

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ja
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
INIMESE GENEETIKA ÕPPETOOL

**Kardiometaboolsete sekundaarsete leidude esinemine Eesti idiopaatilise mehepoolse
viljatusega patsientidel ja kontrollindiviididel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Triin Veinberg

Juhendajad: Kristiina Lillepea, MSc
Laura Kasak, PhD
Tambet Tõnissoo, PhD

TARTU 2023

INFOLEHT

„Kardiometaboolsete sekundaarsete leidude esinemine Eesti idiopaatilise mehepoolse viljatusega patsientidel ja kontrollindiviididel“

Meeste viljatust peetakse üldise tervise seisukohalt oluliseks biomarkeriks ning paljud teadustööd on kinnitanud krooniliste haiguste kõrgemat riski viljatutel indiviididel. Genoomi ja eksoomi sekveneerimiste laiem kasutuselevõtt toob endaga kaasa sekundaarsete leidude tuvastamise, mis on patsiendi primaarsest seisundist kõrvalekalduv kliiniliselt oluline geneetiline leid. Sekundaarsed leiud hõlmavad sekkumistõhusaid monogeenseid ehk ühe geeni muutusest tingitud haigusi ning Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium on avaldanud miinimumnimekirja selliste haigustega seotud geenidest. Käesolev bakalaureusetöö testib hüpoteesi, mille kohaselt on sekundaarsete leidude levimus suurem viljatute meeste hulgas võrreldes viljakate meestega. Töö tulemusel leiti 17 haigusseoselist varianti, millest 10 esinesid viljatutel (1,9%) ja seitse viljakatel (2,2%) meestel. Hüpotees kinnitust ei leidnud.

Märksõnad: sekundaarsed leiud, monogeensed haigused, mehepoolne viljatus

CERCS kood: B220 geneetika, tsütogeneetika; B570 sünnitusabi, günekoloogia, androloogia, paljunemine, seksuaalsus; B790 kliiniline geneetika

„Prevalence of cardiometabolic secondary findings in Estonian idiopathic male infertility patients and control subjects“

Male infertility is considered an important biomarker for overall health and many studies have confirmed a higher risk of chronic diseases in infertile individuals. Genome and exome sequencing leads to the identification of secondary findings which are clinically significant genetic findings unrelated to the patient's primary condition. Secondary findings include actionable monogenic diseases, and the American College of Medical Genetics and Genomics has published a minimum list of genes related to such diseases. This bachelor thesis tests the hypothesis that the prevalence of secondary findings is higher among infertile men compared to fertile men. As a result, 17 disease-related variants were found, of which 10 occurred in infertile (1.9%) and seven in fertile (2.2%) men. The hypothesis was not confirmed.

Keywords: secondary findings, monogenic diseases, male factor infertility

CERCS code: B220 genetics, cytogenetics; B570 obstetrics, gynaecology, andrology, reproduction, sexuality; B790 clinical genetics

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Mehepoolne viljatus.....	7
1.1.1. Kvantitatiivsed spermatogeneesihäired	7
1.1.2. Krüptorhism.....	8
1.2. Mehepoolse viljatuse geneetilised põhjused	8
1.2.1. Mehepoolse viljatuse monogeensed põhjused.....	9
1.2.2. Mehepoolne viljatus ja kardiometaboolsed haigused.....	10
1.3. Sekundaarsed geneetilised leiud.....	12
1.3.1. Eksoomi ja genoomi sekveneerimine	12
1.3.2. Sekundaarsed leiud eksoomi ja genoomi sekveneerimisel.....	12
1.3.3. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi sekundaarsete leidude geeniloend.....	12
1.3.4. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi geeniloendi täiendamine TTN näitel	13
1.3.5. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi geeniloendi kardiometaboolsete haigustega seotud geenid.....	14
1.3.6. Sekundaarsete leidude levimus.....	16
1.3.7. Geenivariantide patogeensuse hindamine	18
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1. Töö hüpotees ja eesmärgid.....	20
2.2. Materjal ja metoodika.....	20

2.2.1.	Uurimistöö etapid ja ülesehitus	20
2.2.2.	Valimi kirjeldus	21
2.2.3.	Eksoomi sekveneerimisandmed	22
2.2.4.	Geenivariantide prioritseerimine ja patogeensuse hindamine	23
2.2.5.	Haigusseoseliste variantide statistiline analüüs	25
2.3.	Tulemused	26
2.3.1.	Kardiometaboolsete sekundaarsete leidude esinemine Ameerika Meditisiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi geeniloendist lähtudes	26
2.3.2.	Sekundaarsete leidude jagunemine vastavalt hinnangule ja tagajärjele	28
2.3.3.	Sekundaarsete leidude jagunemine Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi nimekirja kardiometaboolsetes geenides	28
2.3.4.	Sekundaarsete leidude võrdlus viljatus- ja kontrollgrupi vahel.....	29
2.4.	Arutelu	30
KOKKUVÕTE.....		34
SUMMARY		35
TÄNUAVALDUSED		37
KIRJANDUSE LOETELU		38
TÖÖS KASUTATUD VEEBIAADRESSID		53
LIHTLITSENTS.....		54

KASUTATUD LÜHENDID

ACMG – Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium (*The American College of Medical Genetics and Genomics*)

AMP – Molekulaarse Patoloogia Ühing (*Association for Molecular Pathology*)

AZF – azoospermia faktor

B – healoomuline (*benign*)

ClinGen – *Clinical Genome Resource*

ESTAND – *Estonian Andrology*

FIMM – Soome Molekulaarse Meditsiini Instituut (*Institute for Molecular Medicine Finland*)

GEMINI – *GEnetics of Male INFertility Initiative*

IGV – *Integrative Genomics Viewer*

KS – Klinefelteri sündroom

LB – tõenäoliselt healoomuline (*likely benign*)

LoF – funktsioonikadu (*loss-of-function*)

LP – tõenäoliselt patogeenne (*likely pathogenic*)

NCBI – Riiklik Biotehnoloogia Teabekeskus (*National Library of Medicine*)

NGS – järgmise põlvkonna sekveneerimine (*next generation sequencing*)

NOA – mitteobstruktiivne azoospermia (*non-obstructive azoospermia*)

OA – obstruktiivne azoospermia

P – patogeenne

SF – sekundaarne leid (*secondary finding*)

VEP – *Variant Effect Predictor*

VUS – ebaselge tähtsusega variant (*variant of uncertain significance*)

WES – kogu eksoomi sekveneerimine (*whole exome sequencing*)

WGS – kogu genoomi sekveneerimine (*whole genome sequencing*)

SISSEJUHATUS

Mehepoolne viljatus mõjutab ülemaailmselt hinnanguliselt 7% meestest ning 15% juhtudest on tingitud geneetilistest teguritest (Agarwal *et al.*, 2015; Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Meeste viljatuse põhjused on heterogeensed, kuid kuni 60%-l juhtudest jääb viljatuse põhjus tuvastamata (Punab *et al.*, 2017). Mitmed uuringud on kinnitanud, et viljatusega kaasneb tihtipeale ka kõrgeenenud risk krooniliste haiguste tekkeks, näiteks südame-veresoonkonna ja ainevahetushaigused (Eisenberg *et al.*, 2015, 2016; Punab *et al.*, 2017).

Sekundaarsed leiud on geneetilise testimise käigus leitud geenivariandid, mis ei ole seotud patsiendi esmase seisundiga (Green *et al.*, 2013). Sekundaarsed leiud hõlmavad sekkumistõhusaid monogeenseid ehk ühe geeni muutusest tingitud haiguseid. Täisgenoomi ja -eksoomi sekveneerimise integreerumine igapäevasesse kliinilisse praktikasse võimaldab analüüsida juba teadaolevaid pärilike haigustega seotud geene, mis võivad sisaldada sekundaarseid leide. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium on avaldanud nimekirja geenidest, mida genoomi/eksoomi sekveneerimisel silmas pidada (Alfares *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2022). Enamike nimekirjas olevate geenidega seotud haigustel on olemas varase diagnoosimise ja testimise võimalus ning tõhus ravi, mistõttu õigeaegne sekkumine on elulise tähtsusega (Miller *et al.*, 2022).

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaade keskendub meeste viljatuse erinevatele vormidele ja nende geneetilistele põhjustele, genoomi/eksoomi sekveneerimisele ja nende käigus avastatud sekundaarsetele leidudele ning nende levimuse ja tähtsuse selgitamisele. Töö eksperimentaalse eesmärgiks oli tuvastada pärilike monogeensete südame-veresoonkonna ja ainevahetushaiguste ehk kardiometaboolsete fenotüüpidega seotud geenide haigusseoselised variandid ning ühtlasi testida hüpoteesi, mille kohaselt esineb mehepoolse viljatusega patsientidel rohkem sekundaarseid leide kui viljakatel kontrollgrupi indiviididel.

Käesolev töö on läbiviidud Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis inimese geneetika õppetoolis.

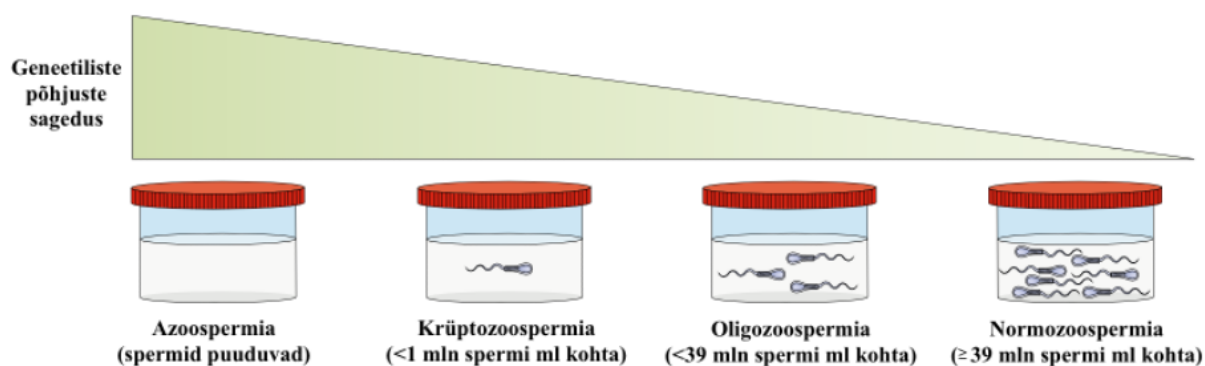
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mehepoolne viljatus

Mehepoolne viljatus on keeruline ja mitmetest teguritest tingitud patoloogiline haigus, mis on fenotüübiliselt väga heterogeenne ning mõjutab ligikaudu 7% meestest üle maailma (Agarwal *et al.*, 2015; Krausz, 2011). Mehepoolse viljatuse võib jagada neljaks suuremaks etioloogiliseks kategooriaks: hüpotalamuse-hüpofüüsi-sugunäärme teljega seotud häired, kvantitatiivsed ja kvalitatiivsed spermatogeneesihäired ning seemnerakkude liikumisteede (munandimanused, seemnejuhad, purskejuhad) sulgus ehk obstruktsioon või talitlushäired. Kvalitatiivne häire mõjutab spermide morfoloogiat ja liikuvust. Kvantitatiivsed spermatogeneesihäired väljenduvad kahjustunud spermatogeneesi protsessides, mis mõjutavad negatiivselt spermide tootmist ja arvukust (Tournaye *et al.*, 2017). Teatud juhtudel võib mehepoolne viljatus osutada tõsisemale tervises seisundi muutusele (Leslie *et al.*, 2023).

1.1.1. Kvantitatiivsed spermatogeneesihäired

Meeste viljatuse kõige raskem vorm on azoospermia ehk seemnerakutus, mis viitab spermide täielikule puudumisele seemnevedelikus (joonis 1). Azoospermia võib klassifitseerida järgnevalt: obstruktiivne (OA) või mitteobstruktiivne (*non-obstructive azoospermia* – NOA) (Agarwal *et al.*, 2021). OA näol on tegemist munandimanuse ehk epididiumi juhade, seemne- või purskejuhade obstruktsiooniga, mis mõjutab spermatogeneesi protsesse negatiivselt (Llabador *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2020). NOA on tingitud peamiselt kaasasündinud teguritest, mille tagajärjeks on puudulik spermatogenees (Kasak & Laan, 2021). Azoospermia puudutab ligi 1% meestest ning 30% haigusjuhtudest on obstruktiivsed ja ülejäänud 70% NOA juhud (Kasak & Laan, 2021; Tournaye *et al.*, 2017).



Joonis 1. Erinevat tüüpi kvantitatiivsed spermatogeneesihäired ja geneetiliste faktorite sagedus igas kategoorias. Pöördvõrdeline korrelatsioon esineb spermide arvukuse ja geneetiliste põhjuste sageduse vahel. Kohandatud Krausz & Riera-Escamilla, 2018 järgi.

Krüptozoospermia on kvantitatiivne spermatogeneesihäire, mille korral puuduvad seemnerakud värsketes spermaproovides, kuid esinevad tsentrifuugitud preparaatides (spermide arvukus seemnevedelikus alla 1 mln/ml) (joonis 1) (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Bioloogilisest vaatenurgast on NOA ja krüptozoospermia lähedalt seotud ning seda ka kliiniliste mõjude osas – viljastamine on praktiliselt võimatu (World Health Organization, 2021).

Oligozoospermia on kvantitatiivne spermatogeneesihäire, mille korral on spermide arv alla 39 mln 1 ml seemnevedeliku kohta (joonis 1) (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

1.1.2. Krüptorhism

Krüptorhism ehk peitmunandilisus on munandi laskumishäire, mis väljendub ühe või mõlema munandi puudumises munandikotis ehk skrootumis. Krüptorhism on kõige sagedam sisesekreetsiooninäärmete ja suguelunditega seotud häire poisslastel, mis võib esineda üksikjuhtumina või seoses teiste kaasasündinud häiretega (Kolon *et al.*, 2014). Haigus levimus on ligi 2-9% vastsündinud poisslaste seas ning 1-3%-l pole laskumist toimunud kolmandaks elukuuks (Hutson & Thorup, 2015). Aastatel 2012-2015 Tartu Ülikooli Kliinikumis läbiviidud uuring leidis, et 1,6%-l valimist esines krüptorhism sünnil, 1%-l kolmandal elukuul ja 0,8%-l kuuendal elukuul (Kübarsepp *et al.*, 2022). Juhul kui laskumine pole toimunud kuuendaks elukuuks, on vähetõenäoline, et munandid peale seda spontaanselt laskuvad (Shin & Jeon, 2020).

Krüptorhismi patsientidel on kõrge risk viljatuseks ja munandivähi tekkeks (Cobellis *et al.*, 2014). Austraalias läbiviidud uuringu põhjal selgus, et tervete meestega võrreldes on krüptorhismi patsientidel märkimisväärselt vähenenud munandi- ja seemnevedelikumaht ning samuti spermide kontsentratsioon (Hart *et al.*, 2015). Lisaks on ligikaudu 17% azoospermia juhtudest otseselt seotud varases eas esinenud krüptorhismiga (Olesen, *et al.*, 2017).

1.2. Mehepoolse viljatuse geneetilised põhjused

Mehepoolset viljatust võivad põhjustada mitmed tervisehäired ja riskitegurid, mis jagunevad omandatud ja kaasasündinud ehk geneetilisteks spermatogeneesi kahjustavateks faktoriteks (Agarwal *et al.*, 2021). 30-60%-l juhtudest jääb viljatuse põhjus tuvastamata ning viljatus klassifitseeritakse kui idiopaatiline ehk selgitamata (Agarwal *et al.*, 2021; Jungwirth *et al.*, 2012; Punab *et al.*, 2017).

Geneetilised tegurid põhjustavad vähemalt 15% meeste viljatusjuhtumitest (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Peamised teadaolevad geneetilised meeste viljatuse põhjustajad on bialleelsetest haigusseoselistest ehk patogeensetest muutustest *CFTR* (*CF transmembrane conductance regulator*) geenis tingitud kaasasündinud kahepoolne seemnejuha puudumine (*congenital bilateral absence of vas deferens* – CBAVD), kromosomaalsed kõrvalekalded ja Y-kromosoomi mikroleetsioonid, mis viivad eraldiseisvate spermatogeneesi defektide kujunemiseni (Agarwal *et al.*, 2021).

Klinefelteri sündroom (KS) on kõige sagedam geneetiline meeste viljatuse põhjustaja. On leitud, et KS põhjustab kuni 10% azoospermia juhtumitest ning moodustab kuni 2% viljatusjuhtumitest üldises meeste populatsioonis (Vloeberghs *et al.*, 2018). Klinefelteri sündroomi puhul on tegemist 47,XXY karüotüübiga. Haiguse fenotüübid on varieeruvad, kuid lisaks ühele või mitmele lisa X-kromosoomile on tüüpilised KS-i tunnused ka hüpogonadotroopne hüpogonadism (madal luteiniseeriva hormooni ja folliikuleid stimuleeriva hormooni tase), testosterooni puudulikkus ning viljatus (Groth *et al.*, 2013).

Azoospermia ja oligozoospermia kõige sagedamad geneetilised põhjused on Y-kromosoomis asuva azoospermia faktori (*AZF*) piirkonna mikroleetsioonid ja ülalmainitud KS (Krausz & Riera-Escamilla, 2018; Oud *et al.*, 2017). *AZF* on regioon, mis paikneb Y-kromosoomi pikas õlas ja reguleerib spermatogeneesi ning selle deletsioon võib esile kutsuda spermatogeneesi seiskumist ja selle tagajärjel ka viljatust (Liu, 2012). Kim *et al.* (2017) poolt läbiviidud uuringus leiti, et Y-kromosoomi mikroleetsioonid esinesid 14%-l NOA patsientidest ja 20%-l oligozoospermia patsientidest.

Rohkem kui 20% kindlaks määratud mehepoolse viljatuse geenidest on seotud spermiogeneesiga (spermatogeneesi viimane etapp, mille käigus omandab spermatiid liikumisvõime ning tulemuseks on küps sperm) ja haruldaste kvalitatiivsete spermatogeneesihäiretega. See-eest geene, mis vastutavad varases etapis toimunud spermatogeneesihäirete eest ja moodustavad suurema osa monogeensetest azoospermia juhtudest, on kindlaks määratud palju vähem (Laan, 2019).

1.2.1. Mehepoolse viljatuse monogeensed põhjused

Kaasasündinud haigused, mis on põhjustatud patogeensest geneetilisest muutusest ehk mutatsioonist ühes geenis, nimetatakse monogeenseteks haigusteks. Monogeensete haiguste esinemissagedus on keskmiselt 1% (Benjamin *et al.*, 2016).

Mehepoolse viljatuse monogeensete põhjuste uurimine ja kaardistamine on olnud aeglane protsess (Laan *et al.*, 2021). Aastaks 2021 oli tuvastatud 104 geeni, mis olid seotud 120 mehepoolse viljatuse fenotüübiga. Siiski on tegemist alamfenotüüpidega, mida kohatakse harva (Houston *et al.*, 2021). Kindlaks tehtud monogeensete põhjuste (<1,5% juhtudest) hulgast on leitud põhjuslikud seosed OA ja CBAVD ning *CFTR* ja *ADGRG2* (*adhesion G protein-coupled receptor G2*) geenide vahel (Agarwal *et al.*, 2021; Patat *et al.*, 2016). Spermatogeneesis ja munandite funktsiooni regulatsioonis osalevate geenide arv on suur, mistõttu NOA monogeensed põhjused on väga heterogeensed (Chalmel *et al.*, 2012; Soraggi *et al.*, 2021). Spermatogeneesi eri etappidega, eriti esimese meiootilise jagunemisega (sekundaarsete spermatotsüütide teke) seotud geenides toimunud mutatsioonide tagajärgedeks on NOA ja seemnerakkude küpsemise peatumine või Sertoli-raku sündroom (Kasak & Laan, 2021). Suure kategooria moodustavad NOA fenotüüpi põhjustavad geenimutatsioonid, mis on seotud hüpotalamuse-hüpofüüsi-sugunäärme teljega (Laan, 2019).

1.2.2. Mehepoolne viljatus ja kardiometaaboolsed haigused

Ligikaudu 10% inimese genoomist on seotud reproduktiivse tervisega, mistõttu pole välistatud, et geneetiline muutus, mis mõjutab viljakust, võib mõjutada ka teisi süsteeme organismis (Choy & Eisenberg, 2018). Leidub üha rohkem tõendeid, mis viitavad asjaolule, et mehepoolne viljatus on tugevalt seotud mitmete haigusseisunditega. Näiteks 2015. aastal avaldatud ristlõikeuuring, mis keskendus seemnevedeliku kvaliteedi ja üldise tervise vahelise suhte uurimisele, näitas, et 44%-l valimist (9387 viljatut meest) esines üks ning 30%-l valimist kaks või enam kaasuvat haigust (Eisenberg *et al.*, 2015). Ameerika Ühendriikides viidi läbi uuring, mille eesmärgiks oli välja selgitada krooniliste haiguste esinemissagedus viljatusega diagnoositud meestel. Leiti, et viljatutel meestel oli võrreldes kontrollgrupiga kõrgem risk mitmete haiguste tekkeks, näiteks diabeet, südame isheemiatõbi ja depressioon (Eisenberg *et al.*, 2016).

Mitmed kardiovaskulaarsetele haigustele keskendunud teadustööd on kinnitanud, et südamehaiguste esinemissagedus viljatute meeste seas on märgatavalt kõrgem kui viljakatel meestel. Taiwanis viidi läbi retrospektiivne kohortuuring ligikaudu 11 600 mehe seas, kellest 2326 (20%) oli diagnoositud viljatus ja ülejäänud olid viljakad. Tulemuste põhjal selgus, et viljatutel meestel oli 1,5 korda kõrgem risk südame-veresoonkonna haiguste nagu kõrgvererõhktõve, isheemiatõve ning südame-reuma tekkeks kui kontrollgrupil (Chen *et al.*, 2022). Sarnane kohortuuring viidi läbi Taanis, kus analüüsiti sperma kvaliteedi ja haigestumuse

suhet. Uurimustulemustest selgus, et meestel, kelle seemnerakkude kontsentratsioon jäi alla 15 mln/ml, oli 50% suurem tõenäosus sattuda haiglasse mõne haigusseisundi tagajärjel ja 40% suurem risk kardiovaskulaarse haiguse esinemiseks, kui meestel, kelle seemnerakkude kontsentratsioon oli üle 40 mln/ml (Latif *et al.*, 2017). Kasman *et al.* (2019) kinnitasid oma uuringuga kardiovaskulaarsete haiguste suuremat levimust viljatute meeste seas ning seda olenemata osalejate rassist, elamispiirkonnast ning sotsiaalmajanduslikust taustast.

Sarnaselt kardiovaskulaarsetele haigustele on leitud seoseid metaboolse tervise ja viljatuse vahel. Xu *et al.* (2020) võrdlesid tervete kontrollide ja erinevate viljatusdiagnoosidega patsientide seminaalplasma (ejakulaadi tsentrifuugimisel saadud sademepealne vedelik) metaboolset koostist ning tegid kindlaks, et 17 metaboliidi tase mõjutas otseselt sperma parameetreid. Nii energia tootmise kui ka hormonaalse regulatsiooniga seotud metaboliitide tase oli korrelatsioonis spermide kontsentratsiooni ja morfoloogiliste muutustega (Xu *et al.*, 2020). Mehepoolse viljatuse seost metaboolsete fenotüüpidega on enim uuritud metaboolse sündroomi ning tüüp 1 ja 2 diabeedi näol. Condorelli *et al.* (2018) teadustöös järeldus, et tüüp 1 ja 2 diabeediga patsientide seemnerakkude kontsentratsioon seemnevedelikus oli oluliselt madalam võrreldes kontrollgrupiga. Tartu Ülikooli Kliinikumi meestekliinikus läbiviidud ristlõikeuuringu tulemused näitasid, et metaboolne sündroom mõjutas testosteroonitaset ning oli tunduvalt rohkem levinud viljatute meeste seas (Ehala-Aleksejev & Punab, 2018).

Kõike seda arvesse võttes võib mehepoolne viljatus osutada potentsiaalseks biomarkeriks tervise seisukohalt hilisemas elus.

1.3. Sekundaarsed geneetilised leiud

1.3.1. Eksoomi ja genoomi sekveneerimine

Viimasel aastakümnel on genoomiuuringud jõudsalt arenenud tänu uute sekveneerimistehnoloogiate väljatöötamisele, mida kutsutakse järgmise põlvkonna sekveneerimiseks (*next generation sequencing* – NGS) (Stranneheim & Wedell, 2016). NGS võimaldab järjestada kiirelt suurel hulgal DNA segmente kuni kogu genoomini välja.

Üheks NGS-i meetodiks on kogu eksoomi sekveneerimine (*whole exome sequencing* – WES), mis võimaldab kiirelt ja tõhusalt analüüsida kõigi geenide kodeerivaid järjestusi ehk eksoneid (Yang *et al.*, 2014). Teine meetod on kogu genoomi sekveneerimine (*whole genome sequencing* – WGS), mis määrab nii kodeerivate kui ka mitte-kodeerivate alade järjestuse (Alfares *et al.*, 2018). WGS katab kuni 98% inimgenoomist, samas kui WES katab kuni 95% kodeerivatest aladest, kuid ainult 1-2% genoomist. Ometi eelistatakse hetkeseisuga veel WES-i, sest ligi 85% haigusseoselistest variantidest asuvad just kodeerivas alas (Majewski *et al.*, 2011). Lisaks sellele on WES-il proovi kohta madalam hind, sihtpiirkondades suurem katvus ning lihtsam andmetöötlus (Alfares *et al.*, 2018; Saunders *et al.*, 2012).

1.3.2. Sekundaarsed leiud eksoomi ja genoomi sekveneerimisel

Aina rohkem kasutatakse eelnimetatud WES/WGS meetodeid kliinilises praktikas uurimaks geneetilisi haiguseid ja nende pärandumismustreid (Alfares *et al.*, 2018). WES-i ja WGS-i laiem kasutuselevõtt suurendab juhuleidude tuvastamise tõenäosust, kuid võimaldab analüüsida ka juba teadaolevaid pärilike haigustega seotud genee, mis võivad sisaldada sekundaarseid leide (Kalia *et al.*, 2016). Geneetilised sekundaarsed leiud (*secondary findings* – SF) on defineeritud kui geenivariandid, mida otsitakse aktiivselt määratletud nimekirja kuuluvate geenide hulgast ning mis ei ole seotud patsiendi primaarse haiguse ega seisundiga (Green *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2022).

1.3.3. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi sekundaarsete leidude geeniloend

Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium (*The American College of Medical Genetics and Genomics* – ACMG) on avaldanud miimumnimekirja sekkumistõhusatest pärilike haigustega seotud geenidest, mida peaks silmas pidama kliinilisi WES/WGS läbi viies (Miller *et al.*, 2022). ACMG SF nimekirja fookus on geenidel, mis on seotud pärilike

monogeensete haigustega, mistõttu kaasati loendisse geenid, kus enamik patogeenseid variante oleksid tuvastatavad rutiinse WES-i käigus (Green *et al.*, 2013; Kalia *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2021).

Üha suuremal määral WES-i ja WGS-i integreerimine kliinilisse ravisse tõi kaasa otsuse, et ACMG SF geeniloendit tuleks uuendada igal aastal eesmärgiga säilitada seda miinimumloendina (Kalia *et al.*, 2016). Uus versioon võib sisaldada suuremaid või väiksemaid muudatusi. Suuremate parandustega versioon hõlmab kontseptsioonilisi muutusi geeni kategooriate osas või suurel hulgal geenide lisamist/eemaldamist. Sellise versiooni number ümardatakse järgmiseks täisarvuks (v2.0, v3.0 jne). Väiksemate muudatustega versioon kujutab endast mõne üksiku geeni lisamist/eemaldamist, ilma et loendi ülesehitus muutuks. Sellise versiooni numbrile lisatakse komakoht (v3.1, v3.2 jne) (Miller *et al.*, 2022).

Viimane versioon – ACMG SF v3.1 (2022) koosneb 78 geenist, mis on seotud erinevate haigustega vähist kuni südamehaigusteni. Võrreldes v3.0-ga lisandus viis uut geeni: *BAG3* (*BAG cochaperone 3*), *DES* (*desmin*), *RBM20* (*RNA binding motif protein 20*), *TNNC1* (*troponin C1, slow skeletal and cardiac type*), *TTR* (*transthyretin*), millest viimane on seotud päriliku *TTR*-seoselise amüloidoosiga ja ülejäänud dilatatiivse kardiomiopaatia (Miller *et al.*, 2022).

1.3.4. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi geeniloendi täiendamine *TTN* näitel

ACMG SF täiendamisel võetakse arvesse potentsiaalse SF-i meditsiinilise sekkumise võimalust, geeni avaldumist ja penetrantsust (sagedus, millega konkreetne genotüüp avaldub selle kandjate fenotüübis) ning koormust, mis langeks laboritele ja meditsiinasutustele (Green *et al.*, 2013). Geen *TTN* (*titin*) on seotud dilatatiivse kardiomiopaatia ning varajane sekkumine *TTN* haigusseoseliste variantide puhul annaks patsiendile võimaluse haigust ennetada ja/või õigeaegselt raviga alustada. *TTN*-i penetrantsuse uurimine on aga raskendatud geeni suuruse tõttu (Miller *et al.*, 2021). Nimelt *TTN*-ni kodeerivas alas asub 363 eksonit, mis kodeerivad pikimat valku titiini (Bang *et al.*, 2001). Uuringute põhjal on aga selgunud, et teatud *TTN* geenimuutused, näiteks varajast stopp-koodonit tekitavad variandid, osutavad erilist riski kardiomiopaatia tekkeks, mistõttu on soovitatud *TTN* geeni puhul edastada ainult funktsioonikaoga (*loss-of-function*– LoF) haigusseoselisi geenivariante (Miller *et al.*, 2021).

1.3.5. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi geeniloendi kardiometaboolsete haigustega seotud geenid

ACMG SF v3.1 geeniloendis on 49 kardiometaboolse haigusega seotud geeni: üheksa metaboolse ja 40 kardiovaskulaarse fenotüübiga (tabel 1) (Miller *et al.*, 2022). Enamik nimekirja kuuluvatest haigustest on autosomaal-dominantse pärandumismustriga, kuus geeni on seotud autosomaal-retsessiivse ning kaks X-liitelise pärandumismustriga haigustega.

Südame-veresoonkonna haigustega geene on ACMG SF nimekirjas enim ning neist 21 on seotud kardiomüopaatiaga. Kardiovaskulaarse fenotüübiga seotud geenid on lisatud ACMG SF nimekirja põhjusel, et südamehaiguste puhul on võimalik õigeaegse sekkumisega ennetada äkilist südame seiskumist ja südamepuudulikkust (Miller *et al.*, 2021). Näiteks haigusseoselised *MYH7* (*myosin heavy chain 7*) geenivariandid põhjustavad üle 80% hüpertroofilise kardiomüopaatia juhtudest (Alfares *et al.*, 2015; Pugh *et al.*, 2014). Hüpertroofilise kardiomüopaatia patsiendid on tihtipeale asümptomaatilised, mistõttu on päriliku riski varajane hindamine oluline (Geske *et al.*, 2018; Merlo *et al.*, 2018).

Sarnaselt südame- ja veresoonkonna haigustele on ACMG SF nimekirja metaboolsete geenidega seotud haigused sekkumistõhusad. Näiteks ainevahetushäirega seotud geeni *BTD* (*biotinidase*) patogeensete variantide poolt põhjustatud biotinidaasi puudulikkusele on olemas efektiivne ravi nii laste kui ka täiskasvanute jaoks (Canda *et al.*, 2020). *GAA* (*alpha glucosidase*) geeniga seotud Pompe tõvele on olemas tõhus ensüümasendusravi nii varases kui ka hilisemas eas avaldunud juhtudeks (Kuperus *et al.*, 2017).

Kõik ACMG SF nimekirja geenid on seotud haigustega, millel on määratletud kliiniliste tunnuste kogum, varajase diagnoosimise ja testimise võimalus ning tõhus ravi (Miller *et al.*, 2022).

Tabel 1. Kardiovaskulaarsete ja metaboolsete häiretega seotud geenid ACMG SF v3.1 geeniloendist (Miller *et al.*, 2022).

Haigus	Geen	Pärandumismuster
Kardiovaskulaarsete haigustega seotud geenid		
Arütmogeenne parema vatsakese kardiomiopaatia	<i>DSC2, DSG2, DSP, PKP2, TMEM43</i>	AD
Dilatatiivne kardiomiopaatia	<i>BAG3, DES, FLNC, LMNA, RBM20, TNNC1, TNNT2, TTN^a</i>	AD
Hüpertroofiline kardiomiopaatia	<i>ACTC1, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, PRKAG2, TNNI3, TPM1</i>	AD
Katehoolaminergiline polümorfne ventrikulaarne tahhükardia	<i>CASQ2</i>	AR
	<i>RYR2</i>	AD
	<i>TRDN</i>	AR
Loeys-Dietzi sündroom	<i>SMAD3, TGFBRI, TGFBRI2</i>	AD
Marfani sündroom	<i>FBN1</i>	AD
Perekondlik hüperkolesteroleemia	<i>APOB, LDLR, PCSK9</i>	AD
Perekondlikud rinnaaordi aneurüsmid ja dissekatsioonid	<i>ACTA2, MYH11</i>	AD
Pika QT sündroomi 1. ja 2. tüüp	<i>KCNQ1, KCNH2</i>	AD
Pika QT sündroomi 3. tüüp; Brugada sündroom	<i>SCN5A</i>	AD
Pärilik hemorraagiline telangiektaasia	<i>ACVRL1, ENG</i>	AD
Pärilik <i>TTR</i> -seoseline amüloidoos	<i>TTR</i>	AD
Vaskulaarne Ehlers-Danlosi sündroom	<i>COL3A1</i>	AD
Metaboolsete haigustega seotud geenid		
Biotinidaasi puudulikkus	<i>BTBD</i>	AR
Fabry tõbi	<i>GLA</i>	XL
Maliigne hüpertermia	<i>CACNAIS, RYR1</i>	AD
Noorte küpsuseas algav diabeet (3. tüüp)	<i>HNF1A</i>	AD
Ornitiin transkarbamülaasi puudulikkus	<i>OTC</i>	XL
Pompe tõbi	<i>GAA</i>	AR
Pärilik hemokromatoos	<i>HFE^b</i>	AR
Wilsoni tõbi	<i>ATP7B</i>	AR

^a Ainult funktsioonikaoga variandid tuleks edastada sekundaarsete leidudena.

^b Ainult *HFE* p.Cys282Tyr homosügootne variant tuleks edastada sekundaarse leiuna.

AD – autosoom-dominantne pärilikkus

AR – autosoom-retsessiivne pärilikkus

XL – X-liiteline pärilikkus

1.3.6. Sekundaarsete leidude levimus

SF tuvastamise tõenäosus koos rutiinse WES-iga on tõusuteel ning sellega koos ka teadustööde arv sellel teemal. Mitmed tööd on võtnud aluseks ACMG SF geeniloendi ning uurinud SF-de levimust erinevates rahvastikugruppides. Tabelis 2 on välja toodud kõige hilisemad teadustööd, mis on lähtunud vastavalt ACMG SF v2.0, v3.0 ja v3.1-st. ACMG SF v2.0 nimekirja geene uurinud tööd näitasid SF-de levimust 2,0-2,3%-l valimist (Elfatih *et al.*, 2021; Gordon *et al.*, 2020; Van Hout *et al.*, 2020). Gordon *et al.* (2020) uuringusse kaasati lisaks *HFE* (*homeostatic iron regulator*) geeni NM_000410.3:c.845G>A (p.Cys282Tyr) homosügootsed leiud, mis oli kolmas kõige levinum SF. Johnston *et al.* (2022) leidsid, et võrreldes ACMG SF v2.0-ga suurendab ACMG SF v3.0, mis sisaldab 14 geeni rohkem, SF-de tuvastamise sagedust 22% võrra. Kõige hiljutisem teadustöö, mis lähtus ACMG SF v3.1-st, näitas SF-de esinemist 2,7%-l valimist (Skrahin *et al.*, 2023).

Tabel 2. Sekundaarsete leidude teadustööde võrdlus.

Uurimus	Valimi suurus	Sekundaarsed leiud	Kandjad	
			n	%
Skrahin <i>et al.</i> (2023) ^a	863	24	23	2,7
Johnston <i>et al.</i> (2022) ^b	1473	25	61	4,1
Elfatih <i>et al.</i> (2021) ^c	6045	60	141	2,3
Gordon <i>et al.</i> (2020) ^{c,d}	21 915	556	557	2,5
Van Hout <i>et al.</i> (2020) ^c	49 960	548	992	2,0

^a Teadustöö lähtus ACMG SF v3.1 geeniloendist (78 geeni).

^b Teadustöö lähtus ACMG SF v3.0 geeniloendist (73 geeni).

^c Teadustöö lähtus ACMG SF v2.0 geeniloendist (59 geeni).

^d Uuringusse kaasati lisaks *HFE* geeni NM_000410.3:c.845G>A (p.Cys282Tyr) homosügootsed leiud.

Uuringud on keskendunud ka konkreetsete haigustega seotud geenide SF-de uurimisele. Abicht *et al.* (2021) teadustöö uuris SF-de levimust ACMG SF v2.0 kardiovaskulaarsete haigustega seotud geenides, keskendudes arütmogeense parema vatsakese kardiomiopaatia geenidele. SF-de levimus kõigis südame-veresoonkonna haigustega seotud geenides oli 1,0% ning 0,2% arütmogeense parema vatsakese kardiomiopaatia seotud geenides (*DSC2* – *desmocollin 2*, *DSG2* – *desmoglein 2*, *DSP* – *desmoplakin*, *PKP2* – *plakophilin 2*, *TMEM43* – *transmembrane protein 43*). Diebold *et al.* (2020) uurisid ACMG SF v2.0 päriliku arütmia haigustega (pika QT sündroom, Brugada sündroom, katehoolaminergiline polümorfne ventrikulaarne tahhükardia) seotud geene. Tulemuste põhjal selgus, et 0,4%-l valimist esines SF ühes neljast arütmia

fenotüübiga seotud geenides (*RYR2* – ryanodine receptor 2, *KCNQ1* – potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1, *KCNH2* – potassium voltage-gated channel subfamily H member 2, *SCN5A* – sodium voltage-gated channel alpha subunit 5). Smith *et al.* (2022) võtsid vaatluse alla iniviidid, kellel oli perekonnas varasemalt esinenud kardiomiopaatia või arütmia juhtumeid ning tuvastasid SF-id 2,2%-l valimist.

Teadustöodes on kõige levinumad SF-d leitud vähi ning kardiovaskulaarse fenotüübiga seotud geenides. Tabelis 3 on välja toodud teadustöodes kõige sagedamad kardiometaboolsete SF-ga geenid. Enim kerkisid esile geenid, mis olid seotud haigustega nagu hüpertroofiline kardiomiopaatia (*MYBPC3* – myosin binding protein C3), arütmogeenne kardiomiopaatia (*PKP2*) maligne hüpertermia (*RYR1* – ryanodine receptor 1), perekondlik hüperkolesteroleemia (*LDLR* – low density lipoprotein receptor) ja pika QT sündroom (*KCNQ1*).

Tabel 3. Teadustöodes kõige suurema sekundaarsete leidude saagisega kardiometaboolsed geenid.

Geen	Haigus	Sagedus (%)
<i>LDLR</i>	Perekondlik hüperkolesteroleemia	0,14-0,35 ^a
<i>KCNQ1</i>	Pika QT sündroomi 1. ja 2. tüüp	0,11-0,35 ^a
<i>RYR1</i>	Maligne hüpertermia	0,08-0,23 ^b
<i>MYBPC3</i>	Hüpertroofiline kardiomiopaatia	0,10-0,23 ^a
<i>PKP2</i>	Arütmogeenne parema vatsakese kardiomiopaatia	0,09-0,11 ^c

^a Elfatih *et al.*, (2021), Gordon *et al.* (2020), Skrahn *et al.*, (2023), Van Hout *et al.* (2020).

^b Elfatih *et al.* (2021), Gordon *et al.* (2020), Skrahn *et al.* (2023).

^c Elfatih *et al.* (2021), Gordon *et al.* (2020), Van Hout *et al.* (2020).

ACMG SF geenidega seotud südamehaigustest on kõige sagedam perekondlik hüperkolesteroleemia, mis esineb ligikaudu ühel inimesel 230-st (Abul-Husn *et al.*, 2016; Benn *et al.*, 2016). Perekondlik hüperkolesteroleemia on põhjustatud haigusseoselistest variantidest *APOB* (apolipoprotein B), *PCSK9* (proteain convertase subtilisin/kexin type 9) või *LDLR* geenides, kuid kuni 90% perekondliku hüperkolesteroleemiaga seotud mutatsioonidest toimuvad *LDLR* geenis (Benito-Vicente *et al.*, 2018). Mutatsioonid geenis *MYBPC3* põhjustavad hüpertroofilist kardiomiopaatiat, mis on pärilik südamelihaseid mõjutav haigus (Toepfer *et al.*, 2019). Hüpertroofilise kardiomiopaatia sagedus on hinnanguliselt 0,07-0,08% (Husser *et al.*, 2018). Arütmogeenne kardiomiopaatia on pärilik südamehaigus, mille fenotüübid on väga heterogeensed (Costa *et al.*, 2021). Haigusega enim seostatud geen on *PKP2*, mis põhjustab kuni 75% haiguse juhtudest (Marcus *et al.*, 2013). Kaasasündinud pika

QT sündroom on samuti südame rütmihäire, mida võivad mõjutada omajagu geene, kuid neist levinum on *KCNQ1* (Schwartz *et al.*, 2012).

Metaboolsete haigustega seotud geenidest leidus enim SF-e geenis *RYR1*. Patogeensed *RYR1* geenivariandid põhjustavad hinnanguliselt 75% maliigse hüpertermia juhtudest, mis on farmakogeneetiline (geneetilisest teguritest tingitud vastus ravimitele) metaboolne haigus (Miller *et al.*, 2018; Rosenberg *et al.*, 2015).

1.3.7. Geenivariantide patogeensuse hindamine

Aastal 2015 avaldasid ACMG ja Molekulaarse Patoloogia Ühing (*Association for Molecular Pathology* – AMP) geenivariantide tõlgendamise juhise, mis kirjeldab variantide klassifitseerimise ajakohastatud standardeid. Juhis lähtub viieastmelisest klassifikatsioonisüsteemist: (1) patogeenne (P), (2) tõenäoliselt patogeenne (*likely pathogenic* – LP), (3) ebaselge tähtsusega (*variant of uncertain significance* – VUS), (4) tõenäoliselt healoomuline (*likely benign* – LB), (5) healoomuline (*benign* – B). Antud süsteem on kohandatud kõikidele variantidele geenides, mis põhjustavad mendelliku pärilikkusega haigusi. Patogeensete või tõenäoliselt patogeensete variantide klassifitseerimiseks on eraldi kriteeriumid: „väga tugev“ (PVS1), „tugev“ (PS1-4), „mõõdukas“ (PM1-6) või „toetav“ (PP1-5). Termin „tõenäoliselt patogeenne/healoomuline“ tuleks lisada, kui variant on üle 90% tõenäosusega patogeenne või healoomuline. Juhul kui variant ei vasta patogeense või healoomulise variandi kriteeriumidele või tõendid healoomulisuse ja patogeensuse kohta on vastuolulised, on tegu VUS-iga (Richards *et al.*, 2015).

Teatud geenides esinevate variantide patogeensuse hindamisel tuleb lähtuda erijuhistest. ClinGen (*Clinical Genome Resource*) on loonud ekspertide komisjonid, et kohendada ACMG/AMP standardiseeritud klassifitseerimiskriteeriumeid konkreetsete geenide ja haiguste jaoks. Näiteks *RYR1* geenivariantide klassifitseerimist raskendavad muutuv ekspressiivsus, mittetäielik penetrantsus ja kõrge alleelne heterogeensus (Johnston *et al.*, 2021). Vastav komisjon on ajakohastanud ACMG/AMP kriteeriume ning klassifitseerinud 335 maliigse hüpertermiaga seotud *RYR1* geenivarianti (Johnston *et al.*, 2022). Sarnaselt *RYR1*-le on erijuhised ka näiteks *MYH7* ja *LDLR* geenivariantide tõlgendamiseks (Chora *et al.*, 2022; Kelly *et al.*, 2018).

Patogeenseks võivad osutuda näiteks LoF variandid, mille alla kuuluvad varajast stoppkoodonit, raaminihkmutatsioone ja splaiss-saidi mutatsioone tekitavad variandid. Lisaks viitab

patogeensusele ka variandi suur levimus haigete inimeste seas võrreldes kontrollgrupiga. Siiski tuleb enne klassifitseerimist teha kindlaks, kas variandi patogeensus on kooskõlas pärandumismustriga (Richards *et al.*, 2015).

ACMG on soovitanud patsientidele edastada WES/WGS-il tuvastatud P ja LP hinnanguga SF-id (Miller *et al.*, 2021). *HFE* on erandlik geen, mille puhul on soovitatud edastada ainult kindla valgumuutuse homosügootseid variante (*HFE* NM_000410.3:c.845G>A p.Cys282Tyr) ning *TTN* geeni puhul edastada ainult LoF LP/P variante (Miller *et al.*, 2021).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö hüpotees ja eesmärgid

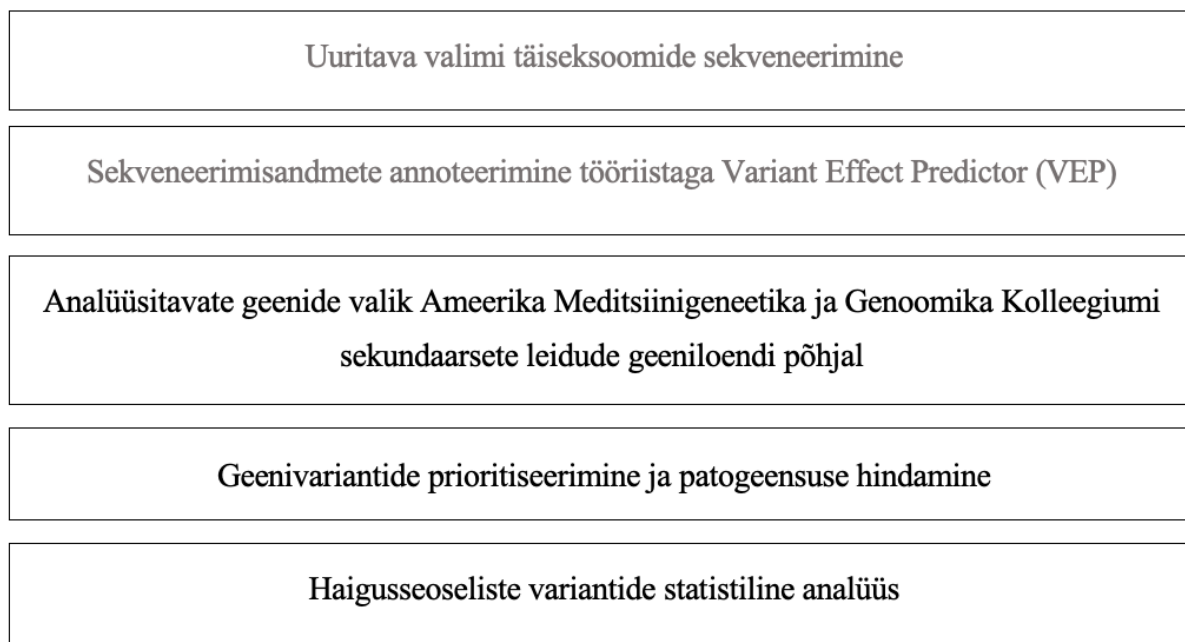
Käesoleva bakalaureusetöö hüpoteesi kohaselt on viljatutel patsientidel kõrgem sekundaarsete leidude esinemissagedus kui kontrollindiviididel. Hüpoteesi kontrollimiseks püstitati järgmised eesmärgid:

- 1) tuvastada annoteeritud sekveneerimisandmetest pärilike monogeensete kardiometaboolsete haigustega seotud geenide haigusseoselised variandid lähtudes ACMG sekundaarsete leidude geeniloendist;
- 2) välja selgitada, millised sekundaarsed leiud tulevad esile uurimisgrupis võrreldes kontrollgrupiga ning kas nende vahel on statistiliselt oluline erinevus.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Uurimistöö etapid ja ülesehitus

Joonis 2 annab ülevaate käesoleva uurimuse etappidest ja ülesehitusest.



Joonis 2. Bakalaureusetöö raames tehtud ja sellele eelnenud töö ülesehitust. Halliga on märgitud etapid, mida töö autor ise ei teostanud. Sekveneerimisandmed annoteeriti inimese geneetika õppetooli bioinformaatika teadur dr Avirup Dutta poolt. Ülejäänud etapid viis läbi töö autor.

2.2.2. Valimi kirjeldus

Uurimus põhineb Tartu Ülikooli Kliinikumi meestekliinikuga koostöös kogutud valimil, mis koosneb 519-st idiopaatilise viljatusega patsiendist ning 323-st normozoospermiaga kontrollindiviidist. Kõik osalejad on andnud informeeritud nõusoleku uuringus osalemiseks. Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt on välja antud heakskiit 74/54 (viimane muudatusettepanek 288/M-13).

Idiopaatilise viljatusega patsiendid kuuluvad ESTAND (*Estonian Andrology*) kohortvalimisse (Punab *et al.*, 2017). Valimisse kaasati mehed, kelle spermide koguarv oli <39 mln/ ejakulaadis. Kõik indiviidid olid Euroopa päritolu ning Eestis elavad mehed vanuses 18-75. Viljatusega patsiendid jagunesid vastavalt haiguse fenotüübile kolme alamgruppi: (1) mitte-obstruktiivne azoospermia, (2) oligozoospermia, (3) krüptorhism. Krüptorhismi patsientidel esines krüptorhism koos spermatogeneesihäirega (spermide arv <39 mln/ ejakulaadis).

Kontrollindiviide ehk normozoospermiaga osalejaid koguti Tartu Ülikooli Kliinikumi ja Lääne-Tallinna Keskhaigla naistekliinikute kaudu. Lõpliku kontrollgrupi moodustasid rasedate naiste meespartnerid, kelle spermaparameetrid olid korras (Ehala-Aleksejev & Punab, 2018; Punab *et al.*, 2017). Kõigi analüüsitud indiviidide androloogiliste parameetrite mediaan- ja referentsväärtused on välja toodud tabelis 4.

Tabel 4. Analüüsitavate indiviidide androloogiliste parameetrite mediaan- ja refentsväärtused.

Parameeter	Viljatud (n=519)			Kontrollgrupp (n=323)
	NOA (n=186)	Oligozoospermia (n=182)	Krüptorhism (n=151)	
Vanus (a)	35,4	35,5	32,4	31,0
Kehamassiindeks	26,6	26,5	26,3	25,8
Spermide arv ejakulaadis ($\times 10^6$) Ref: $>39 \times 10^6$	0	2,0	0	303,1
FSH (IU/l) Ref: 1,5-12,4 IU/l	21,7	15,9	21,0	3,5
LH (IU/l) Ref: 1,7-8,6 IU/l	9,2	8,0	9,3	3,6
Testosteroon (nmol/l) Ref: 19-49 a: 8,6-29,0 nmol/l ≥ 50 a: 6,7-25,7 nmol/l	13,6	15,5	14,2	16,1
Vasaku munandi maht (ml)	13,0	13,0	12,5	23,0
Parema munandi maht (ml)	15,0	15,0	13,0	24,0

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon, LH – luteiniseeriv hormoon, NOA – mitte-obstruktiivne azoospermia, Ref – referentsväärtus (Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori andmed).

2.2.3. Eksoomi sekveneerimisandmed

Uurimistöös kasutatud genoomne DNA eraldati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi inimese geneetika õppetoolis või Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris. Uuritava valimi täiseksoomide sekveneerimine teostati kahes keskus. Nimelt, 445 proovi sekveneeriti Soome Molekulaarse Meditsiini Instituudis (*Institute for Molecular Medicine Finland – FIMM*), Helsingis. Ülejäänud 397 proovi (sh 82 ESTAND patsienti ja 315 kontrolli) sekveneerimine leidis aset Washingtoni Ülikooli McDonnell Genoomi Instituudis St. Louis', Missouri osariigis, Ameerika Ühendriikides (genome.wustl.edu) rahvusvahelise GEMINI (*Genetics of Male Infertility Initiative*) projekti raames (<https://gemini.conradlab.org>, Nagirnaja *et al.*, 2022).

Analüüsitavate geenide valikul lähtuti ACMG SF v3.1 nimekirja geenidest. Sekveneerimisandmete kvaliteedikontrolli, annoteerimise ja eelfiltreerimise (tabel 5) viis läbi inimese geneetika õppetooli bioinformaatika teadur dr Avirup Dutta. Annoteerimiseks kasutati Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) andmebaasi tööriista Variant Effect Predictor (VEP) (v.105) (McLaren *et al.*, 2016). VEP annoteerib erinevate variantide, näiteks insertioonide,

deletsioonide, ühenukleotiidsete polümorfismide ja teiste geneetiliste muutuste mõju geenidele, transkriptidele, valgujärjestustele kui ka regulaatoraladele.

Tabel 5. Annoteeritud sekveneerimisandmete eelfiltreerimisel rakendatud kriteeriumid.

Parameeter	Filter
gnomAD_AF gnomAD_NFE_AF	Välja arvata >0.01
BIOTYPE	Kaasata „ <i>protein_coding</i> “
Canonical	Kaasata „ <i>yes</i> “
INTRON	Kaasata „-“
EXON	Välja arvata „-“
Consequence	Kaasata, kui vähemalt üks järgnevatest kriteeriumitest on täidetud: „ <i>frameshift_variant</i> “, „ <i>missense_variant</i> “, „ <i>stop_gained</i> “, „ <i>stop_lost</i> “, „ <i>start_lost</i> “, „ <i>splice_region_variant</i> “ Välja arvata kõik järgnevad variandid: „ <i>inframe_deletion</i> “, „ <i>inframe_duplication</i> “, „ <i>inframe_insertion</i> “
Impact	Välja arvata „ <i>LOW</i> “
SIFT	Välja arvata (juhul, kui PolyPhen täidetud) „ <i>tolerated</i> “
PolyPhen	Välja arvata (juhul, kui SIFT täidetud) „ <i>benign</i> “
CADD_PHRED	Välja arvata ≤10
CLINSIG	Välja arvata ainult „ <i>benign</i> “ ja „ <i>likely_benign</i> “ (kõik muud jäävad sisse)
ClinVar_CLNSIG	Välja arvata ainult „ <i>benign</i> “ ja „ <i>likely_benign</i> “ (kõik muud jäävad sisse)

Biotype – biotüüp, **CADD** (*Combined Annotation-Dependent Depletion*) – tööriist hindamaks variandi patogeensust, **canonical** – kanooniline, **CLINSIG** (*Clinical significance*) – kliiniline tähtsus ClinVar andmebaasi hinnangute põhjal, **consequence** – tagajärg, **exon** – ekson, **frameshift variant** – raaminihke variant, **gnomAD_AF** (*Genome Aggregation Database allele frequency*, v2.1.1) – alleelisagedused gnomAD koondandmebaasis, **gnomAD_NFE_AF** – alleelisagedused gnomAD andmebaasis eurooplaste (v.a soomlased) populatsioonis (v2.1.1), **impact** – mõju, **inframe deletion/duplication/insertion** – raamisisene deletsioon/duplikatsioon/insertioon, **region** – regioon, **missense variant** – mittesünonüümne muutus, **coding** – valku kodeeriv, **SIFT** (*Sorting intolerant from tolerant*) ja **PolyPhen** (*Polymorphism Phenotyping*) – tööriistad mittesünonüümsete/sünonüümsete variantide mõju ennustamiseks, **splice region variant** – spaiis-saidi variant, **stop-gained** – varajase stoppkoodoni teke, **stop lost/start lost** – stoppkoodoni/initsiaatorkoodoni kadu, **tolerated** – tolereeritud.

2.2.4. Geenivariantide prioritseerimine ja patogeensuse hindamine

Käesoleva töö aluseks võeti ACMG SF v3.1 geeniloend, millest keskenduti 49-le kardiometaboolse fenotüübiga seotud geenile (Miller *et al.*, 2022) (ptk 1.3.5., tabel 1). Patogeensuse hindamisel lähtuti andmebaaside andmestikest, teaduslikest publikatsioonidest ning ACMG variantide tõlgendamise juhise (Richards *et al.*, 2015), kus on sõnastatud reeglid erinevate kriteeriumite kombineerimiseks (ptk1 1.3.7.).

Geenivariantide prioritseerimine algas ebasobivate geenivariantide välistamisega. Annoteeritud sekveneerimisandmetest välistati esmalt autosomaal-retsessiivse pärandumismustriga geenides leiduvad heterosügootsed variandid (v.a juhul, kui vastaval indiviidil leidis ka teine heterosügootne variant). *TTN* geeni puhul on soovitatav SF-na edastada vaid LoF variandid (Miller *et al.*, 2021), mistõttu välistati kõik *TTN* mittesünonüümsed variandid. Mittesünonüümne mutatsioon on geneetiline muutus, mille tagajärjel muutub antud valguga järjestuses üks aminohape (Petrosino *et al.*, 2021). *HFE* geenivariantidest on soovitatav SF-na edastada vaid *HFE* NM_000410.3:c.845G>A p.Cys282Tyr valgumuutusega homosügootses olekus variandid (Miller *et al.*, 2021), seega arvati välja kõik sellest erinevad. Lisaks välistati madala usaldusväärsusega mononukleotiidses kordusjärjestuses esinevad variandid.

Igale variandile lisati Franklin (<https://franklin.genoox.com>) andmebaasist pärit hinnang. Franklin on tervishoiutehnoloogia ettevõtte Geenox-i poolt välja töötatud tehisintellektil põhinev platvorm klassifitseerimaks geenivariante. Franklini andmebaas integreerib kliinilist ja genoomset informatsiooni ning on üles ehitatud Franklini kogukonna poolt esitatud andmete, sh esildiste ja publikatsioonide põhjal. Ühtlasi tehti tuvastatud variantidele käsitsi väljavõtte NCBI (*National Library of Medicine*) andmebaasi alla kuuluvast ClinVar (Landrum *et al.*, 2018) arhiivist, et leida kõige hiljutisemad hinnangud. Allesjäänud geenivariandid jagati kolme gruppi: „tõenäoliselt patogeenne/patogeenne“ ehk LP/P, „ebaselge tähtsusega“ ehk VUS ning „selgusetu“. Viimane grupp „selgusetu“ oli variantide jaoks, mille andmebaaside hinnangud ei olnud ühesed. Variantide klassifitseerimine Franklini ning Clinvar-i andmebaaside hinnangute põhjal toimus järgmiselt:

- ClinVar hinnang puudus:
 - Franklin LP/P → LP/P
 - Franklin VUS → VUS
- ClinVar hinnang oli olemas:
 - Franklin ja ClinVar LP/P → LP/P
 - Franklin ja ClinVar VUS → VUS
 - Kõik muud kombinatsioonid → selgusetu

Seejärel hinnati kõiki variante manuaalselt. „Selgusetu“ grupi variantide klassifitseerimisel lisati kõik variandid, millel esines ClinVar andmebaasis üks või rohkem LB/B hinnangut, VUS gruppi. Geenivariantide klassifitseerimisel võeti arvesse CADD skoori (tööriist hindamiseks

variandi patogeensust), Franklin ja ClinVar andmebaaside hinnanguid ning otsiti toetavaid tõendeid avaldatud kirjandusest. LP/P-ks klassifitseeritud variantide tõlgendamisel lähtuti ACMG juhise (Richards *et al.*, 2015). Teatud geenivariantide tõlgendamiseks on ACMG juhise järgi kohandatud eeskirjad. Näiteks *FBNI* (*fibrillin 1*), *HNFI1A* (*HNFI1 homeobox A*), *LDLR*, *MYH7* ja *RYR1* kontrolliti üle vastavates geenides esinevate variantide klassifitseerimise erijuhiste järgi (Chora *et al.*, 2022; Johnston *et al.*, 2021, 2022; Kelly *et al.*, 2018; Muiño-Mosquera *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Analüüsi esimese poole lõpuks oli LP/P klassifikatsiooniga variante 23.

Analüüsi teises pooles kontrolliti LP/P-ks klassifitseeritud variantide järjestuse lugemeid IGV (*Integrative Genomics Viewer*) interaktiivse tööriista abil, mis visualiseerib uuritava DNA piirkonna (Robinson *et al.*, 2023). IGV programm ei toetanud kuut geenivarianti, mistõttu need variandid välistati.

LP/P-ks klassifitseeriti 17 geenivarianti. Ebaselge tähendusega ehk VUS variantideks jäid 185 geenivarianti.

2.2.5. Haigusseoseliste variantide statistiline analüüs

Viljatusgruppide ja kontrollgrupi vahelise statistilise erinevuse testimiseks kasutati Fisherit täpset testi. Test viidi läbi GraphPad QuickCalcs veebilehel (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Statistilise olulisuse nivooks valiti 0,05.

2.3. Tulemused

2.3.1. Kardiometaboolsete sekundaarsete leidude esinemine Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi geeniloendist lähtudes

Töö esimeseks eesmärgiks oli tuvastada annoteeritud sekveneerimisandmetest pärilike monogeensete kardiometaboolsete haigustega seotud geenide haigusseoselised variandid ehk sekundaarsed leiud lähtudes ACMG SF v3.1 geeniloendist (Miller *et al.*, 2022). Vastava fenotüübiga seotud geene oli analüüsis 49, nendest 40 kardiovaskulaarse ja üheksa metaboolse fenotüübiga (tabel 1). Uurimuse valim koosnes 519-st idiopaatilise viljatusega patsiendist ja 323-st normozoospermiaga kontrollindiviidist (tabel 4). Viljatusgrupi moodustasid 186 NOA, 182 oligozoospermia ja 151 krüptorhismi patsienti.

Annoteeritud sekveneerimisandmetest tuvastati 17 SF-i kümnes geenis 16-l indiviidil (1,9%, 16/842) (tabel 6). Viljatusgrupis leiti SF üheksal indiviidil (1,7%, 9/519) ning kontrollgrupis seitsmel (2,2%, 7/323). 186-st NOA patsiendist tuvastati SF neljal indiviidil (2,2%, 4/186), 182-st oligozoospermia patsiendist kolmel (1,6%, 3/182) ning 151-st krüptorhismi patsiendist kahel (1,3%, 2/151). Kõigil leidudega indiviididel esines vaid üks SF, välja arvatud ühel krüptorhismi patsiendil, kellel tuvastati kaks leidu: *SCN5A* (pika QT sündroom) p.Glu1783Lys valgumuutusega variant ja *TTN* (dilatatiivne kardiomiopaatia) p.Trp24578* varajase stopp-koodoni variant. Kõik indiviidid olid antud variantide suhtes heterosügootid. Lisaks olid kõik tuvastatud SF-id unikaalsed ning korduvaid leide ei esinenud.

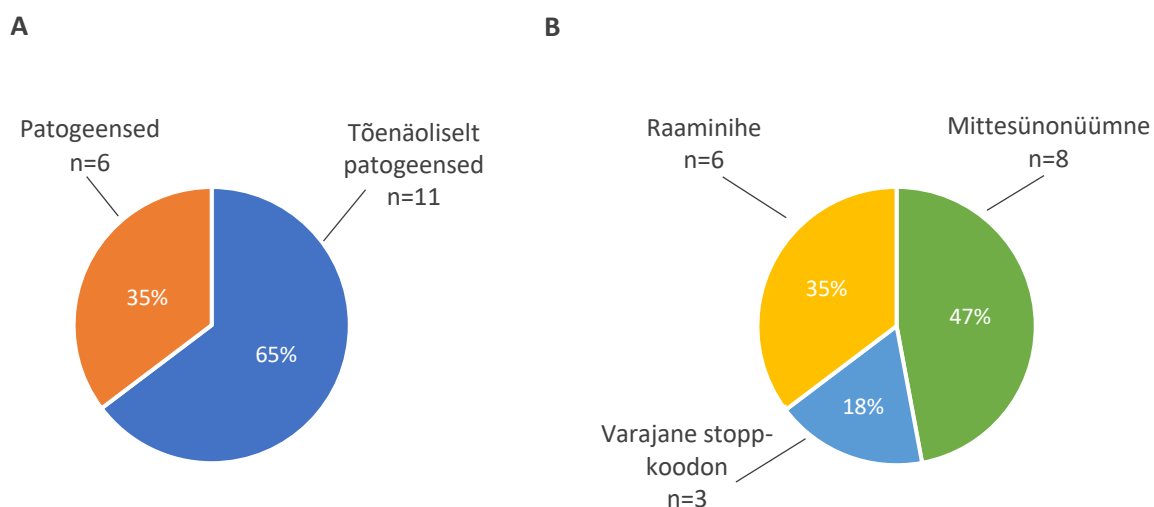
Tabel 6. Antud töös tuvastatud sekundaarsed leiud seoses kardiometaboolsete haigustega.

Geen	Positsioon	cDNA muutus	Valgu muutus	rs kood	Tagajärg	ClinVar	Hinnang	Indiviidi grupp
<i>APOB</i>	2:21009811	c.7057C>T	p.Gln2353*	-	Stopp-koodon	-	LP	NOA
<i>COL3A1</i>	2:189011692	c.4319C>A	p.Pro1440His	-	Mittesünonüümne	-	LP	Krüptorhism
<i>DSP</i>	6:7562666	c.613del	p.Val205fs	-	Raaminihe	-	LP	Kontroll
<i>FBN1</i>	15:48487178	c.3486T>A	p.Ser1162Arg	-	Mittesünonüümne	-	LP	Oligozoosp
<i>MYH7</i>	14:23424876	c.2572C>T	p.Arg858Cys	rs2754158	Mittesünonüümne	LP/P	LP	Kontroll
<i>MYH7</i>	14:23430634	c.925G>A	p.Asp309Asn	rs730880923	Mittesünonüümne	LP/P/VUS	LP	Kontroll
<i>MYH7</i>	14:23429279	c.1207C>T	p.Arg403Trp	rs3218714	Mittesünonüümne	P*	P	Oligozoosp
<i>PKP2</i>	12:32878298	c.582T>A	p.Tyr194*	-	Stopp-koodon	P	P	Kontroll
<i>RYR1</i>	19:38451843	c.1202G>A	p.Arg401His	rs193922766	Mittesünonüümne	P*	P	Kontroll
<i>SCN5A</i>	3:38551022	c.5347G>A	p.Glu1783Lys	rs137854601	Mittesünonüümne	LP/P	LP	Krüptorhism
<i>TGFBR2</i>	3:30671943	c.760C>T	p.Arg254Cys	rs863223856	Mittesünonüümne	LP/P/VUS	LP	NOA
<i>TTN</i>	2:178544316	c.95913del	p.Val31972fs	-	Raaminihe	-	LP	Kontroll
<i>TTN</i>	2:178560480-178560492	c.85640_85652del	p.Pro28547fs	rs762286447	Raaminihe	LP	P	Kontroll
<i>TTN</i>	2:178572398	c.73734G>A	p.Trp24578*	-	Stopp-koodon	LP	P	Krüptorhism
<i>TTN</i>	2:178533255	c.103360del	p.Glu34454fs	rs760768093	Raaminihe	LP/P/VUS	P	NOA
<i>TTN</i>	2:178724081	c.21178del	p.Ser7060fs	-	Raaminihe	-	LP	NOA
<i>TTN</i>	2:178689821	c.31838del	p.Pro10613fs	-	Raaminihe	-	LP	Oligozoosp

Kromosomaalne positsioon põhineb hg38 referentsgenoomil. Kõik indiviidid olid antud geenivariantide suhtes heterosügootid. Sinisel taustal on metaboolse häirega seotud geen, teised geenid on seotud kardiovaskulaarsete haigustega. Rohelisel taustal on toodud geenivariandid, mis esinesid samal kahe leiuga indiviidil. ClinVar tulbas on tärniga tähistatud ekspertpaneeli poolt kinnitatud hinnangud. LP/P – tõenäoliselt patogeenne/patogeenne variant. NOA – mitte-obstruktiivse azoospermia grupp. Oligozoosp – oligozoospermia grupp. VUS – ebaselge tähendusega variant.

2.3.2. Sekundaarsete leidude jagunemine vastavalt hinnangule ja tagajärjele

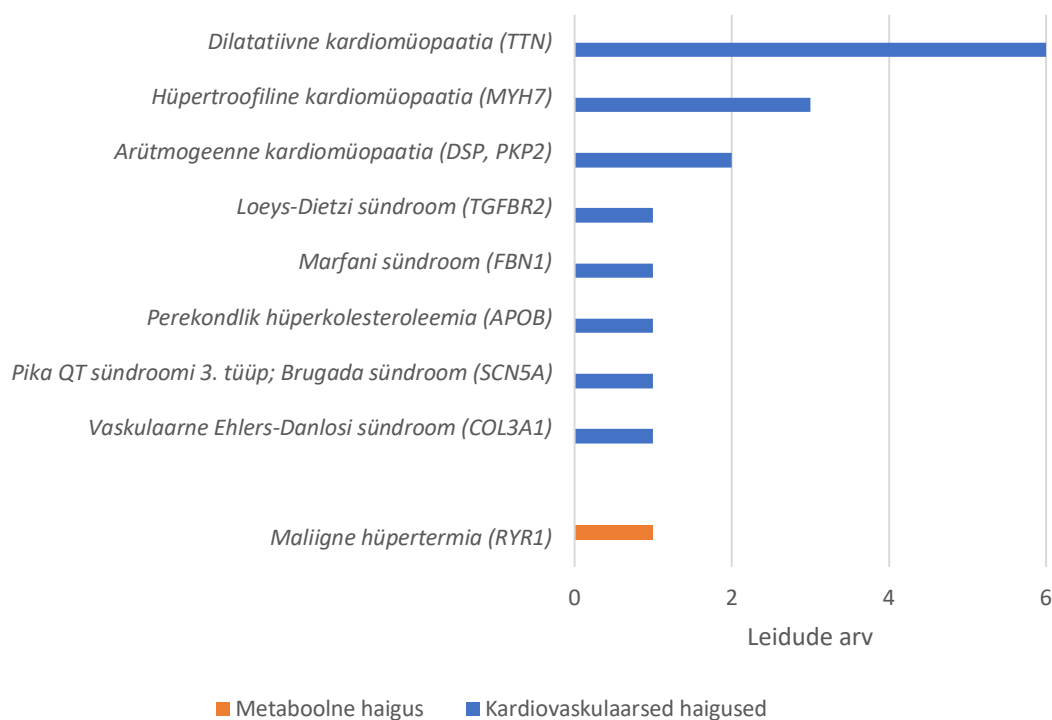
Kõikidest SF-dest kuus varianti hinnati patogeenseks ja 11 tõenäoliselt patogeenseks (joonis 3A). Üle poole (58,8%, 10/17) tuvastatud geenivariantidest olid varasemalt raporteeritud Clinvar (Landrum *et al.*, 2018) andmebaasis ning kaks neist kinnitatud ekspertpaneeli poolt patogeenseteks variantideks (tabel 6). Geneetilise muutuse tüübi järgi esines mittesünonüümseid variante kaheksa ja LoF variante üheksa: kolm varajase stopp-koodoni ja kuus raaminihke varianti (joonis 3B). LoF variantidest hinnati P-ks viis ning LP-ks neli, mittesünonüümsetest variantidest kaks P-ks ja kuus LP-ks. P/LP mittesünonüümsete ja LoF variantide levimus oli vastavalt 4,0% (8/198) ja 4,5% (9/198).



Joonis 3. Antud töös tuvastatud sekundaarsete leidude jagunemine vastavalt (A) haigusseoselisuse hinnangule ja (B) mutatsiooni tüübile.

2.3.3. Sekundaarsete leidude jagunemine Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi nimekirja kardiometaboolsetes geenides

Haigusseoselised variandid esinesid üheksas (22,5%, 9/40) südamehaigusega ja ühes (11,1%, 1/9) metaboolse fenotüübiga seotud geenis (joonis 4). Kardiovaskulaarsete SF-de levimus oli 1,8% (15/842), metaboolsete leidude levimus 0,1% (1/842) ning SF-de üldine levimus oli 1,9% (16/842). Enim haigusseoselisi variante esines *TTN* ja *MYH7* geenides. Geenide *RYR1*, *FBN1*, *APOB*, *SCN5A*, *COL3A1*, *DSP* ja *PKP2* SF-de individuaalne levimus oli 0,1% (1/842), *MYH7* geeni SF-de levimus oli 0,4% (3/842) ja *TTN*-i 0,6% (5/842).



Joonis 4. Antud töös tuvastatud sekundaarsete leidude jagunemine erinevate haiguste vahel.

2.3.4. Sekundaarsete leidude võrdlus viljatus- ja kontrollgrupi vahel

Uurimuse teiseks eesmärgiks oli välja selgitada, kas viljatus- ja kontrollgrupi SF-de levimuse vahel on statistiliselt oluline erinevus. Hüpoteesi kohaselt esineb viljatusgrupis rohkem SF-e kui kontrollgrupis. Selle eesmärgi täitmiseks viidi läbi Fisheri täpne test. Testi tulemusel ei leitud statistiliselt olulist erinevust ühegi viljatusgrupi ega kontrollgrupi vahel ning kõik p -väärtused ületasid statistilise olulisuse nivoo (tabel 7).

Tabel 7. Viljatus- ja kontrollgrupi leidudega ja leidudeta indiviidide jaotus ning Fisheri täpse testi tulemused.

Grupp	Leidudega indiviidid	Leidudeta indiviidid	Leidudega indiviidide sagedus (%)	Fisheri täpne test (p -väärtus)
Normozoospermia	7	316	2,2	-
Kõik viljatud	9	510	1,7	0,796
Krüptorhism	2	149	1,3	0,725
NOA	4	182	2,2	1,000
Oligozoospermia	3	179	1,6	1,000

NOA – mitte-obstruktiivne azoospermia. Fisheri täpse testi tulemusel saadud P -väärtused ületasid statistilise olulise nivoo 0,05 kõigi viljatusgruppide ja kontrollgrupi vahel, seega statistiliselt olulist erinevust ei leitud.

2.4. Arutelu

Publikatsioonide ja uuringute arv SF-de kohta on tõusuteel, kuid SF-de levimus viljatute indiviidide seas on endiselt väheuuritud teema. Mitmed uuringud on kinnitanud viljatusega patsientide kõrgemat riski krooniliste haiguste tekkeks, näiteks südame-veresoonkonna ja ainevahetushaigused (Condorelli *et al.*, 2018; Eisenberg *et al.*, 2016; Latif *et al.*, 2017). Samas nii viljatuse kui ka krooniliste haiguste põhjused ei ole ühesed ning on mõjutatud mitmetest teguritest, näiteks geneetilised, aga ka elustiilifaktorid (Agarwal *et al.*, 2021).

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalses osas tuvastati 17 SF-i 16-l indiviidil ning leidude üldine levimus oli 1,9% (16/842). Kirjanduse ülevaates käsitletud teadustöodes (tabel 3, ptk 1.3.6.), mis analüüsisid ACMG SF nimekirja kõiki geene, oli tuvastatud SF-de levimus 2,0-4,1% ning suurim just vähi ja kardiovaskulaarsete haigustega seotud geenides (Elfatih *et al.*, 2021; Gordon *et al.*, 2020; Johnston *et al.*, 2022; Skrahin *et al.*, 2023; Van Hout *et al.*, 2020). Käesolev töö keskendus vaid ACMG SF v3.1 nimekirja südame-veresoonkonna ja metaboolsete häiretega seotud geenidele, mis moodustavad üle poole nimekirjas esindatud geenidest (62,8%, 49/78). Haigusseoselised variandid leiti üheksas kardiovaskulaarse fenotüübiga seotud geenis (*APOB*, *COL31A*, *DSP*, *FBN1*, *MYH7*, *PKP2*, *SCN5A*, *TGFBR2*, *TTN*) 1,8% valimist (15/842) ning ühes metaboolse fenotüübiga seotud geenis (*RYR1*) 0,1% valimist (1/842).

Skrahin *et al.* (2023) uuring, mis lähtus ACMG SF v3.1 nimekirjast, nagu ka käesolev töö, tuvastas 24 SF-i 23-l indiviidil (2,7% 23/863) ning neist 18 kardiovaskulaarsete fenotüüpidega seotud geenides *TTN*, *KCNQ1*, *LDLR*, *TMEM43*, *MYBPC3*, *FBN1*, *PCSK9*, *APOB*, *TNNT2* (*Troponin T2*) ja *ACTC1* (*actin alpha cardiac muscle 1*). Kaks leidu esinesid metaboolse fenotüübiga geenis *RYR1*. Võrreldes antud tööga esinesid mitmed leiud samades geenides: *TTN*, *APOB*, *FBN1* ja *RYR1*. Lisaks leidsid ka Skrahin *et al.* (2023) kõige enam SF-e just *TTN* geenis (4) ning metaboolse fenotüübiga geenide hulgast SF-d ainult *RYR1* geenis (2).

Kirjanduse ülevaates mainitud publikatsioonid analüüsisid SF-de levimust üldpopulatsioonis, antud töö keskendus aga SF-de levimuse uurimisele idopaatilise mehepoolse viljatusega patsientide ning kontrollindiviidide seas. Viljatusgrupis tuvastati SF üheksal indiviidil (1,7%, 9/519) ning kontrollgrupis seitsmel (2,2%, 7/323). 186-st NOA patsiendist tuvastati SF neljal indiviidil (2,1% 4/186), 182-st oligozoopermia patsiendist kolmel (1,6% 3/182) ning 151-st krüptorhismi patsiendist kahel (1,3% 2/151). Siinkohal saab võrdluseks tuua Kasak *et al.* (2022) teadustöö, kus uuriti sekkumistõhusate SF-de levimust NOA patsientide seas, lähtudes ACMG SF v2.0 nimekirja geenidest. Analüüsi tulemusel leiti 25 SF-i 19-s ACMG SF v2.0 nimekirja

geenis. ACMG SF nimekirja geenide SF-de üldine levimus NOA patsientide seas oli 3,0% (28/836) ning südame-veresoonkonna haigustega seotud geenides 1,9% (16/836), mis on sarnane antud töös tuvastatud SF-de levimusele NOA patsientide seas (2,1%). Kasak *et al.* (2022) töös tuvastatud SF-ga geenid, mis esinesid ka antud töös, olid *FBNI*, *MYH7*, *PKP2*, *RYR1*, *SCN5A* ja *TGFBR2*.

Mõnede geenide SF-de sagedused ühtivad varasemate teaduspublikatsioonidega, näiteks *RYR1* (0,08-0,23%), *PKP2* (0,09-0,11%) (Elfatih *et al.*, 2021; Gordon *et al.*, 2020; Skrahin *et al.*, 2023; Van Hout *et al.*, 2020), kuid esineb ka variatsioone, mis suure tõenäosusega tulenevad erinevustest uuringu ja valimi ülesehituses, vastavate indiviidide androloogilistes parameetrites, variantide filtreerimises ning muudest teguritest.

Antud töös tuvastati enim haigusseoselisi variante kardiovaskulaarsete fenotüüpidega seotud geenides *MYH7* (3) ja *TTN* (6). Kirjanduse ülevaate peatükk 1.2.2. toob näiteid mitmetest teadustöödest, mis on kinnitanud viljatute meeste suuremat riski südame-veresoonkonna haiguste tekkeks. *MYH7* haigusseoselised variandid põhjustavad kuni 80% hüpertroofilise kardiomiopaatia juhtudest (Alfares *et al.*, 2015; Pugh *et al.*, 2014). SF-d *MYH7* geenis leiti see-eest kahel kontrollindiviidil (0,6% 2/323) ja vaid ühel viljatusega patsiendil (0,2% 1/519), seega patogeensete variantide suurem sagedus *MYH7* geenis võis olla juhuslik. Kuni 85% mutatsioonidest toimuvad genoomi kodeerivas alas eksoomis ning geenis *TTN* on üle 300 eksoni (Bang *et al.*, 2001; Majewski *et al.*, 2011), mis võib selgitada haigusseoseliste variantide suuremat esinemist selles geenis.

Metaboolsete häiretega seotud geenidest tuvastati vaid üks SF – *RYR1* p.Arg401His valgumuutusega geenivariant ühel kontrollindiviidil. Haigusseoselised variandid *RYR1* geenis põhjustavad maliigset hüpertermiat. Nii Miller *et al.* (2018b) kui ka Chang *et al.* (2019) teadustööd on varasemalt tuvastanud p.Arg401His valgumuutusega *RYR1* geenivariandid maliigse hüpertermia patsientide seas.

Geneetilise muutuse tüübi järgi esines mittesünonüümseid variante kaheksa ja LoF variante üheksa: kolm varajase stopp-koodoni ja kuus raaminihke varianti. LoF variantidest viis klassifitseeriti P-ks ning neli LP-ks, mittesünonüümsetest variantidest kaks P-ks ja kuus LP-ks. Mittesünonüümssed variandid esinevad sagedamini kardiovaskulaarsete fenotüüpidega seotud geenivariantide seas ning LoF variandid vähifenotüüpidega variantide seas (Gordon *et al.*, 2020; Kasak *et al.*, 2022; Van Hout *et al.*, 2020). Mittesünonüümsete variantide tõlgendamine ja klassifitseerimine on aga keeruline, sest variandil võivad olla erinevad tagajärjed vastavalt

geneetilise muutuse asukohale ja aminohappe muutusele (Samocha *et al.*, 2017). Sellest tulenevalt hinnatakse neid ka tihemini LP-ks.

Töös käsitletud SF-dega seotud haiguste hulgas on fenotüüpe, mis võivad avalduda järsult, hilisemas eas või mitte üldse (mittetäielik penetrantsus). Näiteks maligne hüpertermia, mida võib põhjustada haigusseoseline *RYR1* geenivariant, on farmakogeneetiline haigus, mille vallandavad inhaleeritavad anesteesia ravimid ja/või suksinüülkoliin (farmakoloogiline ravim) (Riazi *et al.*, 2018). Tõenäosus, et haigusseoselise *RYR1* geenivariandiga patsiendil vallandub anesteetikumidega kokkupuutel maligne hüpertermia on aga 25% ning enne haiguse avaldumist võib patsiendil olla mitu kokkupuudet anesteesia ravimitega, ilma et haigus avalduks (Nkonge *et al.*, 2020; Riazi *et al.*, 2014). Geeni *TTN* varajase stopp-koodoni variandid on sarnaselt *RYR1* variantidega mittetäieliku penetrantsusega (~60%) (Fraszczyk *et al.*, 2017). See-eest on leitud, et *TTN*-i varajase stopp-koodoni penetrantsus suureneb peale 40-ndat eluaastat (~95%-ni) (Herman *et al.*, 2012). Mittetäielik penetrantsus ja haiguse avaldumine või mitte avaldumine viitab seega teistele geneetilistele ja/või keskkonna teguritele, mis võivad mõjutada haiguse avaldumist (Fraszczyk *et al.*, 2017).

Töö eksperimentaalselt uuriti SF-e, mille sümptomid pole (autorile teadaolevalt) avaldunud. Valimi moodustavate indiviidide kohta olid saadaval androloogilised andmed, kuid reproduktiivtervist mittepuudutavad tervisenäitajad olid puudulikud või isegi olematud. Näiteks *HNF1A* haigusseoseliste variantide poolt põhjustatava noorte küpsuseas algava diabeedi üheks diagnostiliseks kriteeriumiks on hüperglükeemia (kõrge veresuhkru sisaldus) enne 30-ndat eluaastat (Nkonge *et al.*, 2020). Glükoosi näitajate olemasolu oleks andnud võimaluse *HNF1A* geenivariantide patogeensust paremini hinnata ning määrata neile vastav klassifikatsioon. Lisaks glükoosisisaldusele oleks ka mitmete teiste näitajate olemasolu tulnud kasuks geenivariantide patogeensuse hindamisel. Suurem andmete kättesaadavus ning üldise tervisenäitajate kooskõlastamine androloogiliste andmetega võimaldaks SF-de levimust ning seost viljatusega hinnata laiemas perspektiivis. Lisaks tervisenäitajatele on olulisel kohal ka perekonna ajalugu ehk terviseandmed patsiendi perekonnaliikmete ja sugulaste kohta. Juhul kui indiviidi perekonnas on teatud haigus esinenud ka varasemalt, annab see alust arvata, et haigusseoselise variandiga patsiendil on eelsoodumus teatud haiguse suhtes.

Hüpotees, mille kohasel pidi viljatusgrupis esinema rohkem leide kui kontrollgrupis, kinnitust ei leidnud. Antud töös analüüsiti ACMG SF v3.1 geeniloendist vaid kardiometaboolsete fenotüüpidega seotud geene. Selleks, et korralikult hüpoteesi testida ning välja selgitada, kas

mehepoolse viljatusega patsientidel on geneetiline eelsoodumus, peaks uurima kõiki ACMG SF nimekirjas esindatud geene. Bakalaureusetöö maht ei võimaldanud antud juhul kõikide geenide uurimist. Vaatamata sellele tuvastati 17 haigusseoselist varianti 16-l indiviidil. ACMG on tungivalt soovitanud WES/WGS-il tuvastatud haigusseoselisi geenivariante täiendavalt uurida ning vajadusel patsientidele edastada (Miller *et al.*, 2021). SF-de edastamine patsientidele on aga esile kutsunud vastakaid seisukohti (Crawford *et al.*, 2013; Mackley *et al.*, 2017). Käesolevas töös tuvastatud kliiniliselt olulised geenivariandid on seotud haigustega, mida on võimalik enneaegse sekkumisega ennetada (äkiline südame seiskumine, südame puudulikkus, maligne hüpertermia). Haigusseoseliste geenivariantide edastamine patsientidele ja kontrollindiviididele teadustaks haiguse võimaliku avaldumise riski, mis annaks võimaluse patsientidel oma tervist tähelepanelikumalt jälgida. Edaspidi oleks oluline antud töös tuvastatud geenivariantide valideerimine Sanger sekveneerimisega ning võimalusel patsientide ja nende perekonnaliikmete põhjalik kliiniliste andmete kogumine, et hinnata fenotüübi avaldumise tõenäosust.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemustest järeldub, et viljatuspatsientide ja kontrollindiviidide sekundaarsete leidude levimuse vahel ei ole statistiliselt olulist erinevust.

KOKKUVÕTE

Eksoomiuuringute kaasamine kliinilisse praktikasse toob kaasa suurema sekundaarsete leidude tuvastamise. Sekundaarsed leiud on kliiniliselt olulised geenivariandid, mis ei ole seotud patsiendi primaarse seisundiga ning mida otsitakse aktiivselt. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium avaldab igal aastal uuendatud nimekirja geenidest, mis võivad selliseid leide sisaldada ning mille haigusseoselised variandid oleksid tuvastatavad rutiinse eksoomi sekveneerimisega. Teadustööd on kinnitanud, et krooniliste haiguste risk viljatuspatsientide seas on kõrgem võrreldes viljakate indiviididega. Leidude edastamine patsientidele annab võimaluse alustada raviga ning õigeaegsel sekkumisel ka tõsisemaid tervises seisundeid ennetada.

Antud bakalaureusetöö peamine eesmärk oli tuvastada pärilike monogeensete kardiometaboolsete haigustega seotud geenide haigusseoselised variandid lähtudes Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika sekundaarsete leidude v3.1 geeniloendist. Ühtlasi taheti välja selgitada, millised sekundaarsed leiud tulevad esile uurimisgrupis võrreldes kontrollgrupiga ning kas nende vahel on statistiliselt oluline erinevus. Uurimus põhines 519 viljatuspatsiendi ja 323 kontrollindiviidi eksoomiantmetel. Analüüsi tulemusel tuvastati 17 sekundaarset leidu 16-l indiviidil (1,9%). Viljatusgrupis oli sekundaarsete leidude levimus 1,7% (9/519) ning kontrollgrupis 2,2% (7/323). Kõigil leidudega indiviididel esines vaid üks sekundaarne leid, välja arvatud ühel krüptorhismi patsiendil, kellel tuvastati kaks kardiovaskulaarsete haigustega seotud leidu. Kõik geenivariandid esinesid vaid ühel indiviidil ning korduvaid leide ei olnud. Haigusseoselised variandid leiti järgmistest geenidest: *APOB*, *COL31A*, *DSP*, *FBNI*, *MYH7*, *PKP2*, *RYR1*, *SCN5A*, *TGFBR2* ja *TTN*. Patogeensed variandid esinesid üheksas (22,5%, 9/40) südamehaigusega seotud geenis ja ühes (11,1%, 1/9) metaboolse fenotüübiga geenis. Enim patogeenseid variante esines dilatatiivse kardiomiopaatiaiga seotud geenis *TTN* (6) ja hüpertroofilise kardiomiopaatiaiga seotud geenis *MYH7* (3).

Uurimuse hüpoteesi kohaselt pidi viljatusgrupis esinema rohkem leide kui kontrollgrupis. Hüpotees ei leidnud aga kinnitust ning sekundaarsete leidude levimus viljatusgrupis ja kontrollgrupis ei olnud statistiliselt erinev. Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium on soovitanud patsientidele edastada leitud haigusseoselised geenivariandid. Antud bakalaureusetöös tuvastatud sekundaarsed leiud põhjustavad haigusi, mida on võimalik ennetada või ravida, mistõttu võib SF-ide edastamine indiviididele olla elulise tähtsusega.

Prevalence of cardiometabolic secondary findings in Estonian idiopathic male infertility patients and control subjects

Triin Veinberg

SUMMARY

Incorporating exome studies into clinical practice will lead to increased detection of secondary findings. Secondary findings are clinically significant genetic variants unrelated to the patient's primary condition that are actively sought. The American College of Medical Genetics and Genomics annually publishes an updated list of genes that may harbor such findings and whose pathogenic variants can be identified through routine exome sequencing. Studies have confirmed that the risk of chronic diseases among male infertility patients is higher compared to fertile individuals. Returning the findings to patients provides an opportunity to start treatment and prevent serious health conditions.

The main aim of this bachelor's thesis was to identify pathogenic variants in genes associated with hereditary monogenic cardiometabolic diseases based on the American Medical Genetics and Genomics Secondary Findings v3.1 gene list. Additionally, the objective was to determine which secondary findings emerge in the study group compared to the control group and whether there is a statistically significant difference between them. The study was based on exome data from 519 infertility patients and 323 control subjects. The analysis identified 17 secondary findings in 16 individuals (1.9%). The prevalence of secondary findings in the study group was 1.7% (9/519) and 2.2% (7/323) in the control group. All individuals with findings had only one secondary finding, except for one patient with cryptorchidism who had two findings. All genetic variants occurred in only one individual and there were no recurrent findings. Disease-associated variants were found in the following genes: *APOB*, *COL31A*, *DSP*, *FBNI*, *MYH7*, *PKP2*, *RYR1*, *SCN5A*, *TGFBR2*, and *TTN*. Pathogenic variants were present in nine genes associated with heart disease (22.5%, 9/40) and one gene with a metabolic phenotype (11.1%, 1/9). The highest number of pathogenic variants occurred in the dilated cardiomyopathy-related gene *TTN* (6) and in the hypertrophic cardiomyopathy-related gene *MYH7* (3).

According to the hypothesis of the study, a higher prevalence of secondary findings was expected in the study group compared to the control group. However, the hypothesis was not confirmed, and the prevalence of secondary findings in the infertility group and control group did not differ significantly. The American College of Medical Genetics and Genomics has

recommended returning pathogenic genetic variants to patients. Secondary findings identified in this thesis cause diseases that can be prevented or treated, making it crucial to return them to the patients.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajaid – Kristiina Lillepea ja Laura Kasak, kelle kommentaarid, õpetussõnad ning suunised aitasid käesoleval tööl sündida. Ühtlasi sooviksin tänada oma kaasjuhendajat – Tambet Tõnissood, kelle julgustavad sõnad olid alati suureks toeks.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abicht, A., Schön, U., Laner, A., Holinski-Feder, E., & Diebold, I. (2021). Actionable secondary findings in arrhythmogenic right ventricle cardiomyopathy genes: impact and challenge of genetic counseling. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 11(2), 63749–63649. <https://doi.org/10.21037/CDT-20-585>
- Abul-Husn, N. S., Manickam, K., Jones, L. K., Wright, E. A., Hartzel, D. N., Gonzaga-Jauregui, C., O'Dushlaine, C., Leader, J. B., Kirchner, H. L., Lindbuchler, D. M., Barr, M. L., Giovanni, M. A., Ritchie, M. D., Overton, J. D., Reid, J. G., Metpally, R. P. R., Wardeh, A. H., Borecki, I. B., Yancopoulos, G. D., ... Murray, M. F. (2016). Genetic identification of familial hypercholesterolemia within a single U.S. Health care system. *Science*, 354(6319). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF7000/SUPPL_FILE/AAF7000-ABUL-HUSN-SM.PDF
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *Lancet (London, England)*, 397(10271), 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0032-1/FIGURES/2>
- Alfares, A. A., Kelly, M. A., McDermott, G., Funke, B. H., Lebo, M. S., Baxter, S. B., Shen, J., McLaughlin, H. M., Clark, E. H., Babb, L. J., Cox, S. W., Depalma, S. R., Ho, C. Y., Seidman, J. G., Seidman, C. E., & Rehm, H. L. (2015). Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: Expanded panels offer limited additional sensitivity. *Genetics in Medicine*, 17(11), 880–888. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.205>
- Alfares, A., Aloraini, T., subaie, L. Al, Alissa, A., Qudsi, A. Al, Alahmad, A., Mutairi, F. Al, Alswaid, A., Alothaim, A., Eyaid, W., Albalwi, M., Alturki, S., & Alfadhel, M. (2018a). Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing. *Genetics in Medicine*, 20(11), 1328–1333. <https://doi.org/10.1038/GIM.2018.41>

- Alfares, A., Aloraini, T., subaie, L. al, Alissa, A., Qudsi, A. al, Alahmad, A., Mutairi, F. al, Alswaid, A., Alothaim, A., Eyaied, W., Albalwi, M., Alturki, S., & Alfadhel, M. (2018b). Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing. *Genetics in Medicine*, 20(11), 1328–1333. <https://doi.org/10.1038/GIM.2018.41>
- Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., Granzier, H., & Labeit, S. (2001). The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circulation research*, 89(11), 1065–1072. <https://doi.org/10.1161/HH2301.100981>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., & Martin, C. (2018). Molecular Sciences Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. *Int. J. Mol. Sci*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061676>
- Benjamin, I., Griggs, R., Fitz, G., & Wing, E. (2016). *Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine*, 9th Edition. 1216. <https://evolve.elsevier.com/cs/product/9781437718997?role=student>
- Benn, M., Watts, G. F., Tybjærg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G. (2016). Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *European heart journal*, 37(17), 1384–1394. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHW028>
- Canda, E., Kalkan Uçar, S., Çoker, M., & Kalkan Uçar Mahmut Çoker, S. (2020). Biotinidase Deficiency: Prevalence, Impact And Management Strategies. *Pediatric health, medicine and therapeutics*, 11, 127–133. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S198656>
- Chalmel, F., Lardenois, A., Evrard, B., Mathieu, R., Feig, C., Demougin, P., Gattiker, A., Schulze, W., Jégou, B., Kirchhoff, C., & Primig, M. (2012). Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Human*

- reproduction* (Oxford, England), 27(11), 3233–3248.
<https://doi.org/10.1093/HUMREP/DES301>
- Chang, L., Daly, C., Miller, D. M., Allen, P. D., Boyle, J. P., Hopkins, P. M., & Shaw, M. A. (2019). Permeabilised skeletal muscle reveals mitochondrial deficiency in malignant hyperthermia-susceptible individuals. *British Journal of Anaesthesia*, 122(5), 613–621. <https://doi.org/10.1016/J.BJA.2019.02.010>
- Chen, P. C., Chen, Y. J., Yang, C. C., Lin, T. T., Huang, C. C., Chung, C. H., Sun, C. A., & Chien, W. C. (2022). Male Infertility Increases the Risk of Cardiovascular Diseases: A Nationwide Population-Based Cohort Study in Taiwan. *The World Journal of Men's Health*, 40(3), 490. <https://doi.org/10.5534/WJMH.210098>
- Chora, J. R., Iacocca, M. A., Tichý, L., Wand, H., Kurtz, C. L., Zimmermann, H., Leon, A., Williams, M., Humphries, S. E., Hooper, A. J., Trinder, M., Brunham, L. R., Costa Pereira, A., Jannes, C. E., Chen, M., Chonis, J., Wang, J., Kim, S., Johnston, T., ... Bourbon, M. (2022). The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for LDLR variant classification. *Genetics in Medicine*, 24(2), 293–306. <https://doi.org/10.1016/J.GIM.2021.09.012>
- Choy, J. T., & Eisenberg, M. L. (2018). Male infertility as a window to health. *Fertility and Sterility*, 110(5), 810–814. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2018.08.015>
- Cobellis, G., Noviello, C., Nino, F., Romano, M., Mariscoli, F., Martino, A., Parmeggiani, P., & Papparella, A. (2014). Spermatogenesis and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2014.00063>
- Condorelli, R. A., Vignera, S. La, Mongioi, L. M., Alamo, A., & Calogero, A. E. (2018). Diabetes mellitus and infertility: Different pathophysiological effects in type 1 and type 2 on sperm function. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAY), 268. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00268/BIBTEX>
- Costa, S., Cerrone, M., Saguner, A. M., Brunckhorst, C., Delmar, M., & Duru, F. (2021). Arrhythmogenic cardiomyopathy: An in-depth look at molecular mechanisms and clinical correlates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 31(7), 395–402. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2020.07.006>

- Crawford, G., Foulds, N., Fenwick, A., Hallowell, N., & Lucassen, A. (2013). Genetic medicine and incidental findings: it is more complicated than deciding whether to disclose or not. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 15(11), 896–899. <https://doi.org/10.1038/GIM.2013.165>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic acids research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1049>
- Diebold, I., Schön, U., Scharf, F., Benet-Pagès, A., Laner, A., Holinski-Feder, E., & Abicht, A. (2020). Critical assessment of secondary findings in genes linked to primary arrhythmia syndromes. *Human Mutation*, 41(5), 1025–1032. <https://doi.org/10.1002/HUMU.23996>
- Ehala-Aleksejev, K., & Punab, M. (2018a). The effect of metabolic syndrome on male reproductive health: A cross-sectional study in a group of fertile men and male partners of infertile couples. *PLOS ONE*, 13(3), e0194395. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0194395>
- Ehala-Aleksejev, K., & Punab, M. (2018b). The effect of metabolic syndrome on male reproductive health: A cross-sectional study in a group of fertile men and male partners of infertile couples. *PLOS ONE*, 13(3), e0194395. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0194395>
- Eisenberg, M. L., Li, S., Behr, B., Pera, R. R., & Cullen, M. R. (2015). Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertility and Sterility*, 103(1), 66–71. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2014.10.017>
- Eisenberg, M. L., Li, S., Cullen, M. R., & Baker, L. C. (2016). Increased risk of incident chronic medical conditions in infertile men: analysis of United States claims data. *Fertility and Sterility*, 105(3), 629–636. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.11.011>
- Elfatih, A., Mifsud, B., Syed, N., Badii, R., Mbarek, H., Abbaszadeh, F., Estivill, X., & W O R D S Acmg, K. E. (2021). Actionable genomic variants in 6045 participants from the Qatar Genome Program. <https://doi.org/10.1002/humu.24278>

- Franaszczyk, M., Chmielewski, P., Truszkowska, G., Stawinski, P., Michalak, E., Rydzanicz, M., Sobieszczanska-Malek, M., Pollak, A., Szczygiel, J., Kosinska, J., Parulski, A., Stoklosa, T., Tarnowska, A., Machnicki, M. M., Foss-Nieradko, B., Szperl, M., Sioma, A., Kusmierczyk, M., Grzybowski, J., ... Bilinska, Z. T. (2017). Titin Truncating Variants in Dilated Cardiomyopathy – Prevalence and Genotype-Phenotype Correlations. *PLOS ONE*, 12(1), e0169007. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0169007>
- Geske, J. B., Ommen, S. R., & Gersh, B. J. (2018). Hypertrophic Cardiomyopathy: Clinical Update. *JACC: Heart Failure*, 6(5), 364–375. https://doi.org/10.1016/J.JCHF.2018.02.010/SUPPL_FILE/MMC1.DOCX
- Gordon, A. S., Zouk, H., Venner, E., Eng, C. M., Funke, B. H., Amendola, L. M., Carrell, D. S., Chisholm, R. L., Chung, W. K., Denny, J. C., Fedotov, A., Hakonarson, H., Kullo, I. J., Larson, E. B., Leduc, M. S., Leppig, K. A., Lennon, N. J., Linder, J. E., Muzny, D. M., ... Jarvik, G. P. (2020). Frequency of genomic secondary findings among 21,915 eMERGE network participants. *Genetics in Medicine*, 22(9), 1470–1477. <https://doi.org/10.1038/S41436-020-0810-9>
- Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., Kalia, S. S., Korf, B. R., Martin, C. L., McGuire, A. L., Nussbaum, R. L., O'Daniel, J. M., Ormond, K. E., Rehm, H. L., Watson, M. S., Williams, M. S., & Biesecker, L. G. (2013). ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 15(7), 565. <https://doi.org/10.1038/GIM.2013.73>
- Groth, K. A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C. H., & Bojesen, A. (2013). Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(1), 20–30. <https://doi.org/10.1210/JC.2012-2382>
- Hart, R. J., Doherty, D. A., McLachlan, R. I., Walls, M. L., Keelan, J. A., Dickinson, J. E., Skakkebaek, N. E., Norman, R. J., & Handelsman, D. J. (2015). Testicular function in a birth cohort of young men. *Human reproduction (Oxford, England)*, 30(12), 2713–2724. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEV244>
- Herman, D. S., Lam, L., Taylor, M. R. G., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., Conner, L., DePalma, S. R., McDonough, B., Sparks, E., Teodorescu, D. L., Cirino,

- A. L., Banner, N. R., Pennell, D. J., Graw, S., Merlo, M., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Bos, J. M., ... Seidman, C. E. (2012). Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 366(7), 619–628. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1110186/SUPPL_FILE/NEJMOA1110186_DISCLOSURES.PDF
- Houston, B. J., Riera-Escamilla, A., Wyrwoll, M. J., Salas-Huetos, A., Xavier, M. J., Nagirnaja, L., Friedrich, C., Conrad, D. F., Aston, K. I., Krausz, C., Tüttelmann, F., O'Bryan, M. K., Veltman, J. A., & Oud, M. S. (2021). A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Human reproduction update*, 28(1), 15–29. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMAB030>
- Husser, D., Ueberham, L., Jacob, J., Heuer, D., Riedel-Heller, S., Walker, J., Hindricks, G., & Bollmann, A. (2018). Prevalence of clinically apparent hypertrophic cardiomyopathy in Germany—An analysis of over 5 million patients. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0196612>
- Hutson, J. M., & Thorup, J. (2015). Evaluation and management of the infant with cryptorchidism. *Current opinion in pediatrics*, 27(4), 520–524. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000237>
- Johnston, J. J., Brennan, M. L., Radenbaugh, B., Yoo, S. J., Hernandez, S. M., Lewis, K. L., Katz, A. E., Manolio, T. A., & Biesecker, L. G. (2022). The ACMG SF v3.0 gene list increases returnable variant detection by 22% when compared with v2.0 in the ClinSeq cohort. *Genetics in Medicine*, 24(3), 736–743. <https://doi.org/10.1016/J.GIM.2021.11.012>
- Johnston, J. J., Dirksen, R. T., Girard, T., Gonsalves, S. G., Hopkins, P. M., Riazi, S., Saddic, L. A., Sambuughin, N., Saxena, R., Stowell, K., Weber, J., Rosenberg, H., & Biesecker, L. G. (2021). Variant curation expert panel recommendations for RYR1 pathogenicity classifications in malignant hyperthermia susceptibility. *Genetics in Medicine*, 23(7), 1288–1295. <https://doi.org/10.1038/S41436-021-01125-W>
- Johnston, J. J., Dirksen, R. T., Girard, T., Hopkins, P. M., Kraeva, N., Ognoon, M., Radenbaugh, K. B., Riazi, S., Robinson, R. L., Saddic, L. A., Sambuughin, N., Saxena, R., Shepherd, S., Stowell, K., Weber, J., Yoo, S., Rosenberg, H., &

- Biesecker, L. G. (2022). Updated variant curation expert panel criteria and pathogenicity classifications for 251 variants for RYR1-related malignant hyperthermia susceptibility. *Human Molecular Genetics*, 31(23), 4087–4093. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDAC145>
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 62(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2012.04.048>
- Kalia, S. S., Adelman, K., Bale, S. J., Chung, W. K., Eng, C., Evans, J. P., Herman, G. E., Hufnagel, S. B., Klein, T. E., Korf, B. R., McKelvey, K. D., Ormond, K. E., Richards, C. S., Vlangos, C. N., Watson, M., Martin, C. L., & Miller, D. T. (2016). Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine* 2017 19:2, 19(2), 249–255. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.190>
- Kasak, L., & Laan, M. (2021). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human genetics*, 140(1), 135–154. <https://doi.org/10.1007/S00439-020-02112-Y>
- Kasak, L., Lillepea, K., Nagirnaja, L., Aston, K. I., Schlegel, P. N., Gonçalves, J., Carvalho, F., Moreno-Mendoza, D., Almstrup, K., Eisenberg, M. L., Jarvi, K. A., O'Bryan, M. K., Lopes, A. M., Conrad, D. F., Consortium, G., Conrad, D. F., Nagirnaja, L., Aston, K. I., Carrell, D. T., ... Laan, M. (2022). Actionable secondary findings following exome sequencing of 836 non-obstructive azoospermia cases and their value in patient management. *Human Reproduction*, 37(7), 1652–1663. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAC100>
- Kasman, A. M., Li, S., Luke, B., Sutcliffe, A. G., Pacey, A. A., & Eisenberg, M. L. (2019). Male Infertility and Future Cardiometabolic Health: Does the Association Vary by Sociodemographic Factors? *Urology*, 133, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2019.06.041>
- Kelly, M. A., Caleshu, C., Morales, A., Buchan, J., Wolf, Z., Harrison, S. M., Cook, S., Dillon, M. W., Garcia, J., Haverfield, E., Jongbloed, J. D. H., Macaya, D., Manrai,

- A., Orland, K., Richard, G., Spoonamore, K., Thomas, M., Thomson, K., Vincent, L. M., ... Wilde, A. (2018). Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel. *Genetics in Medicine*, 20(3), 351–359. <https://doi.org/10.1038/GIM.2017.218>
- Kim, S. Y., Kim, H. J., Lee, B. Y., Park, S. Y., Lee, H. S., & Seo, J. T. (2017). Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men with Non-obstructive Azoospermia and Severe Oligozoospermia. *Journal of Reproduction & Infertility*, 18(3), 307. [/pmc/articles/PMC5641440/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35641440/)
- Kolon, T. F., Herndon, C. D. A., Baker, L. A., Baskin, L. S., Baxter, C. G., Cheng, E. Y., Diaz, M., Lee, P. A., Seashore, C. J., Tasian, G. E., & Barthold, J. S. (2014). Evaluation and treatment of Cryptorchidism: AUA guideline. *Journal of Urology*, 192(2), 337–345. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2014.05.005>
- Krausz, C. (2011). Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2), 271–285. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2010.08.006>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature reviews. Urology*, 15(6), 369–384. <https://doi.org/10.1038/S41585-018-0003-3>
- Kuperus, E., Kruijshaar, M. E., Wens, S. C. A., De Vries, J. M., Favejee, M. M., Van Der Meijden, J. C., Rizopoulos, D., Brusse, E., Van Doorn, P. A., Van Der Ploeg, A. T., & Van Der Beek, N. A. M. E. (2017). Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease. *Neurology*, 89(23), 2365–2373. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004711>
- Kübarsepp, V., Varik, K., Varendi, H., Antson, A., Veinla, M., Nellis, G., Merila, M., Salundi, U., Astover, V., & Punab, M. (2022). Prevalence of congenital cryptorchidism in Estonia. *Andrology*, 10(2), 303–309. <https://doi.org/10.1111/ANDR.13121>
- Laan, M. (2019). Systematic review of the monogenetic causes of male infertility: the first step towards diagnostic gene panels in the andrology clinic. *Human Reproduction*, 34(5), 783–785. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEZ024>

- Laan, M., Kasak, L., & Punab, M. (2021). Translational aspects of novel findings in genetics of male infertility—status quo 2021. *British Medical Bulletin*, 140(1), 5–22. <https://doi.org/10.1093/BMB/LDAB025>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., ... Maglott, D. R. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic acids research*, 46(D1), D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1153>
- Latif, T., Jensen, T. K., Mehlsen, J., Holmboe, S. A., Brinth, L., Pors, K., Skouby, S. O., Jørgensen, N., & Lindahl-Jacobsen, R. (2017). Semen Quality as a Predictor of Subsequent Morbidity: A Danish Cohort Study of 4,712 Men With Long-Term Follow-up. *American Journal of Epidemiology*, 186(8), 910–917. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWX067>
- Leslie, S., Khan, M. A., & Soon-Sutton, T. (2023). Male infertility. *StatPearls*.
- Liu, R. Z. (2012). [AZF deletions and male infertility]. *Zhonghua nan ke xue = National Journal of Andrology*, 18(11), 963–968. <https://europepmc.org/article/med/23214242>
- Llabador, M. A., Pagine, A., Lefebvre-Maunoury, C., Marcelli, F., Leroy-Martin, B., Rigot, J. M., & Mitchell, V. (2015). Congenital bilateral absence of the vas deferens: the impact of spermatogenesis quality on intracytoplasmic sperm injection outcomes in 108 men. *Andrology*, 3(3), 473–480. <https://doi.org/10.1111/ANDR.12019>
- Mackley, M. P., Fletcher, B., Parker, M., Watkins, H., & Ormondroyd, E. (2017). Stakeholder views on secondary findings in whole-genome and whole-exome sequencing: a systematic review of quantitative and qualitative studies. *Genetics in Medicine*, 19(3), 283–293. <https://doi.org/10.1038/GIM.2016.109>
- Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A., & Jabado, N. (2011). What can exome sequencing do for you? *Journal of medical genetics*, 48(9), 580–589. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2011-100223>
- Marcus, F. I., Edson, S., & Towbin, J. A. (2013). Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: A Practical Guide for Physicians. *Journal of the*

- American College of Cardiology*, 61(19), 1945–1948.
<https://doi.org/10.1016/J.JACC.2013.01.073>
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13059-016-0974-4/TABLES/8>
- Merlo, M., Cannatà, A., Gobbo, M., Stolfo, D., Elliott, P. M., & Sinagra, G. (2018). Evolving concepts in dilated cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, 20(2), 228–239. <https://doi.org/10.1002/EJHF.1103>
- Miller, D. M., Daly, C., Aboelsaod, E. M., Gardner, L., Hobson, S. J., Riasat, K., Shepherd, S., Robinson, R. L., Bilmen, J. G., Gupta, P. K., Shaw, M. A., & Hopkins, P. M. (2018a). Genetic epidemiology of malignant hyperthermia in the UK. *British Journal of Anaesthesia*, 121(4), 944–952. <https://doi.org/10.1016/J.BJA.2018.06.028>
- Miller, D. M., Daly, C., Aboelsaod, E. M., Gardner, L., Hobson, S. J., Riasat, K., Shepherd, S., Robinson, R. L., Bilmen, J. G., Gupta, P. K., Shaw, M. A., & Hopkins, P. M. (2018b). Genetic epidemiology of malignant hyperthermia in the UK. *British Journal of Anaesthesia*, 121(4), 944–952. <https://doi.org/10.1016/J.BJA.2018.06.028>
- Miller, D. T., Lee, K., Abul-Husn, N. S., Amendola, L. M., Brothers, K., Chung, W. K., Gollob, M. H., Gordon, A. S., Harrison, S. M., Hershberger, R. E., Klein, T. E., Richards, C. S., Stewart, D. R., & Martin, C. L. (2022). ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 24(7), 1407–1414. <https://doi.org/10.1016/J.GIM.2022.04.006>
- Miller, D. T., Lee, K., Chung, W. K., Gordon, A. S., Herman, G. E., Klein, T. E., Stewart, D. R., Amendola, L. M., Adelman, K., Bale, S. J., Gollob, M. H., Harrison, S. M., Hershberger, R. E., McKelvey, K., Richards, C. S., Vlangos, C. N., Watson, M. S., & Martin, C. L. (2021). ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 23(8), 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/S41436-021-01172-3>

- Muiño-Mosquera, L., Steijns, F., Audenaert, T., Meerschaut, I., De Paepe, A., Steyaert, W., Symoens, S., Coucke, P., Callewaert, B., Renard, M., & De Backer, J. (2018). Tailoring the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology Guidelines for the Interpretation of Sequenced Variants in the FBN1 Gene for Marfan Syndrome: Proposal for a Disease- and Gene-Specific Guideline. *Circulation. Genomic and precision medicine*, 11(6), e002039. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.002039>
- Nagirnaja, L., Lopes, A. M., Charng, W. L., Miller, B., Stakaitis, R., Golubickaite, I., Stendahl, A., Luan, T., Friedrich, C., Mahyari, E., Fadial, E., Kasak, L., Vigh-Conrad, K., Oud, M. S., Xavier, M. J., Cheers, S. R., James, E. R., Guo, J., Jenkins, T. G., ... Conrad, D. F. (2022). Diverse monogenic subforms of human spermatogenic failure. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35661-z>
- Nkonge, K. M., Nkonge, D. K., & Nkonge, T. N. (2020). The epidemiology, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment of maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Clinical Diabetes and Endocrinology* 2020 6:1, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40842-020-00112-5>
- Olesen, I. A., Andersson, A.-M., Aksglaede, L., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Joergensen, N., & Juul, A. (2017). Clinical, genetic, biochemical, and testicular biopsy findings among 1,213 men evaluated for infertility. *Fertility and Sterility*, 107, 74–82.e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.015>
- Oud, M. S., Ramos, L., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., Okutman, Ö., Viville, S., de Vries, P. F., Smeets, D. F. C. M., Lugtenberg, D., Hehir-Kwa, J. Y., Gilissen, C., van de Vorst, M., Vissers, L. E. L. M., Hoischen, A., Meijerink, A. M., Fleischer, K., Veltman, J. A., & Noordam, M. J. (2017). Validation and application of a novel integrated genetic screening method to a cohort of 1,112 men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Human Mutation*, 38(11), 1592–1605. <https://doi.org/10.1002/HUMU.23312>
- Patat, O., Pagin, A., Siegfried, A., Mitchell, V., Chassaing, N., Faguer, S., Monteil, L., Gaston, V., Bujan, L., Courtade-Saïdi, M., Marcelli, F., Lalau, G., Rigot, J. M., Mieusset, R., & Bieth, E. (2016). Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral

- Absence of Vas Deferens. *The American Journal of Human Genetics*, 99(2), 437–442. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2016.06.012>
- Peña, V. N., Kohn, T. P., & Herati, A. S. (2020). Genetic mutations contributing to non-obstructive azoospermia. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 34(6). <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2020.101479>
- Petrosino, M., Novak, L., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Turina, P., Capriotti, E., & Consalvi, V. (2021). Analysis and interpretation of the impact of missense variants in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5416. <https://doi.org/10.3390/IJMS22115416/S1>
- Pugh, T. J., Kelly, M. A., Gowrisankar, S., Hynes, E., Seidman, M. A., Baxter, S. M., Bowser, M., Harrison, B., Aaron, D., Mahanta, L. M., & Lakdaw, N. K. (2014). *The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing*. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.204>
- 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. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEW284>
- Riazi, S., Kraeva, N., & Hopkins, P. M. (s.a.). Updated guide for the management of malignant hyperthermia. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, 65. <https://doi.org/10.1007/s12630-018-1108-0>
- Riazi, S., Larach, M. G., Hu, C., Wijeyesundera, D., Massey, C., & Kraeva, N. (2014). Malignant hyperthermia in Canada: Characteristics of index anesthetics in 129 malignant hyperthermia susceptible probands. *Anesthesia and Analgesia*, 118(2), 381–387. <https://doi.org/10.1213/ANE.0B013E3182937D8B>
- 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* 2015 17:5, 17(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Turner, D., & Mesirov, J. P. (2023). igv.js: an embeddable JavaScript implementation of the Integrative Genomics Viewer (IGV). *Bioinformatics*, 39(1). <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAC830>
- Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T., & Stowell, K. (2015). Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S13023-015-0310-1/TABLES/2>
- Samocha, K. E., Kosmicki, J. A., Karczewski, K. J., O'Donnell-Luria, A. H., Pierce-Hoffman, E., MacArthur, D. G., Neale, B. M., & Daly, M. J. (2017). Regional missense constraint improves variant deleteriousness prediction. *bioRxiv*, 148353. <https://doi.org/10.1101/148353>
- Saunders, C. J., Miller, N. A., Soden, S. E., Dinwiddie, D. L., Noll, A., Alnadi, N. A., Andraws, N., Patterson, M. L. A., Krivohlavek, L. A., Fellis, J., Humphray, S., Saffrey, P., Kingsbury, Z., Weir, J. C., Betley, J., Grocock, R. J., Margulies, E. H., Farrow, E. G., Artman, M., ... Kingsmore, S. F. (2012). Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Science Translational Medicine*, 4(154). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3004041/SUPPL_FILE/4-154RA135_SM.PDF
- Schwartz, P. J., Crotti, L., & Insolia, R. (2012). Long-QT Syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 5(4), 868–877. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.962019>
- Shin, J., & Jeon, G. W. (2020). Comparison of diagnostic and treatment guidelines for undescended testis. *Clinical and experimental pediatrics*, 63(11), 415–421. <https://doi.org/10.3345/CEP.2019.01438>
- Skrahin, A., Cheema, H. A., Hussain, M., Rana, N. N., Rehman, K. U., Kumar, R., Oprea, G., Ameziane, N., Rolfs, A., & Skrahina, V. (2023). Secondary findings in a large Pakistani cohort tested with whole genome sequencing. *Life Science Alliance*, 6(3). <https://doi.org/10.26508/LSA.202201673>
- Smith, E., Care, M., Burke-Martindale, C., & Weissler-Snir, A. (2022). Secondary Findings Using Broad Pan Cardiomyopathy and Arrhythmia Panels in Patients With a Personal or Family History of Inherited Cardiomyopathy or Arrhythmia Syndrome.

American Journal of Cardiology, 178, 137–141.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2022.05.022>

- Soraggi, S., Riera, M., Rajpert-De Meyts, E., Schierup, M. H., & Almstrup, K. (2021). Evaluating genetic causes of azoospermia: What can we learn from a complex cellular structure and single-cell transcriptomics of the human testis? *Human genetics*, 140(1), 183–201. <https://doi.org/10.1007/S00439-020-02116-8>
- Stranneheim, H., & Wedell, A. (2016). Exome and genome sequencing: a revolution for the discovery and diagnosis of monogenic disorders. *Journal of Internal Medicine*, 279(1), 3–15. <https://doi.org/10.1111/JOIM.12399>
- ZHANG, H., MALONEY, K. A., BARBETTI, F., GREELEY, S. A. W., KETTUNEN, J. L. T., MIRANDA, J. P., MIRSHAHI, U. L., MOLNES, J., MURPHY, R., NAYLOR, R. N., PAKYZ, R. E., PHILIPSON, L. H., PRUDENTE, S., TUOMI, T., UDLER, M., COLCLOUGH, K., JENG, L., & POLLIN, T. I. (2020). 1453-P: Adaption of the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines for GCK, HNF1A, HNF4A-MODY: Recommendations from the ClinGen Monogenic Diabetes Expert Panel. *Diabetes*, 69(Supplement_1). <https://doi.org/10.2337/DB20-1453-P>
- Toepfer, C. N., Wakimoto, H., Garfinkel, A. C., McDonough, B., Liao, D., Jiang, J., Tai, A. C., Gorham, J. M., Lunde, I. G., Lun, M., Lynch, T. L., McNamara, J. W., Sadayappan, S., Redwood, C. S., Watkins, H. C., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2019). Hypertrophic cardiomyopathy mutations in MYBPC3 dysregulate myosin. *Science Translational Medicine*, 11(476). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAT1199/SUPPL_FILE/AAT1199_SM.PDF
- Tournaye, H., Krausz, C., & Oates, R. D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 5(7), 544–553. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30040-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30040-7)
- Van Hout, C. V, Tachmazidou, I., Backman, J. D., Hoffman, J. D., Liu, D., Pandey, A. K., Gonzaga-Jauregui, C., Khalid, S., Ye, B., Banerjee, N., Li, A. H., Marcketta, A., Staples, J., Schurmann, C., Hawes, A., Maxwell, E., Barnard, L., Lopez, A., Penn, J., ... Baras, A. (2020). Exome sequencing and characterization of 49,960 individuals in the UK Biobank. *Nature*, 586, 749. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2853-0>

- Vloeberghs, V., Verheyen, G., Santos-Ribeiro, S., Staessen, C., Verpoest, W., Gies, I., & Tournaye, H. (2018). Is genetic fatherhood within reach for all azoospermic Klinefelter men? *PloS one*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0200300>
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* (s.a.). Salvestatud 16. veebruar 2022, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
- Xu, Y., Lu, H., Wang, Y., Zhang, Z., & Wu, Q. (2020). Comprehensive metabolic profiles of seminal plasma with different forms of male infertility and their correlation with sperm parameters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 177, 112888. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2019.112888>
- Yang, Y., Muzny, D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Ding, Y., Ward, P., Braxton, A., Wang, M., Buhay, C., Veeraraghavan, N., Hawes, A., Chiang, T., Leduc, M., Beuten, J., Zhang, J., He, W., Scull, J., Willis, A., ... Eng, C. M. (2014). Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA*, 312(18), 1870–1879. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2014.14601>

TÖÖS KASUTATUD VEEBIAADRESSID

ClinVar andmebaas. Külastatud märts 2023.

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

Franklin andmebaas. Külastatud aprill 2023.

<https://franklin.genoox.com>

GraphPad QuickCalcs veebileht. Külastatud 07.05.2023.

<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ClinVar> andmebaas Külastatud märts 2023.

Tartu Ülikooli Kliinikum, Ühendlabor aineregister. Külastatud mai 2023.

<https://www.kliinikum.ee/yhendlabor/analueueside-aineregister>

LIHTLITSENTS

Mina, Triin Veinberg

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Kardiometaboolsete sekundaarsete leiudude esinemine Eesti päritoluga idiopaatilise viljatusega patsientidel ja kontrollindiviididel“, mille juhendajad on Kristiina Lillepea, Laura Kasak ja Tambet Tõnissoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 29.05.2026 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.

Triin Veinberg

29.05.2023