

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

**Meessuguelundite arengu anomaaliate geneetilised põhjused ühe
patsiendi eksoomi sekveneerimise andmete põhjal**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Eveliis Koppel

Juhendajad:

teadur Marina Grigorova, PhD

prof. Maris Laan

TARTU 2017

INFOLEHT

Meessuguelundite arengu anomaaliate geneetilised põhjused ühe patsiendi eksoomi sekveneerimise andmete põhjal.

Käesolevas töös annan kirjanduse põhjal ülevaate mehe reproduktiivsüsteemi arengust ning nimekirja geenidest, milles esinevad geneetilised variandid võiksid põhjustada hüpospaadiat ning hüpogonadismi. Kõnealuse fenotüübiga patsiendi eksoom ehk geenide kodeerivad osad, millelt toimub ekspressioon ja valkude süntees, sekveneeriti ning saadud andmeid võrreldi kandidaatgeenide nimekirjaga. Ühtegi patsiendi fenotüüpi põhjustavat geneetilist varianti nende geenide seast ei leitud.

Meessuguelundite areng, reproduktiivsüsteem, eksoomi sekveneerimine, hüpospaadia, hüpogonadism

B790 Kliiniline geneetika

Genetical causes of male reproductive system developmental disorders using single patient's exome sequencing data.

This study gives a brief overview about the development of male reproductive system and a list about genes, which could carry genetical variants that have been previously related to hypospadias and hypogonadism. Exome of a patient with this phenotype was sequenced and results were compared with candidate gene's variants. Exome is a part of human genome that consists protein coding genes. Ultimately, no genetical variants were found from the candidate gene list that could cause patient's phenotype.

Development of male genitalia, reproductive system, exome sequencing, hypospadias, hypogonadism

B790 Clinical genetics

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Mehe sooline areng.....	8
1.1.1. Prenataalne mehe suguorganite areng	8
1.1.2. Postnataalne mehe suguorganite areng.....	12
1.1.2.1. Minipuberteet	12
1.1.2.2. Puberteet	14
1.2. Täiskasvanud mehe munandite funktsioneerimine.....	14
1.2.1. Steroidogenees.....	14
1.2.2. Spermatogenees	15
1.3. Inimese meessuguorganite arengu anomaaliad	16
1.3.1. Mehe suguelundite anomaaliate definitsioonid	16
1.3.2. Mehe suguelundite anomaaliate põhjused	18
1.3.3. Mehe suguelundite anomaaliate tagajärjed.....	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	22
2.2.1. Patsiendi fenotüüp	22
2.2.2. DNA eraldamine patsiendi vereproovist	22
2.2.3. Teadusliku erialakirjanduse otsimine ja analüüsimine.....	23
2.2.4. Eksoomi analüüs.....	24
2.2.4.1. Eksoomi sekveneerimine	24
2.2.4.2. Bioinformaatiline analüüs	25

2.3. Tulemused	27
2.3.1. DNA kvaliteet.....	27
2.3.2. Sugulise arengu häirega seotud geenid.....	27
2.3.3. Geneetiline varieeruvus patsiendi eksoomis	35
2.3.3.1. Mittesünonüümsed mutatsioonid.....	35
2.4. Arutelu	38
KOKKUVÕTE	40
SUMMARY	41
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS	50

KASUTATUD LÜHENDID

AMH – anti-Mülleri hormoon (*anti-Müllerian hormone*)

BWA - Burrows-Wheeleri joondaja (*Burrows-Wheeler Aligner*)

CADD skoor – skoor, mis näitab, kui kahjulik on antud ühenukleotiidne muutus või insertioon-deletsioon inimese genoomis (*combined annotation-dependent depletion*)

CNV – DNA koopiarvu variatsioonid (*copy number variation*)

DHT - 5 α -dihüdrotestosteroon

EDC – endokriinide tööd häirivad kemikaalid (*endocrine disrupting chemicals*)

ExAC – eksoomi sekveneerimise andmete andmebaas (*Exome Aggregation Consortium*)

FIMM – Helsingi Ülikooli Molekulaarmeditsiini osakond (*Institute for Molecular Medicine Finland*)

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

g - raskuskiirendus

GnRH – gonadotropiine vabastav hormoon (*gonadotropin-releasing hormone*)

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

INSL3 – insuliinilaadne peptiid (*insuline-like peptide 3*)

LH – luteiniseeriv hormoon (*luteinizing hormone*)

MGI – hiire genoomi andmebaas (*Mouse Genome Informatics*)

NCBI – andmebaas (*National Center for Biotechnology Information*)

OMIM – andmebaas (*Online Mendelian Inheritance in Man*)

PSAP – bioinformaatilise analüüsi töövoog, mis võrdleb eksoomi sekveneerimise üksikuid variante tervete inimeste populatsioonidega (*population sampling probability*)

SHBG – suguhormoone siduv globuliin (*sex hormone-binding globulin*)

SIFT – tarkvara, mis ennustab geneetilise variandi kahjulikkust (*Sorting Tolerant from Intolerant*)

TBE - Tris-boorhape-EDTA puhvrilahus

TDS – testise düsgeneesi sündroom (*testicular dysgenesis syndrome*)

UCSC – andmebaas (*University of California Santa Cruz*), mis sisaldab informatsiooni nii inimese kui paljude mudelorganismide genoomi kohta

VCF – eksoomi või genoomi sekveneerimise variantide tekstifail (*Variant Call Format*)

VCP – geneetiliste variantide esilekutsumise käsuriid (*variant-calling pipeline*)

SISSEJUHATUS

Soolise arengu häire on kaasasündinud haigus, mille puhul esineb anomaaliad fenotüübis, suguelundites või kromosoomide õiges ehituses ning arvus. Tegemist on multifaktoriaalse haigusega, kus patsiendi fenotüüp sõltub nii keskkonna faktoritest kui ka patsiendi geneetilisest taustast. Kõigest 13% soolise arengu häirega patsientidest saab õige geneetilise diagnoosi (Eggers jt., 2016). Soolise arengu häire toob endaga kaasa suurenenud riski munandivähile ning viljatusele (Skakkebaek jt., 2016). Samuti on tegemist traumeeriva haigusega nii lapsele kui vanematele. Viimastel aastatel on uute haigustega seotud geneetiliste variantide tuvastamiseks hakatud kasutama hüpoteesivaba suuremahulist analüüsi, mille käigus uuritakse kõiki inimese eksoomi ehk genoomi valke kodeerivad alasid (eksoneid).

Eksoomi sekveneerimine kujutab endast valke kodeerivate alade (eksonite) nukleotiidses järjestuses määramist, mis moodustavad kogu inimese genoomist umbes 2% (Bamshad jt., 2011). Viimasel ajal on aina populaarsust kogunud monogeensete haiguste diagnostikas eksoomi sekveneerimise andmete kasutamine (Chaitankar jt., 2016), sealhulgas ka viljatusega seotud geenide polümorfismide tuvastamine (Rui jt., 2015).

Käesolevas bakalaureusetöös annan kirjanduse osas ülevaate mehe suguelundkonna arengust, arengut mõjutavatest keskkonna ning geneetilistest faktoritest ning soolise arengu anomaaliatest. Eksperimentaalses osas koostas nimekirja geenidest, mille variante on kirjanduses varasemalt seostatud mehe soolise arengu häiretega, eelkõige hüpogonadismi ning hüpospaadiaga. Antud nimekirja võrdlesin hüpospaadia ja hüpogonadismi diagnoosiga patsiendi eksoomi sekveneerimise andmetega.

Töö eesmärgiks on ühe patsiendi eksoomi geneetilisi variante võrrelda kandidaatgeenide nimekirjaga ning teha kokkuvõtte leitud muutustest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

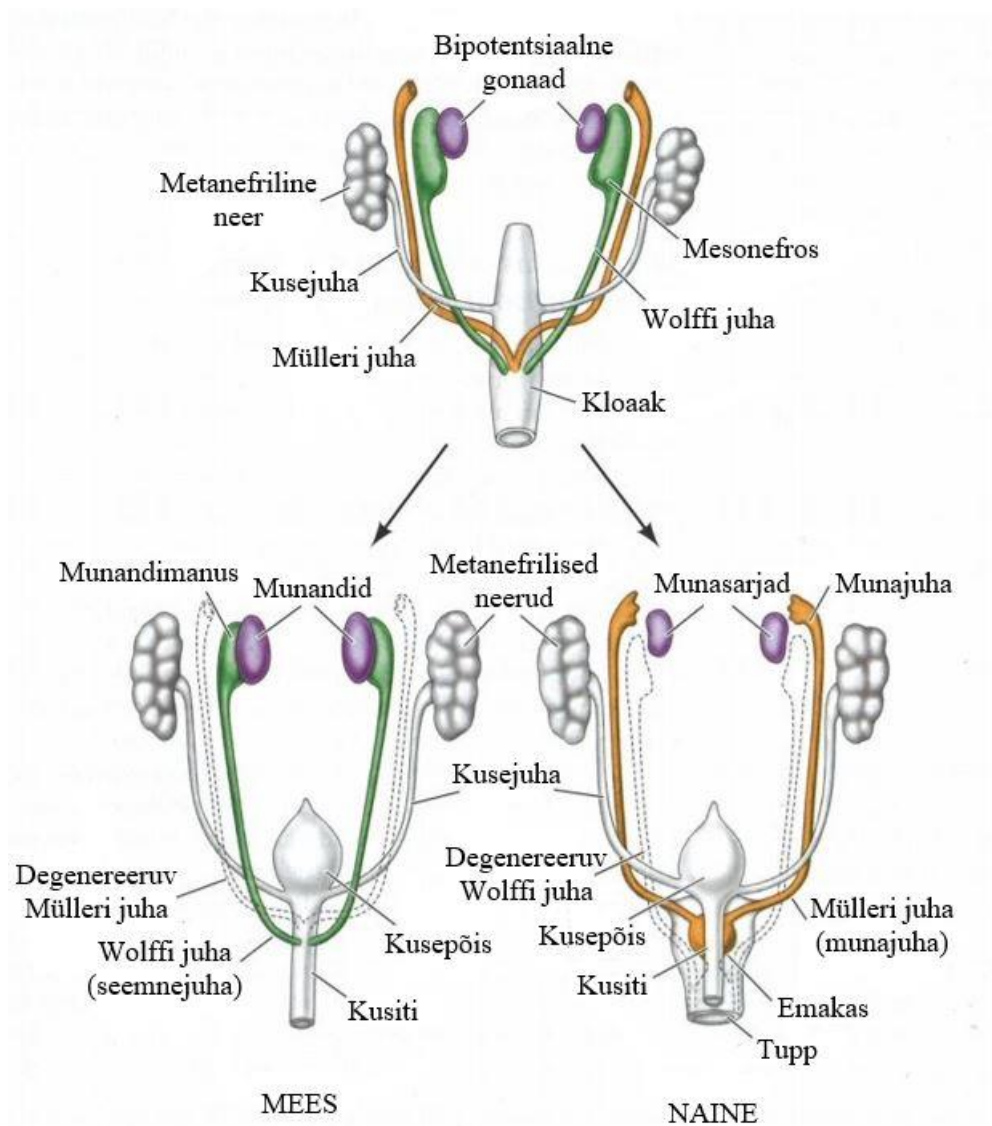
1.1. Mehe sooline areng

1.1.1. Prenataalne mehe suguorganite areng

Primaarne soo määratlus toimub üldjuhul Y-kromosoomi olemasolu või puudumise kaudu. Mõnedel putukatel ning imetajatel on esmaseks soo määrajaks kas teine X kromosoom, mille korral sünnib tütar (XX), või Y kromosoom poiste puhul (XY). Sugurakud ning gonaadid tekivad mõlemad ühisest bipotentsiaalsest organist. Munasarja ning testiste kujunemine on geenide poolt juhitud protsess (Joonis 1). Meessoo kujunemiseks on Y kromosoomi olemasolu suure tähtsusega, sest kodeerib testist-määravat faktorit (TDF või SRY), mis suunab bipotentsiaalse gonaadi arenema munanditeks (Gilbert, 2010; Sinclair jt., 1990).

Munandid toodavad kahte olulist faktorit: anti-Mülleri hormooni (AMH) ja androgeene, testosterooni ja 5 α -dihüdrotestosterooni (DHT). Sertoli rakud sünteesivad AMH-d, mis viib Mülleri juha degenereerumiseni. Leydigi rakkude poolt androgeenide tootmise tulemusena kujunevad Wolffi juhadest sisemised meessuguelundid – seemnejuha, munandimanus, seemnepõieke. Paljud soospetsiifilised arengu häired on põhjustatud androgeenide toime regulatsioonis osalevate geenide mutatsioonidest (Gilbert, 2010).

Meessuguelundid arenevad välja bipotentsiaalsest gonaadist, mis kujuneb loote neljandal arengunädalal ning säilib seitsmenda nädalani (Joonis 1). Sugurakud migreeruvad kuuendal raseduse nädalal somaatiliste rakkude keskele. Alates kaheksandast nädalast hakkavad arenema meessugutunnused (Gilbert, 2010). Y-kromosoomil paikneva geeni *SRY* poolt kodeeritud valk aktiveerib nii autosomaalse *SOX9* (*SRY-box 9*, kromosoom 17) kui ka teiste sooliseks arenguks vajalike geenide ekspressiooni, reprogrammeerib kromatiini struktuuri ja juhib Sertoli rakkude arengut (Oh ja Lau, 2006). Sertoli rakkude arenguks on oluline *SOX9* transkriptsioonifaktor, koos *SF1* (*steroidogenic factor 1*) transkriptsioonifaktoriga reguleerivad *AMH* geeni ekspressiooni. (Morais da Silva jt., 1996). Nii *SRY* kui *SOX9* aktiveerivad koos järgmiste meessoo arengus oluliste geenide ekspressiooni: *FGF9* (*fibroblast growth factor 9*) (Colvin jt., 2001), *FGF13* (*fibroblast growth factor 13*) (Cory jt., 2007), *WT1* (*Wilms tumor1*) (Hammes jt., 2001), *BMP7* (*bone morphogenic protein 7*) (Ross jt., 2007). Kõik need geenid on olulised bipotentsiaalse gonaadi tekkeks (Joonis 2) (Li jt., 2014).



Joonis 1. Bipotentsiaalse gonaadi areng mees- ning naissuguelunditeks.

Bipotentsiaalse gonaadi staadiumis on olemas nii Wolffii kui Mülleri juha. Naissuguelundid arenevad Mülleri juhast, mis diferentseerub emakaks, munajuhaks, emakakaelaks. Testosterooni puudumise tõttu degenerereerub Wolffii juha. Meestel arenevad munandimanus ning seemnejuha Wolffii juhast. Loote Sertoli rakud sekreteerivad AMH-d, mis ei lase naissuguelunditel areneda. Kohandatud Gilbert, 2010 joonise 14.3 järgi.

Kõigepealt diferentseeruvad somaatilised rakud Sertoli rakkudeks, mis ümbritsevad sugurakke ning moodustavad esmased seemnetorukesed. Pärast kaheksandat arengunädalat hakkab kujunema sugurakkude ja seemnetorukeste ümber paks ekstratsellulaarne maatriks. Sellest hetkest arenevad sugurakud seemnetorukeste sees. Sertoli rakud eritavad AMH-d ja seega blokeerivad naissuguorganite arengu ning on hiljem vajalikud spermatogeneesiks. Samuti arenevad lootel mesenhümaalsetest rakkudest Leydigi rakud, mis toodavad testosterooni (Gilbert, 2010). Hiire embrüos tekivad Leydigi rakud 12,5 päeva (inimesel

vastavalt 40 päeva, Joonis 2) pärast viljastumist ning on olulised maskuliniseerumise regulaatorid (Byskov, 1986). Loote Leydigi rakkude töö ei sõltu LH-st ega tema retseptorist (O'Shaughnessy jt., 1998). Munandisse tekib ka hulgaliselt veresooni (Moody, 2007).

Liik	Carniege staadium	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inimene	Päev	1	2-3	4-5	5-6	7-12	13-15	15-17	17-19	20	22	24	28
Hiir	Päev	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9,5	10	10,5

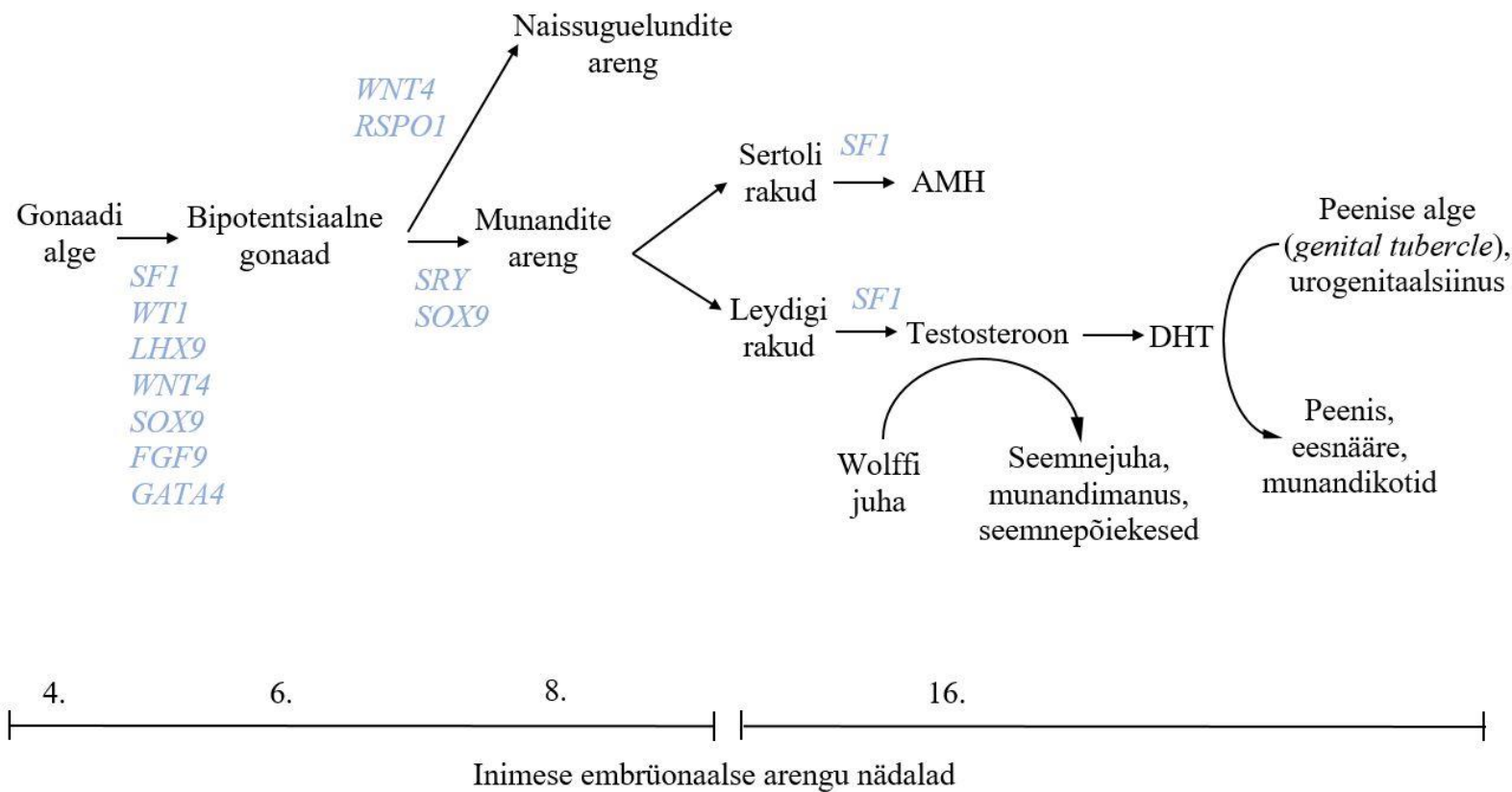
Liik	Carniege staadium	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Inimene	Päev	30	33	36	40	42	44	48	52	54	56	58
Hiir	Päev	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14	14,5	15	15,5	16

Joonis 2. Hiire ja inimese varajaste embrüonaalsete päevade võrdlus koos nn. Carniege staadiumitega.

Carniege staadiume hakati klassifitseerima 1900-ndate alguses ning määratakse embrüo sisemiste ning väliste morfoloogiliste tunnuste järgi. Inimeses katavad staadiumid raseduse esimesed kaheksa nädalat. Kohandatud Otis ja Brent, 1954 järgi.

Peale munandite kujunemist mängivad kaheksandast arengunädalast kuni sünnini olulist rolli kolm põhilist hormooni: AMH, testosteroon ja insuliinilaadne peptiid 3 (INSL3). AMH vastutab Mülleri juha degenereerumise eest, testosteroon Wolff'i juha tekkimise eest ning INSL3 munandite laskumise eest munandikotti (Moody, 2007). Oluline on ka DHT, mis konverteeritakse testosteroonist ning osaleb seemnejuha, eesnäärme, peenise ja munandikottide arengus (Siiteri ja Wilson, 1974).

Gonaadi algest bipotentsiaalse gonaadi tekkeks on teiste seas vaja ka *LHX9*, *SF1* ning *WT1* geenideprodukte (Joonis 3). Hiirtes on näidatud, et nende geenide inaktiveerimisel suguelundeid ei teki (Gilbert, 2010). Bipotentsiaalne gonaad suunatakse arenema naissuguelunditeks *RSPO1* ja *WNT4* poolt ning meessuguelunditeks Y -kromosoomil asuva *SRY* ja autosomaalse *SOX9* poolt. *SF1* suunab testosterooni ning AMH sünteesi, mille tagajärjel arenevad seemnejuha, munandimanus, seemnepõiekesed ning peenis, eesnääre, munandikotid (Gilbert, 2010).

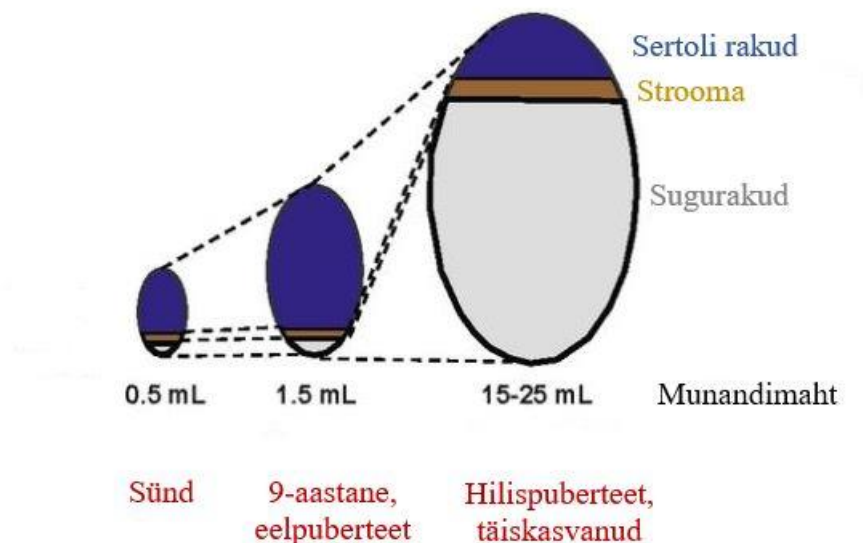


Joonis 3. Inimese meessuguelundite areng ning arengut mõjutavad geenid. Kohandatud Gilbert, 2010 joonise 14.1 järgi
FGF9 – fibroblast growth factor 9; *GATA4* – GATA binding protein 4; *LHX9* – LIM homeobox 9; *RSPO1* – R-spondin 1;
SF1 – splicing factor 1; *SOX9* – SRY-box9; *SRY* – sex determining region Y; *WNT4* – Wingless-type MMTV integration site family, member 4; *WT1* – Wilms tumor 1

1.1.2. Postnataalne mehe suguorganite areng

Sekundaarne soo determinatsioon toimub suguelundite poolt toodetud hormoonide ning parakriinsete faktorite mõjul (Gilbert, 2010). Rakud, milles on *SOX9* ekspresseeritud, toodavad parakriinset signaalhormooni- prostaglandiin D₂-te, mis võib ka teistes rakkudes reguleerida *SOX9* ekspressiooni (Quinn ja Koopman, 2012). Tekib soole omane fenotüüp. Meeste puhul keha- ja näokarvade kasv, madal hääl, luude ja lihaste suurenemine, munandite ja peenise suurenemine.

Sündides on keskmine munandimaht poistel 0,5 ml. Sertoli rakkude proliferatsiooni tõttu suureneb üheksandaks eluaastaks 1,5 milliliitrini (Nistal jt., 1982). Puberteedia lõpuks on munandimaht suurenenud sugurakkude arvu suurenemise arvelt 15-25 milliliitrini (Joonis 4) (Rey jt., 2012). Puberteedias arenevad poistel seemnetorukesed lõpuni ning sugurakud migreeruvad torukeste perifeeriasse. Spermid alustavad oma küpsemist ning arengut just sealt ning valmides liiguvad keskosa poole (Gilbert, 2010).

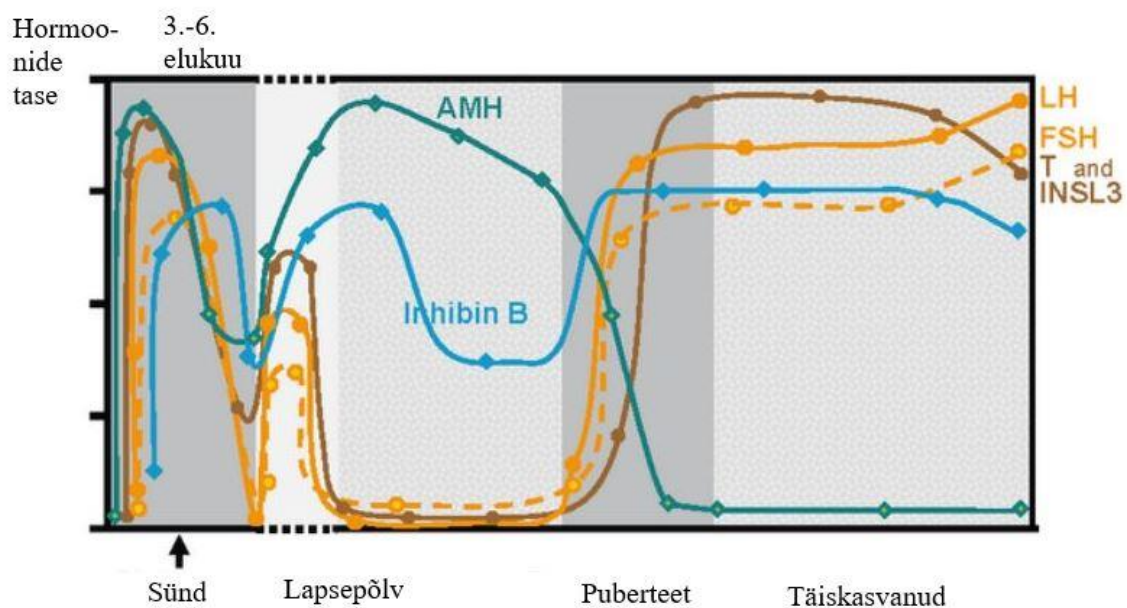


Joonis 4. Munandimahu muutumine mehe elu jooksul. Kohandatud Rey jt., 2012 artikli joonise 1.b järgi.

1.1.2.1. Minipuberteet

Peale sündi hakkab gonadotropiinide tase langema ning langeb kuni kuuenda elukuuni, mil algab minipuberteet (Joonis 5). Sel ajal aktiveerub lühiajaliselt hüpotaalamuse-hüpofüüsi-

gonaadi telg, tõuseb märgatavalt hormoonide LH, FSH, INSL3, AMH ja inhibiin B tase. Minipuberteet on oluline varajaseks postnataalseks mehe sugutunnuste kujunemiseks – peenise edasiarenemiseks, munandimahu suurenemiseks seemnetorukeste suurenemise arvelt, Sertoli rakkude ja sugurakkude arvu suurenemiseks ning tulevase spermatogeneesi ettevalmistuseks. Samuti toimub aju maskuliniseerumine, kus testosteroon mõjutab aju arengut. Minipuberteeti on seostatud ka Leydigi rakkude arenguga, sest suureneb nii testosterooni kui LH tase (Dhayat jt., 2017). Kuigi munandites on testosterooni tase nii looteas kui pärast sündi kõrge, siis meioosi siiski ei indutseerita, sest androgeeni retseptor on sel arenguperioodil Sertoli rakkudes vähe ekspresseeritud (Berensztein jt., 2006; Rey jt., 2012).



Joonis 5. Hormoonide LH, FSH, INSL3, inhibiin B, AMH ja testosterooni tase mehe elu jooksul. Kohandatud Rey jt., 2012 artikli joonise 1.a järgi.

Peale sündi hakkab kohe ka Leydigi rakkude arv tõusma ning saavutab maksimumi kolmandal elukuul. Sel ajahetkel koosneb Leydigi rakkude populatsioon kahest osast: küpsed Leydigi rakud ning väiksemad Leydigi rakud, mis regresseeruvad (Prince, 1984). Nad ekspresseerivad LH retseptorit ning androgeenide biosünteesiks vajalikke steroidogeneenseid ensüüme (Svechnikov jt., 2010). Peale seda lähevad lootelist päritolu Leydigi rakud apoptoosi (Nistal jt., 1986).

Minipuberteediga kaasnevat androgeenide taseme tõusu on seostatud ka teatud kudede mõjutamisega eesnäärmes, neerudes ning ajus, mis on vajalik, et täiskasvanueas antud koed androgeenide toimele õigesti vastaksid (Svechnikov jt., 2010).

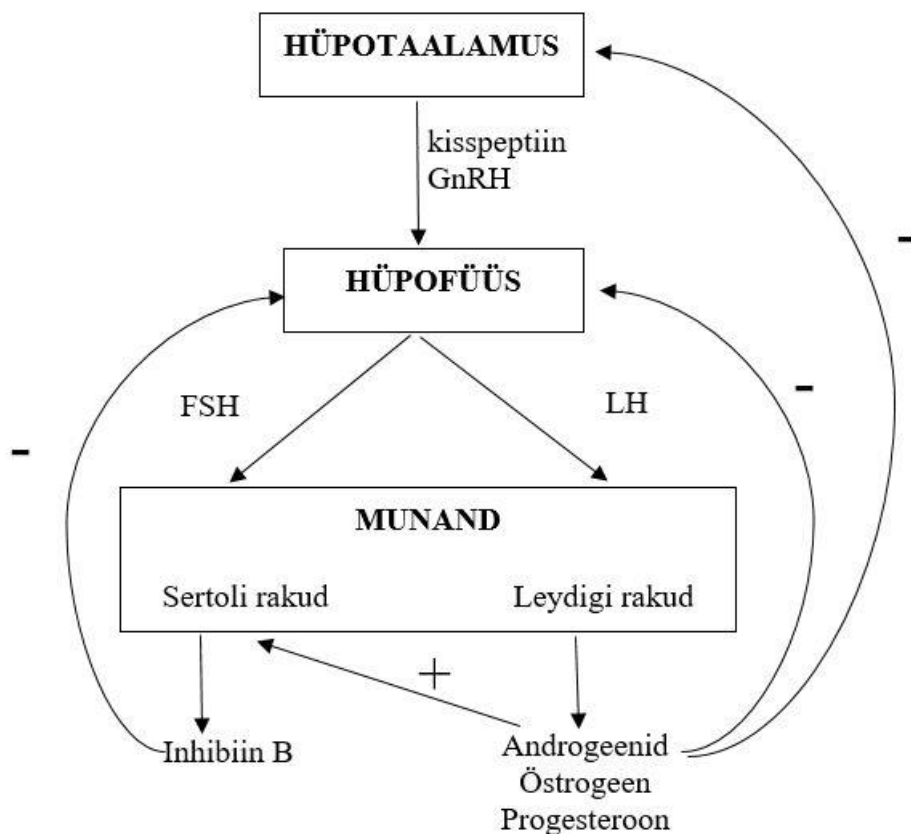
1.1.2.2. Puberteet

Puberteedi algust iseloomustab gonadotropiinide ning testosterooni taseme järsk tõus. Testosteron indutseerib AMH taseme langust (Josso jt., 2006), Sertoli rakkude küpsemise, rakkude suurenemise ning sellega ka munandite mahu suurenemise. Kliiniliselt loetakse puberteedi alguseks, kui munandimaht on suurenenud üle 4 ml. Spermatogenees algab poistel tavaliselt 12-15-aastasena, mil munandimaht on keskmiselt 10-12 ml (Nielsen jt., 1986). Inhibiin B sekretsioon, mis on reguleeritud FSH ja sugurakkude poolt, suureneb puberteedieas (Jensen jt., 1997). Inhibiin B on põhiline FSH sekretsiooni reguleerija täiskasvanud mehe munandites (Joonis 6).

1.2. Täiskasvanud mehe munandite funktsioneerimine

1.2.1. Steroidogenees

Endokriinsete faktorite süntees (LH ja FSH), mis juhib munandite õigesti töötamist sõltub hüpotaalamuse, hüpofüüsi ning munandite vahelisest signaliseerimise rajast (hüpotaalamus-hüpofüüs-gonaadi telg). Hüpotaalamus stimuleerib läbi gonadotropiini vabastava hormooni (GnRH) ajuripatsit eritama luteiniseerivat hormooni (LH) ja folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH). GnRH sekreteerimist juhib omakorda kisspeptiin. FSH stimuleerib Sertoli rakke, mis omakorda mõjutavad spermatogeneesi ning LH seondub Leydigi rakkudega, mis vastutavad testosterooni tootmise eest. Toimub ka negatiivne tagasisidestamine, kus testosteron inhibeerib LH tootmist ning Sertoli rakkude sekreteeritud inhibiin B inhibeerib FSH sünteesi. Leydigi rakkude poolt toodetud steroidhormoonid (androgeenid, östrogeen, progesteron) stimuleerivad uuesti märklaudrakke reproduktiivsüsteemis (Sharpe, 1994; Laan jt., 2012). Vastupidiselt loote Leydigi rakkudele sõltub täiskasvanud mehe Leydigi rakkude töö LH-st. Reproduktiivhormoonide toimimise skeem on kujutatud joonisel 6.



Joonis 6. Hüpotaalamus-hüpofüüs-gonaadi (HPG) telg. Modifitseeritud Laan jt., 2012 artikli joonise järgi.

1.2.2. Spermatogenees

Spermatogenees on protsess, kus sugurakkude eellasrakkudest arenevad spermatosoidid. Võib jaotada kolme suuremasse osasse: mitootiline faas, kus arenemata sugurakud läbivad mitu jagunemise tsüklit; meioosi faas, kus spermatotsüüdid läbivad kaks jagunemist ning tekivad haploidsed spermatiidid; spermiogeneesi faas, mille käigus spermatiidid omandavad transformatsiooni käigus viburi ning moodustuvad spermatosoidid (Jegou, 2000).

Spermatogenees sõltub täielikult reproduktiivhormoonidest FSH-st ja LH-st. On näidatud, et homosügootsed mutatsioonid *FSHB* geenis põhjustavad meestel azoospermiat. Seega on FSH oluline spermatogeneesi programmeerija varajases arengus (Nagirnaja jt., 2012). Sugurakkude arenguks on vajalikud ka androgeenid, mis vastutavad spermatotsüütide meioosi ning spermatiidide tekkimise eest. Spermatogeneesi mõjutavad veel östrogeen ja aktiviinid (O'Shaughnessy, 2014). Sertoli rakud on olulised kõikide spermatogeneesi etappide juures. Nende pinnal on retseptorid, millega seostuvad nii FSH kui androgeenid

(O'Shaughnessy, 2014). Sertoli rakud varustavad igat sugurakkude generatsiooni nii füüsiliste kui keemiliste signaalidega, mida on vaja jagunemiseks, differentseerumiseks ja metabolismiks (Jegou, 2000). Peale hormonaalse regulatsiooni on vaja spermatogeneesi ka vajalike geenide ekspressiooni, mis osalevad sugurakkude proliferatsioonis ja apoptoosis, homoloogilises rekombinatsioonis, DNA replikatsioonis ning reparatsioonis meioosi ajal ja kromatiini pakkimises (Matzuk ja Lamb, 2008).

1.3. Inimese meessuguorganite arengu anomaaliad

1.3.1. Mehe suguelundite anomaaliade definitsioonid

Loote maskuliniseerumine toimub 7.-14. raseduse nädalal (Welsh jt., 2008). Soolise arengu häire hõlmabki endas ebatüüpilist fenotüüpi, testiste mittetoimimist või välja arengut, mis on tingitud vigadest androgeenide sünteesis ning nende õigesti toimimises (Bashamboo ja McElreavey, 2016; Eggers jt., 2016).

Soolise arengu häire võib jagada osaliseks ja täielikuks suguelundite düsgeneesiks. Esimesel juhul on munandid osaliselt arenenud ning koosnevad nii Wolff'i kui Mülleri juhast. Täieliku düsgeneesi korral on välimised suguelundid naistele omased ning Mülleri juha on välja arenenud (Bashamboo ja McElreavey, 2016). Täielik düsgenees esineb näiteks koos Swyer-i sündroomiga. Osalise düsgeneesiga esineb kõige sagedamini 45,X/46,XY kariotüüp (McCann-Crosby jt., 2014).

Swyer-i sündroom ehk XY gonaadi düsgenees on heterogeenne haigus, mille korral on Y-kromosoomis struktuursed anomaaliad, mis viivad SRY geeni mittetoimimiseni. Samuti on sündroomi seostatud autosomaalsete mutatsioonidega. Patsiendid sünnivad naise fenotüübiga, aga ei ole võimelised tootma suguhormoone, mis on puberteedi alguseks olulised. Sekundaarseid naissugutunnuseid ilma hormoonravita ei kujune (Moody, 2007).

Androgeenide tundetuse (insensitiivsuse) sündroom kujuneb, kui on olemas X- ja Y-kromosoomid, aga patsient on resistentne androgeenide suhtes, sest nende retseptoris esineb mutatsioon. Seega areneb välja kas täielik või osaline naise fenotüüp, sest AMH toimel degenereerub Mülleri juha, kuid Wolff'i juha regresseerub, sest puudub võime testosteroonile reageerida. Samuti puuduvad sisemised suguelundid (Moody, 2007). Osalise androgeenide insensitiivsuse sündroomiga kaasneb hüpospaadia, mikropeenise ja günekomastia. Munandid ei lasku oma õigele kohale ning eemaldatakse tavaliselt enne puberteeti, et vähendada kasvaja tekkimise ohtu (Matzuk ja Lamb, 2008).

Hermafrodismi korral on patsientidel olemas nii meessoos (XY) kui ka naissoos (XX) kromosoomid ehk organism on mosaiikne. Seega on nii meeste kui naiste välimised sugutunnused ning leidub nii testikulaarset kui ovariaalset kude. Naistüüpi pseudohermafrodismi korral on kariotüüp naisele omane (46, XX), kuid genitaalid on omased kas mehele või segamini mõlemale soole. Meestüüpi pseudohermafrodismi korral on kariotüüp mehele omane (46, XY), munandid on diferentseerunud, kuid esineb ka naissugutunnuseid (Moody, 2007).

Turneri sündroomi iseloomustab vigane gonaadide areng ning sugukromosoomide arvu anomaalia (45, X). Esinemissagedus on 1 juhtum 2500 elussünni kohta. Patsiendid on fenotüübilt naised ning samuti arenevad välimised ning sisemised naissuguorganid, sest puudub AMH ja testosteroon. Sugurakud aga degenerereeruvad peale gonaadi jõudmist (Oktay jt., 2016).

Krüptorhism on patoloogia, mille korral munandid ei ole laskunud munandikotti, vaid paiknevad kõhuõõnes või kubemekanalis. Jaotatakse kaasasündinud ning omandatud krüptorhismiks ja tehakse vahet uni- ning bilateraalsel variandil. Samuti loetakse üheks kõige sagedasemaks sünnidefektiks poisslastel (Skakkebaek jt., 2016). 66% juhtudest laskuvad munandid oma õigele kohale esimese eluaasta jooksul, teistel juhtudel tuleb sekkuda kirurgiliselt (Krausz, 2000).

Hüpospaadia on peenise väärareng, mille puhul kusiti ei avane peenisepea tipus vaid alumisel pinnal (Skakkebaek jt., 2016). Tema esinemissagedus on üks juhtum 200 poisslapse kohta. Kuigi haigus tavaliselt mehe tervist ei mõjuta, võib ta olla siiski viljatuse põhjuseks (https://www.kliinik.ee/haiguste_abc/hupospaadia/id-546).

Hüpogonadism jaguneb hüpo- ja hüpergonadotroopseks. Hüponadotroopne ehk sekundaarne hüpogonadism viitab madalale LH ning FSH tasemele, vähesele testosteroonile tootmisele ning väikesele munandimahule. Sekundaarse tüübi korral tuleneb madal LH ja FSH tase liiga vähesest GnRH tootmisest hüpotaalamuse või ajuripatsi vea tõttu (Fraietta jt., 2013). Hüpergonadotroopse ehk primaarse hüpogonadismi korral on probleem munandites, FSH ning LH tase on kõrge, kuid testosteroon tase madal. Eristatakse veel kaasasündinud ning omandatud hüpogonadismi. Omandatud hüpogonadismi põhjuseks on näiteks kasvaja, infektsioon, kiiritusravi. Kaasasündinud vormi esineb 1-10 juhtumit iga 100 000 sünni kohta, millest Kallmanni sündroom moodustab 75% ning ülejäänud loetakse idiopaatiliseks (Fraietta jt., 2013). Kallmanni sündroomi seostatakse mutatsioonidega *KAL1* geenis (Zhang jt., 2011).

1.3.2. Mehe suguelundite anomaaliate põhjused

Munandi düsgenees on tingitud nii geneetilistest kui keskkonna teguritest, olles seega multifaktoriaalne haigus (Joonis 7). Suguelundkonna arengu jaoks on vajalik, et juba varajases embrüonaalses eas oleksid aktiveeritud õiged signaalide ülekanderajad. Kõige olulisem on *SRY* geeni aktiveerimine, mille tulemusel algab munandite arenemine bipotentsiaalsest gonaadist (Koopman jt., 1991). Loote munandite poolt toodetud hormoonid, eelkõige testosteroon, mõjutavad kogu keha maskuliniseerumist (Jost, 1972). WNT signaliseerimise rada on oluline naissugutunnuste tekkeks (Joonis 3). Geeni inaktivatsiooniga hiirte mudelite peal on näidatud, et *WNT4* ekspressioon on mõlema soo puhul algselt olemas, kuid 11,5 hiire arengupäeval (inimesel vastavalt 33. päeval, Joonis 2) väheneb meestel ekspressioon, kuid naistel tõuseb. Kui mingil põhjusel jääb ekspressioon siiski meestel kõrgeks, siis represserib see *SOX9* ekspressiooni (Quinn ja Koopman, 2012).

Täieliku suguelundite düsgeneesi patsientidest ligikaudu 15% kannab mutatsiooni *SRY* geenis (McElreavey ja Fellous, 1999), mida on seostatud munandite arengu häiretega. Samuti on *SRY* mutatsioonid tavaliselt *de novo*, ehk isa sugurakkude eellasrakkudes on tekkinud mutatsioonid (Bashamboo ja McElreavey, 2016).

Krüptorhism ja hüpospaadia esinevad sageli koos ning jagavad mitmeid riskifaktoreid. Samuti on näidatud, et samad tegurid mõjutavad ka sperma kvaliteeti ning munandivähi teket (Toppari jt., 2010). Tegemist on multifaktoriaalsete haigustega ning suurel määral mõjutavad keskkond ja elustiil patoloogiate esinemist, kuid on näidatud ka geneetilise päritavuse rolli. Patoloogiad saavad alguse loote arengu käigus toimuvatest muutustest (Dalgaard jt., 2012).

Peenise arengut reguleerib looteas DHT, mida toodetakse lokaalselt 5- α -reduktaasi poolt testosteroonist. Kuigi on teada mitmed geenid, mille mutatsioon viib hüpospaadiani (*AR*, *ATF3*, *CYP11A1*, *SRD5A2*, *MAMLD1*) (Eggers jt., 2016), siis geneetiline põhjus leitakse patsientidel harva (Kalfa jt., 2009). 20% juhtudest saab seostada endokriinide ebanormaalsusega (Rey jt., 2005).

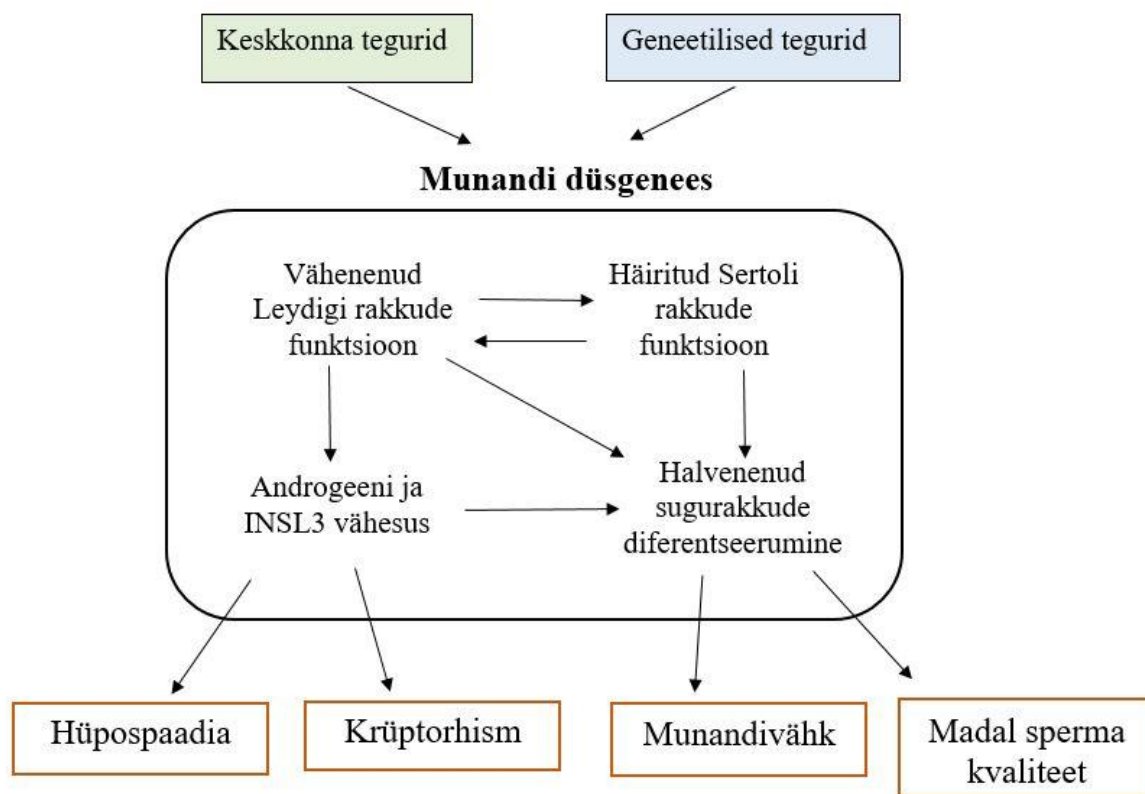
Kõige rohkem on uuritud pestitsiidide mõju hüpospaadia tekkele, sest need pärsvad hormoonide tööd (Toppari jt., 2010). Samuti on välja toodud, et taimetoiqlastest emade lastel on suurenenud risk hüpospaadia esinemiseks (North ja Golding, 2000). Raseduse ajal dietüül silbestrooli (DES) kasutamine viis genitaalide väärarenguni, sealhulgas hüpospaadia ning krüptorhismini. DES mõjutab epigeneetiliselt (Toppari jt., 2010). Samuti on raskemetallidega ning endokriine segavate kemikaalidega (EDC) kokkupuutunud rasedate naiste lastel suurem risk hüpospaadia tekkeks (Giordano jt., 2010).

Krüptorhism tekib, kui munandite laskumiseks vajalike hormoonide, testosterooni ja INSL3 tootmine on häiritud. Mõlema sekreteerimise eest vastutavad Leydigi rakud, mida omakorda stimuleerib LH. Kõige sagedasemaks põhjuseks ongi androgeenide tootmise ning nende töötamisega seotud vead. Nii INSL3 kui androgeene on vaja, et munandi juhtside (*gubernaculum*) õigesti töötaks ning loote munandid õigele kohale juhiks. Kemikaalid, mis käituvad antiandrogeenidena ning androgeenide retseptorite antagonistidena, mõjutavad munandite laskumist. Ka östrogeenid võivad INSL3 tootmist häirida (Skakkebaek jt., 2016).

Ema suitsetamine ning alkoholi tarbimine raseduse ajal soodustab samuti krüptorhismi kujunemist lapsel (Damgaard jt., 2007; Thorup jt., 2006). Suitsetamine mõjutab loote kasvu, seega kui loode on gestatsiooniaja kohta sündides liiga väike, siis ei ole ka munandid laskunud. Samuti on enneaegsus tugev riskifaktor (Skakkebaek jt., 2016). Raseduse 14-22. nädalal paratsetamooli tarvitamist on seostatud suurenenud riskiga krüptorhismi tekkeks lootel (Snijder jt., 2012).

Kaasasündinud hüpogonadism tekib, kui loote gestatsiooni teises pooles, mil FSH ning LH mängivad suurt rolli munandite füsioloogia kujunemisel, esineb probleeme (Petersen ja Soder, 2006). Mitmeid geenide mutatsioone on seostatud hüpogonadismiga: *FGF8*, *FGFR1*, *CHD7* (Rey jt., 2012). Sekundaarne kaasasündinud hüpogonadism esineb, kui leidub polümorfisme GnRH sekreteerimise ning regulatsiooni eest vastutavates geenides. (Ross ja Bhasin, 2016). Idiopaatilise hüpogonadotroopse hüpogonadismi puhul on tegemist pigem mitme geeni mutatsiooniga (Balasubramanian jt., 2010).

Munandivähk on tugeva geneetilise eelsoodumusega. Mitmed ülegenoomsed geneetilise assotsiatsiooni uuringud on näidanud, et munandivähiga seostatud geenid asuvad enamasti regioonides, mis vastutavad reproduktiivorganite arengu ning sugurakkude õigesti toimimise eest (Skakkebaek jt., 2016). *KITLG*, *SPRY4* ja *BAK1* geenid osalevad munandite arengus ja gametogeneesis ning neis esinevaid geneetilisi varieeruvusi on seostatud suurema munandivähi tõenäosusega. Samuti on 3,7 korda suurem risk munandivähi tekkeks patsientidel, kellel on Y-kromosoomi AZFc piirkonnas mikroleetsioon (Nemtsova jt., 2016). Võrreldes viljakate meestega, on oligozoospermiaga meestel suurenenud risk munandivähi tekkimiseks (Hanson jt., 2016).



Joonis 7. Munandi düsgeneesi teket mõjutavad tegurid ja tagajärjed. Kohandatud Toppari jt., 2010 artikli joonise järgi.

1.3.3. Mehe suguelundite anomaaliade tagajärjed

Nii krüptorhism, hüpospaadia kui hüpogonadotroopne hüpogonadism viivad vähenenud meeste viljakusele (Punab jt., 2016) ning suurenenud soodumusele sugurakkude vähiks (Dalgaard jt., 2012).

Kliinilised hüpogonadismi tagajärjed olenevad, millisel eluetapil sümptomid välja kujunevad. Kaasasündinud hüpogonadism viib soolise arengu häireni. Võib kujuneda täielik või osaline naise fenotüüp, sest testosterooni ei toodeta piisavalt (Rey ja Grinspon, 2011). Puberteedieas avastatud hüpogonadism toob kaasa puberteedieaga kaasnevate muutuste kadumise- ei kujune sekundaarseid sugutunnuseid. Häälemurret ei teki, luustiku areng ei kulge õige kiirusega, munandite maht ei suurene ning seega ei alga ka spermatogenees. Täiskasvanueas omandatuna toob hüpogonadism kaasa vähenenud libiido, impotentsuse ning oligo- või azoospermia (Rey jt., 2012). Primaarse ehk hüpergonadotroopse hüpogonadismiga kaasnevateks sümptomiteks on vähenenud libiido, ereksioonihäired, rasvumine, lihaste nõrkus, depressioon (Fraietta jt., 2013). Sekundaarne hüpogonadism on meeste viljatuse põhjuseks (Punab jt., 2016).

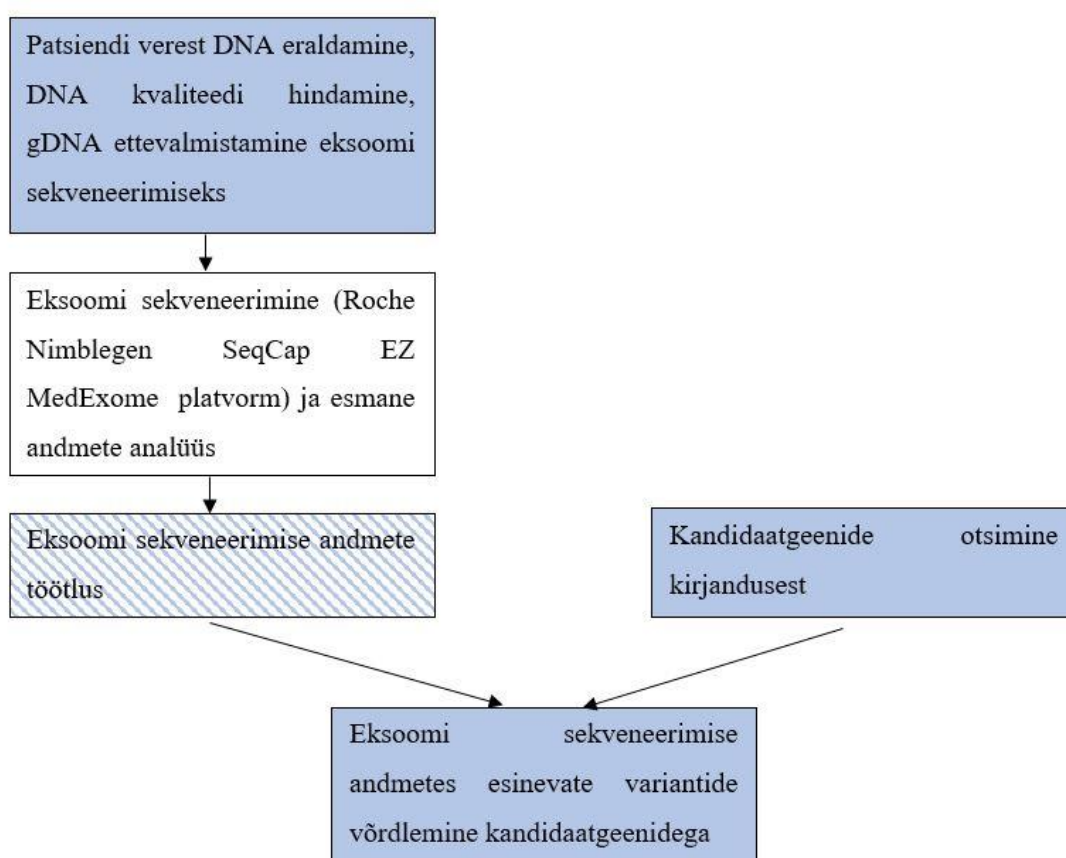
2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärkideks on:

1. Kirjandusest otsida kandidaatgeene, milles esinevad mutatsioonid võivad põhjustada hüpospaadiat ning idiopaatilist hüpergonadotroopset hüpogonadismi.
2. Analüüsida SA TÜK Androloogiakeskusesse pöördunud hüpospaadia ning idiopaatilise hüpergonadotroopse hüpogonadismi diagnoosiga patsiendi eksoomi sekveneerimise andmetest teadaolevate kandidaatgeenide variante.

Töö skeem on esitatud joonisel 8.



Joonis 8. Bakalaureusetöö raames teostatud uuringu skeem. Valgel taustal osa on läbi viidud FIMM-is ning ostetud teenusena. Sini-valge triibulisega osa kujutab endast PSAP käsurea jooksutamist (Wilfred jt. 2016), mis on mõeldud üksikute patsientide eksoomi analüüsiks ja on välja töötatud professor Donald F. Conradi uurimisrühma poolt Washingtoni Meditsiini ülikoolis (*Washington University School of Medicine in St. Louis*) ning rakendatud minu poolt. Sinise taustaga etapid teostas in käesolevas bakalaureusetöös.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Patsiendi fenotüüp

Patsient pöördus SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Meeste Kliinikumi androloogiliste probleemidega. Ta on sündinud 1998. aastal ning uuringusse võetud 2015. aasta juulis, proovide võtmise ajal oli patsient 17-aastane. Tal diagnoositi hüpospaadia raske vorm ning idiopaatiline hüpergonadotroopne hüpogonadism. Tabelist 1 on näha, et nii FSH kui LH tasemed on normaalsest palju kõrgemad, kuid testosterooni tase jääb normide piiresse, vaatamata mõlema munandi väga väikesele mahule.

Tabel 1. Patsiendi kliinilised näitajad.

Näitaja	Analüüsitud patsiendi kliinilised andmed	TÜ Kliinikumi referentsväärtuste vahemik (13-18 a.)	Eesti noorte meeste kohort ^a (19,2±1,7) Mediaan (5-95%)
FSH (IU/L)	60,4	0,4-7,4	3 (1,3-6,7)
LH (IU/L)	23,7	0,15-5,33	3,8 (1,8-7,3)
FSH/LH	2,5	-	-
Testosteroon (nmol/L)	15,8	0,98-38,5	28,4 (16,9-45,6)
SHBG (nmol/L)	38,5	17,9-113,1	32 (18-55,9)
Parema munandi maht (ml)	4	>20	25 (18-35)
Vasaku munandi maht (ml)	2	>20	25 (18-35)
Pikkus (cm)	175	-	180 (170,1-192)
Kaal (kg)	72,9	-	72 (60-90)
Kehamassiindeks (kg/m ²)	23,8	18,5-24,9	22 (18,8-27,4)

^a Eesti noorte meeste kohordi andmed pärinevad teadusartiklist Grigorova jt., 2008, millest leiab ka valimi täpse kirjelduse

2.2.2. DNA eraldamine patsiendi vereproovist

Patsiendilt võeti vereproov veenist SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Androloogiakeskuse Tallinna filiaalis. Kuni DNA eraldamiseni hoiti proovi EDTA vaakumkatsutis -80°C juures.

Genoomse DNA eraldas verest välja soolamise meetodil. Järgnevad kogused käivad 1 ml vere kohta. Kõigepealt sulatasin proovi toatemperatuurini ja lisasin verele 4 ml puhvrit A ning loksutasin tuubi õrnalt. Tsentrifuugisin puhvri ja vere segu 30 min 4°C ja 1942 x g (raskuskiirendus) juures. Supernatandi valasin ära ning keerasin tuubi ümber, et ka viimane

puhvri jääk välja voolaks. Kordasin eelnevat etappi. Viimaks lisasin 2 ml puhvrit A, loksutasin sademe põhjast lahti ning tsentrifuugisin 20 min 4°C ja 1942 x g juures. Valasin ära supernatandi, nõrutasin tuubi ja lisasin 0,9 ml puhvrit B. Tilkhaaval lisasin 100 µl puhvrit C ning inkubeerisin segu üleöö loksutil 37°C juures.

Järgmisel päeval lisasin 270 µl küllastatud NaCl lahust ning raputasin tuubi 15 sek tugevalt. Tsentrifuugisin toatemperatuuril 30 min 3452 x g juures ja pipeteerisin supernatandi uude tuubi. Lisasin 96% etanooli kaks korda sama palju, kui tuubis lahust oli. Segasin õrnalt ning eemaldasini Pasteuri pipetiga DNA tuubist ja panin 500 µl TE lahusesse. Eraldatud DNA-d säilitasin -20°C juures ja kontsentratsiooni mõõtsin NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga. Genoomse DNA terviklikkust kontrollisin 1% agarosgeelil (0,5x TBE).

Tabel 2. Kasutatud puhvrite koostis.

Puhver A	Puhver B	Puhver C
Sahharoos	400mM NaCl	10% SDS
1mM Tris-HCl	2mM EDTA	2mg/ml Proteinaas K
5mM MgCl ₂	10mM Tris-HCl	
1% Triton X-100		

2.2.3. Teadusliku erialakirjanduse otsimine ja analüüsimine

Kirjandusest ning andmebaasidest otsisin gene, mis oleksid seotud soolise arenguga ning mille mutatsioon võiks potentsiaalselt viia patsiendi fenotüübini. Otsingu teostasini 2017. aasta märtsis. Kasutasin avalikku PubMed-i andmebaasi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), *Mouse Genome Informatics* (MGI) andmebaasi (<http://www.informatics.jax.org/>) ning kahte arengubioloogia õpikut: *Principles of Developmental Genetics* (Moody, 2007) ja *Developmental Biology* (Gilbert, 2010). MGI andmebaasi sai valitud, sest hiirt kasutatakse tihti mudelorganismina ning antud andmebaas on mõeldud hiirtes inaktiveeritud geenide seostamiseks haiguseliste fenotüüpidega.

MGI andmebaasist otsisin gene fenotüübi järgi kasutades otsingusõna „*hypospadias*“.

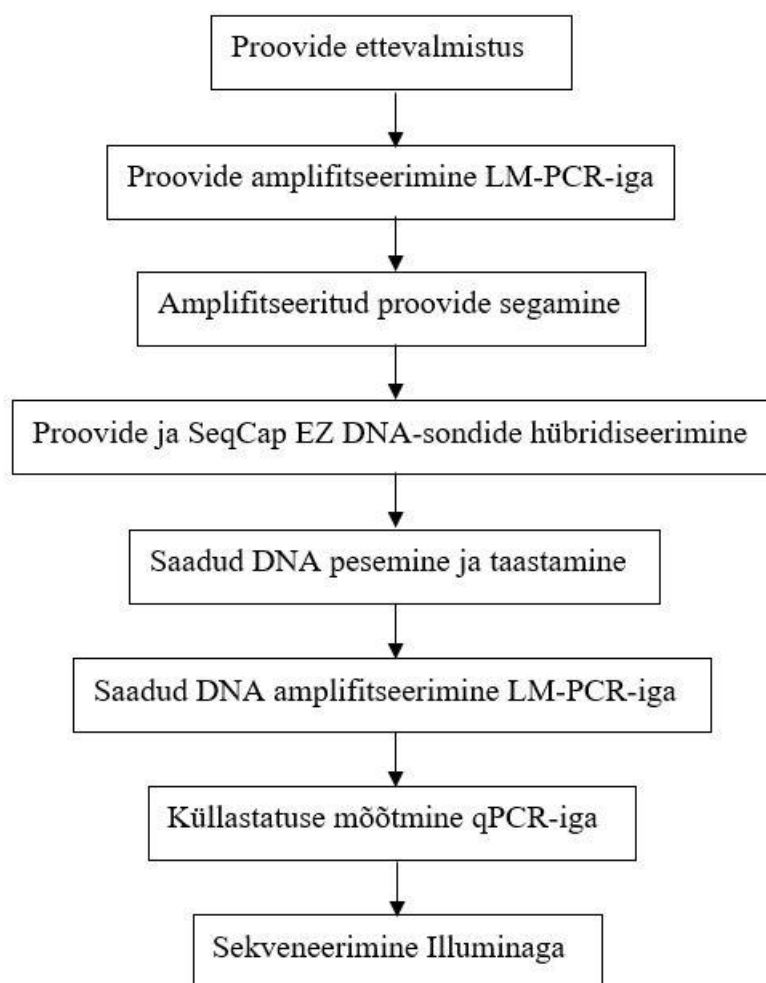
Pubmed-ist otsisin artikleid järgmiste otsingusõnade järgi: „*testicular dysgenesis syndrome*“, „*hypospadias*“, „*hypogonadism*“, „*disorder of sex development*“, „*developmental genes*“. Otsingusõnu kasutasin kombineerituna, näiteks „*hypospadias AND developmental genes*“. Leitud artiklid vaatasin käsitsi üle ning valisin sobivad välja. Keskendusin viimase aja ülevaateartiklitele, näiteks Eggers jt., 2016.

Peale patsiendi eksoomi geneetilise varieeruvuse võrdlemist kandidaatgeenidega töötasin eraldi läbi kõik leitud mittesünonüümsed variandid. Kasutasin OMIM (<https://www.omim.org/>), NCBI ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) andmebaase, et välja selgitada, kas antud geneetilisi variante on varasemalt seostatud mõne haigusega. Mittesünonüümsete variantide jaoks otsisin välja ka SIFT (*Sorting Tolerant from Intolerant*) ja PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) ennustuse. Mõlemad ennustavad, kui suure tõenäosusega mõjutab aminohappeline asendus valgu funktsiooni, vaadates ka aminohappe konserveeritust. Mõlemad kasutavad vahemikku 0-st 1-ni, aga SIFT puhul on 1 healoomuline ja 0 pahaloomuline ning PolyPhen-i puhul on 0 healoomuline ja 1 patogeenne (Ng ja Henikoff, 2001; Sunyaev jt., 1999).

2.2.4. Eksoomi analüüs

2.2.4.1. Eksoomi sekveneerimine

Eksoomi sekveneerimine viidi läbi Helsingi Ülikooli Molekulaarmeditsiini osakonna (FIMM) sekveneerimise tuumiklaboris ning osteti sisse teenusena. Sekveneerimiseks kasutati Roche NimbleGen SeqCap EZ MedExome süsteemi. SeqCap EZ MedExome Kit katab kogu inimese genoomi, pöörates suuremat tähelepanu eksonitele geenides, mida on varasemalt seostatud mõne haigusega. Märklauaks olevad eksonid lähtuvad inimese referentsgenoomist GRCh38, hõlmates kliiniliselt olulisi regioone ning valke kodeerivaid regioone (<http://sequencing.roche.com/products/nimblegen-seqcap-target-enrichment/seqcap-ez-system/seqcap-ez-medexome.html>). Eksoomi sekveneerimise töövoog on näha joonisel 6. Proovide ettevalmistamine kujutab endast uuritava DNA fragmenteerimist ultraheliga, tekivad umbes 300 aluspaari pikad fragmendid, mille otstesse lülitatakse ligikaudu 100 aluspaaripikkused adapterid. Võeti 100 ng gDNA-d ning esimeses etapis amplifitseeriti gDNA LM-PCR-iga (*Ligation Mediated PCR*), kus kasutati sekveneerimise adapteritega komplementaarseid praimereid. Järgmises etapis hübridiseeriti proovid DNA-sondidega, mis on 60-90 aluspaari pikad oligonukleotiidid ning mille inkubeerimine kestab 16-20 tundi (Roche NimbleGen, 2015). DNA-sondid katsid 64,1 Mb genoomist (Chaitankar jt., 2016). Järgmisena lisati väikesed magnetilised kerad, mis sidusid eksoneid sisaldavad proovid enda külge ning ülejäänud mittekodeerivad järjestused pesti välja. Lõpuks saadakse ssDNA, mille kogus on aga üsna väike, seega tehakse uuesti LM-PCR (Sulonen jt., 2011). DNA küllastatust enne sekveneerimist mõõdetakse qPCR-iga kasutades viit praimerite paari viie erineva lookuse jaoks. Viimaseks etapiks on järjestuse sekveneerimine (Roche NimbleGen, 2015).



Joonis 9. Eksoomi sekveneerimise töövoog. Modifitseeritud Roche NimbleGen SeqCap EZ Library SR User's Guide, version 5.1, 2015 järgi.

2.2.4.2. Bioinformaatiline analüüs

Toorandmete bioinformaatiline baastöötlus, mille eesmärgiks on andmekvaliteedi kontroll, lugemite joondamine ja analüüsitud indiviidi geneetiliste variantide annoteerimine, teostati samuti teenusepakkuja poolt. Variantide esilekutsumise käsurida (VCP) arendati välja eksoomi sekveneerimisest saadud andmete analüüsiks. Esmalt filtreeriti FASTQ formaadis järjestuste lugemeid kvaliteedi alusel, seejärel joondati *Burrows-Wheeler* joondajaga (BWA-0.6.2) referentsgenoomile ning eemaldati lugemite duplikaatjärjestused. SAMtools-i (samtools-1.2) kasutades võrreldi järjestusi referentsgenoomiga (hg19 ehk GRCh37) ning otsiti ühenukleotiidilisi muutusi. Tulemustest moodustus VCF (*variant call format*) fail, kus olid ridade kaupa näidatud kõik ühenukleotiidsed variandid. Samuti lisandus fail insertiooni

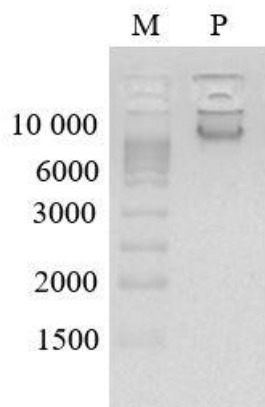
ja deletsiooni variantidega, mida analüüsiti eraldi Pindel (pindel-0.2.5b6) programmiga (Sulonen jt., 2011).

Rakendasin VCF failile PSAP (*population sampling probability*) käsurida, mis on loodud üksikute patsientide eksoomi analüüsiks (Wilfert jt., 2016). Käsurida võrdleb igat konkreetset geenivarianti kolme erineva andmebaasiga: ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), 1000 Genomes (<http://www.internationalgenome.org/>, september 2014) ja ESP6500 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Analüüsi tulemuseks on tõenäosus, et võrreldav variant on olemas tervetel indiviididel (*PopScore* ehk p-väärtus) (Wilfert jt., 2016). Kõik loetletud andmebaasid keskenduvad genoomi ning eksoomi andmete ühendamisele ning geneetiliste variantide seostamisele erinevate fenotüüpidega. Samuti on üheks väljundiks CADD (*combined annotation dependent depletion*) skoor (Kircher jt., 2014), mis näitab, kui kahjulik on antud ühenukleotiidne muutus või insertioon-deletsioon inimese genoomis. CADD skoor 10 näitab, et ennustuse kohaselt on tegemist 10% kõige kahjulikemate asendustega inimese genoomis. Skoor 20 näitab, et tegemist on 1% kõige kahjulikemate asendustega. Kahjulikeks loetakse polümorfisme, mille skoor on üle 20 (<http://cadd.gs.washington.edu/info>).

2.3. Tulemused

2.3.1. DNA kvaliteet

Patsiendi genoomse DNA (gDNA) eraldasid üldtoodud protokoll järgi ning selle terviklikkuse määrasin 1% agarosgeelil (Joonis 10).



Joonis 10. Gelelektroforeesi tulemused, patsiendi (P) gDNA terviklikkus 1% agarosgeelil (0,5x TBE). Kasutasin Solis Biodyne 1 kb DNA suurusmarkerit (*1 kb DNA Ladder Ready to Load*) (M).

Genoomse DNA kontsentratsiooni mõõtsin NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga, mille tulemused näitasid, et DNA on piisavalt kõrge kvaliteediga. Nagu näha tabelist 4, siis DNA kontsentratsioon oli 144,1 ng/μl, 260 ning 280 lainepikkuste suhe 1,84, mis näitab, et kontamineerivaid valke proovis ei olnud. 260 ning 230 lainepikkuste suhe oli 1,96, mis näitab, et kontamineerivaid detergente ning DNA eraldamisel kasutatavaid aineid proovis ei olnud. Eraldatud gDNA-st tegin lahjenduse lõppkontsentratsiooniga 5 ng/μl ning proov saadeti Helsingisse FIMM-i tuumiklaborisse eksoomi sekveneerimiseks.

Tabel 4. Patsiendi gDNA kontsentratsioon ja kvaliteet. Mõõdetud NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga.

Kontsentratsioon (ng/μl)	A260	A280	A260/A280	A260/A230
144,1	2,882	1,569	1,84	1,96

2.3.2. Sugulise arengu häirega seotud geenid

Tabelis 3 on välja toodud teadusliku kirjanduse ja inimese genoomi, meditsiinigeneetika ja loomudelitel andmebaaside läbi töötamise tagajärjel välja valitud geenid, mis on embrüo

meessuguelundkonna õigeks arenguks vajalikud ning mehe fenotüübi kujunemiseks võtme tähtsusega. Iga geeni kohta on näidatud geeni lokalisatsioon inimese genoomis, ekspressiooni muster, nimetus inglise keeles, funktsioon ja informatsiooni allikas.

MGI (*Mouse Genome Informatics*) andmebaasist leidsin 19 hiire inaktiveeritud geeni, mille puhul oli hiire fenotüübiks isoleeritud hüpospaadia. Samast andmebaasist tuli välja ka kuus hiirel inaktiveeritud geeni, mille puhul kaasnes hüpospaadia koos mõne teise sündroomiga. MGI andmebaasist jäi lõpuks analüüsis sõelale 13 geeni.

Kokkuvõttes leidsin artiklitest 21 sobivat geeni, kahest raamatust ning MGI andmebaasist vastavalt 12 ja 13 geeni. Pärast kattuvate geenide eemaldamist jäi lõplikku loetellu 32 geeni.

Iga geeni kohta otsisin välja andmed avaldumise kohta inimese kudedes ning organites ja kui oli teada, siis ka nende täpsema funktsiooni. Leitud geenid grupeerisin nelja suuremasse gruppi: transkriptsioonifaktorid, retseptorid ja koretseptorid, kasvufaktorid, muu (Tabel 3). Suurem osa gene on avaldunud enamikes kudedes, koe-spetsiifilisem ekspressioon on vähestel geenidel. Näiteks *LHX9*, mis on ekspresseeritud munandites, munasarjades, kopsudes ning *SP8*, mis on ekspresseeritud eesnäärmes, nahas. Ainult munandite spetsiifiline ekspressioon oli kahel geenil, *INSL3* ja *AMH*. Siiski, tänases andmebaasides ja avaldatud kirjanduses ei ole piisavat teavet geenide koelise avaldumise kohta loote-eas.

Tabel 3. Kirjandusest leitud kandidaatgeenid.

Geen	Kromosomaalne asukoht (GRCh37.p13)	Ekspressioon	Funktsioon	Viited
Transkriptsioonifaktorid				
<i>ATF3</i>	Chr1:212738676-212794119	Enamikes kudedes	<i>Activating transcription factor 3</i> Kodeerib transkriptsioonifaktoreid, mis on olulised rakulises stressivastuses. Seostatud isoleeritud hüpospaadiaga.	(Eggers jt., 2016) The Human Protein Atlas
<i>GATA4</i>	Chr8:11534433-11617510	Munandites, platsentas, munasarjades, südamelihases, maksas, pankreases, söögitorus, kaksteistsõrmiksooles, peensooles, maos	<i>Gata binding protein 4</i> Kodeerib tsink-sõrme transkriptsioonifaktoreid, tunnevad ära GATA järjestuse ning reguleerivad embrüogeneesi, südamelihase diferentseerumist ja funktsiooni. Vaja normaalseks munandite arenguks. Seostatud mitme erineva vähitüübiga.	(Gilbert, 2010) The Human Protein Atlas
<i>HOXA13</i>	Chr7:27236499-27239725	Eesnäärmes, seemnepõiekestes, emakakaelas, platsentas, jämesooles, pärakus, kusepõies	<i>Homeobox A13</i> Kodeerib transkriptsioonifaktoreid, mis on olulised loote arengus ning vastutavad geeni ekspressiooni, morfogeneesi ja diferentseerumise eest. Seostatud käte-jalgade-genitaalide sündroomiga (<i>hand-foot-genital syndrome</i>).	(Eggers jt., 2016; Moody, 2007) MGI The Human Protein Atlas
<i>HOXA4</i>	Chr7:27168126-27170399	Enamikes kudedes	<i>Homeobox A4</i> Kodeerib DNA-ga seonduvat transkriptsioonifaktorit, mis reguleerib morfogeneesi, geenide ekspressiooni ja diferentseerumist.	(Chen jt., 2007; Geller jt., 2014) The Human Protein Atlas
<i>IRX5</i>	Chr16:54965111-54968397	Kopsudes, nahkkoos, seedesüsteemis, neerudes, eesnäärmes, munandites	<i>Iroquois homeobox 5</i> Kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis osaleb embrüo arenguga seotud protsessides.	(Geller jt., 2014) The Human Protein Atlas

<i>LHX9</i>	Chr1:197881635-197904606	Munandites, munasarjades, kopsudes	<i>LIM homeobox 9</i> Kodeerib proteiini, mis on oluline transkriptsioonifaktor. Väga sarnane hiire valgule, mis inaktiivsena viib suguelundite taandarenguni.	(Gilbert, 2010) The Human Protein Atlas
<i>MAMLD1</i>	ChrX:149529836-149682448	Enamikes kudedes	<i>Mastermind-like domain containing 1</i> Kodeerib transkriptsiooni koaktivaatorit.	(Bashamboo ja Mcelreavey, 2016; Eggers jt., 2016) MGI (<i>Mamld1</i>) The Human Protein Atlas
<i>NOG</i>	Chr17:54671060-54672951	Enamikes kudedes	<i>Noggin</i> Kodeerib polüpeptiidi, mis seostub ning inaktiveerib <i>BMP4</i> . Osaleb neuraaloru ja liigeste arengus.	MGI (<i>Nog</i>) The Human Protein Atlas
<i>RSPO1</i>	Chr1:38076821-38100595	Enamikes kudedes	<i>R-spondin 1</i> Kodeerib sekreteeritavat aktivaatorproteiini, mis reguleerib Wnt signalseerimisrada.	(Gilbert, 2010) The Human Protein Atlas
<i>SF1</i>	Chr11:64532076-64546515	Enamikes kudedes	<i>Splicing factor 1</i> Kodeerib tuumset pre-mRNA lõikamise faktorit, mida on vaja varajases splaisosoomi kokkupanekus.	(Gilbert, 2010; Moody, 2007) The Human Protein Atlas
<i>SOX9</i>	Chr17:70117161-70122561	Enamikes kudedes	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i> Kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis reguleerib nii <i>AMH</i> kui ka paljude teiste reproduktiivsüsteemi arenguks vajalike geenide transkriptsiooni, kondrotsüütide diferentseerumist.	(Gubbay jt., 1990; Eggers jt., 2016; Moody, 2007) The Human Protein Atlas
<i>SP8</i>	Chr7:20821894-20826508	Eesnäärmes, nahas	<i>SP8 transcription factor</i> Kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis hiirtes vastutab korrektse jäsemete arengu eest.	MGI (<i>Sp8</i>) The Human Protein Atlas
<i>ZEB2</i>	Chr2:145141942-145277958	Enamikes kudedes	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i> Kodeerib proteiini, mis käitub transkriptsiooni	MGI (<i>Zeb2</i>) The Human Protein

			repressorina. Seostatud Mowat-Wilsoni sündroomiga.	Atlas
<i>ZFHX3</i>	Chr10:72816784-73092534	Enamikes kudedes	<i>Zinc finger homeobox 3</i> Kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis vastutab südamelihaskoe ning närvisüsteemi diferentseerumise eest.	(Geller jt., 2014) The Human Protein Atlas
<i>TP63</i> (<i>Trp63</i> ortoloog inimeses)	Chr3:189348942-189615068	Mandlites, bronhis, neelus, söögitorus, suuõõnes, kusepõies, munandimanuses, eesnäärmes, tupes, emakas, seemnepõiekestes, rindades, platsentas, nahas	<i>Tumor protein p63</i> Kodeerib transkriptsioonifaktoreid perekonnast p53. Osaleb jäsemete, hammaste, rindade arengus. Oluline epiteelkoe arengus ja säilitamises. Seostatud Rap-Hodgkin-si sündroomiga, käte ja jalgade väärarenditega.	MGI (<i>Trp63</i>) The Human Protein Atlas
<i>WNT4</i>	Chr1:22443798-22470474	Enamikes kudedes	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i> Kodeerib sekreteeritavaid signalseerimisproteiine, mis on olulised onko- ja embrüogeneesis. Mõjutab soo määramise kaskaadi, käitudes sugu määrava faktori antagonistina. Seostatud Rokitansky-Kuster-Hauser sündroomiga.	(Gilbert, 2010) The Human Protein Atlas

Retseptorid ja koretseptorid

<i>AR</i>	ChrX:66763874-66950461	Seemnepõiekestes, munandites, munandimanuses, rindades, endomeetriumis, munajuhas, emakakaelas	<i>Androgen receptor</i> Kodeerib proteiini, mis aktiveerub steroidhormoonidega ning käitub transkriptsioonifaktorina, reguleerides androgeene kodeerivaid geene.	(Eggers jt., 2016) MGI (<i>Ar</i>) The Human Protein Atlas
<i>EFNB2</i>	Chr13:107142079-107187388	Enamikes kudedes	<i>Ephrin-B2</i> Kodeerib retseptor türosiin kinaasi, mis osaleb arengulistest protsessidest, eriti närvisüsteemi arengus ning	MGI (<i>Efnb2</i>) The Human Protein Atlas

			erütropoeesis.	
<i>EPHB2</i>	Chr1:23037263-23241823	Enamikes kudedes	<i>EPH receptor B2</i> Kodeerib transmembraanset retseptor türosiin kinaasi glükoproteiini. Seostuvad efrinidega, mis osalevad raku jagunemisel ja diferentseerumisel. Seostatud eesnäärme- ning ajuvähiga.	MGI (<i>Ephb2</i>) The Human Protein Atlas
<i>FGFR2</i>	Chr10:123237844-123357972	Enamikes kudedes	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i> Kodeerib fibroblastide kasvufaktori retseptorit, mis osaleb mitmes signaliseerimisrajas, kaasa arvatud mitogenees ning diferentseerumine.	MGI (<i>Fgfr2</i>) The Human Protein Atlas
<i>TGFBR3</i>	Chr1:92145900-92371559	Enamikes kudedes, kindlasti peritubulaarsetes ning Leydigi rakkudes	<i>Transforming growth factor β receptor type III</i> Membraani proteoglükaan, mis töötab tihti koretseptorina teiste sama perekonna retseptorite jaoks, võib inhibeerida TGFB signaliseerimise rada.	(Dalgaard jt., 2012) The Human Protein Atlas

Ensüümid

<i>CYP11A1</i>	Chr15:74630103-74660081	Munandites, platsentas, neerupealistes	<i>Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1</i> Kodeerib ensüümi mis käituvad monooksügenaasina ja katalüüsib reaktsioone, mis on seotud ravimite metabolismiga, kolesterooli, steroidide ja teiste lipiidide sünteesiga. Seostatud hüpospaadiaga.	(Eggers jt., 2016) The Human Protein Atlas
<i>HSD3B2</i>	Chr1:119957554-119965662	Neerupealistes, munandites, platsentas	<i>Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase</i> Kodeerib bifunktsionaalset ensüümi, mis on oluline kõikide hormonaalsete steroidide biosünteesis.	(Eggers jt., 2016) The Human Protein Atlas
<i>SRD5A1</i>	Chr5:6633500-6669675	Enamikes kudedes	<i>Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1</i> Kodeerib ensüümi, mis katalüüsib testosterooni dihidrotestosterooniks.	(Eggers jt., 2016) The Human Protein Atlas
<i>SRD5A2</i>	Chr2:31749656-31806040	Maksas, eesnäärmes, munandites, seemnepõiekestes, munandimanuses,	<i>Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2</i> Kodeerib valku, mida ekspresseeritakse kõrgel hulgal androgeenitundlikes kudedes (eesnääre). Seostatud pseudohermafrodisimiga ning hüpospaadiaga.	(Eggers jt., 2016) The Human Protein Atlas

		munajuhades		
Kasvufaktorid				
<i>BMP7</i>	Chr20:55743809-55841707	Enamikes kudedes	<i>Bone morphogenic protein 7</i> Osaleb luukoe, neerude ja pruuni rasvkoe kujunemisel.	(Dalgaard jt., 2012) The Human Protein Atlas
<i>FGF10</i>	Chr5:44305004-44389808	Enamikes kudedes	<i>Fibroblast growth factor 10</i> Kodeerib valku, mis osaleb embrüo arengus, rakkude kasvus, morfogeneesis, kudede regeneratsioonil, kasvajate arengus. Hiirtega uuringud on näidanud, et osalebaju arengus, kopsude morfogeneesis ning varajases jäsemete arengus.	MGI (<i>Fgf10</i>) The Human Protein Atlas
<i>FGF9</i>	Chr13:22245215-22278640	Enamikes kudedes	<i>Fibroblast growth factor 9</i> Kodeerib proteiine, mis osalevad embrüo arengus, rakkude kasvus, morfogeneesis, kudede parandamisel, kasvajate arengus. Hiired, kellel puudus geeni homoloog, omasid teise sugupoole fenotüüpi.	(Gilbert, 2010) The Human Protein Atlas
Muu				
<i>AMH</i>	Chr19:2249113-2252072	Munandites	<i>Anti-Mullerian hormone</i> Reguleerib mehe sugulist diferentseerumist, põhjustades Mülleri juha degenereerumist. Seostatud püsiva Mülleri juha sündroomiga (<i>persistent Mullerian duct syndrome</i>).	(Eggers jt., 2016; Perry jt., 2016) The Human Protein Atlas
<i>FKBP4</i>	Chr12:2904108-2914589	Enamikes kudedes	<i>FK506 binding protein 4</i> Kodeerib valku, mis osaleb immuunvastuse regulatsioonis ja rakulistes protsessides, näiteks valkude voltumises.	MGI (<i>Fkbp4</i>) The Human Protein Atlas
<i>INSL3</i>	Chr19:17927322-17932383	Munandites	<i>Insuline-like 3</i> Kodeerib insuliinilaadsete hormoonide perekonda, osaleb urogenitaaltrakti arengus ning munandite laskumisel. Seostatud krüptorhismiga.	(Eggers jt., 2016; Moody, 2007) The Human Protein Atlas

<i>MID1</i>	ChrX:10413350-10851829	Enamikes kudedes	<i>Midline 1</i> Kodeerib proteiini, mis moodustavad multiproteiinseid struktuure ja toimivad mikrotuubulitele ankrutena. Seostatud Opitzi sündroomiga (kaasa arvatud hüpospaadia).	MGI (<i>Mid1</i>) The Human Protein Atlas
-------------	------------------------	------------------	--	--

MGI (*Sp8*) näitab, et geen on võetud MGI andmebaasist, kus on toodud hiire geenid. Kromosomaalse asukoha võtsin NCBI andmebaasist.

2.3.3. Geneetiline varieeruvus patsiendi eksoomis

Peale PSAP käsurea rakendamist, mis on mõeldud üksiku patsiendi eksoomi andmete analüüsiks ning iga konkreetse geenivariandi võrdlemiseks kolme erineva andmebaasiga (ExAC, 1000 Genomes, ESP6500), sain väljundina faili, kus oli välja toodud 15 780 mutatsiooni patsiendi eksoomis. Nendest sünonüümseid 7809, mittesünonüümseid 7605, 123 teadmata funktsiooniga, 120 stop-koodoni tekkimist põhjustavat mutatsiooni, 12 stop-koodoni kadumist põhjustavat mutatsiooni, mille seas on nii homo- kui heterosügootseid variante ning 111 mutatsiooni, mis võivad olla nii sünonüümsed, mittesünonüümsed kui ka teadmata tagajärjedega.

Patsiendi eksoomi andmetest otsisin kõiki kandidaatgeenides (Tabel 3) leiduvaid mutatsioone. Leidsin 10 varianti üheksas geenis, kõik muutused olid heterosügootsed. Nende seas sünonüümseid kuus ning mittesünonüümseid neli (Tabel 4).

2.3.3.1. Mittesünonüümsed mutatsioonid

Sünonüümsed mutatsioonid ei põhjusta aminohappelist muutust valgu struktuuris, seega keskendun mittesünonüümsetele variantidele, mida oli kokku neli. Kõik need variandid olid heterosügootsed ning nii SIFT kui PolyPhen ennustuste järgi tolereeritavad. Samuti jäid CADD skoorid kõigil alla 10, mis näitab, et tegemist ei ole patogeensete variantidega. Ühegi haigusega antud variante seostatud ei ole (OMIM, NCBI ClinVar, Ensembl).

AMH asub 19. kromosoomil (Joonis 11). Leidsin patsiendil antud geenis muutuse (rs10417628), kus C nukleotiidi asemel on T, alleelide sagedused vastavalt 98,03% ja 1,97%. Tegemist on mittesünonüümse mutatsiooniga (UCSC).

BMP7 asub kromosoomil 20, ning patsiendil on geneetiline variant, kus G nukleotiid on asendunud A-ga (rs2148328). G alleelisagedus on 48,08% ning A sagedus 51,92%.

EPHB2 asub 1. kromosoomil, patsiendil on T alleel asendunud A-ga (rs138464253). Sagedused on vastavalt 98,86% ja 1,14% (UCSC).

IRX5 geeni, mis asub 16. kromosoomil, muutuse puhul on C nukleotiid asendunud A-ga (rs13336114). Alleelisagedused on vastavalt 55,74% ja 44,26% (UCSC).

Tabel 4. Patsiendi eksoomist leitud kandidaatgeenide varieeruvus

Geen	Krom. as. (GRCh3 7.p13)	Rs number	Geno tüüp	SIFT	PolyPh en	MAF. ExAC (%)	MAF. 1000 Genom es (%)	MAF. ESP6 500 (%)	CADD Skoor	P- väärtus	Transkript	cDNA muutus	AH muutus
Mittesünonüümsed													
<i>AMH</i>	Chr19:22 51817 C>T	rs10417628	het	0,77	0	2,10	1,00	2,00	6,50	0,20	ENST00000 221496.4	c.T1544C	p.V515A
<i>BMP7</i>	Chr20:55 748206 G>A	rs2148328	het	0,39	0	45,6	40,6	41,8	7,26	0,55	ENST00000 450594.2	c.C1196T	p.A399V
<i>EPHB2</i>	Chr1:231 01708 T>A	rs13846425 3	het	0,2	0,042	1,10	0,80	0,99	8,90	0,31	ENST00000 374627.1	c.T14A	p.V5D
<i>IRX5</i>	Chr16:54 967096 C>A	rs13336114	het	0,5	0,041	31,3	36,3	27,2	0,04	1	ENST00000 558597.1 ENST00000 320990.5 ENST00000 394636.4	c.C565A c.C760A c.C763A	p.P189T p.P254T p.P255T
Sünonüümsed													
<i>AMH</i>	Chr19:22 51512 A>T	rs7252789	het	-	-	24,2	8,1	NA	1,92	0,20	ENST00000 221496.4	c.T1239A	p.G413G
<i>FGFR2</i>	Chr10:12 3239112 G>A	rs1047057	het	-	-	36,7	41,4	43,5	0,66	0,68	ENST00000 357555.5	c.C2107T	p.L703L
<i>SOX9</i>	Chr17:70	rs2229989	het	-	-	19,3	13,7	16,7	9,82	0,32	ENST00000	c.C507T	p.H169H

	118935 C>T										245479.2		
<i>SP8</i>	Chr7:208 24614 C>T	rs34908430	het	-	-	29,8	27,0	19,4	6,06	0,44	ENST00000 418710.2 ENST00000 361443.4	c.G822A c.G768A	p.S274S p.S256S
<i>ZFHX3</i>	Chr16:72 828403 A>G	rs2229286	het	-	-	7,70	11,0	1,86	0,65	0,87	ENST00000 268489.5 ENST00000 397992.5	c.T8178C c.T5436C	p.L2726 L p.L1812 L
<i>ZFHX3</i>	Chr16:72 992221 G>A	rs61735550	het	-	-	18,0	8,31	18,1	4,13	0,89	ENST00000 268489.5	c.C1824T	p.S608S

SIFT ja Polyphen ennustuse andmed on võetud Ensembl andmebaasist. Polümorfisme, mille CADD skoor on üle 20 loetakse kahjulikeks (Kircher jt., 2014).

AH - aminohape

het – heterosügoot

hom - homosügoot

Krom. as. – kromosomaalne asukoht

MAF. – minoorse alleeli sagedus

NA – pole teada

2.4. Arutelu

Käesoleva töö raames töötasin läbi kirjanduse ning panin kokku nimekirja kandidaatgeenidest, milles esinevaid geneetilisi variante on varasemalt seostatud mehe soolise arengu häiretega, eelkõige hüpospaadia ning hüpogonadismiga. Näiteks eraldati 60 isoleeritud hüpospaadiaga patsiendi DNA, ning uuriti varasemalt hüpospaadiaga seosatud geenide variante. Uuringu tulemusena näidati, et *FGF10* ja *FGFR2* geneetilised variandid suurendavad inimestes hüpospaadia tekke riski (Beleza-Meireles jt., 2007). Samuti on hiirtes inaktiveeritud *HOXA13* geen, mille tulemusena oli häiritud nii *Fgf8* kui *Bmp7* ekspressioon ning hiirtel kujunes hüpospaadia (Morgan jt., 2003). Leitud geenide produktide funktsioonid sai järgmiselt alagruppideks jaotada: transkriptsioonifaktorid, retseptorid ja koretseptorid, kasvufaktorid, muud funktsioonid. Mehe sooline areng on mõjutatud paljude geenide ning erinevate valguliste produktide poolt. Kandidaatgeenide varieeruvuse alusel töötasin läbi patsiendi eksoomi sekveneerimise andmed.

Viimastel aastatel on uute haigustega seotud geneetiliste variantide tuvastamiseks hakatud kasutama hüpoteesivaba suuremahulist analüüsi, mille käigus uuritakse kõiki inimese eksoomi ehk genoomi valke kodeerivad alasid (eksoneid). Kogu eksoomi analüüs (eksoomi sekveneerimine) ja tulemuste interpretatsioon on lisandunud 2014. aastal Eesti Haigekassa tervishoiuteenuste loetelusse. Eksoomi sekveneerimine diagnostilise analüüsina on kasutusel vastsündinu- ja lapseas avalduvate ebaselge etioloogiaga haiguste põhjuste uurimisel (näiteks neuroloogilised ja ainevahetushäired). Eksoomi analüüs reproduktiivtervise kõrvalekallete geneetiliste põhjuste tuvastamisel ei ole hetkel veel Eestis väga laia kasutust leidnud. Kuna nii viljatus kui teised reproduktiivsüsteemi haigused on kliiniliselt kompleksed, siis eksoomi andmete tõlgendamine võib olla keerukas ning seega ka vähem levinud kliinilises diagnostikas.

Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudi inimese molekulaargeneetika uurimisrühmal prof. Maris Laane juhendamisel on tugev koostöö SA TÜ Kliinikumi Androloogiakeskusega (Dr. Margus Punab), kelle poole pöördus hüpospaadia ning idiopaatilise hüpergonadotroopse hüpogonadismi diagnoosiga patsient. Patsiendi eksoom sekveneeriti Helsingi Ülikooli juures vastav teenust pakkuvas tuumiklaboris, kus viidi läbi ka esmane andmete analüüs. Kandidaatgeenide varieeruvust patsiendi eksoomis uuriti käesolevas töös.

Üheks töö eesmärgiks oli kirjanduse läbitöötamine, et edaspidi hõlbustada eksoomi sekveneerimise andmete analüüsi. Seega keskendusin analüüsis ainult kandidaatgeenidele. Ühtegi sobivat geenivarianti, mis oleks seotud patsiendi fenotüübiga, nende 32 geeni

eksonites ei leidnud. Samas võib olla ka olukord, kus mitme heterosügootse variandi koosmõju erinevates geenilookusestes võib viia patsiendi fenotüübini. Ühes uurimuses on välja toodud, et geenide *AR* (*Androgen receptor*) ning *POR* (*P450 cytochrome oxireductase*) heterosügootsed muutused on põhjustanud patsiendil soolise arengu häire (46, XY) (Idkowiak jt., 2010). Antud lähenemisel on mitu kitsaskohta. Uuring ei hõlmanud potentsiaalseid splaissaitide mutatsioonide analüüse ja samuti mitte raaminihke mutatsioone. Samuti ei võimaldanud antud meetod tuvastada Y-kromosoomi ümberkorraldusi. Kuna leitud heterosügootsed variandid on nii SIFT kui PolyPhen ennustuse järgi tolereeritavad, siis tuleks edasiseks analüüsimiseks modelleerida nende kodeeritud valkude 3D struktuur, et lähemalt näha, kuidas võivad geneetilised muutused valkude funktsiooni muuta.

Kuna ühtegi patsiendi fenotüübiga seostatavat geneetilist varianti ei leitud, siis on plaanis vaadata ka faili, kus on välja toodud insertioonid-deletsioonid, mis eksoomi sekveneerimisest välja tulid. Antud failile tuleks rakendada PSAP käsurida. Tuleks liikuda hüpoteesipõhisest analüüsist edasi hüpoteesivabale analüüsile ning analüüsida kogu patsiendi eksoom. Vaadelda ka splaissaitide mutatsioone ning insertioone ja deletsioone, mis võivad tekitada raaminihke mutatsioone.

KOKKUVÕTE

Käesolevas uurimistöös andsin ülevaate mehe suguelundkonna arengust nii pre- kui postnataalselt ning õigest funktsioneerimisest täiskasvanueas. Tähelepanu pöörasin mehe suguelundkonna arengu häiretele, mida võivad põhjustada nii geneetilised kui keskkonna faktorid. Suuremasse fookusesse võtsin hüpospaadia ning hüpogonadism, sest uuritava patsiendil oli just antud fenotüüp.

Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli kirjandusest otsida kandidaatgeene, mille geneetilised variandid võiksid viia hüpospaadia ning hüpogonadismi tekkeni ning vaadata, kas antud geenide variandid leiduvad ka sama fenotüübiga patsiendi eksoomis. Patsiendi eksoomi sekveneerimise andmed töötasin läbi ning analüüsisin PSAP käsureaga, mis on mõeldud üksiku patsiendi eksoomi andmete analüüsiks. Kõiki leitud mittesünonüümseid asendusi geenides analüüsisin eraldi ning otsisin andmebaasidest antud variantide varasemat seostatust mõne haigusega.

Töö tulemusena moodustus nimekiri geenidest, mille variante on varasemalt seostatud mehe soolise arengu häiretega. Patsiendi eksoomit leidsin antud geenide hulgast 10 varianti, millest kuus olid sünonüümsed ning neli mittesünonüümsed, asudes geenides *AMH*, *BMP7*, *EPHB2*, *IRX5*. Ühtegi kandidaatgeeni varianti patsiendi fenotüübiga ei seostanud. Põhjus võib olla oluliste geenide väljajäämisel kandidaatgeenide nimekirjast, heterosügootsete variantide koosmõjul, insertioonide või deletsioonide esinemisel patsiendi eksoomis.

Tulevikus tuleks kindlasti analüüsida patsiendi eksoomi hüpoteesivabalt ning analüüsida ka eksoomis leiduvaid insertioone ning deletsioone. Tähelepanu tuleks pöörata ka võimalike heterosügootsete variantide koosmõjule.

Genetical causes of male reproductive system developmental using single patient's exome sequencing data

Eveliis Koppel

SUMMARY

Disorder of sexual development is a congenital condition, which can be indentified as anomalies in chromosomes, reproductive system or phenotype. However, only 13% of all reproductive disorders get the right genetical diagnosis (Eggers jt., 2016).

Male sexual development is driven by genetical and environmental factors. The most important part is from 7-14th weeks of gestation, when bipotential gonads first start developing into male gonads (Welsh jt., 2008). It is important that correct genes are activated at this time of development (Gilbert, 2010).

This study aimed to investigate genetic variants that could lead to disorders of sexual development, especially hypospadias and hypogonadism. In this study, a patient's exome sequencing data was compared with the list of candidate genes. The patient had been previously diagnosed with hypospadias and hypogonadism.

Aming the 32 candidate genes, 10 variants were detected in the patient's exome. Six of them were synonymous and four nonsynonymous. The nonsynonymous variants were in *AMH*, *BMP7*, *EPHB2*, *IRX5* genes. In the detailed assessment of the background knowledge, I concluded that none of these variants were associated with patient's phenotype.

Patient's phenotype is very complex and could also be caused by heterozygous mutatsions in different genes or concurrence of different genetic variants rather than one mutation. Further hypothesis-free investigation of the patient's exome is foreseen.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Balasubramanian, R., Dwyer, A., Seminara, S.B., Pitteloud, N., Kaiser, U.B., and Crowley, W.F. (2010). Human GnRH deficiency: a unique disease model to unravel the ontogeny of GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 92, 81–99.

Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A., and Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Publ. Gr.* 12.

Bashamboo, A., and Mcelreavey, K. (2016). Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Dev* 10, 313–325.

Beleza-Meireles, A., Lundberg, F., Lagerstedt, K., Zhou, X., Omrani, D., Frisén, L., and Nordenskjöld, A. (2007). FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 405–410.

Berensztejn, E.B., Baquedano, M.S., Gonzalez, C.R., Saraco, N.I., Rodriguez, J., Ponzio, R., Rivarola, M.A., and Belgorosky, A. (2006). Expression of Aromatase, Estrogen Receptor α and β , Androgen Receptor, and Cytochrome P-450scc in the Human Early Prepubertal Testis. *Pediatr. Res.* 60, 740–744.

Byskov, A.G. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev.* 66, 71–117.

Chaitankar, V., Okhan Karakulah, G.€, Ratnapriya, R., Giuste, F.O., Brooks, M.J., and Swaroop, A. (2016). Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research.

Chen, T., Li, Q., Xu, J., Ding, K., Wang, Y., Wang, W., Li, S., and Shen, Y. (2007). Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 23–28.

Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D.M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104, 875–889.

Cory, A.T., Boyer, A., Pilon, N., Lussier, J.G., and Silversides, D.W. (2007). Presumptive pre-Sertoli cells express genes involved in cell proliferation and cell signalling during a critical window in early testis differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1491–1504.

Dalgaard, M.D., Weinhold, N., Edsgård, D., Silver, J.D., Pers, T.H., Nielsen, J.E., Jørgensen, N., Juul, A., Gerds, T.A., Giwercman, A., et al. (2012). A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J Med Genet.*

Damgaard, I.N., Jensen, T.K., Petersen, J.H., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., Main, K.M., and Group, the N.C.S. (2007). Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 115, 272–277.

Dhayat, N.A., Dick, B., Frey, B.M., d’Uscio, C.H., Vogt, B., and Flück, C.E. (2017). Androgen biosynthesis during minipuberty favors the backdoor pathway over the classic pathway: Insights into enzyme activities and steroid fluxes in healthy infants during the first year of life from the urinary steroid metabolome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165, 312–322.

Eggers, S., Sadedin, S., van den Bergen, J.A., Robevska, G., Ohnesorg, T., Hewitt, J., Lambeth, L., Bouty, A., Knarston, I.M., Tan, T.Y., et al. (2016). Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 17, 243.

Fraietta, R., Zylberstejn, D.S., and Esteves, S.C. (2013). Hypogonadotropic Hypogonadism Revisited. *Clinics* 68, 81–88.

Geller, F., Feenstra, B., Carstensen, L., Pers, T.H., van Rooij, I.A.L.M., Körberg, I.B., Choudhry, S., Karjalainen, J.M., Schnack, T.H., Hollegaard, M. V, et al. (2014). Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nat. Genet.* 46, 957–963.

Gilbert, S.F. 2010. *Developmental Biology*, p. 511-540. Sex Determination, 9th ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Giordano, F., Abballe, A., De Felip, E., di Domenico, A., Ferro, F., Grammatico, P., Ingelido, A.M., Marra, V., Marrocco, G., Vallasciani, S., et al. (2010). Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 88, NA-NA.

Grigorova, M., Punab, M., Ausmees, K., and Laan, M. (2008). FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum. Reprod.* 23, 2160–2166.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245–250.

Hammes, A., Guo, J.K., Lutsch, G., Leheste, J.R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M.C., and Schedl, A. (2001). Two splice variants of the Wilms’ tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106, 319–329.

Hanson, H.A., Anderson, R.E., Aston, K.I., Carrell, D.T., Smith, K.R., and Hotaling, J.M. (2016). Subfertility increases risk of testicular cancer: evidence from population-based semen samples. *Fertil. Steril.* 105, 322–328.e1.

Idkowiak, J., Malunowicz, E.M., Dhir, V., Reisch, N., Szarras-Czapnik, M., Holmes, D.M., Shackleton, C.H.L., Davies, J.D., Hughes, I.A., Krone, N., et al. (2010). Concomitant mutations in the P450 oxidoreductase and androgen receptor genes presenting with 46,XY disordered sex development and androgenization at adrenarche. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 3418–3427.

Jegou, B., Stephen, J. P., Cudicini, C., Gomez, E., Bauche, F., Piquet-Pellorce, C., Touzalin, A. M. 2000. The Sertoli Cell-Germ Cell Interactions and the Seminiferous Tubule Interleukin-1 and Interleukin-6 system, p. 53-68. *In* K. McElreavey (ed.), *The Genetic Basis of Male Infertility. Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol.28., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Jensen, T.K., Andersson, A.-M., Hjollund, N.H.I., Scheike, T., Kolstad, H., Giwercman, A., Henriksen, T.B., Ernst, E., Bonde, J.P., Olsen, J., et al. (1997). Inhibin B as a Serum Marker of Spermatogenesis: Correlation to Differences in Sperm Concentration and Follicle-Stimulating Hormone Levels. A Study of 349 Danish Men ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4059–4063.

Josso, N., Picard, J.Y., Rey, R., and di Clemente, N. (2006). Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 3, 347–358.

Jost, A. (1972). A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med. J.* 130, 38–53.

Kalfa, N., Philibert, P., and Sultan, C. (2009). Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *Int. J. Androl.* 32, 187–197.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117–121.

Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O’Roak, B. J., Cooper, G. M., & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, 46(3), 310–315.

Krausz, C., Forti, G. 2000. Clinical Aspects of Male Infertility, p. 1-21. *In* K. McElreavey (ed.), *The Genetic Basis of Male Infertility. Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol.28., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Laan, M., Grigороva, M., and Huhtaniemi, I.T. (2012). Pharmacogenetics of follicle-

stimulating hormone action. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 19, 220–227.

Li, Y., Zheng, M., and Lau, Y.-F.C. (2014). The Sex-Determining Factors SRY and SOX9 Regulate Similar Target Genes and Promote Testis Cord Formation during Testicular Differentiation. *Cell Rep.* 8, 723–733.

Matzuk, M.M., and Lamb, D.J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* 1197–1213.

McCann-Crosby, B., Mansouri, R., Dietrich, J.E., McCullough, L.B., Sutton, V.R., Austin, E.G., Schlomer, B., Roth, D.R., Karaviti, L., Gunn, S., et al. (2014). State of the art review in gonadal dysgenesis: challenges in diagnosis and management. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* 2014, 4.

McElreavey, K., and Fellous, M. (1999). Sex determination and the Y chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 89, 176–185.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.

Moody, S.A. 2007. Principles of Developmental genetics, p. 805- 822. In H. Du, H. S. Taylor (ed.), *Development of the Genital System*, Elsevier, New Haven, CT.

Morais da Silva, S., Hacker, a, Harley, V., Goodfellow, P., Swain, a, and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14, 62–68.

Morgan, E.A., Nguyen, S.B., Scott, V., and Stadler, H.S. (2003). Loss of Bmp7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development* 130.

Nagirnaja, L., Venclovas, Č., Rull, K., Jonas, K. C., Peltoketo, H., Christiansen, O. B., Kairys, V., Kivi, G., Steffensen, R., Huhtaniemi, I. T., Laan, M. (2012). Structural and functional analysis of rare missense mutations in human chorionic gonadotrophin β -subunit. *Molecular Human Reproduction*, 18(8), 379–390.

Nemtsova, M.V., Ivkin, E.V., Simonova, O.A., Rudenko, V.V., Chernykh, V.B., Mikhaylenko, D.S., and Loran, O.B. (2016). Polymorphisms of KITLG, SPRY4, and BAK1 genes in patients with testicular germ cell tumors and individuals with infertility associated with AZFc deletion of the Y chromosome. *Молекулярная Биология* 50, 960–967.

Ng, P.C., and Henikoff, S. (2001). Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Res.* 11, 863–874.

Nielsen, C.T., Skakkebaek, N.E., Richardson, D.W., Darling, J.A.B., Hunter, W.M., Jorgensen, M., Nielsen, A., Ingerslev, O., Keiding, N., and Müller, J. (1986). Onset of the Release of Spermatozoia (Supermarche) in Boys in Relation to Age, Testicular Growth, Pubic

Hair, and Height*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 532–535.

Nistal, M., Asunci6n, M., And, A., and Paniagua, R. (1982). Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty*. *J. Anat* 14, 351–363.

Nistal, M., Paniagua, R., Regadera, J., Santamaria, L., and Amat, P. (1986). A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res.* 246, 229–236.

North, K., and Golding, J. (2000). A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. *BJU Int.* 85, 107–113.

O'Shaughnessy, P.J. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 55–65.

O'Shaughnessy, P.J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A.M., Charlton, H.M., and Huhtaniemi, I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139, 1141–1146.

Oh, H.J., and Lau, Y.-F.C. (2006). KRAB: A partner for SRY action on chromatin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 247, 47–52.

Oktay, K., Bedoschi, G., Berkowitz, K., Bronson, R., Kashani, B., McGovern, P., Pal, L., Quinn, G., and Rubin, K. (2016). Fertility Preservation in Women with Turner Syndrome: A Comprehensive Review and Practical Guidelines. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 29, 409–416.

Otis, E.M., and Brent, R. (1954). Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat. Rec.* 120, 33–63.

Perry, J.R.B., McMahon, G., Day, F.R., Ring, S.M., Nelson, S.M., and Lawlor, D.A. (2016). Genome-wide association study identifies common and low-frequency variants at the AMH gene locus that strongly predict serum AMH levels in males. *Hum. Mol. Genet.* 25, 382–388.

Petersen, C., and Soder, O. (2006). The sertoli cell--a hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66, 153–161.

Prince, F.P. (1984). Ultrastructure of immature leydig cells in the human prepubertal testis. *Anat. Rec.* 209, 165–176.

Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., Korrovits, P., and Laan, M. (2016). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts STUDY QUESTION: What are the primary causes of severe male factor infertility? *Hum. Reprod.* 32, 18–31.

Quinn, A., and Koopman, P. (2012). The Molecular Genetics of Sex Determination and Sex Reversal in Mammals. *Semin. Reprod. Med.* 30, 351–363.

Rey, R.A., and Grinspon, R.P. (2011). Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 221–238.

Rey, R.A., Codner, E., Iñíguez, G., Bedecarrás, P., Trigo, R., Okuma, C., Gottlieb, S., Bergadá, I., Campo, S.M., and Cassorla, F.G. (2005). Low Risk of Impaired Testicular Sertoli and Leydig Cell Functions in Boys with Isolated Hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 6035–6040.

Rey, R.A., Grinspon, R.P., Gottlieb, S., Pasqualini, T., Knoblovits, P., Aszpis, S., Pacenza, N., Stewart Usher, J., Bergadá, I., and Campo, S.M. (2012). Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. *Andrology* 1, 3–16.

Roche NimbleGen SeqCap EZ Library SR User's Guide, version 5.1, 2015

Ross, A., and Bhasin, S. (2016). Hypogonadism. *Urol. Clin. North Am.* 43, 163–176.

Ross, A., Munger, S., and Capel, B. (2007). Bmp7 regulates germ cell proliferation in mouse fetal gonads. *Sex Dev.* 1, 127–137.

Rui, N., Ho, Y., Huang, N., and Conrad, D.F. (2015). Improved detection of disease-associated variation by sex-specific characterization and prediction of genes required for fertility. *Andrology*.

Sharpe, R. M. (1994). Regulation of spermatogenesis. The physiology of reproduction, 1, 1363-1434.

Siiteri, P.K., and Wilson, J.D. (1974). Testosterone Formation and Metabolism During Male Sexual Differentiation in the Human Embryo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38, 113–125.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., et al. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* 96, 55–97.

Snijder, C.A., Kortenkamp, A., Steegers, E.A.P., Jaddoe, V.W. V., Hofman, A., Hass, U., and Burdorf, A. (2012). Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the

occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Hum. Reprod.* 27, 1191–1201.

Sulonen, A.-M., Ellonen, P., Almusa, H., Lepistö, M., Eldfors, S., Hannula, S., Miettinen, T., Tynismaa, H., Salo, P., Heckman, C., et al. (2011). Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing. *Genome Biol.* 12, R94.

Sunyaev, S.R., Eisenhaber, F., Rodchenkov, I. V, Eisenhaber, B., Tumanyan, V.G., and Kuznetsov, E.N. (1999). PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. *Protein Eng.* 12, 387–394.

Svechnikov, K., Landreh, L., Weisser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikov, I., and Söder, O. (2010). Origin, development and regulation of human leydig cells. *Horm. Res. Paediatr.* 73, 93–101.

Zhang, S., Wang, T., Yang, J., Liu, Z., Wang, S., and Liu, J. (2011). A fertile male patient with Kallmann syndrome and two missense mutations in the KAL1 gene. *Fertil. Steril.* 95, 1789.e3-1789.e6.

Thorup, J., Cortes, D., and Petersen, B.L. (2006). The Incidence of Bilateral Cryptorchidism is Increased and the Fertility Potential is Reduced in Sons Born to Mothers who Have Smoked During Pregnancy. *J. Urol.* 176, 734–737.

Toppari, J., Virtanen, H.E., Main, K.M., and Skakkebaek, N.E. (2010). Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): Environmental connection. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 88, 910–919.

Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fisk, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B., and Sharpe, R.M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization , disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. 118.

Wilfert, Amy; Chao, B Katherine R; Kaushal, Madhurima; Jain, Sanjay; Zöllner, Sebastian; Adams, David R; Conrad, D.F. (2016). Genome-wide significance testing of variation from single case exomes. *Nat. Genet.* 48.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://cadd.gs.washington.edu/info> (17.05.2017)

<http://sequencing.roche.com/products/nimblegen-seqcap-target-enrichment/seqcap-ez-system/seqcap-ez-medexome.html> (22.05.2017)

<http://www.epatsient.ee/yhendlabor/images/stories/kasiraamat/FG/folliikuleid%20stimuleeriv%20hormoon.pdf> (27.04.2017)

<http://www.informatics.jax.org/> (20.04.2017)

http://www.kliinikum.ee/koolitus/Kliinik2008/K_1320_PunabM.pdf (23.03.2017)

<http://www.kliinikum.ee/taastusravi/spo-teenused/159> (27.04.2017)

<http://www.kliinikum.ee/yhendlabor/images/stories/referentsvaartused/tl-14%201%20v17%20kliinilise%20keemia%20erialaliini%20referentsvrtused.pdf>
(27.04.2017)

<http://www.proteinatlas.org> (20.04.2017)

https://www.kliinik.ee/haiguste_abc/hupospaadia/id-546 (13.02.2017)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (07.05.2017)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (02.04.2017)

<https://www.omim.org/> (22.05.2017)

https://www.sbd.ee/EN/products/dna_ladders/1_kb_dna_ladder (28.04.2017)

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Eveliis Koppel, (sünnikuupäev: 08.11.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Meessuguelundite arengu anomaaliate geneetilised põhjused ühe patsiendi eksoomi
sekveneerimise andmete põhjal“, mille juhendaja on Marina Grigorova ja Maris Laan,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 31.12.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25. mai 2017