr. L. Nagirnaja (Oregon Health & Science University, Portland, USA). Telomeeri pikkusega seotud kandidaatgeenide nimekirja koostamine, kandidaatgeenide väljavõtmine ning kirjeldamine ja täiseksoomi andmete sisuline analüüs ning interpreteerimine teostati töö autori poolt.

2.3. Materjalid ja metoodika

2.3.1. Eetikakommitee luba

Tartu Ülikooli inimuuringute eetika kommitee poolt välja antud heakskiit 74/54 (viimane muudatusettepanek 288/M-13). Kõik uuritavad on andnud informeeritud nõusoleku geneetiliste uuringute läbiviimiseks, mille eesmärk on selgitada viljatuse molekulaarseid põhjuseid.

2.3.2. Uuritav kliiniline valim

Uurimistöö viidi läbi koostöös prof. Margus Punabiga ja SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Meestekliinikuga. Kõik uuritavad olid kaasatud ja kliiniliselt fenotüpiseeritud SA TÜK Meestekliiniku androloogide poolt vastavalt rahvusvahelistele mehepoolse viljatuse käsitluse juhistele (Jungwirth jt., 2018). Antud uurimus põhineb 85 idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermia diagnoosiga mehe valimil, kes kõik on pärit Eestist. Nendest 77 juhul oli määratud ka kliinilises käsitluses karüotüüp, mis oli kõigil 46,XY. Analüüsitud indiviidide kliiniliste androloogiliste parameetrite mediaanväärtused olid järgmised:

1) vanus 33.3 aastat;
2) kehamassiindeks (KMI) 25.6 (põhineb 76 indiviidi andmetel);
3) folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) tase vereseerumis 21.7 IU/L;
4) luteiniseeriva hormooni (LH) tase vereseerumis 6.8 IU/L;
5) testosterooni tase vereseerumis 15.2 nmol/L;
6) parema munandi maht 15.0 ml;
7) vasaku munandi maht 16.0 ml;
8) spermide arv ejakulaadis 0.

Uurimistöös kasutatud genoomne DNA eraldati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi inimese geneetika uurimisrühmas ja säilitati SA TÜK Meestekliinikuga ühises biopangas -80°C sügavkülmikus.

2.3.3. Eksoomi sekveneerimise andmed

Uuritava valimi täiseksoomide sekveneerimine leidis aset Washingtoni Ülikooli McDonnell Genoomi instituudis St. Louis'es, Missouri osariigis, Ameerika Ühendriikides (genome.wustl.edu) GEMINI *(GEnetics of Male INfertility Initative)* projekti raames (gemini.conradlab.org). GEMINI koosneb 20 erinevast androloogia uuringute keskusest üheksas riigis. Nende seas on ka Tartu Ülikool (Prof. Maris Laane uurimisgrupp) ning Tartu Ülikooli Kliinikum (Prof. Margus Punab). Projekti pikaajaliste eesmärkide hulka kuulub

muuhulgas nii võrgustiku kui ka teadushuvi laiendamine teistele meeste, aga naiste viljatuse fenotüüpidele.

Täiseksoomide sekveneerimiseks kasutati *in-house* eksoomi sihtmärgistamist Illumina HiSeq 4000-ga. Keskmiselt 99.9% lugemitest joondus sihtmärkregioonidega, moodustades 80x katvuse sekveneeritud indiviidide ning platvormide lõikes. Algseid järjestuste lugemeid töödeldi ning joondati hg38 referentsgenoomile, kasutades selleks bwa-mem v0.7.1768, GATK *(Genome Analysis Toolkit)* v3.6.069 ja Picard tööriista v2.10.0 (broadinstitute.github.io/picard/). Kõikide proovide ühine genotüpiseerimine viidi läbi GATK vahendite abil, saavutades 99% täpsuse SNV-de ehk ühenukleotiidsete variantide korral ning 91% täpsuse indelite puhul (Nagirnaja jt., 2021, avaldamisele saadetud teadusartikkel). Sekveneerimisel tuvastatud variandid annoteeriti ANNOVAR-iga (*ANNOtate VARiation*) (annovar.openbioinformatics.org) (teostatud teadur L. Kasak poolt).

2.3.4. Uurimistöös kasutatud andmebaasid

Uurimistöös kasutati erinevaid andmebaase ja programme, mille kirjeldused ja veebilehekülgede aadressid on tabelis 2.

Tabel 2. Uurimistöös kasutatud andmebaaside ja programmide lühikirjeldused ning veebileheküljed.

Andmebaas/programm	Kirjeldus	Veebilehekülg
ClinVar	Avalik arhiiv inimese geneetilistest variantidest ning nende tõlgendustest erinevate haiguste kontekstis.	www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
DOMINO	Tööriist, millega on võimalik hinnata dominantsete muutuste tõenäosust geenides.	wwwfbm.unil.ch/domino/index.html
Franklin	Veebipõhine otsingumootor, mida on võimalik kasutada inimeste geenivariantide leidmiseks ning tõlgendamiseks. Põhineb ACMG klassifikatsioonikriteeriumitel.	franklin.genoox.com
gnomAD	Koondandmebaas, kuhu on integreeritud genoomide/eksoomide sekveneerimisandmed mitmetest suuremahulistest järjestusprojektidest.	gnomad.broadinstitute.org
GWAS (ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute) kataloog	Andmebaas, kuhu on koondatud erinevatest ülegenoomsetest assotsiatsiooniuuringutest tuvastatud SNP-d ning nendega seotud tunnused.	www.ebi.ac.uk/gwas/home
HPA *(Human Protein Atlas)*	Andmebaas, millega on võimalik leida informatsiooni geenide valgueksprессiooni kohta, seda nii üksikute rakkude tasandil kui ka erinevate kudede, vere ja patoloogiate korral.	www.proteinatlas.org
IGV *(Integrative Genomics Viewer)*	Interaktiivne genoomibrauser, millega on võimalik visualiseerida erinevaid genoomiandmeid.	software.broadinstitute.org/software/igv/
InterVar	Tööriist, mis aitab tõlgendada geneetiliste variantide kliinilist olulisust. Põhineb ACMG klassifikatsioonikriteeriumitel.	wintervar.wglab.org
MGI *(Mouse Genome Informatics)*	Rahvusvaheline laborihiirte andmebaas, kus on kirjeldatud geneetiliste mutatsioonidega laborihiirte fenotüübid.	www.informatics.jax.org
NCBI *(National Center for Biotechnology Information)*	Andmebaas, mis koondab biotehnoloogia- ja meditsiiniga seotud andmebaase.	www.ncbi.nlm.nih.gov
PubMed	Andmebaas, millega on võimalik leida teadustekste meditsiini- ja loodusteaduste vallas.	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
STRING	Andmebaas, millega on võimalik leida informatsiooni nii teadaolevate kui ka prognoositavate valkude vaheliste interaktsioonide kohta.	string-db.org
UCSC *(University of California Santa Cruz)* genoomibrauser	Annab ligipääsu erinevate liikide genoomijärjestuse andmetele. Ühtlasi saab uurida erinevatel inimese referentsgenoomidel põhinevaid järjestusi.	genome.ucsc.edu
Varsome	Veebipõhine otsingumootor, mida on võimalik kasutada inimeste geenivariantide leidmiseks ning tõlgendamiseks. Põhineb ACMG klassifikatsioonikriteeriumitel.	varsome.com

2.3.5. Käesolevas töös analüüsitavad kandidaatgeenid

2.3.5.1. Uuritavate geenide valiku kriteeriumid

Uuritavateks kandidaatgeenideks valiti 66 geeni, mis:

1) omasid 13 ülegenoomse assotsiatsiooniuuringu põhjal seost telomeeri pikkusega (n=44);
2) kuulusid teaduskirjanduse põhjal telomeeri kaitsvasse valgukompleksi, telomeraasi komponentide hulka või mõjutasid telomeere erinevate rakuprotsesside näol (n=15);
3) omasid sidet telomeeridega seotud valkudega STRING andmebaasi põhjal (n=7).

2.3.5.2. Kandidaatgeenides esinevate variantide filtreerimine

Andmetest selekteeriti variandid järgnevate parameetrite põhjal:

1) asusid eksonites või ekson-intron piiril;
2) olid mitte-sünonüümsed või funktsioonikaoga variandid;
3) asusid DOMINO andmebaasist lähtudes dominantsetes või dominantsete-retsesiivsete piiril olevates geenides. Uuringusse kaasati ka retsessiivsete geenide variandid, kui ühes geenis esines mitu varianti;
    a. DOMINO andmed ei kehtinud X-liiteliste geenide korral;
4) olid harvad (minoorse alleeli esinemissagedus gnomAD v2.1.1 andmebaasis ≤1%) või uued variandid ehk ei esinenud gnomAD andmebaasis.

2.3.5.3. Geenivariantide patogeensuse hindamine

Geenivariantide patogeensuse hindamiseks võeti vaatluse alla variandid, millel olid annotatsioonifailis CLINSIG (ClinVar) (v20200316) ning InterVar (v20180118) hinnangud: „tõenäoliselt patogeenne“, „patogeenne“ või „ebaselge tähendusega“. Variandid, mille hinnanguks oli „tõenäoliselt healoomuline“ või „healoomuline“, jäid edasisest uuringust välja. Patogeensuse hindamisel lähtuti ACMG juhistest (Richards jt., 2015) (kirjanduse ülevaade ptk 1.6) ning toetuti lisaks kahele andmebaasile, Franklin (franklin.genoox.com) ja Varsome (Kopanos jt., 2019). Ühtlasi tehti tuvastatud variantidele käsitsi väljavõte ClinVar (Landrum jt., 2020) andmebaasist, et leida kõige hiljutisemad hinnangud.

2.3.6. Selekteeritud kandidaatgeenide kirjeldamine ja variantide kontrollimine

Välja valitud kandidaatgeene kirjeldati HPA, MGI ning PubMed andmebaaside (tabel 2, ptk 2.3.4.) abil:

1) HPA andmebaasist otsiti informatsiooni RNA ja valgueksрessiooni kohta meestele omastes kudedes (seemnejuha, munandid, munandimanus, seemnepõieke, eesnääre);
2) MGI andmebaasist uuriti, kas otsitav geen on ekspresseeritud hiirte reproduktiivsüsteemis ning milline on selle seos reproduktiivsüsteemi fenotüübiliste iseärasustega;
3) PubMed andmebaasist koguti informatsiooni erinevatest meeste reproduktiivsüsteemi ning viljatusega seotud teaduspublikatsioonidest.

Kandidaatgeenide variandid kontrolliti üle IGV programmiga (tabel 2, ptk 2.3.4.). Variandid põhinesid hg19 referentsgenoomil. UCSC genoomibrauserit kasutati järjestuste koordinaatide ümbertõlgendamiseks hg38 referentsgenoomi parameetritele, kuna patsientide individuaalsed sekveneerimisandmed põhinesid hg38 referentsgenoomil. Individuaalseid sekveneerimisandmeid kasutati kontrollimaks, kas tuvastatud patsiendid kandsid valitud kandidaatgeenide variante või mitte.

2.3.7. Individuaalsete eksoomide analüüs

Individuaalsete eksoomide analüüsimisel kasutati *Population Sampling Probability* (PSAP) programmiga saadud tulemusi. PSAP on mudelipõhine programm, millega on võimalik kirjeldada, kui suure tõenäosusega on uuritav variant haigusseoseline. Seda populatsioonis täheldatud patogeensuse skooride ning variantide sageduste põhjal. Kokku analüüsiti seitsme meesoost eestlase eksoome, kellel esines idiopaatiline MOA.

Uuritavate eksoomide analüüsimisel seati variantidele järgnevad tingimused:

1) olid mitte-sünonüümsed aminohappe asendusvariandid või funktsioonikaoga variandid;
2) olid harvad (minoorse alleeli esinemissagedus (MAF) gnomAD v2.1.1 andmebaasis ≤1%) või uued variandid ehk ei esinenud gnomAD andmebaasis;
3) asusid DOMINO andmebaasist lähtudes dominantsetes või dominantsete-retsesiivsete piiril olevates geenides. Uuringusse kaasati ka retsessiivsete geenide variandid, kui ühes geenis esines mitu varianti;
    a. DOMINO andmed ei kehtinud X-liiteliste geenide korral.
4) PSAP väärtus ≤0,005;
5) CADD *(Combines Annotation Dependent Depletion)* skoor ≥15;

a. CADD-iga on võimalik kirjeldada, kui suure tõenäosusega on variant patogeenne.

Harvade variantidena määratleti variandid, mille MAF oli üldpopulatsioonis ≤ 1%. Üldpopulatsioon määratleti vastavalt 1000 genoomiprojekti (1000 *Genomes Project)* (1000g2015_aug_all) kõikide populatsioonide genoomiandmetele ning gnomAD v2.1.1 andmebaasi populatsioonide eksoomiandmetele:

1) kõik populatsioonid (gnomAD_exome_ALL);
2) eurooplased, välja arvatud soomlased (gnomAD_exome_NFE)
3) aafriklased või afroameeriklased (gnomAD_exome_AFR);
4) eestlased.

Indelid ning need variandid, mille minoorse alleeli lugemeid oli alla viie, kontrolliti üle IGV programmiga. Individuaalsete eksoomide analüüsist tuvastatud kandidaatgeenide kohta otsiti lisainformatsiooni HPA, MGI ning PubMed andmebaasidest (tabel 2, ptk 2.3.4.).

2.3.8. Andmete analüüs

Kandidaatgeenide variantide filtreerimiseks ning jooniste tegemiseks kasutati Microsoft Excel (2016) programmi.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Uuringusse valitud kandidaatgeenid ja nende iseloomustus

Töö esmaseks eesmärgiks oli koostada ülevaatlik andmestik geenidest, millel on võimalik seos telomeeride pikkusega. Kokku kirjeldati 66 kandidaatgeeni. Ülegenoomsetest assotsiatsiooniuuringutest tuvastati 44 erinevat geeni (lisa 1). STRING analüüsi põhjal kirjeldati seitset geeni (tabel 3). Muudest kirjandusallikatest lähtudes esines seos telomeeridega 15 geenil (tabel 4).

STRING andmebaasist tuvastatud geenid osalevad telomeersetes rakuprotsessides. Sealjuures kuuluvad *SUN1* ja *CCDC155* mõlemad LINC *(Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)* kompleksi, *TERF1* ja *TINF2* on aga telomeeri kaitsva kompleksi komponendid. Ühtlasi on leitud, et *CCDC155* ja *REC8* geenide variantidel esineb seos azoospermiaga (tabel 3). Fakhro jt. täiseksoomi sekveneerimise analüüsist selgus, et MOA diagnoosiga meestel esines *CCDC155* geenis harv potentsiaalselt haigusseoseline variant c.1604T>A,p.Leu535Gln, mis viljakatel meestel puudus. Ühtlasi toodi välja, et *CCDC155* on kõrgelt ekspresseerunud munandites (Fakhro jt., 2018). Araujo jt. kirjeldasid aga azoospermiaga seotud *REC8* varianti c.91C>T,p.Arg31Cys Brasiilia patsientide eksoomiandmete põhjal (Araujo jt., 2020). Sama geenivarianti on kirjeldatud ka varasemas Euroopa viljatute meeste uuringus (Griffin jt., 2008).

Tabel 3. STRING andmebaasist tuvastatud telomeeridega seotud geenid.

Geen	Seos telomeeri pikkusega
BLM	ATP-sõltuv DNA helikaas, mis lihtsustab telomeeri replikatsiooni.
CCDC155	Kuulub LINC kompleksi. Vajalik telomeeri seondumiseks tuumaümbrisele meioosi profaasis.
DCLRE1B	Eksonukleaas, millel on keskne roll telomeeride säilitamisel ja kaitsmisel S-faasis. Võtmeroll telomeersete lingude moodustamisel.
REC8	Eraldab meioosi ajal tütarkromatiidid ning homoloogsed kromosoomid.
SUN1	Kuulub LINC kompleksi, mis on seotud tuumalaamina ja tsütoskeleti ühendusega. Läbib sisemist tuumamembraani ning seondub tuumas olevate telomeersete valkudega.
TERF1	Telomeeride kaitsva kompleksi komponendid, mis kaitsevad ning reguleerivad telomeeride pikkust.
TINF2	

Rasvase kirjaga on märgitud geenid, millel on leitud seos azoospermiaga (Fakhro jt, 2018; Araujo jt., 2020; Griffin jt., 2008).

Teaduspublikatsioonide põhjal tuvastatud geenidest esineb enamus telomeersetes rakuprotsessides ning mõjutavad erinevatel viisidel telomeeride pikkust (tabel 4; kirjanduse ülevaade ptk 1.3.). Telomeeride meiootilisse kompleksi kuuluvad geenid *MAJIN, TERB1* ja *TERB2,* mille harvasid variante on kirjeldatud MOA diagnoosiga meestel (Salas-Huetos jt., 2021).

Tabel 4. Teaduspublikatsioonidest tuvastatud telomeeride pikkusega seotud geenid.

Geen	Seos telomeeri pikkusega	Viide
ACD	Kuulub telomeeri kaitsvasse valgukompleksi, mis aitab kaasa telomeraasi seondumisele.	Robles-Espinoza jt., 2015
BICD1	Variant rs2630578 G>C on seotud 605 (+/- 204) bp võrra lühemate telomeeridega.	Mangino jt., 2008
BUB1	Moodustavad BUB3-BUB1 kompleksi, soodustades telomeeri DNA replikatsiooni.	Li jt., 2018
BUB3		
DDX11	Lookus, mis võib määrata inimese telomeeri pikkuse.	Vasa-Nicotera jt., 2005
GAR1	Kuulub telomeraasi kompleksi.	Robles-Espinoza jt., 2015
MAJIN	Kuulub MAJIN-TERB1-TERB2 kompleksi, mis seondub varajases meioosis telomeerse DNA ning selle kaitsva kompleksiga.	Shibuya jt., 2015
NHP2	Kuulub telomeraasi kompleksi.	Robles-Espinoza jt., 2015
NOP10	Kuulub telomeraasi kompleksi.	Robles-Espinoza jt., 2015
PARN	Patogeensed variandid on seotud lühikeste telomeeride sündroomidega, sealhulgas kopsufibroosiga.	Newton jt., 2016
ZNF257	Variant rs8105767 A>G mõjutab telomeeri pikkust erinevates inimkudedes.	Demanelis jt., 2019
TERB1	Kuuluvad MAJIN-TERB1-TERB2 kompleksi, mis seondub varajases meioosis telomeerse DNA ning selle kaitsva kompleksiga.	Shibuya jt., 2015
TERB2		
ZBTB48	Ajendab telomeeri lühenemise protsessi, mille jooksul toimub telomeersete järjestuste kiire deletsioon. Määrab telomeeri maksimaalse pikkuse.	Li jt., 2017
WRN	Helikaas, mis osaleb telomeeri replikatsioonis. Surub maha defektid telomeeri mahajääva ahela sünteesis.	Robles-Espinoza jt., 2015

Rasvase kirjaga on märgitud geenid, millel on leitud seos azoospermiaga (Salas-Huetos jt., 2021).

3.2. Kandidaatgeenides esinevate varieeruvuste üldine profiil Eesti idiopaatilise MOA valimis

Töö järgmiseks eesmärgiks oli tuvastada telomeeride pikkust mõjutavate kandidaatgeenide harvad variandid ning nende võimalik patogeensus, seda Eesti idiopaatilise MOA valimis. Ühtlasi vaadati, milline on geenivariantide varieeruvus uuritavate indiviidide seas.

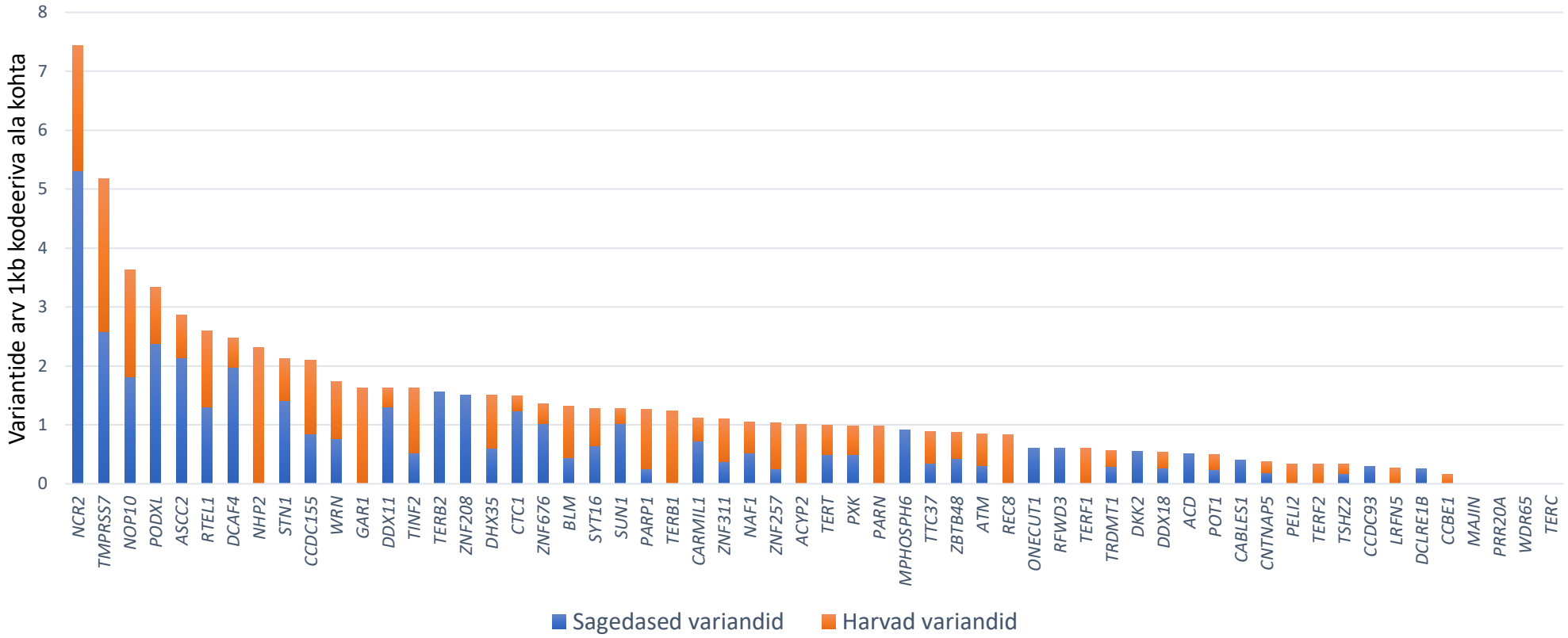
Kandidaatgeenide (n=66) eksonites esinevad variandid võeti välja GEMINI konsortsiumi annoteeritud kogu eksoomi sekveneerimise andmestikust, mis sisaldas 85 Eesti idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermiaga patsientide andmeid. Neljas geenis *(MAJIN, PRR20A, WDR65, TERC)* ei esinenud varieeruvust ning jäid seetõttu edasisest analüüsist välja. gnomad v2.1.1 andmebaasist lähtudes on *PRR20A* lühike geen, mille pikkuseks on vaid 3kb. Ühtlasi ei esine gnomAD andmebaasis *PRR20A* geeni sekveneerimisandmete kohta informatsiooni. *TERC* on samuti lühike geen, mis hõlmab 541 bp. Seetõttu võib mainitud geenides esineda väiksem varieeruvus. Pärast esmast geenivariantide selektsiooni ei esinenud huvipakkuvaid

variante järgnevates geenides: *BCL2L1, BICD1, BUB1, BUB3, KPNA5, MOB1B, SENP7* ja *PIK3C3*. Mainitud geenide variandid ei asunud eksonites ega ekson-intron piirides või ei olnud tegu mitte-sünonüümsete või funktsioonikaoga variantidega. Edasisse kandidaatgeenide varieeruvuse uuringusse jäid 54 geeni.

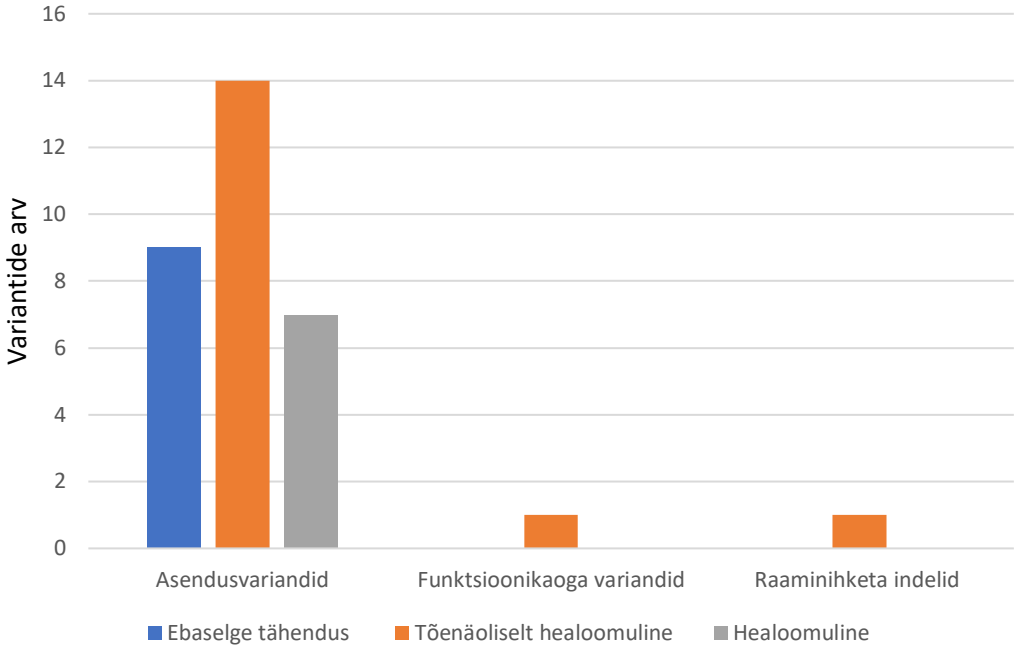
Uuritavaid kandidaatgeenide variante oli kokku 204, nende seas 109 sagedast ning 95 harva varianti, mis moodustasid vastavalt 53,4% ning 46,6% kogu varieeruvusest. Suuremal osal geenidest esines kokku kaks varianti, sealjuures oli enamusel üks sagedane ja üks harv variant (andmed näitamata). Ainult sagedased variandid esinesid 10 geenis: *ZNF208, RFWD3, CABLES1, CCDC93, DKK2, TERB2, ACD, DCLRE1B, MPHOSPH6, ONECUT1*. Ainult harvad variandid esinesid 11 geenis: *PARN, TERB1, GAR1, NHP2, PELI2, REC8, ACYP2, CCBE1, TERF1, TERF2* ja *LRFN5* (joonis 8). Enim variante oli geenides *RTEL1* ja *TMPRSS7*, mõlemal kuus sagedast ning kuus harva geenivarianti. Kõige rohkem harvasid variante esines aga *ATM* geenis, milles oli seitse harva varianti (andmed näitamata). 1kb kodeeriva ala kohta esines 74,2 varianti, millest 39,9 olid sagedased ja 34,4 harvad variandid, moodustades vastavalt 52,8% ja 46,4% varieeruvusest. Suurim varieeruvus 1kb kodeeriva ala kohta esines *NCR2* geenis, milles oli 5,3 sagedast ning 2,1 harva varianti, mis moodustasid vastavalt 13,1% ning 5,9% variantide kogusummast. *TMPRSS7* geenis oli 1kb kodeeriva ala kohta enim harvasid variante, mida oli kokku 2,6 (joonis 8).

Harvade variantide seas esines 87 asendusvarianti, mis moodustas 91,6% kõikidest harvade variantide seas olevatest varianditüüpidest. Nii funktsioonikaoga variante kui ka raaminihketa indeleid oli neli varianti, mis moodustasid kumbki 4,2% uuritavate variantide seas (andmed näitamata). Asendusvariandid on geenides üks levinumaid muutuseid (Andrews jt., 2013), mistõttu esines neid ka käesolevas uuringus kõige rohkem erinevate varianditüüpidega võrreldes. Kõige rohkem harvasid variante oli *ATM* geenis, milles oli kokku 7 asendusvarianti. Funktsioonikaoga variandid esinesid geenides *TMPRSS7, WRN* ning *ZNF676*. Raaminihketa indelid olid aga *RTEL1, WRN, TERB1, NCR2* geenides (andmed näitamata). Uuritava 32 harva variandi seas esines 30 asendusvarianti, üks raaminihketa indel ning üks funktsioonikaoga variant.

Asendusvariantide seas oli ACMG standardkriteeriumitele tuginedes 9 ebaselge tähendusega, 14 tõenäoliselt healoomulist ning 7 healoomulist varianti. Raaminihketa indel ning funktsioonikaoga variant olid aga mõlemad tõenäoliselt healoomulised, ehkki sagedamini on viimaseid hinnatud patogeenseteks (Pagel jt., 2017). Tõenäoliselt patogeenseid ja patogeenseid variante uuritavate variantide seas ei tuvastatud (joonis 9).



Joonis 8. Telomeeride pikkusega seotud kandidaatgeenide sagedaste ja harvade variantide varieeruvus 1kb kodeeriva ala kohta. Harvade variantidena on määratletud variandid, mille minoorse alleeli sagedus on ≤ 1%



Joonis 9. Uuritavate harvade variantide patogeensuse hinnangud sõltuvalt variandi tüübist. Patogeensuse hinnangud määrati vastavalt ACMG standardkriteeriumitele.

Lisaks uuriti, milline on hetero- ja homosügootsete indiviidide osakaal sagedaste ja harvade variantide suhtes. Enim geenivariante kandis indiviid HPM210246, kes oli heterosügootne 43 variandi suhtes ning homosügootne 15 variandi korral. Ühtlasi esines antud patsiendil 11 harva varianti, mis moodustas kõige suurema osakaalu harvade variantide seas. Küll aga oli indiviidil HPM310022 kõige rohkem sagedasi homosügootseid variante, mida esines kokku 20. Vähim sagedasi homosügootseid variante kandis indiviid 150551, kellel oli neid kokku seitse. Indiviid 4818 oli aga heterosügootne 12 variandi suhtes, mis ühtlasi moodustas sagedaste variantide seas väikseima osakaalu. Ükski indiviid ei kandnud harva homosügootset varianti. Enamus patsientidel olid homosügootsed asendusvariandid, kuid indiviididel 110317 ning 3131 esines mõlemal üks harv raaminihketa indel (andmed näitamata). Funktsioonikaoga variante harvade variantide seas kandis üks inimene (HPM210246) (joonis 9).

3.3. Harvade variantide uuring potentsiaalse põhjusliku seose osas idiopaatilise MOA-ga

Telomeeride pikkusega seotud kandidaatgeenide harvade variantide analüüsist tuvastati 9 ebaselge tähendusega varianti, mida kandsid 9 erinevat indiviidi. Neist seitse patsienti kaasati järgnevasse eksoomianalüüsi (tabel 5). Valitud variandid kontrolliti üle IGV programmiga, millega on võimalik visualiseerida sekveneerimislugemeid. IGV väljavõtted on leitavad lisas 2.

Tabel 5. Harvade variantide analüüsist selgunud teadmata patogeensusega geenivariandid ning neid kandvad indiviidid uuritavas valimis.

Geen	Positsioon	rs kood	cDNA muutus	Valgu muutus	Alleelisagedus (gnomAD)	Indiviid
ATM	11:108141803	rs1377840647	c.2851T>G	p.L951V	$3{,}19 \times 10^{-5}$	3131
ATM	11:108122683	rs730881342	c.1727T>C	p.I576T	$9{,}56 \times 10^{-5}$	2095
PARP1	1:226564855	rs138228205	c.1895C>T	p.T632M	$1{,}01 \times 10^{-3}$	1480
PARP1	1:226568874	rs1197320544	c.1195G>A	p.G399R	$7{,}07 \times 10^{-6}$	4202
PELI2	14:56645159	rs766009455	c.184A>G	p.I62V	$1{,}42 \times 10^{-5}$	1599
REC8	14:24641956	rs34075659	c.91C>T	p.R31C	$2{,}94 \times 10^{-3}$	HPM210367
REC8	14:24641989	Puudub	c.124T>C	p.C42R	Puudub	1404
TERF1	8:73921156	rs767125396	c.35C>T	p.P12L	$1{,}82 \times 10^{-5}$	1290
TSHZ2	20:51871924	Puudub	c.1918G>A	p.A643T	Puudub	1384

Kollasega on märgitud variandid, mis valiti järgnevasse indiviididel põhinevasse eksoomianalüüsi, et uurida nende võimalikku põhjuslikku seost idiopaatilise MOA-ga. Alleelisagedused põhinevad gnomAD v2.1.1 andmebaasi eksoomi- ja genoomisagedustel (rs1377840647 korral genoomisagedusel). Kõik indiviidid olid valitud variantide suhtes heterosügoodid. Kromosomaalne positsioon põhineb hg19 referentsgenoomil.

Analüüsist tuvastatud kuue kandidaatgeeni kohta otsiti lisainformatsiooni erinevatest teaduspublikatsioonidest, aga ka MGI ja HPA andmebaasidest, et uurida antud geenide võimalikku põhjuslikku seost meeste viljatusega. Sealjuures täheldati, et potentsiaalne seos mainitud fenotüübiga võib esineda geenidel *ATM, PARP1, REC8* ja *TERF1*. Küll aga puudus teaduskirjanduse põhjal
PELI2 ja *TSZH2* geenidel võimalik seos meeste viljatusega, mistõttu arvati nad edasisest analüüsist välja (tabel 6).

Kirjanduse põhjal leiti, et *ATM* geenipromootori regulatoorne variant rs189037 G>A võib olla seotud idiopaatilise MOA kõrgema riskiga. Antud uuringus osales 229 patsienti, kellel esines mainitud viljatusvorm. Artikli autorid täheldasid, et nii AA genotüüp kui ka variandi minoorne alleel (A) omasid seost suurema idiopaatilise MOA riskiga. Sealjuures oli AA genotüübiga indiviidel kõrgem FSH tase ning väiksemad testised kui GG genotüübiga patsientidel (Li jt., 2013). MGI andmebaasi põhjal esineb aga *ATM* geeni suhtes homosügootsetel nullhiirtel meiootilise aresti tõttu viljatus. Lisaks on hiirtel täheldatud ebanormaalset spermatiidide ja spermatotsüütide morfoloogiat ning väikeseid munandeid (tabel 6).
Chen jt. kirjeldasid *PARP1* varianti rs1136410, millel leiti olevat seos oligozoospermiaga. Antud uuringus viljatute patsiendiga täheldati, et variandi CC genotüüp võib märkimisväärselt suurendada oligozoospermia riski. Küll aga on variandi TT genotüüp seotud vastupidise efektiga (Chen jt., 2014).

Meeste viljatuse ning *TERF1* geeni vahel ei ole täheldatud otsest geneetilist seost. Küll aga omab TERB1-TERF1 (alias TRF1) kompleks olulist rolli meeste meioosis. TERB1 seondub TERF1 valguga ning reguleerib kromosomaalset liikumist meioosi profaasis. Viimane on vajalik homoloogseks paardumiseks ning rekombinatsiooniks. Katsetes hiirtega on leitud, et TERB1-TERF1 interaktsiooni häirimine põhjustab spermatogeensete rakkude järk-järgulist kadu ning vähenenud viljakust isastel hiirtel (Long jt., 2017).

REC8 geenivariandil c.91C>T,p.Arg31Cys on täheldatud seost azoospermiaga (Araujo jt., 2020), mida on kirjeldatud käesoleva töö peatükis 3.1. Ühtlasi on *REC8* homosügootsed nullhiired MGI andmebaasi põhjal viljatud ning neil esinevad väikesed munandid. Isastel hiirtel on märgatud ka meioosi aresti (tabel 6).

Tabel 6. Telomeeri pikkusega seotud kandidaatgeenide seos meeste viljatusega tuginedes MGI, HPA ning PubMed-i andmebaasidele.

Geen	PubMed	MGI	HPA
ATM	*ATM* geenipromootori funktsionaalne variant rs189037 G>A on seotud idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermiaga Hiina päritolu meeste seas (Li jt., 2013).	Homosügootsetel nullhiirtel võib esineda meiootilise aresti tõttu viljatus. Ühtlasi on täheldatud azoospermiat, ebanormaalset spermatiidide ja spermatotsüütide morfoloogiat ning väikeseid munandeid.	Madal RNA ekspressioon meeste kudedes. Kõrge valguekspressioon seemnepõiekeses ning eesnäärmes, keskmine munandites ja munandimanuses.
PARP1	*PARP1* levinud geenivariant rs1136410 on seotud oligozoospermiaga Hiina päritolu meeste seas (Chen jt., 2014).	Geenimutatsioon võib kaasa tuua väiksema pesakonna järglasi. Rohkem reproduktiivsüsteemiga seotud muutusi ei ole täheldatud.	Madal RNA ekspressioon meeste kudedes. Keskmine valguekspressioon munandites, munandimanuses, seemnepõiekeses ning eesnäärmes.
PELI2	Meeste viljatuse ning *PELI2* geeni vahel ei ole täheldatud seost.	Reproduktiivsüsteemiga seotud muutusi ei esine.	Madal RNA ekspressioon meeste kudedes. Kõrge valguekspressioon munandites, keskmine munandimanuses, seemnepõiekeses ning eesnäärmes.
REC8	*REC8* geenivariant c.91C>T,p.Arg31Cys on seotud azoospermiaga (Araujo jt., 2020; Griffin jt., 2008).	Homosügootsed nullhiired on viljatud ning neil esinevad väikesed munandid. Isastel hiirtel on täheldatud ebanormaalset kromosomaalset paardumist meioosi ajal. Ühtlasi esineb isaste meioosi arest.	Madal ja keskmine RNA ekspressioon meeste kudedes. Kõrge valguekspressioon munandites, keskmine munandimanuses.
TERF1	Meeste viljatuse ning *TERF1* geeni vahel ei ole täheldatud otsest seost. Küll aga omab TERB1-TERF1 kompleks olulist rolli meeste meioosis (Long jt., 2017).	Reproduktiivsüsteemiga seotud muutusi ei esine.	Keskmine RNA ekspressioon seemnejuhas, seemnepõiekeses ning eesnäärmes. Valguekspressiooni tasandil informatsioon puudub.
TSHZ2	Meeste viljatuse ning *TSHZ2* geeni vahel ei ole täheldatud seost.	Reproduktiivsüsteemiga seotud muutusi ei esine.	Kõrge RNA ekspressioon seemnejuhas ja seemnepõiekeses. Keskmine valguekspressioon munandites, munandimanuses ja eesnäärmes.

3.4. Individuaalsete eksoomide analüüs tuvastamaks idiopaatilise MOA-ga seotud variante

Telomeeride pikkusega seotud variantide analüüsist ei selgunud variante, millel oleks esinenud tugev põhjuslik seos idiopaatilise MOA-ga. Seetõttu teostati individuaalne eksoomianalüüs seitsmele indiviidile, kes kandsid telomeeride pikkusega seotud geenivariantide uuringust tuvastatud ebaselge tähendusega *ATM, PARP1, REC8* ja *TERF1* geenide variante. Uuringu läbiviimisel analüüsiti ja tõlgendati PSAP programmiga saadud tulemusi, mis oli teostatud indiviidide täiseksoomi andmetele. Analüüsi eesmärk oli uurida, kas eelnevast telomeeride pikkusega seotud harvade variantide uuringust tuvastatud ühenukleotiidsed variandid võivad olla põhjuslikud idiopaatilise MOA suhtes või esineb valitud patsientide eksoomides mõni muu põhjuslik variant.

Uuringu käigus analüüsiti harvasid (MAF ≤ 1%) eksoomivariante, võttes arvesse variantide PSAP väärtuseid ja CADD skoore. PSAP väärtus kirjeldas, kui suure tõenäosusega on uuritav variant haigusseoseline. CADD skoor näitas, kui suure tõenäosusega on uuritav variant patogenne. Andmete filtreerimise ning dominantsete ja retsessiivsete geenide määramise järel otsiti võimalike kandidaatgeenide kohta informatsiooni PubMed-i, MGI ja HPA andmebaasidest leidmaks, kas neil esineb seos meeste reproduktiivsüsteemi või viljatusega. Kui võimalik seos kõnealuste fenotüüpidega esines, viidi läbi eraldi analüüs vastavate geenide variantidega ning võrreldi neid telomeeride pikkuse analüüsist tuvastatud variantidega. Selleks määrati tuvastatud variantide patogeensus toetudes ACMG ning ClinVar-i hinnangutele ning vaadati, millised on nende alleelisagedused erinevate populatsioonide lõikes. Analüüsi tulemusena tuvastati kuus uut varianti, millel võib esineda põhjuslik seos idiopaatilise MOA-ga (tabel 8 ja 9). Informatsioon, kui palju indiviididel algselt PSAP tulemustes variante oli ning mitu geeni ja varianti eraldi analüüsiti on välja toodud tabelis 7

Tabel 7. Valitud indiviidide PSAP analüüsis uuritud geenide ja variantide arvud.

Indiviid	Algne variantide arv PSAP programmi tulemustes	Uuritavad kandidaatgeenid ja nende variandid	Eraldi analüüs valitud variantidele
4202	16154	56 geeni, 70 varianti	8
1408	15551	63 geeni, 82 varianti	13
3131	15836	58 geeni, 70 varianti	16
HPM210367	15704	60 geeni, 65 varianti	13
1404	15976	57 geeni, 70 varianti	12
1290	15782	52 geeni, 60 varianti	9
2095	15998	55 geeni, 65 varianti	12

Indiviidi 4202 PSAP programmi tulemusi võrreldi telomeeride pikkuse analüüsist tuvastatud geeni *PARP1* variandiga c.1195G>A,p.G399R. Analüüsist tuvastati üks *ATF4* geeni variant c.251G>T,p.W84L, mis võib olla seotud meeste viljatuse kõrgenenud riskiga. Tegu on ebaselge tähendusega asendusvariandiga, mille PSAP väärtus on võrreldes varasemalt tuvastatud *PARP1* geeni variandiga oluliselt madalam. Seega on võimalik, et tegu on suurema tõenäosusega haigusseoselise variandiga. Küll aga pole *ATF4* variandi CADD skoor *PARP1* variandiga võrreldes oluliselt kõrgem ning ühtlasi on selle alleelisagedus üldpopulatsioonis kõrgem. Teaduskirjanduse põhjal *ATF4* geenil seost meeste reproduktiivsüsteemi või viljatusega ei esine, ehkki MGI andmebaasi põhjal võib geenialleeli puudumine kaasa tuua isastel hiirtel vähenenud viljakuse (tabel 8 ja 9).

Indiviidi HPM210367 PSAP programmi tulemusi võrreldi telomeeride pikkuse analüüsist tuvastatud geeni *REC8* variandiga c.91C>T,p.R31C. Analüüsist tuvastati *PLEKHA5* geeni c.154C>T,p.R52W ja *DDB1* geeni c.1424C>T,p.S475L variandid. *PLEKHA5* geeni kohta pole kirjandusest meeste viljatusega seost leitud. Küll aga esinevad MGI andmetel isastel hiirtel reproduktiivsüsteemi rakkude häired. *DDB1* geen omab olulist rolli Sertoli rakkude proliferatsioonis ning munandites. Zheng jt. on kirjeldanud, et *Ddb1* geeni eemaldamine Sertoli rakkudes põhjustab hiirtel häireid nii Sertoli rakkude proliferatsioonis kui ka munandikoti füsioloogias (Zheng jt., 2019). Mõlema variandi CADD skoorid olid kõrgemad võrreldes *REC8* variandiga, kuigi erinevus ei olnud märkimisväärne. Küll aga oli *REC8* variandi alleelisagedus üldpopulatsioonis oluliselt väiksem kui *PLEKHA5* ja *DDB1* variantidel (tabel 8 ja 9).

Indiviidil 1404 esines telomeeride pikkuse analüüsist tuvastatud *REC8* variant c.124T>C,p.C42R. Vastavalt prof. Frank Tüttelmann-i (Münsteri Ülikool, Saksamaa; suuline kommunikatsioon, juhendaja M. Laan kaudu) andmetele esineb mainitud ühenukleotiidne variant nii viljatute kui ka viljakate meeste eksoomides sarnase sagedusega. Seetõttu pole võimalik väita, et antud variant omab põhjuslikku seost idiopaatilise MOA-ga. PSAP programmi tulemuste analüüsist tuvastati *COG3* geeni c.1670C>T,p.T557M ja *INO80* geeni c.85C>T,p.L29F variandid. *COG3* geeni korral on kirjeldatud konserveerunud mittesünonüümset adenosiinist inosiiniks RNA muutumiskohta, mis leiab aset spermatogeneesi ajal (Wang jt., 2019). Ühtlasi on täheldatud, et meestele omastes kudedes esineb kõrge COG3 valgueкspressioon. *INO80* ekspresseerub hiire spermatotsüütides varajases meioosi profaasis. Selle puudumine toob aga kaasa meioosi aresti, mis omakorda on seotud suutmatusega meiootilise rekombinatsiooni ajal DNA kahjustusi parandada (Serber jt., 2016). *INO80* geeni puhul on MGI andmebaasis välja toodud ebanormaalne seemnepõiekeste morfoloogia. *COG3*

variandi alleelisagedus ja PSAP väärtus olid väiksemad ning CADD skoor kõrgem kui *INO80* variandil, seega on *COG3* geeni c.1670C>T,p.T557M variant suurema tõenäosusega haigusseoseline kui *INO80* geeni c.85C>T,p.L29F variant (tabel 8 ja 9).
Indiviidi 1290 PSAP programmi tulemusi võrreldi telomeeride analüüsist tuvastatud geeni *TERF1* variandiga c.35C>T,p.P12L. Analüüsist tuvastati *GGT1* geeni c.797G>A,p.R266Q variant, mis võib olla seotud meeste viljatuse kõrgenenud riskiga. Geen ei oma teaduskirjanduse põhjal seost meeste reproduktiivsüsteemiga, küll aga esineb MGI andmetel isastel mutantsetel hiirtel viljatus. Sealjuures on inimeste seemnepõiekestes täheldatud *GGT1* kõrget RNA ekspressiooni. *TERF1* variandiga võrreldes on aga c.797G>A,p.R266Q alleelisagedus ning PSAP väärtus kõrgemad ehk väiksema tõenäosusega on tegu haigusseoselise variandiga (tabelid 8 ja 9).

Indiviididel 1480, 3131 ja 2095 ei tuvastatud ühtegi uut geenivarianti, mis võiks olla seotud meeste viljatuse kõrgenenud riskiga. Indiviidi 1480 PSAP programmi tulemusi võrreldi telomeeride pikkuse analüüsist tuvastatud geeni *PARP1* variandiga c.1895C>T,p.T632M, patsiendil 3131 oli aga varasemalt leitud *ATM* variant c.2851T>G,p.L951V. Indiviid 2095 kandis telomeeride pikkusega võimalikus seoses olevat *ATM* varianti c.1727T>C,p.I576K. Ükski mainitud variant ei näidanud aga potentsiaalset monogeenset seost idiopaatilise MOA-ga (tabel 8 ja 9).

Varasemalt on täheldatud, et lühikesed telomeerid on seotud MOA kõrgenenud riskiga (Yang jt., 2018). Samuti on hiljuti kirjeldatud üksikuid MOA patsiente, kellel esinevad haigusseoselised geenivariandid telomeeri funktsiooni ja stabiilsusega seotud geenides (Salas-Huetos jt., 2021). Seega on võimalik, et mainitud fenotüüpide vahel esineb ka geneetiline seos. Käesoleva uurimistöö tulemustest lähtuvalt pole aga hetkel võimalik väita, et analüüsitud 85 Eesti idiopaatilise MOA patsientidel esineb haigusseoselisi variante, mis võiks olla põhjuslikult seotud viljatusega. Seda seetõttu, et MOA geneetilised põhjused on äärmiselt heterogeensed (Kasak ja Laan, 2021) ja käesolev magistritöö põhineb väikesel uuritavate arvul, olles käsitletav kui piloot-uuring. Küll aga ei saa välistada tuvastatud variantide seost telomeeride pikkusega, mida antud töö raames ei olnud võimalik läbi viia ning mida oleks keeruline harvade variantide korral teostada. Edasiste uuringutena oleks võimalik täiendada telomeeride pikkusega seotud kandidaatgeenide nimekirja ja suurendada uuritavate valimit.

Tabel 8. Seitsme indiviidi eksoomianalüüsist tuvastatud geenivariandid, mis võivad olla seotud kõrgema meeste viljatuse riskiga.

Geen	Positsioon	cDNA muutus	Valgu muutus	rs kood	Alleelisagedus (gnomAD kõik)	Alleelisagedus (gnomAD eestlased)	ClinVar	CADD	PSAP	Indiviid
PARP1	1:226568874	c.1195G>A	p.G399R	rs1197320544	$3{,}98 \times 10^{-6}$	0	Puudub	25	0.27960195	4202
ATF4	22:39917802	c.251G>T	p.W84L	rs772567775	$8{,}12 \times 10^{-6}$	0	Puudub	28	0.000267085	4202
PARP1	1:226564855	c.1895C>T	p.T632M	rs138228205	$9{,}66 \times 10^{-4}$	0	Puudub	24	0.28125194	1480
ATM	11:108141803	c.2851T>G	p.L951V	rs1377840647	Puudub	Puudub	Puudub	18	0.43704649	3131
REC8	14:24641956	c.91C>T	p.R31C	rs34075659	$2{,}41 \times 10^{-5}$	0	ET	29	0.4525654	HPM210367
PLEKHA5	12:19283049	c.154C>T	p.R52W	rs374080735	2×10^{-4}	0	Puudub	35	0.00092914	HPM210367
DDB1	11:61081945	c.1424C>T	p.S475L	rs778820024	1×10^{-4}	0	Puudub	33	0.00282584	HPM210367
REC8	14:24641989	c.124T>C	p.C42R	Puudub	Puudub	Puudub	Puudub	32	0.01093746	1404
COG3	13:46083902	c.1670C>T	p.T557M	rs750948239	$8{,}12 \times 10^{-6}$	0	Puudub	34	0.00043596	1404
INO80	15:41388424	c.85C>T	p.L29F	rs763897418	$2{,}45 \times 10^{-5}$	0	Puudub	25.3	0.01042876	1404
TERF1	8:73921156	c.35C>T	p.P12L	rs767125396	$1{,}64 \times 10^{-5}$	0	Puudub	20	0.00287371	1290
GGT1	22:24982005	c.797G>A	p.R266Q	rs199729018	$2{,}4 \times 10^{-3}$	$8{,}78 \times 10^{-3}$	Puudub	34	0.00754902	1290
ATM	11:108122683	c.1727T>C	p.I576K	rs730881342	$9{,}56 \times 10^{-5}$	$6{,}21 \times 10^{-4}$	ET	25	0.18279594	2095

Kollasega on märgitud geenivariandid, mis tuvastati telomeeri pikkusega seotud kandidaatgeenide harvade variantide analüüsist. Kõik variandid olid vastavalt ACMG kriteeriumitele „ebaselge tähendus“ (ET) hinnanguga. ACMG hinnang määrati Varsome-i ja Franklin-i andmebaaside hinnangutele toetudes.

Tabel 9. Seitsme indiviidi eksoomianalüüsist tuvastatud geenide seos meeste viljatusega vastavalt PubMed-i, MGI ja HPA andmebaasidele.

Geen	PubMed	MGI	HPA
ATF4	Meeste viljatuse ning *ATF4* geeni vahel ei ole täheldatud seost.	Ühe kõrvaldatud geenialleeli suhtes homosügootsetel isastel hiirtel esineb vähenenud viljakus.	Madal RNA ekspressioon meeste kudedes. Keskmine valgueksрessioon munandites, munandimanuses, seemnepõiekeses ja eesnäärmes.
PLEKHA5	Meeste viljatuse ning *PLEKHA5* geeni vahel ei ole täheldatud seost.	Isaste sugurakkude ebanormaalne apoptoos ning Sertoli rakkude morfoloogia.	Keskmine RNA ekspressioon meeste kudedes. Keskmine valgueksрessioon munandites ja seemnepõiekeses.
DDB1	*DDB1* geenil on oluline roll Sertoli rakkude proliferatsioonis ning munandites (Zheng jt., 2019).	Reproduktiivsüsteemis esineb geenieksрessioon, kuid pole täheldatud fenotüüpi.	Madal RNA ekspressioon meeste kudedes. Keskmine valgueksрessioon munandites ja eesnäärmes, kõrge seemnepõiekeses.
COG3	Spermatogeneesi ajal on Cog3-s mittesünonüümne RNA adenosiinist inosiiniks (*A-to-I)* muutumise koht (Wang jt., 2019).	Reproduktiivsüsteemis esineb geenieksрessioon, kuid pole täheldatud fenotüüpi.	Keskmine RNA ekspressioon meeste kudedes. Kõrge valgueksрessioon munandites, munandimanuses, seemnepõiekses, eesnäärmes.
INO80	*INO80* ekspresseerub hiirte spermatotsüütide arengus meiootilise profaasi varases staadiumis. Selle puudumine toob kaasa meioosi aresti (Serber jt., 2016).	Isastel esineb ebanormaalne seemnepõiekeste morfoloogia.	Keskmine RNA ekspressioon meeste kudedes. Valgutasemel info puudub.
GGT1	Meeste viljatuse ning *GGT1* geeni vahel ei ole täheldatud seost.	Isastel esineb viljatus.	Kõrge RNA ekspressioon seemnepõiekeses, keskmine valgueksрessioon munandimanuses.

KOKKUVÕTE

Telomeerid on kromosoomide otstes esinevad valk-DNA kompleksid, mis kaitsevad kromosoome erinevate kahjustuste eest. Telomeeride pikkus on seotud mitmete erinevate fenotüüpide ja haigustega, sealhulgas on telomeeride lühenemine üks vananemisele iseloomulikke tunnusjooni. Ühtlasi on täheldatud, et viljatutel meestel esinevad lühemad telomeerid (Darmishonnejad jt., 2020). Meeste viljatus on mitmetahuline probleem, mis mõjutab globaalselt 7% meessoost elanikkonnast ning on tingitud nii kaasasündinud, omandatud kui ka idiopaatilistest põhjustest. Sealjuures on idiopaatiline mitte-obstruktiivne azoospermia üks raskemaid meeste viljatusvorme, mille korral puuduvad spermatogeneesihäirete tõttu ejakulaadis seemnerakud.

Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks oli leida, kas telomeeride pikkusega seotud geenides esinevate harvade variantide ja idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermia vahel esineb monogeenne seos, seda 85 Eesti meessoost patsiendi eksoomiandmete põhjal. Telomeeride pikkusega seotud geenivariantide analüüsist selgus neli geeni, millel esines kirjanduse põhjal seos meeste reproduktiivsüsteemi või viljatusega: *ATM, PARP1, REC8, TERF1*. Kõikide mainitud geenide variandid olid „ebaselge tähendus“ hinnanguga. Ühtegi patogeenset või tõenäoliselt patogeenset varianti geenides ei esinenud. Antud geenivariantide põhjal analüüsiti seitsme patsiendi individuaalset eksoomi tuvastamaks variante, mis võivad olla seotud idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermiaga. Individuaalsetest eksoomianalüüsidest leiti geenides *ATF4, PLEKHA5, DDB1, COG3, INO80* ja *GGT1* variandid, millel võib esineda seos kõnealuse viljatustüübiga. Mainitud geenivariantide seos antud fenotüübiga polnud aga piisavalt tugev, et kinnitada nende monogeenset seost idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermiaga.

Käesoleva uurimuse tulemustest lähtudes ei esine 85 Eesti viljatu mehe hulgas indiviide, kellel oleks tuvastatud põhjuslik seos idiopaatilise mitte-obstruktiivse azoospermia ning telomeeride pikkusega seotud geenide harvade haigusseoseliste variantide vahel.

Genetic variants modulating telomere length in infertile men and their role in impaired spermatogenesis

Anna-Grete Juchnewitsch

SUMMARY

Human chromosome ends consist of repetitive telomeric sequences and shelterin complex, which protects chromosomes from damage. Telomeres modulate several important cellular processes and due to incomplete replication of telomeric DNA, shorten with each cell division in most somatic cells. Telomere length can be maintained by telomerase, a large ribonucleoprotein complex, which adds telomeric repeats at the ends of chromosomes. For example, this mechanism takes place in stem and germ cells. Telomere length is a biomarker of aging. Furthemore, the length of repetitive telomeric sequences varies between gender and ancestry, as well as a response to different environmental factors and diseases. In addition, male infertility is associated with shorter leukocyte telomeres. Thus, the main aim of this study was to find an association between rare genetic variation in genes linked to telomere length and idiopathic non-obstructive azoospermia (NOA). NOA is one of the severest forms of male infertility, which is characterized by a complete lack of sperm in ejaculate due to impaired spermatogenesis.

In the current study, a list of 66 genes influencing the telomere length was compiled based on the genomewide association studies and other scientific publications as well as STRING database. For the next step, rare variants (minor allele frequency $\leq 1\%$) were identified in the candidate genes and their possible pathogenicity were evaluated. The examined group consisted of 85 Estonian men diagnosed with idiopathic NOA. The study revealed six candidate genes and nine possible rare variants of unknown significance, which may influence telomere length. Furthermore, based on different databases, four of these genes had an association with male reproductive system or infertility. Thus, the final aim of this study was to examine seven individual exomes of infertile Estonian men to identify possible variants influencing idiopathic NOA.

The results of current study showed no assocation between rare genetic variation in genes linked to telomere length and idiopathic NOA among 85 infertile Estonian men.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid – Maris Laan ja Laura Kasak, kelle abi, suunamine ning kommentaarid aitasid käesoleval tööl sündida.

Ühtlasi lähevad minu tänusõnad kõigile neile lähedastele inimestele, kes kirjutamisprotsessi ajal emotsionaalset ja vaimset tuge pakkusid.

KASUTATUD KIRJANDUS

Achi, M. V., Ravindranath, N., & Dym, M. (2000). Telomere Length in Male Germ Cells Is Inversely Correlated with Telomerase Activity1. *Biology of Reproduction*, *63*(2), 591–598.

Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Selvam, M. K. P., & Shah, R. (2021). Male infertility. *The Lancet*, *397*(10271), 319–333.

Alder, J. K., Stanley, S. E., Wagner, C. L., Hamilton, M., Hanumanthu, V. S., & Armanios, M. (2015). Exome Sequencing Identifies Mutant TINF2 in a Family With Pulmonary Fibrosis. *Chest*, *147*(5), 1361–1368.

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., & Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(21), 10114–10118.

Amir, S., Vakonaki, E., Tsiminikaki, K., Tzatzarakis, M. N., Michopoulou, V., Flamourakis, M., Kalliantasi, K., Karzi, V., Fragkiadaki, P., Renieri, E. A., Tsoukalas, D., Thanasoula, M., Sarandi, E., Sakellaris, G., Makrigiannakis, A., Nepka, C., Spandidos, D. A., & Tsatsakis, A. (2019). Sperm telomere length: Diagnostic and prognostic biomarker in male infertility (Review). *World Academy of Sciences Journal*, *1*(6), 259–263.

Andrews, T. D., Sjollema, G., & Goodnow, C. C. (2013). Understanding the immunological impact of the human mutation explosion. *Trends in Immunology*, *34*(3), 99–106.

Antunes, D. M. F., Kalmbach, K. H., Wang, F., Dracxler, R. C., Seth-Smith, M. L., Kramer, Y., Buldo-Licciardi, J., Kohlrausch, F. B., & Keefe, D. L. (2015). A single-cell assay for telomere DNA content shows increasing telomere length heterogeneity, as well as increasing mean telomere length in human spermatozoa with advancing age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(11), 1685–1690.

Aoude, L. G., Pritchard, A. L., Robles-Espinoza, C. D., Wadt, K., Harland, M., Choi, J., Gartside, M., Quesada, V., Johansson, P., Palmer, J. M., Ramsay, A. J., Zhang, X., Jones, K., Symmons, J., Holland, E. A., Schmid, H., Bonazzi, V., Woods, S., Dutton-Regester, K., … Hayward, N. K. (2014). Nonsense Mutations in the Shelterin Complex Genes ACD and TERF2IP in Familial Melanoma. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *107*(2).

Araujo, T. F., Friedrich, C., Grangeiro, C. H. P., Martelli, L. R., Grzesiuk, J. D., Emich, J., Wyrwoll, M. J., Kliesch, S., Simões, A. L., & Tüttelmann, F. (2020). Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: Challenges in variant assessment and validating genes. *Andrology*, *8*(2), 434–441.

Barthel, F. P., Wei, W., Tang, M., Martinez-Ledesma, E., Hu, X., Amin, S. B., Akdemir, K. C., Seth, S., Song, X., Wang, Q., Lichtenberg, T., Hu, J., Zhang, J., Zheng, S., & Verhaak, R. G. W. (2017). Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nature genetics*, *49*(3), 349–357.

Bisht, K., Smith, E. M., Tesmer, V. M., & Nandakumar, J. (2016). Structural and functional consequences of a disease mutation in the telomere protein TPP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(46), 13021–13026.

Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, *350*(6265), 1193–1198.

Bojesen, S. E., Pooley, K. A., Johnatty, S. E., Beesley, J., Michailidou, K., Tyrer, J. P., Edwards, S. L., Pickett, H. A., Shen, H. C., Smart, C. E., Hillman, K. M., Mai, P. L., Lawrenson, K., Stutz, M. D., Lu, Y., Karevan, R., Woods, N., Johnston, R. L., French, J. D., … Dunning, A. M. (2013). Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nature genetics*, *45*(4), 371-384e2.

Calvete, O., Garcia-Pavia, P., Domínguez, F., Bougeard, G., Kunze, K., Braeuninger, A., Teule, A., Lasa, A., Ramón y Cajal, T., Llort, G., Fernández, V., Lázaro, C., Urioste, M., & Benitez, J. (2017). The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *European Journal of Human Genetics*, *25*(11), 1278–1281.

Cariati, F., Jaroudi, S., Alfarawati, S., Raberi, A., Alviggi, C., Pivonello, R., & Wells, D. (2016). Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reproductive BioMedicine Online*, *33*(3), 404–411.

Chakraborty, A., Tapryal, N., Venkova, T., Horikoshi, N., Pandita, R. K., Sarker, A. H., Sarkar, P. S., Pandita, T. K., & Hazra, T. K. (2016). Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nature Communications*, *7*(1), 13049.

Chatterjee, S., de Gonzalo-Calvo, D., Derda, A. A., Schimmel, K., Sonnenschein, K., Bavendiek, U., Bauersachs, J., Bär, C., & Thum, T. (2018). Leukocyte telomere length correlates with hypertrophic cardiomyopathy severity. *Scientific Reports*, *8*.

Chen, H., Pu, X.-Y., Zhang, R.-P., & A, Z.-C. (2014). Association of common SNP rs1136410 in PARP1 gene with the susceptibility to male infertility with oligospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *31*(10), 1391–1395.

Chen, L.-Y., Redon, S., & Lingner, J. (2012). The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature*, *488*(7412), 540–544.

Codd, V., Mangino, M., van der Harst, P., Braund, P. S., Kaiser, M., Beveridge, A. J., Rafelt, S., Moore, J., Nelson, C., Soranzo, N., Zhai, G., Valdes, A. M., Blackburn, H., Leach, I. M., de Boer, R. A., Goodall, A. H., Ouwehand, W., van Veldhuisen, D. J., van Gilst, W. H., … Samani, N. J. (2010). Variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nature genetics*, *42*(3), 197–199.

Codd, V., Nelson, C. P., Albrecht, E., Mangino, M., Deelen, J., Buxton, J. L., Jan Hottenga, J., Fischer, K., Esko, T., Surakka, I., Broer, L., Nyholt, D. R., Mateo Leach, I., Salo, P., Hägg, S., Matthews, M. K., Palmen, J., Norata, G. D., O'Reilly, P. F., … Samani, N. J. (2013). Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nature genetics*, *45*(4), 422-427e2.

Coimbra, B. M., Carvalho, C. M., Moretti, P. N., Mello, M. F., & Belangero, S. I. (2017). Stress-related telomere length in children: A systematic review. *Journal of Psychiatric Research*, *92*, 47–54.

Condorelli, R. A., Russo, G. I., Calogero, A. E., Morgia, G., & La Vignera, S. (2017). Chronic prostatitis and its detrimental impact on sperm parameters: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*, *40*(11), 1209–1218.

Dahal, S., Dubey, S., & Raghavan, S. C. (2018). Homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks operates in mammalian mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(9), 1641–1655.

Dalby, A. B., Hofr, C., & Cech, T. R. (2015). Contributions of the TEL-patch Amino Acid Cluster on TPP1 to Telomeric DNA Synthesis by Human Telomerase. *Journal of Molecular Biology*, *427*(6, Part B), 1291–1303.

Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J. D., Labat, C., Kimura, M., Desai, K. K., Granick, M., & Aviv, A. (2013). Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nature Communications*, *4*(1), 1597.

Darmishonnejad, Z., Zarei-Kheirabadi, F., Tavalaee, M., Zarei-Kheirabadi, M., Zohrabi, D., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia*, *52*(5), e13546.

de Lange, T. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual Review of Genetics*, *52*(1), 223–247.

Delgado, D. A., Zhang, C., Chen, L. S., Gao, J., Roy, S., Shinkle, J., Sabarinathan, M., Argos, M., Tong, L., Ahmed, A., Islam, T., Rakibuz-Zaman, M., Sarwar, G., Shahriar, H., Rahman, M., Yunus, M., Jasmine, F., Kibriya, M. G., Ahsan, H., & Pierce, B. L. (2018). Genome-wide association study of telomere length among South Asians identifies a second RTEL1 association signal. *Journal of Medical Genetics*, *55*(1), 64–71.

Demanelis, K., Jasmine, F., Chen, L. S., Chernoff, M., Tong, L., Shinkle, J., Sabarinathan, M., Lin, H., Ramirez, E., Oliva, M., Kim-Hellmuth, S., Stranger, B. E., Ardlie, K. G., Aguet, F., Ahsan, H., Consortium, Gte., Doherty, J., Kibriya, M. G., & Pierce, B. L. (2019). Determinants of telomere length across human tissues. *BioRxiv*, 793406.

Ehala-Aleksejev, K. (2019). The associations between body composition, obesity and obesity-related health and lifestyle conditions with male reproductive function. Tartu Ülikool. [Doktoritöö]. Tartu.

Factor-Litvak, P., Susser, E., Kezios, K., McKeague, I., Kark, J. D., Hoffman, M., Kimura, M., Wapner, R., & Aviv, A. (2016). Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics*, *137*(4).

Fakhro, K. A., Elbardisi, H., Arafa, M., Robay, A., Rodriguez-Flores, J. L., Al-Shakaki, A., Syed, N., Mezey, J. G., Abi Khalil, C., Malek, J. A., Al-Ansari, A., Al Said, S., & Crystal, R. G. (2018). Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genetics in Medicine*, *20*(11), 1365–1373.

Feng, J., Wu, X., Zhang, Y., Yang, X., Ma, G., Chen, S., Luo, S., & Zhang, Y. (2019). A novel mutation (−195C>A) in the promoter region of CFTR gene is associated with Chinese Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Gene*, *719*, 144007.

Franik, S., Smeets, D., Zande, G. van de, Gomes, I., D'Hauwers, K., Braat, D. D. M., Fleischer, K., & Ramos, L. (2018). Klinefelter syndrome and fertility—Impact of X-chromosomal inheritance on spermatogenesis. *Andrologia*, *50*(5), e13004.

Galati, A., Micheli, E., Alicata, C., Ingegnere, T., Cicconi, A., Pusch, M. C., Giraud-Panis, M.-J., Gilson, E., & Cacchione, S. (2015). TRF1 and TRF2 binding to telomeres is modulated by nucleosomal organization. *Nucleic Acids Research*, *43*(12), 5824–5837.

Gardner, M., Bann, D., Wiley, L., Cooper, R., Hardy, R., Nitsch, D., Martin-Ruiz, C., Shiels, P., Sayer, A. A., Barbieri, M., Bekaert, S., Bischoff, C., Brooks-Wilson, A., Chen, W., Cooper, C., Christensen, K., De Meyer, T., Deary, I., Der, G., … Ben-Shlomo, Y. (2014). Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Experimental gerontology*, *51*, 15–27.

Gielen, M., Hageman, G. J., Antoniou, E. E., Nordfjall, K., Mangino, M., Balasubramanyam, M., de Meyer, T., Hendricks, A. E., Giltay, E. J., Hunt, S. C., Nettleton, J. A., Salpea,

K. D., Diaz, V. A., Farzaneh-Far, R., Atzmon, G., Harris, S. E., Hou, L., Gilley, D., Hovatta, I., … TELOMAAS group. (2018). Body mass index is negatively associated with telomere length: A collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *108*(3), 453–475.

Greider, C. W. (1999). Telomeres Do D-Loop–T-Loop. *Cell*, *97*(4), 419–422.

Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*, *43*(2), 405–413.

Griffin, J., Emery, B. R., Christensen, G. L., & Carrell, D. T. (2008). Analysis of the Meiotic Recombination Gene REC8 for Sequence Variations in a Population with Severe Male Factor Infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *54*(3), 163–165.

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & Lange, T. de. (1999). Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell*, *97*(4), 503–514.

Gu, J., Chen, M., Shete, S., Amos, C. I., Kamat, A., Ye, Y., Lin, J., Dinney, C. P., & Wu, X. (2011). A Genome-wide Association Study Identifies a Locus on Chromosome 14q21 as a Predictor of Leukocyte Telomere Length and as a Marker of Susceptibility for Bladder Cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, *4*(4), 514–521.

Han, H., Liu, S., Zhou, X.-G., Tian, L., & Zhang, X.-D. (2016). Aetiology of obstructive azoospermia in Chinese infertility patients. *Andrologia*, *48*(7), 761–764.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *37*(3), 614–636.

Heinaru, A. (2012). *Geneetika*: õpik kõrgkoolile. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

Hom, R. A., & Wuttke, D. S. (2017). Human CST Prefers G-Rich but Not Necessarily Telomeric Sequences. *Biochemistry*, *56*(32), 4210–4218.

Horvath, K., Eisenberg, D., Stone, R., Anderson, J., Kark, J., & Aviv, A. (2019). Paternal Age and Transgenerational Telomere Length Maintenance: A Simulation Model. *Scientific Reports*, *9*(1), 20.

Hu, C., Rai, R., Huang, C., Broton, C., Long, J., Xu, Y., Xue, J., Lei, M., Chang, S., & Chen, Y. (2017). Structural and functional analyses of the mammalian TIN2-TPP1-TRF2 telomeric complex. *Cell Research*, *27*(12), 1485–1502.

Janoušková, E., Nečasová, I., Pavloušková, J., Zimmermann, M., Hluchý, M., Marini, V., Nováková, M., & Hofr, C. (2015). Human Rap1 modulates TRF2 attraction to telomeric DNA. *Nucleic Acids Research*, *43*(5), 2691–2700.

Jarvi, K., Lo, K., Grober, E., Mak, V., Fischer, A., Grantmyre, J., Zini, A., Chan, P., Patry, G., Chow, V., & Domes, T. (2015). The workup and management of azoospermic males. *Canadian Urological Association Journal*, *9*(7–8), 229–235.

Jensen, C. F. S., Østergren, P., Dupree, J. M., Ohl, D. A., Sønksen, J., & Fode, M. (2017). Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*, *14*(9), 523–533.

Jungwirth, A., Diemer, T., Kopa, Z., Krausz, C., Minhas, S., & Tournaye, H. (2018). EAU Guidelines Panel on Male Infertility. EAU Guidelines Office.

Jose, S. S., Tidu, F., Burilova, P., Kepak, T., Bendickova, K., & Fric, J. (2018). The Telomerase Complex Directly Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Senescence in an Induced Pluripotent Stem Cell Model of Telomeropathy. *Frontiers in Genetics*, *9*.

Kasak, L., & Laan, M. (2021). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: Challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human Genetics*, *140*(1), 135–154.

Kasak, L., Punab, M., Nagirnaja, L., Grigorova, M., Minajeva, A., Lopes, A. M., Punab, A. M., Aston, K. I., Carvalho, F., Laasik, E., Smith, L. B., Conrad, D. F., & Laan, M. (2018). Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. *American Journal of Human Genetics*, *103*(2), 200–212.

Kocak, H., Ballew, B. J., Bisht, K., Eggebeen, R., Hicks, B. D., Suman, S., O'Neil, A., Giri, N., Maillard, I., Alter, B. P., Keegan, C. E., Nandakumar, J., & Savage, S. A. (2014). Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes & Development*, *28*(19), 2090–2102.

Kohn, T. P., Kohn, J. R., Owen, R. C., & Coward, R. M. (2019). The Prevalence of Y-chromosome Microdeletions in Oligozoospermic Men: A Systematic Review and Meta-analysis of European and North American Studies. *European Urology*, *76*(5), 626–636.

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.

Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, *15*(6), 369–384.

Kuo, C., Pilling, L. C., Kuchel, G. A., Ferrucci, L., & Melzer, D. (2019). Telomere length and aging-related outcomes in humans: A Mendelian randomization study in 261,000 older participants. *Aging Cell*, *18*(6).

Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Orimo, A., & Inoue, M. (1999). Estrogen Activates Telomerase. *Cancer Research*, *59*(23), 5917–5921.

Lamprokostopoulou, A., Moschonis, G., Manios, Y., Critselis, E., Nicolaides, N. C., Stefa, A., Koniari, E., Gagos, S., & Charmandari, E. (2019). Childhood obesity and leucocyte telomere length. *European Journal of Clinical Investigation*, *49*(12), e13178.

Landrum, M. J., Chitipiralla, S., Brown, G. R., Chen, C., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Kaur, K., Liu, C., Lyoshin, V., Maddipatla, Z., Maiti, R., Mitchell, J., O'Leary, N., Riley, G. R., Shi, W., Zhou, G., Schneider, V., … Kattman, B. L. (2020). ClinVar: Improvements to accessing data. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D835–D844.

Lazzerini-Denchi, E., & Sfeir, A. (2016). Stop pulling my strings—What telomeres taught us about the DNA damage response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(6), 364–378.

Latifovic, L., Peacock, S. D., Massey, T. E., & King, W. D. (2016). The Influence of Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Physical Activity on Leukocyte Telomere Length. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *25*(2), 374–380.

Levy, D., Neuhausen, S. L., Hunt, S. C., Kimura, M., Hwang, S.-J., Chen, W., Bis, J. C., Fitzpatrick, A. L., Smith, E., Johnson, A. D., Gardner, J. P., Srinivasan, S. R., Schork, N., Rotter, J. I., Herbig, U., Psaty, B. M., Sastrasinh, M., Murray, S. S., Vasan, R. S., … Aviv, A. (2010). Genome-wide association identifies OBFC1 as a locus involved in human leukocyte telomere biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(20), 9293–9298.

Li, C., Stoma, S., Lotta, L. A., Warner, S., Albrecht, E., Allione, A., Arp, P. P., Broer, L., Buxton, J. L., Alves, A. D. S. C., Deelen, J., Fedko, I. O., Gordon, S. D., Jiang, T., Karlsson, R., Kerrison, N., Loe, T. K., Mangino, M., Milaneschi, Y., … Codd, V. (2020). Genome-wide Association Analysis in Humans Links Nucleotide Metabolism to Leukocyte Telomere Length. *The American Journal of Human Genetics*, *106*(3), 389–404.

Li, F., Kim, H., Ji, Z., Zhang, T., Chen, B., Ge, Y., Hu, Y., Feng, X., Han, X., Xu, H., Zhang, Y., Yu, H., Liu, D., Ma, W., & Songyang, Z. (2018). The BUB3-BUB1 Complex Promotes Telomere DNA Replication. *Molecular cell*, *70*(3), 395-407.e4.

Li, J. S. Z., Fuste, J. M., Simavorian, T., Bartocci, C., Tsai, J., Karlseder, J., & Denchi, E. L. (2017). TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control. *Science (New York, N.Y.)*, *355*(6325), 638–641.

Li, Q., & Wang, K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *American Journal of Human Genetics*, *100*(2), 267–280.

Li, Z., Yu, J., Zhang, T., Li, H., & Ni, Y. (2013). Rs189037, a functional variant in ATM gene promoter, is associated with idiopathic nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, *100*(6), 1536-1541.e1.

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.

Long, J., Huang, C., Chen, Y., Zhang, Y., Shi, S., Wu, L., Liu, Y., Liu, C., Wu, J., & Lei, M. (2017). Telomeric TERB1-TRF1 interaction is crucial for male meiosis. *Nature structural & molecular biology*, *24*(12), 1073–1080.

Luu, H. N., Huang, J. Y., Wang, R., Adams-Haduch, J., Jin, A., Koh, W.-P., & Yuan, J.-M. (2019). Association between leukocyte telomere length and the risk of pancreatic cancer: Findings from a prospective study. *PLOS ONE*, *14*(8), e0221697.

Ly, K., Walker, C., Berry, S., Snell, R., Marks, E., Thayer, Z., Atatoa-Carr, P., & Morton, S. (2019). Telomere length in early childhood is associated with sex and ethnicity. *Scientific Reports*, *9*.

Mangino, M, Richards, J. B., Soranzo, N., Zhai, G., Aviv, A., Valdes, A. M., Samani, N. J., Deloukas, P., & Spector, T. D. (2009). A genome-wide association study identifies a novel locus on chromosome 18q12.2 influencing white cell telomere length. *Journal of Medical Genetics*, *46*(7), 451–454.

Mangino, Massimo, Brouilette, S., Braund, P., Tirmizi, N., Vasa-Nicotera, M., Thompson, J. R., & Samani, N. J. (2008). A regulatory SNP of the BICD1 gene contributes to telomere length variation in humans. *Human Molecular Genetics*, *17*(16), 2518–2523.

Mangino, Massimo, Christiansen, L., Stone, R., Hunt, S. C., Horvath, K., Eisenberg, D. T. A., Kimura, M., Petersen, I., Kark, J. D., Herbig, U., Reiner, A. P., Benetos, A., Codd, V., Nyholt, D. R., Sinnreich, R., Christensen, K., Nassar, H., Hwang, S.-J., Levy, D., … Aviv, A. (2015). DCAF4, a novel gene associated with leucocyte telomere length. *Journal of Medical Genetics*, *52*(3), 157–162.

Mangino, Massimo, Hwang, S.-J., Spector, T. D., Hunt, S. C., Kimura, M., Fitzpatrick, A. L., Christiansen, L., Petersen, I., Elbers, C. C., Harris, T., Chen, W., Srinivasan, S. R., Kark, J. D., Benetos, A., El Shamieh, S., Visvikis-Siest, S., Christensen, K., Berenson, G. S., Valdes, A. M., … Aviv, A. (2012). Genome-wide meta-analysis points to CTC1 and ZNF676 as genes regulating telomere homeostasis in humans. *Human Molecular Genetics*, *21*(24), 5385–5394.

Marioni, R. E., Harris, S. E., Shah, S., McRae, A. F., von Zglinicki, T., Martin-Ruiz, C., Wray, N. R., Visscher, P. M., & Deary, I. J. (2016). The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *International Journal of Epidemiology*, *45*(2), 424–432.

Meyne, J., Ratliff, R. L., & Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(18), 7049–7053.

Mieusset, R., Bieth, E., Daudin, M., Isus, F., Delaunay, B., Bujan, L., Monteil, L., Fauquet, I., Huyghe, E., & Hamdi, S. M. (2020). Male partners of infertile couples with congenital unilateral absence of the vas deferens are mainly non-azoospermic. *Andrology*, *8*(3), 645–653.

Nagirnaja, L., Lopes, A.M., Charng, W-L., Miller, B., Stakaitis, R., Golubickaite, I., Stendahl, A., Luan, T., Friedrich, C. & Mahyari, E. (2021). Diverse monogenic subforms of human spermatogenic failure. *Saadetud avaldamisele.*

Napier, C. E., Huschtscha, L. I., Harvey, A., Bower, K., Noble, J. R., Hendrickson, E. A., & Reddel, R. R. (2015). ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget*, *6*(18), 16543–16558.

Newton, C. A., Batra, K., Torrealba, J., Kozlitina, J., Glazer, C. S., Aravena, C., Meyer, K., Raghu, G., Collard, H. R., & Garcia, C. K. (2016). Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *The European respiratory journal*, *48*(6), 1710–1720.

Nguyen, T. H. D., Tam, J., Wu, R. A., Greber, B. J., Toso, D., Nogales, E., & Collins, K. (2018). Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature*, *557*(7704), 190–195.

Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, *27*(18), R988–R994.

Oduwole, O. O., Peltoketo, H., & Huhtaniemi, I. T. (2018). Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, *9*.

Okada, K., & Fujisawa, M. (2019). Recovery of Spermatogenesis Following Cancer Treatment with Cytotoxic Chemotherapy and Radiotherapy. *The World Journal of Men's Health*, *37*(2), 166–174.

Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, *41*(1), 181–190.

Pagel, K. A., Pejaver, V., Lin, G. N., Nam, H.-J., Mort, M., Cooper, D. N., Sebat, J., Iakoucheva, L. M., Mooney, S. D., & Radivojac, P. (2017). When loss-of-function is loss of function: Assessing mutational signatures and impact of loss-of-function genetic variants. *Bioinformatics*, *33*(14), i389–i398.

Pech, M. F., Garbuzov, A., Hasegawa, K., Sukhwani, M., Zhang, R. J., Benayoun, B. A., Brockman, S. A., Lin, S., Brunet, A., Orwig, K. E., & Artandi, S. E. (2015). High telomerase is a hallmark of undifferentiated spermatogonia and is required for maintenance of male germline stem cells. *Genes & Development*, *29*(23), 2420–2434.

Pooley, K. A., Bojesen, S. E., Weischer, M., Nielsen, S. F., Thompson, D., Amin Al Olama, A., Michailidou, K., Tyrer, J. P., Benlloch, S., Brown, J., Audley, T., Luben, R., Khaw, K.-T., Neal, D. E., Hamdy, F. C., Donovan, J. L., Kote-Jarai, Z., Baynes, C., Shah, M., … Nordestgaard, B. G. (2013). A genome-wide association scan (GWAS) for mean telomere length within the COGS project: Identified loci show little association with hormone-related cancer risk. *Human Molecular Genetics*, *22*(24), 5056–5064.

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.

Ramos-Ibeas, P., Pericuesta, E., Peral-Sanchez, I., Heras, S., Laguna-Barraza, R., Pérez-Cerezales, S., & Gutiérrez-Adán, A. (2019). Longitudinal analysis of somatic and germ-cell telomere dynamics in outbred mice. *Molecular Reproduction and Development*, *86*(8), 1033–1043.

Reig-Viader, R., Garcia-Caldés, M., & Ruiz-Herrera, A. (2016). Telomere homeostasis in mammalian germ cells: A review. *Chromosoma*, *125*(2), 337–351.

Rice, C., Shastrula, P. K., Kossenkov, A. V., Hills, R., Baird, D. M., Showe, L. C., Doukov, T., Janicki, S., & Skordalakes, E. (2017). Structural and functional analysis of the human POT1-TPP1 telomeric complex. *Nature Communications*, *8*(1), 14928.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & 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*, *17*(5), 405–423.

Rivera, T., Haggblom, C., Cosconati, S., & Karlseder, J. (2017). A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(1), 30–39.

Roake, C. M., & Artandi, S. E. (2020). Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(7), 384–397.

Robles-Espinoza, C. D., del Castillo Velasco-Herrera, M., Hayward, N. K., & Adams, D. J. (2015). Telomere-regulating Genes and the Telomere Interactome in Familial Cancers. *Molecular cancer research : MCR*, *13*(2), 211–222. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0305

Rocca, M. S., Speltra, E., Menegazzo, M., Garolla, A., Foresta, C., & Ferlin, A. (2016). Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. *Human Reproduction*, *31*(6), 1158–1163.

Rode, L., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2016). Long telomeres and cancer risk among 95 568 individuals from the general population. *International Journal of Epidemiology*, *45*(5), 1634–1643.

Salas-Huetos, A., Tüttelmann, F., Wyrwoll, M. J., Kliesch, S., Lopes, A. M., Goncalves, J., Boyden, S. E., Wöste, M., Hotaling, J. M., Conrad, D. F., Aston, K. I., Carrell, D. T., Hotaling, J. M., Nagirnaja, L., Jenkins, T. G., O'Bryan, M. K., McLachlan, R., Schlegel, P. N., Eisenberg, M. L., … GEMINI Consortium. (2021). Disruption of human meiotic telomere complex genes TERB1, TERB2 and MAJIN in men with non-obstructive azoospermia. *Human Genetics*, *140*(1), 217–227.

Serber, D. W., Runge, J. S., Menon, D. U., & Magnuson, T. (2016). The Mouse INO80 Chromatin-Remodeling Complex Is an Essential Meiotic Factor for Spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, *94*(1).

Sharifi-Sanjani, M., Oyster, N. M., Tichy, E. D., Bedi, K. C., Harel, O., Margulies, K. B., & Mourkioti, F. (2017). Cardiomyocyte-Specific Telomere Shortening is a Distinct Signature of Heart Failure in Humans. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, *6*(9).

Shibuya, H., Hernández-Hernández, A., Morimoto, A., Negishi, L., Höög, C., & Watanabe, Y. (2015). MAJIN Links Telomeric DNA to the Nuclear Membrane by Exchanging Telomere Cap. *Cell*, *163*(5), 1252–1266.

Shibuya, H., Ishiguro, K., & Watanabe, Y. (2014). The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis. *Nature Cell Biology*, *16*(2), 145–156.

Shin, Y.-A., Lee, K.-Y., Shin, Y.-A., & Lee, K.-Y. (2016). Low estrogen levels and obesity are associated with shorter telomere lengths in pre- and postmenopausal women. *Journal of Exercise Rehabilitation*, *12*(3), 238–246.

Shukla, S., Schmidt, J. C., Goldfarb, K. C., Cech, T. R., & Parker, R. (2016). Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects. *Nature structural & molecular biology*, *23*(4), 286–292.

Smith, E. M., Pendlebury, D. F., & Nandakumar, J. (2020). Structural biology of telomeres and telomerase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *77*(1), 61–79.

Sobotka, V., Vozdova, M., Heracek, J., & Rubes, J. (2015). A rare Robertsonian translocation rob(14;22) carrier with azoospermia, meiotic defects, and testicular sperm aneuploidy. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *61*(4), 245–250.

Sung, J.-Y., Lim, H.-W., Joung, J.-G., & Park, W.-Y. (2020). Pan-Cancer Analysis of Alternative Lengthening of Telomere Activity. *Cancers*, *12*(8).

Zeiger, A. M., White, M. J., Eng, C., Oh, S. S., Witonsky, J., Goddard, P. C., Contreras, M. G., Elhawary, J. R., Hu, D., Mak, A. C. Y., Lee, E. Y., Keys, K. L., Samedy, L.-A., Risse-Adams, O., Magaña, J., Huntsman, S., Salazar, S., Davis, A., Meade, K., … Burchard, E. G. (2018). Genetic Determinants of Telomere Length in African American Youth. *Scientific Reports*, *8*.

Zeng, Z., Zhang, W., Qian, Y., Huang, H., Wu, D. J. H., He, Z., Ye, D., Mao, Y., & Wen, C. (2020). Association of telomere length with risk of rheumatoid arthritis: A meta-analysis and Mendelian randomization. *Rheumatology*, *59*(5), 940–947.

Zhao, S., Wang, F., & Liu, L. (2019). Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) in Tumors and Pluripotent Stem Cells. *Genes*, *10*(12).

Zheng, W., Nazish, J., Wahab, F., Khan, R., Jiang, X., & Shi, Q. (2019). DDB1 Regulates Sertoli Cell Proliferation and Testis Cord Remodeling by TGFβ Pathway. *Genes*, *10*(12).

Zhu, X., Han, W., Xue, W., Zou, Y., Xie, C., Du, J., & Jin, G. (2016). The association between telomere length and cancer risk in population studies. *Scientific Reports*, *6*(1), 22243.

Zitzmann, M., Aksglaede, L., Corona, G., Isidori, A. M., Juul, A., T'Sjoen, G., Kliesch, S., D'Hauwers, K., Toppari, J., Słowikowska-Hilczer, J., Tüttelmann, F., & Ferlin, A. (2021). European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology. *Andrology*, *9*(1), 145–167.

Tahamtan, S., Tavalaee, M., Izadi, T., Barikrow, N., Zakeri, Z., Lockshin, R. A., Abbasi, H., & Nasr- Esfahani, M. H. (2019). Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. *Scientific Reports*, *9*(1), 4336.

Turner, K. J., Vasu, V., & Griffin, D. K. (2019). Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*, *8*(1).

Vasa-Nicotera, M., Brouilette, S., Mangino, M., Thompson, J. R., Braund, P., Clemitson, J.-R., Mason, A., Bodycote, C. L., Raleigh, S. M., Louis, E., & Samani, N. J. (2005). Mapping

of a Major Locus that Determines Telomere Length in Humans. *American Journal of Human Genetics*, *76*(1), 147–151.

Walsh, K. M., Codd, V., Smirnov, I. V., Rice, T., Decker, P. A., Hansen, H. M., Kollmeyer, T., Kosel, M. L., Molinaro, A. M., McCoy, L. S., Bracci, P. M., Cabriga, B. S., Pekmezci, M., Zheng, S., Wiemels, J. L., Pico, A. R., Tihan, T., Berger, M. S., Chang, S. M., … Wrensch, M. R. (2014). Variants near TERT and TERC influencing telomere length are associated with high-grade glioma risk. *Nature genetics*, *46*(7), 731–735.

Wang, H., Zhang, K., Liu, Y., Fu, Y., Gao, S., Gong, P., Wang, H., Zhou, Z., Zeng, M., Wu, Z., Sun, Y., Chen, T., Li, S., & Liu, L. (2017). Telomere heterogeneity linked to metabolism and pluripotency state revealed by simultaneous analysis of telomere length and RNA-seq in the same human embryonic stem cell. *BMC Biology*, *15*(1), 114.

Wang, J., Dong, X., Cao, L., Sun, Y., Qiu, Y., Zhang, Y., Cao, R., Covasa, M., & Zhong, L. (2016). Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *The Journal of International Medical Research*, *44*(6), 1156–1173.

Wang, X., Wu, X., Zhu, Z., Li, H., Li, T., Li, Q., Zhang, P., Li, L., Che, D., Xiao, X., Liu, T., Hua, J., & Liao, M. (2019). Landscape of RNA editing reveals new insights into the dynamic gene regulation of spermatogenesis. *Cell Cycle*, *18*(23), 3351–3364.

Watson, J. D. (1972). Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*, *239*(94), 197–201.

Whittemore, K., Vera, E., Martínez-Nevado, E., Sanpera, C., & Blasco, M. A. (2019). Telomere shortening rate predicts species life span. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(30), 15122–15127.

WHO laboratory manual for the examination and processing human semen. (2010). / Koost Maailma Tervisehoiuorganisatsioon. 5. tr. Šveits. Maailma Tervisehoiuroganisatsioon

Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., & Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & Development*, *11*(21), 2801–2809.

Wynchank, D., Bijlenga, D., Penninx, B. W., Lamers, F., Beekman, A. T., Kooij, J. J. S., & Verhoeven, J. E. (2019). Delayed sleep-onset and biological age: Late sleep-onset is associated with shorter telomere length. *Sleep*, *42*(zsz139).

Yang, Q., Luo, X., Bai, R., Zhao, F., Dai, S., Li, F., Zhu, J., Liu, J., Niu, W., & Sun, Y. (2018). Shorter leukocyte telomere length is associated with risk of nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, *110*(4), 648-654.e1.

Yang, Q., Zhao, F., Dai, S., Zhang, N., Zhao, W., Bai, R., & Sun, Y. (2015). Sperm telomere length is positively associated with the quality of early embryonic development. *Human Reproduction*, *30*(8), 1876–1881.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

ClinVar andmebaas, külastatud mai 2021
www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/

DOMINO andmebaas, külastatud november 2020
wwwfbm.unil.ch/domino/index.html

Franklin andmebaas, külastatud mai 2021
franklin.genoox.com

GEMINI koduleht, külastatud märts 2021
gemini.conradlab.org

gnomAD andmebaas, külastatud mai 2021
gnomad.broadinstitute.org

Human Protein Atlas (HPA) andmebaas, külastatud mai 2021
www.proteinatlas.org

Maailma Tervishoiuorganisatsiooni veebilehekülg, külastatud aprill 2021
www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility

Mouse Genome Informatics (MGI) andmebaas, külastatud mai 2021
www.informatics.jax.org

National Center of Biotechnology Information (NCBI) andmebaas, külastatud mai 2021
www.ncbi.nlm.nih.gov

PubMed andmebaas, külastatud mai 2021
pubmed.ncbi.nlm.nih.gov

STRING andmebaas, külastatud aprill 2021
string-db.org

University of California Santa Cruz (UCSC) genoomibrauser, külastatud mai 2021
genome.ucsc.edu

Varsome andmebaas, külastatud mai 2021
varsome.com

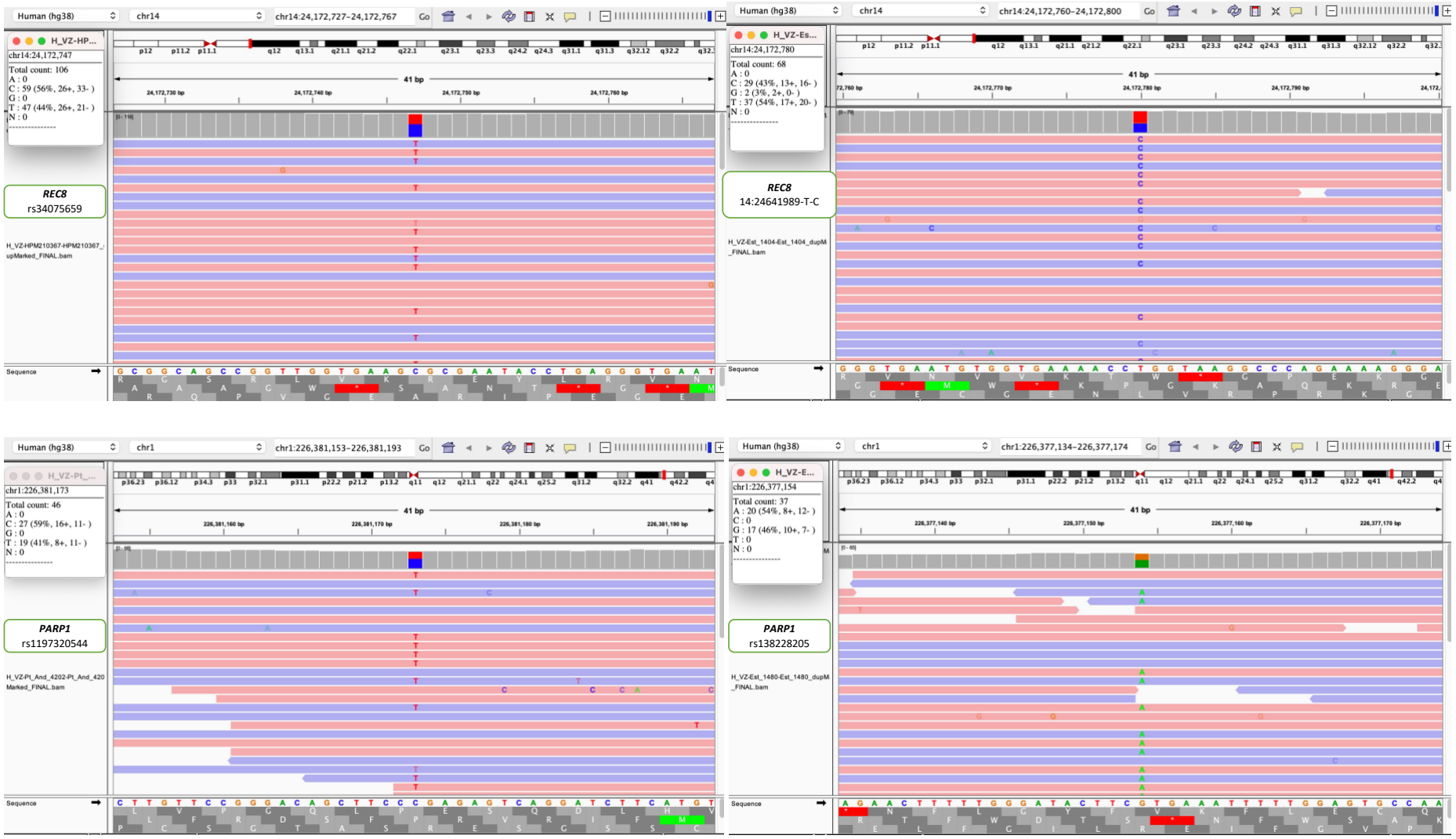
Ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute kataloog, külastatud mai 2021
www.ebi.ac.uk/gwas/home

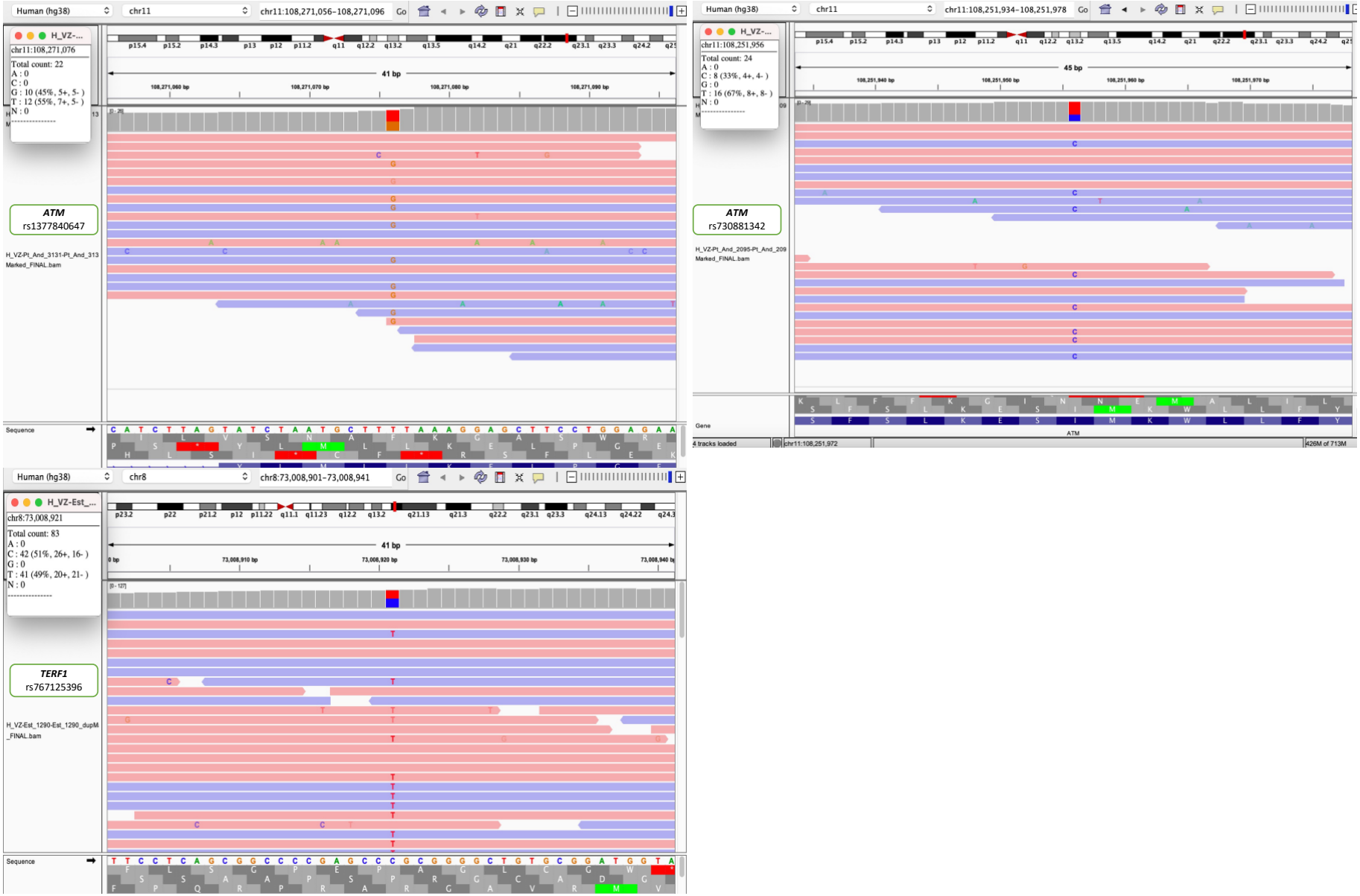
LISAD

Lisa 1. Telomeeride pikkusega seotud ülegenoomsetest assotsiatsiooniuuringutest tuvastatud kandidaatgeenid ja variandid.

Geen	SNP	Viide
ACYP2	rs11125529	Codd jt., 2013
	rs10165485	Pooley jt., 2013
ASCC2	rs73394838	Lee jt., 2014
ATM	rs228595	Lit jt., 2020
BCL2L1	rs6060627	Pooley jt., 2013
CABLES1	rs9675924	Zeiger jt., 2018
CARMIL1	rs34991172	Li jt., 2020
CCBE1	rs1791285	Levy jt., 2010
CCDC93	rs13432259	Levy jt., 2010
CNTNAP5	rs10189889	Levy jt., 2010
CTC1	rs3027234	Mangino jt., 2012
DCAF4	rs2535913	Mangino jt., 2015
	rs2302588	Li jt., 2020
DDX18	rs6712766	Levy jt., 2010
DHX35	rs6028466	Gu jt., 2011
DKK2	rs11732697	Lee jt., 2014
KPNA5	rs654128	Gu jt., 2011
LRFN5	rs1483898	Zeiger jt., 2018
MOB1B	rs13137667	Li jt., 2020
MPHOSPH6	rs7194734	Li jt., 2020
NAF1	rs7675998	Codd jt., 2013
	rs4691895	Li jt., 2020
NCR2	rs9357354	Delgado jt., 2018
OBFC1	rs9420907	Codd jt., 2013
	rs9419958	Mangino jt., 2012; Pooley jt., 2013; Li jt., 2020
	rs4387287	Levy jt., 2010
	rs2487999	Pooley jt., 2013
ONECUT1	rs28790308	Delgado jt., 2018
PARP1	rs1151814	Delgado jt., 2018
	rs3219104	Li jt., 2020
PELI2	rs398652	Gu jt., 2011
PIK3C3	rs2162440	Mangino jt., 2009
	rs7235755	Mangino jt., 2009
PODXL	rs12534413	Levy jt., 2010
POT1	rs59294613	Li jt., 2020
PRR20A	rs9537514	Delgado jt., 2018
PXK	rs6772228	Pooley jt., 2013
RFWD3	rs62053580	Li jt., 2020
RTEL1	rs2297439	Delgado jt., 2018
	rs6010620	Walsh jt., 2014
	rs75691080	Li jt., 2020
SENP7	rs55749605	Li jt., 2020
SYT16	rs4902100	Lee jt., 2014
TERC	rs10936599	Codd jt., 2013
	rs12696304	Codd jt., 2010
	rs16847897	Codd jt., 2010
	rs12638862	Delgado jt., 2018
	rs1317082	Mangino jt., 2012; Pooley jt., 2013
	rs3772190	Levy jt., 2010
	rs1920116	Walsh jt., 2014
	rs10936600	Li jt., 2020
TERF2	rs3785074	Li jt., 2020
TERT	rs2736100	Codd jt., 2013; Walsh jt., 2014
	rs7705526	Delgado jt., 2018
TMPRSS7	rs16859140	Lee jt., 2014
TRDMT1	rs10904887	Lee jt., 2014
TSHZ2	rs56290013	Lee jt., 2014
TTC37	rs4305653	Zeiger jt., 2018
WDR65	rs621559	Gu jt., 2011
ZNF208	rs8105767	Li jt. 2020
ZNF311	rs9257445	Pooley jt., 2013
ZNF676	rs412658	Mangino jt., 2012

Lisa 2. Telomeeride pikkusega seotud kandidaatgeenide harvade variantide analüüsist tuvastatud variandid ning nende väljavõtted IGV programmist.




Human (hg38)
chr11
chr11:108,271,056-108,271,096
chr11:108,271,076
Total count: 22
A : 0
C : 0
G : 10 (45%, 5+, 5-)
T : 12 (55%, 7+, 5-)
N : 0
41 bp
ATM
rs1377840647
H_VZ-Pt_And_3131-Pt_And_313
Marked_FINAL.bam
Sequence
Human (hg38)
chr11
chr11:108,251,934-108,251,978
chr11:108,251,956
Total count: 24
A : 0
C : 8 (33%, 4+, 4-)
G : 0
T : 16 (67%, 8+, 8-)
N : 0
45 bp
ATM
rs730881342
H_VZ-Pt_And_2095-Pt_And_209
Marked_FINAL.bam
Gene
ATM
4 tracks loaded
chr11:108,251,972
426M of 713M
Human (hg38)
chr8
chr8:73,008,901-73,008,941
chr8:73,008,921
Total count: 83
A : 0
C : 42 (51%, 26+, 16-)
G : 0
T : 41 (49%, 20+, 21-)
N : 0
41 bp
TERF1
rs767125396
H_VZ-Est_1290-Est_1290_dupM
_FINAL.bam
Sequence

LIHTLITSENTS

Mina, Anna-Grete Juchnewitsch

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Telomeeride pikkust mõjutavad geneetilised variandid viljatutel meestel ja nende roll spermatogeneesihäiretes“, mille juhendajad on Maris Laan ja Laura Kasak, 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 Commonsi 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 **03.06.2024** 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.

Anna-Grete Juchnewitsch
03.06.2021