

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Michaela Daňková

Cílené sekvenování nové generace kandidátních genů zodpovědných za poruchu spermatogeneze a neplodnost mužů

Targeted next-generation sequencing of candidate genes responsible for impaired spermatogenesis and male infertility

Diplomová práce

Školitel: doc. MUDr. František Liška, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2015

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Františku Liškovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a přínosné konzultace. Dále velice děkuji Ing. Blance Chylíkové za její čas, pomoc, ochotu a cenné rady během práce v laboratoři. Děkuji Mgr. Ivanu Hrdličkovi za poskytnutí klinických dat pacientů. Také děkuji celému kolektivu laboratoře na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK za pomoc a vstřícné přijetí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu v průběhu studia.

Práce byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví ČR jako grant číslo NT/12269-5.

Abstrakt

Neplodnost je rozšířeným zdravotním problémem, v asi polovině případů trpí neplodností muž a opět asi polovina případů mužské neplodnosti je bez známé příčiny. U významné části těchto mužů se předpokládá genetická etiologie onemocnění. Současné rutinní metody laboratorní diagnostiky, které zahrnují vyšetření karyotypu, vyloučení mutací v *CFTR* genu a mikroleceí chromozomu Y často neodhalí příčinu neplodnosti, z toho důvodu je snaha odhalit mutace v dalších genech, které vedou k neplodnosti mužů. V posledních letech bylo s použitím modelových zvířat identifikováno mnoho genů nezbytných pro plodnost. Na základě toho jsme vybrali 12 kandidátních genů (*CAPZA3*, *CDC14B*, *CDC42*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *HOOK1*, *HRB*, *OAZ3*, *ODF1*, *RIMBP3*, *SPATA16*), které jsou nezbytné pro spermatogenezi. Myší nebo potkaní mutanty v těchto genech jsou spojovány s oligoasthenoteratozoospermii, protože se podílejí na morfogenezi spermií. Nicméně spektrum fenotypů může zahrnovat i azoospermii. Podstatou diplomové práce bylo stanovit sekvence vybraných genů u neplodných mužů s poruchou spermatogeneze a prokázat nález, případně absenci patogenních mutací v těchto genech. Byla použita cDNA a genomická DNA z periferní krve. Dvanáct kandidátních genů bylo amplifikováno pomocí PCR a osekvenováno pomocí sekvenování nové generace na platformě GS Junior od firmy Roche. Bylo osekvenováno 73 pacientů a 7 kontrolních vzorků, které tvoří muži s normozoospermii. Získané sekvenční varianty byly tříděny podle jejich možné patogenity, celkem bylo zachyceno 14 nových variant a 63 známých variant. Kauzální mutace způsobující neplodnost nebyla u žádného z pacientů prokázána.

Klíčová slova:

neplodnost mužů, genetická příčina, kandidátní geny, spermatogeneze, spermiogeneze, sekvenování nové generace, platforma GS Junior

Abstract

Infertility is a widespread health problem, caused by the male factor in about half of all cases, and in about a half of the infertile men the cause is unknown. In a significant number of these men, genetic etiology is assumed. Current routine methods of laboratory diagnostics, which include karyotype examination, exclusion of mutations in the CFTR gene, and Y chromosome microdeletions, do not usually reveal the cause of infertility. That is why researchers' efforts aim at detecting mutations in other genes that are causing male infertility. In recent years, animal models have been used to identify many genes necessary for fertility. Based on these findings, 12 candidate genes have been selected (CAPZA3, CDC14B, CDC42, CNTROB, CSNK2A2, GOPC, HOOK1, HRB, OAZ3, ODF1, RIMBP3, SPATA16) that are essential for spermatogenesis. Mouse or rat mutants in these genes are primarily associated with oligoasthenoteratozoospermia, since they are involved in sperm morphogenesis. However, the phenotype spectrum may comprise also azoospermia. The purpose of the thesis was to determine the sequence of the afore mentioned genes in infertile men with impaired spermatogenesis and to reveal presence or absence of pathogenic mutations in these genes, using cDNA and genomic DNA from peripheral blood. The candidate genes were amplified by PCR and sequenced using next-generation sequencing on the GS Junior platform (Roche). 73 patients and 7 control samples of men with normozoospermia have been sequenced, uncovering 14 new and 63 known variants that have been classified according to their potential pathogenicity. None of the observed variants could be classified as causal mutations responsible for the infertility phenotype.

Key words:

male infertility, genetic cause, candidate genes, spermatogenesis, spermiogenesis, next-generation sequencing, platform GS Junior

Obsah

1 Úvod	8
2 Přehled literatury	9
2.1 Neplodnost – definice, diagnostika a možná řešení	9
2.2 Mužská neplodnost.....	10
2.2.1 Genetické příčiny neplodnosti	10
2.2.2 Diagnostika neplodnosti a genetické poradenství	13
2.2.3 Spermatogeneze a hodnocení spermioqramu	14
2.3 Výzkum neplodnosti s použitím modelových zvířat.....	16
2.4 Vybrané kandidátní geny	17
2.4.1 Gen <i>CAPZA3</i>	18
2.4.2 Gen <i>CDC14B</i>	18
2.4.3 Gen <i>CDC42</i>	18
2.4.4 Gen <i>CNTROB</i>	19
2.4.5 Gen <i>CSNK2A2</i>	19
2.4.6 Gen <i>GOPC</i>	19
2.4.7 Gen <i>HOOK1</i>	20
2.4.8 Gen <i>HRB</i>	20
2.4.9 Gen <i>OAZ3</i>	20
2.4.10 Gen <i>ODF1</i>	21
2.4.11 Gen <i>RIMBP3</i>	21
2.4.12 Gen <i>SPATA16</i>	21
2.5 Sekvenování nové generace – platforma GS Junior (Roche).....	22
2.5.1 Pyrosekvenování.....	22
2.5.2 Základní protokol metody	24
2.5.3 Výhody, nevýhody a využití.....	25
3 Cíle práce	26
4 Materiál a metody	27
4.1 Experimentální skupina.....	27
4.2 Stanovení koncentrace RNA a reverzní transkripce	27
4.3 Polymerázová řetězová reakce	28

4.4 Elektroforéza	33
4.5 Sekvenování na platformě GS Junior (Roche).....	34
4.5.1 Reagencie, pomůcky a přístroje	34
4.5.2 Metodický postup	35
4.6 Zpracování výsledků	44
5 Výsledky.....	46
6 Diskuze.....	53
7 Souhrn.....	57
8 Seznam použité literatury	58

Seznam zkratek

AZF	<i>azoospermia factor</i>
bdSNP	<i>The Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
CAPZA3	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3</i>
CDC14B	<i>cell division cycle 14B</i>
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CNTROB	<i>centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein</i>
CSNK2A2	<i>casein kinase 2, alpha prime polypeptide</i>
emPCR	emulzní polymerázová řetězová reakce
GOPC	<i>golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing</i>
HOOK1	<i>hook microtubule-tethering protein 1</i>
HRB	<i>ArfGAP with FG repeats 1</i>
ICSI	<i>intra cytoplasmic sperm injection, intracytoplazmatická injekce spermií</i>
IVF	<i>in vitro fertilizace</i>
MESA	<i>microchirurgical epididymal sperm aspiration</i>
OAZ3	<i>ornithine decarboxylase antizyme 3</i>
ODF1	<i>outer dense fiber of sperm tails</i>
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
RIMBP3	<i>RIMS binding protein 3</i>
RT	reverzní transkripce
SNP	<i>single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus</i>
SPATA16	<i>spermatogenesis associated 16</i>
TESE	<i>testicular sperm extraction</i>
UTR	<i>untranslated region, nepřekládaná oblast</i>
WHO	<i>World Health Organization, Světová zdravotnická organizace</i>

1 Úvod

Neplodnost je rozšířeným zdravotním problémem. Vědci a lékaři na celém světě se snaží této problematice porozumět, hledají příčiny a nové možnosti v diagnostice a léčbě neplodnosti. Přes veškeré pokroky reprodukční medicíny stále mnoho párů zůstává bezdětných. Neplodnosti mužů je obecně věnována menší pozornost než neplodnosti žen, přestože je příčina asi z 50 % právě na straně muže. Z toho polovina případů mužské neplodnosti zůstává bez známé příčiny. U velké části těchto mužů se předpokládá genetická příčina. Rutinně je u neplodných mužů vyšetřován karyotyp a následně molekulární genetickou diagnostikou vyloučeny mutace v *CFTR* genu a mikrodelece v oblasti AZF na chromozomu Y. Nedílnou součástí diagnostiky je vyšetření spermioqramu. Často se u těchto mužů vyskytuje azoospermie, oligozoospermie a teratozoospermie. U významného podílu neplodných mužů pomocí zmíněných vyšetření není nalezena příčina. Proto je snaha identifikovat kauzální mutace neplodnosti a v ideálním případě zavést nové metody DNA diagnostiky, které by odhalily genetickou etiologii onemocnění alespoň u některých pacientů a znalost mutace by bylo možné použít k preimplantační diagnostice a zamezit přenosu mutace do další generace. Genů, které ovlivňují vývoj, funkci a regulaci mužského reprodukčního systému je však mnoho a stále se objevují další.

Tato diplomová práce se zaměřuje na genetickou příčinu mužské neplodnosti. Dává si za cíl ověřit pomocí mutačního screeningu kandidátních genů přítomnost patogenních mutací u neplodných mužů s poruchou spermatogeneze. Tyto mutace by byly zodpovědné za poruchu spermatogeneze a tím by vedly k narušení plodnosti nebo úplné neplodnosti muže. Bylo sekvenováno těchto 12 genů: *CAPZA3*, *CDC14B*, *CDC42*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *HOOK1*, *HRB*, *OAZ3*, *ODF1*, *RIMBP3*, *SPATA16*. Geny byly vybrány na základě studií provedených na zvířatech. S použitím modelových zvířat bylo identifikováno mnoho genů, které jsou nezbytné pro plodnost. Vybrané geny jsou nezbytné pro poslední krok spermatogeneze, tj. pro proces spermioogeneze - vývoj morfologicky a funkčně zralé spermie. Mutační screening kandidátních genů byl proveden pomocí sekvenování nové generace na platformě GS Junior od firmy Roche.

2 Přehled literatury

2.1 Neplodnost – definice, diagnostika a možná řešení

Infertilita, v diplomové práci bude používán český ekvivalent neplodnost, je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) onemocnění reprodukčního systému a je definována jako neschopnost dosáhnout těhotenství po 12 a více měsících pravidelného nechráněného pohlavního styku (Zegers-Hochschild *et al.* 2009). Neplodnost se dělí na primární, kdy těhotenství nebylo vůbec dosaženo a na sekundární neplodnost, což znamená, že v minulosti k oplodnění došlo, ale páru se nedaří druhé nebo další těhotenství (Nieschlag 2010). Uvádí se, že celosvětově je přibližně 9 % párů neplodných a z toho 56 % vyhledá lékařskou pomoc (Boivin *et al.* 2007). Ze všech neplodných párů je ve 40 až 50 % příčina na straně ženy a ve 30 až 40 % je na vině muž, u zbývajících 10 až 30 % jde o vzájemnou kombinaci nebo neznámou příčinu (Kara a Simoni 2010).

Při diagnostice neplodnosti je třeba brát v úvahu fertilitní potenciál celého páru. Pokud žena nemá poruchu plodnosti a u muže je zjištěna závažnější porucha, mají stále vysokou šanci na spontánní početí. U žen je v posledních letech problém zejména věk. Biologická reprodukční kapacita párů, kdy je ženě nad 30 let a věk muže ještě vyšší je nesrovnatelná s mladšími dvojicemi (Zvěřina 2010). Žena ve věku kolem 20 let potřebuje k otěhotnění průměrně čtyři cykly, ve věku 25 až 35 let v průměru šest cyklů, po 35. roku pravděpodobnost otěhotnění prudce klesá a u ženy starší 40 let je k otěhotnění zapotřebí v průměru 20 cyklů. Proto je nezbytné přizpůsobit vyšetření a následně léčbu neplodného páru věku ženy. Cílem vyšetření neplodného páru je najít příčinu, a pokud je to možné jí léčit. Vyšetřují se oba partneři, protože bylo by velkou chybou podrobit ženu nepříjemným a drahým vyšetřením a až následně zjistit, že na vině je např. azoospermie muže, tedy nepřítomnost spermií v ejakulátu. Proto je prvním vyšetřením spermioqram a u ženy vyšetření hodnotící ovulaci, další vyšetření se provádí až doplňkově, přesto však u části vyšetřovaných párů není příčina nalezena (Roztočil *et al.* 2011).

Komplexní diagnostikou a léčbou neplodnosti se dnes zabývají specializovaná pracoviště - centra reprodukční medicíny nebo centra asistované reprodukce. Díky moderním metodám asistované reprodukce lze velké části neplodných párů pomoci. Metody lze rozdělit na ty, které pracují jen se spermiemi - inseminace nebo i s oocyty - *in vitro* fertilizace (IVF). Při IVF dochází k oplodnění oocyty v laboratorních podmínkách mimo tělo ženy. Další metody související s IVF jsou intracytoplazmatická injekce spermie do oocyty (ICSI), dále

jde o metody chirurgického získání spermií z nadvarlete nebo varlete – mikrochirurgické odsátí spermií z nadvarlete (MESA) a získání spermií z varlete (TESE). TESE umožňuje získání spermií z kanálků zárodečného epitelu, pokud nejsou schopny uvolnění a transportu do nadvarlete (Roztočil *et al.* 2011). Existence zmíněných metod snižuje pozornost, kterou reprodukční medicína věnuje neplodnosti. Vyšetření celého neplodného páru a opakovaným kontrolám spermioqramu musí lékaři věnovat dostatek času a i přes pokroky v asistované reprodukci by mělo být cílem lékařů a jejich pacientů dosažení spontánního početí (Zvěřina 2010). Pokud však u neplodného páru lékaři přistoupí na možnost asistované reprodukce, je třeba brát v potaz případný přenos genetické vady na další generaci (Matzuk a Lamb 2002).

2.2 Mužská neplodnost

Muž je zodpovědný za asi polovinu případů neplodnosti. Primární neplodnost se vyskytuje u 67-71 % pacientů a sekundární u 29-33 % pacientů. Mužská neplodnost je multifaktoriální syndrom a může být způsobena celou řadou onemocnění, ale u více než poloviny neplodných mužů je příčina neznámá (Poongothai *et al.* 2009). U těchto mužů se předpokládá genetická příčina. Vzhledem k četnému výskytu idiopatické neplodnosti je snaha identifikovat genetické příčiny neplodnosti a lépe porozumět mechanismům regulujícím spermatogenezi a správnou funkci spermie (Ferlin *et al.* 2006).

Kromě genetické příčiny mohou neplodnost mužů způsobovat i další faktory. Mezi ně patří hormonální nerovnováha, anatomické a morfologické abnormality reprodukčního systému, chemikálie a toxiny. Dále mohou dočasně nebo trvale ovlivnit mužský reprodukční systém změny životního stylu, kouření, alkohol, léky a psychické problémy (Singh *et al.* 2014).

2.2.1 Genetické příčiny neplodnosti

Chromozomální abnormality

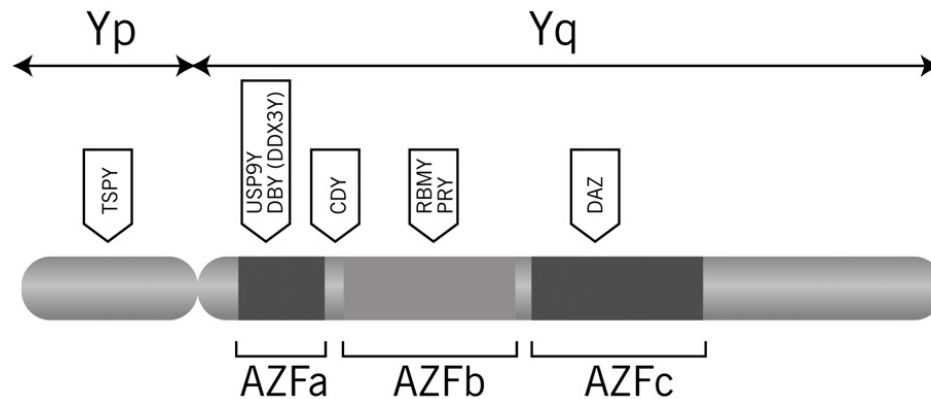
Chromozomální abnormality se vyskytují asi u 5 % neplodných mužů a v populaci mužů s azoospermií asi u 15 %. Abnormality Y chromozomu jsou hlavní příčinou azoospermie nebo oligozoospermie u mužů. Nejčastější chromozomální abnormalitou je aneuploidie, což je ztráta nebo nadbytek jednoho či více chromozomů. Muži s neobstrukční azoospermií mají vysoký výskyt aneuploidií a to především u pohlavních chromozomů.

Nejčastější aneuploidií pohlavních chromozomů je Klinefelterův syndrom s karyotypem 47,XXY (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010). Vzácně se vyskytuje i 48,XXXXY nebo 49,XXXXXY. Incidence tohoto syndromu je 1:1 000 narozených chlapců. Typický fenotyp pacientů s Klinefelterovým syndromem je vysoká hubená postava, dlouhé končetiny, hypogonadismus, gynekomastie a klinicky nejvýznamnějším projevem je azoospermie (Otová *et al.* 2010). Existují dvě varianty Klinefelterova syndromu: s karyotypem 47,XXY a mozaika 47,XXY/46,XY. Téměř 100% mužů s karyotypem 47,XXY má azoospermii, ale u mužů s mozaikou se někdy vyskytuje zbytková spermatogeneze v některých semenotvorných kanálcích (Ferlin *et al.* 2007). Dalším zdrojem aneuploidií jsou translokace chromozomů, což je strukturální přestavba, kdy dochází k přemístění genetického materiálu z jednoho chromozomu na druhý. Bylo zjištěno, že výskyt autozomální translokace u neplodných mužů je 4-10x pravděpodobnější než u zdravých mužů. Robertsonova translokace, tedy translokace mezi akrocentrickými chromozomy může způsobovat různé fenotypy, od normální spermatogeneze po oligozoospermii nebo azoospermii (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010).

Mikrodelece chromozomu Y

Chromozom Y nese mnoho genů, které jsou nezbytné pro spermatogenezi a vývoj mužských pohlavních žláz. Je obtížné určit přesnou příčinu neplodnosti, protože na chromozomu Y se vyskytují různé geny a rozsah delecí je velmi variabilní, kromě toho stejný fenotyp může být způsoben několika různými delecemi nebo mutacemi. Mikrodelece chromozomu Y jsou velmi často příčinou neplodnosti mužů (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010). Mikrodelece jsou přestavby chromozomů malého rozsahu, které zpravidla není možné identifikovat základními cytogenetickými metodami. Mikroskopicky s použitím konvenčních metod jsou pozorovatelné jen výjimečně. Lze je diagnostikovat pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) nebo molekulárně-biologickými metodami (Kočárek *et al.* 2010). Mikrodelece se nejčastěji vyskytují na dlouhém raménku Y chromozomu. Zvláště v oblasti AZF (*azoospermia factor*), která obsahuje geny podílející se na růstu a vývoji spermie. Oblast AZF (Yq11.3) je rozdělena do tří podoblastí: AZFa, AZFb, AZFc, které jsou znázorněny na obrázku 2.1 (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010).

Obr. 2.1. Chromozom Y s vyznačenou oblastí AZFa, AZFb, AZFc a souvisejícími geny. Převzato a upraveno podle (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010).



Mikrodelece v oblasti AZF se nachází asi u 4 - 5 % mužů s oligozoospermii a asi u 15 – 18 % azoospermických mužů. Vyšetření oblasti AZF je prováděno pouze u mužů, u kterých po opakovaném vyšetření spermioqramu byla zjištěna těžká oligozoospermie nebo azoospermie (Gaillyová *et al.* 2007). Mikrodelece oblasti AZFa tvoří asi 10 % všech delecí AZF a vždy způsobují azoospermii. Mikrodelece AZFb a AZFc se většinou projeví oligozoospermii až azoospermii. U pacientů, kde je možné odebrat spermie a provést ICSI se musí počítat s rizikem přenosu mikrodelece chromozomu Y na syny a tím pádem přenos poruchy plodnosti do další generace (Nieschlag *et al.* 2010).

Mutace CFTR genu

Gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) se nachází na dlouhém raménku 7. chromozomu v pozici q31.2. Gen kóduje protein, který funguje jako tzv. ABC transportér (ATP-binding cassette) a má funkci chloridového kanálu, který řídí transport chloridových iontů přes buněčnou membránu. Mutace tohoto genu jsou spojené s autozomálně recesivním onemocněním cystickou fibrózou a kongenitální bilaterální absencí vas deferens (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Mutace v rámci *CFTR* genu způsobují velmi variabilní fenotyp, závažnost onemocnění závisí na kombinaci mutací. *CFTR* protein je defektní, redukován nebo zcela chybí. Gen *CFTR* je vyšetřován v souvislosti s neplodností, protože více než 95 % pacientů mužského pohlaví s mutovaným genem *CFTR* je díky obstrukční azoospermii neplodných. Nejčastější mutací je F508del, která se vyskytuje v 70 % případů (Field a Martin 2011). Dále se vyšetřují polytymidinové alelické varianty lokalizované v intronu 8, sekvence označovaná jako IVS8polyT osahuje 5, 7 nebo 9 tyminů.

Alela T5 IVS8polyT polymorfismus patří mezi mírné mutace a ve zvýšené míře vede k přeskočení exonu 9. Varianta T5 způsobuje větší redukci normální hladiny CFTR mRNA než u alely T7 a T9. Redukce CFTR mRNA má za následek poruchu funkce CFTR proteinu (Tomaiuolo *et al.* 2011). U neplodných mužů se doporučuje vyšetřovat kromě mutací CFTR genu také T polymorfizmy, protože varianta T5 je poměrně častá a může být považována za patogenní. U dárců gamet je nutné vyloučit přítomnost alely T5 (Hrdlička 2008).

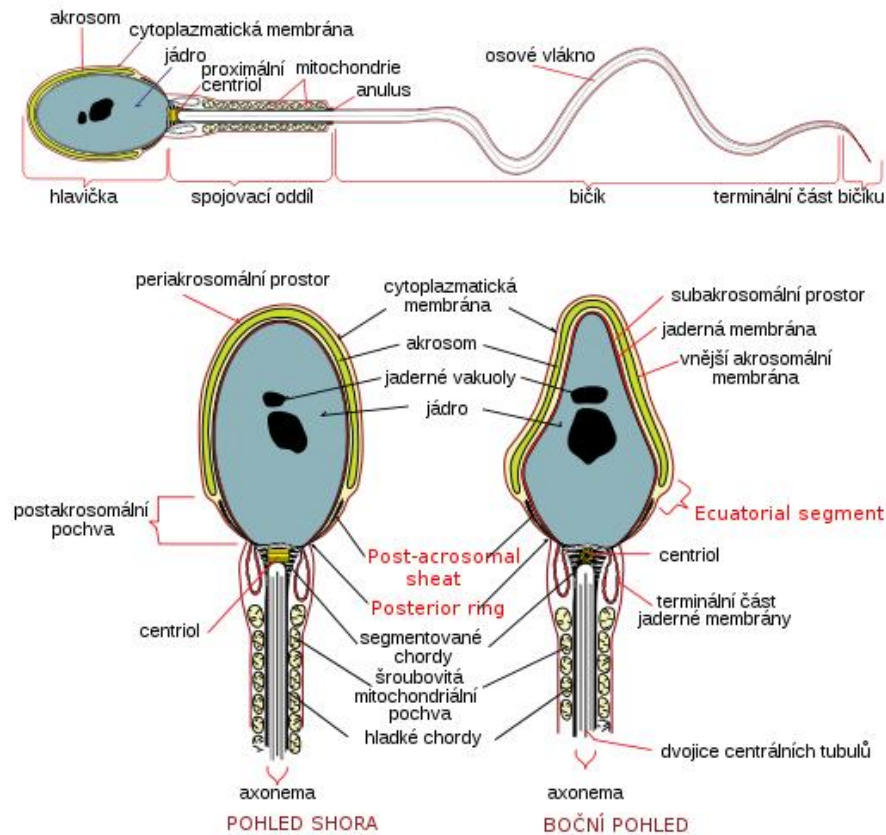
2.2.2 Diagnostika neplodnosti a genetické poradenství

Při vyšetřování mužů s poruchami plodnosti se prolíná mnoho lékařských oborů, protože různými aspekty mužské neplodnosti se zabývají pediatři, gynekologové, endokrinologové, urologové, dermatovenerologové, toxikologové, sexuologové a v neposlední řadě genetici. Vždy musí hodnocení plodnosti muže vycházet z důkladného tělesného vyšetření a spermiogramu. Variabilita hodnot spermiogramu je vysoká, proto by mělo být kontrolní vyšetření spermií prováděno opakovaně v několikaměsíčních intervalech (Zvěřina 2010). Genetické poradenství a diagnostika neplodnosti by měly zahrnovat sestavení podrobné anamnézy obou partnerů a třígenerační rodokmen. Dále cytogenetické vyšetření obou partnerů a také mutační analýzu *CFTR* genu a detekci mikrodelecií oblasti AZF na chromozomu Y u mužů azoospermií nebo těžkou oligozoospermií (Gaillyová *et al.* 2007).

Objasnění genetické etiologie neplodnosti má pro neplodné páry zásadní význam. Dnešní možnosti asistované reprodukce, jako je IVF a ICSI umožňují překonat přirozené mechanismy výběru a produkovat životaschopná zygota i u párů, kdy kvalita spermií u muže je velmi nízká. Je nutné si uvědomit možný přenos genetické vady na další generace. Zmíněné metody asistované reprodukce jsou relativně nové, proto frekvence dědičnosti mutací prostřednictvím těchto postupů a jejich vliv na budoucí generace není dosud objasněn. Někteří odborníci se obávají možného negativního vlivu na epigenetické úrovni, ale v současné době neexistují žádné přesvědčivé důkazy. U dětí počatých pomocí ICSI byl zaznamenán mírný nárůst výskytu aneuploidií pohlavních chromozomů a zvýšený nález abnormalit u autozomů. Tyto skutečnosti je však obtížné interpretovat, protože neplodní muži mají sníženou kvalitu spermií a vyšší výskyt aneuploidií a genetických abnormalit. Předané genetické abnormality prostřednictvím metod asistované reprodukce mohou mít vážné důsledky pro vývoj zygoty (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010). Z toho důvodu je vhodné před asistovanou reprodukcí provádět preimplantační genetickou diagnostiku.

2.2.3 Spermatogeneze a hodnocení spermiogramu

Spermatogeneze je proces tvorby a vývoje mužských pohlavních buněk spermií, začíná v období puberty a probíhá celý život. Jde o složitý proces zahrnující mitotické dělení, meiózu a proces spermiogeneze. Probíhá ve varlatech v semenotvorných kanálcích, jejichž vývody se spojují a ústí do nadvarlete. V semenotvorných kanálcích se nacházejí spermatogonie (kmenové buňky) a spermie v různém stádiu vývoje, s nimi jsou propojené Sertoliho buňky, které dodávají potřebné živiny a enzymy. Spermatogonie se na začátku spermatogeneze mitoticky dělí na dvě dceřiné diploidní buňky. Jedna buňka zůstává součástí populace kmenových buněk a druhá je primární spermatocyt, který je výchozím buněčným typem pro meiotické dělení. Prvním meiotickým dělením vznikají dva haploidní sekundární spermatocyty a následuje druhé meiotické dělení, při kterém vznikají čtyři spermatidy. Spermatida je nezralá forma spermie, z které se postupným vyzríváním stává spermie, tento proces se nazývá spermiogeneze (Kittnar *et al.* 2011). Spermatidy se přeměňují v bičíkovité buňky v záhybech Sertoliho buněk. Postupně vzniká hlavička spermie z jádra spermatidy, tvoří se krček a bičík. Z Golgiho komplexu vzniká akrozomální váček a později akrozom. Po dokončení přeměny se spermie uvolňuje do lumina kanálků. Vývoj zralé spermie trvá přibližně 64 dní, neprobíhá ve všech kanálcích rovnoměrně, ale probíhá v cyklech. Na průřezu kanálku lze pozorovat různá stadia pohlavních buněk. Spermie vyžadují pro svůj vývoj nižší teplotu než je normální teplota lidského těla, to je zajištěno sestupem varlete do skrota. U nesestouplého varlete může dojít k vážnému narušení spermiogeneze. Spermie je asi 50-60 μm dlouhá buňka, z toho 40-50 μm tvoří bičík. Skládá se z hlavičky, středního oddílu a z bičíku. Na hlavičce spermie je akrozom, který se uplatňuje při oplození, obsahuje enzymy, které štěpí glykoproteinový obal oocyty a celá spermie je na povrchu pokryta buněčnou membránou. Střední oddíl se skládá z krčku a spojovacího oddílu, v kterém jsou nahromaděny mitochondrie sloužící jako energetické centrum spermie zajišťující správnou funkci. Vývoj spermie je dokončen v nadvarletí, kde dochází k dozrání spermií (Vacek 2006). Schéma spermie s popisem jejích částí je na obrázku 2.2.

Obr. 2.2. Schéma spermie. Převzato z (<http://cs.wikipedia.org/>).

Základní vyšetření pro zhodnocení kvality spermií je spermioqram. Spermioqram je vyšetření ejakulátu, které slouží k posouzení plodnosti muže. Normální ejakulát dle normy WHO by měl mít objem 1,5 ml a více, koncentraci spermií 15 mil/ml a více, 4 % spermií a více s normální morfologií, 32 % spermií a více s progresivním pohybem vpřed a minimálně 40 % pohyblivých spermií. Průměrné pH ejakulátu je 7,2. WHO stanovuje také nomenklaturu související s kvalitou spermatu, popisuje odchylka od referenčních hodnot. Tyto termíny jsou používány při vyhodnocení spermioqramu k popisu vzorků spermatu s hodnotami mimo referenční rozmezí. Některé termíny se vztahují na jediný parament a jiné jich popisují více. Jednotlivé termíny hodnotí hybnost, morfologii a počet spermií. Jsou vysvětleny v tabulce 2.1 (WHO 2010).

Tab. 2.1. Nomenklatura související s kvalitou spermatu podle WHO. Převzato a upraveno podle (WHO 2010).

Diagnóza	Definice podle WHO
aspermie	nepřítomnost ejakulátu
asthenozoospermie	procento progresivně pohyblivých spermií je pod dolní referenční mezí
asthenotaratozoospermie	procento progresivně pohyblivých a morfologicky normálních spermií je pod dolní referenční mezí
azoospermie	nepřítomnost spermií v ejakulátu
kryptozoospermie	velmi nízký počet spermií v ejakulátu, pozorovatelný až po centrifugaci
normozoospermie	počet spermií, pohyblivost a morfologie je v normálu
oligoasthenozoospermie	počet spermií a pohyblivost je pod dolní referenční mezí
oligoasthenoteratozoospermie	počet spermií a procento pohyblivých a morfologicky normálních spermií je pod dolní referenční mezí
oligoteratozoospermie	počet spermií a procento morfologicky normálních spermií je pod dolní referenční mezí
oligozoospermie	celkový počet spermií je pod dolní referenční mezí
teratozoospermie	procento morfologicky normálních spermií je pod dolní referenční mezí

2.3 Výzkum neplodnosti s použitím modelových zvířat

Modelová zvířata jsou nepostradatelným nástrojem při výzkumu neplodnosti a snaže identifikovat geny, které se uplatňují při reprodukci. Především myších modelů s vadou reprodukce dnes existuje velké množství, ale používají se i další modelová zvířata. Byly vytvořeny pomocí indukovaných nebo spontánních mutací a cílenou mutagenezí (knock-outy). Tyto modely pomáhají studovat a pochopit mechanismy reprodukce a identifikovat geny nezbytné pro plodnost samců. Proto významně přispívají k lepšímu porozumění neplodnosti. Studované geny jsou konzervovány u lidí, očekává se tedy podobná funkce ve spermatogenezi i u člověka (Liška 2003, Matzuk a Lamb 2002, Matzuk a Lamb 2008).

Velkým úkolem do budoucna je převést výsledky získané výzkumem modelových zvířat do klinické praxe a rozšířit současné klinické hodnocení neplodných párů a na základě nových poznatků zdokonalovat diagnostiku a léčbu (Matzuk a Lamb 2008).

2.4 Vybrané kandidátní geny

Bylo vybráno 12 kandidátních genů, které jsou nezbytné pro poslední krok spermatogeneze, tedy vývoj morfologicky a funkčně specializované spermie. Studium těchto genů u modelových zvířat bylo zjištěno, že mají význam pro plodnost samců. Geny *CNTROB*, *HOOK1*, *OAZ3* a *ODF1* způsobují poruchu morfogeneze vedoucí k dekapitaci spermie, tzn. oddělení hlavičky a bičíku. Gen *CSNK2A2* vede ke generalizované poruše a vyčerpání spermatogeneze. Geny *HRB*, *SPATA16* a *GOPC* způsobují poruchu utváření akrozomu. Geny *RIMBP3* a *CAPZA3* vedou k abnormálnímu tvaru hlavičky spermie. Geny *CDC42* a *CDC14B* způsobují narušení buněčného cyklu a základní morfologie buněk. Základní charakteristika genů, jako je název, lokalizace na chromozomu, délka a počet exonů je uvedena v tabulce 2.2.

Tab. 2.2. Přehled kandidátních genů a jejich základní charakteristika.

Gen	Gen - celý název	Lokalizace genu	Délka (bp)	Počet exonů	Citace
CAPZA3	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3</i>	12p12.3	1078	1	(Geyer <i>et al.</i> 2009)
CDC14B	<i>cell division cycle 14B</i>	9q22.3	129613	26	(Tumurbaatar <i>et al.</i> 2011)
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>	1p36.1	40317	8	(Kierszenbaum <i>et al.</i> 2004)
CNTROB	<i>centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein</i>	17p13.1	17796	19	(Liška <i>et al.</i> 2009) (Wang <i>et al.</i> 2010)
CSNK2A2	<i>casein kinase 2, alpha prime polypeptide</i>	16q21	39972	12	(Escalier <i>et al.</i> 2003) (Xu <i>et al.</i> 1999)
GOPC	<i>golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing</i>	6q21	42274	9	(Yao <i>et al.</i> 2002)
HOOK1	<i>hook microtubule-tethering protein 1</i>	1p32.1	61518	23	(Mendoza-Lujambio <i>et al.</i> 2002)
HRB	<i>ArfGAP with FG repeats 1</i>	2q36.3	89051	17	(Kang-Decker <i>et al.</i> 2001), (Kierszenbaum <i>et al.</i> 2004)
OAZ3	<i>ornithine decarboxylase antizyme 3</i>	1q21.3	8362	7	(Ivanov <i>et al.</i> 2000)
ODF1	<i>outer dense fiber of sperm tails 1</i>	8q22.3	9398	2	(Burmester a Hoyer-Fender 1996) (Yang <i>et al.</i> 2014)
RIMBP3	<i>RIMS binding protein 3</i>	22q11.21	5796	1	(Zhou <i>et al.</i> 2009)
SPATA16	<i>spermatogenesis associated 16</i>	3q26.31	251912	14	(Dam <i>et al.</i> 2007)

Převzato z (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4.1 Gen *CAPZA3*

Gen *CAPZA3* - *capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3* je lokalizován na chromozomu 12 (12p12.3). Je dlouhý 1078 bp a skládá se pouze z jediného exonu. Kóduje aktin *capping* protein, který patří do rodiny F-aktin *capping* proteinů alfa podjednotky. Tento protein je převážně lokalizován v oblasti spojovacího oddílu spermií, dále také v bičíku a v postakrozomální oblasti. Protein může tvořit heterodimery z alfa a beta podjednotky a je důležitý pro stavbu spermie a mužskou plodnost. Gen bývá označován také jako *Gsg3* nebo *CAPPA3* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Byla provedena studie na myších, která potvrdila, že gen *CAPZA3* je nezbytný pro plodnost samců u myši a pravděpodobně i u dalších savců. Také bylo potvrzeno, že F-aktin má zásadní roli při tvorbě a stabilizaci spermie (Geyer *et al.* 2009).

2.4.2 Gen *CDC14B*

Gen *CDC14B* – *cell division cycle 14B* se nachází na chromozomu 9 (9q22.3), je dlouhý 129613 bp a má 26 exonů. Kódovaný protein patří do rodiny proteinů tyrosin fosfatázy s duální specifitou. Někdy je označován také jako *CDC14B3*, *Cdc14B1*, *Cdc14B2*, *hCDC14B*. Protein kódovaný tímto genem se uplatňuje při mitóze a iniciaci replikace DNA, má pravděpodobně svou roli při kontrole buněčného cyklu. Bylo prokázáno, že interaguje s tumor supresorovým proteinem p53 a reguluje jeho funkci. Alternativním sestřihem tohoto genu vznikají 3 transkripční varianty (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Bylo prokázáno, že *CDC14B* má důležitou roli v regulaci mitózy. Nefunkční gen způsobuje chybnou segregaci chromozomů, vede k závažným mitotickým vadám, dochází ke zpoždění přechodů mezi metafází a anafází, vznikají multipolární vřetenka (Tumurbaatar *et al.* 2011).

2.4.3 Gen *CDC42*

Gen *CDC42* - *cell division cycle 42* je lokalizován na 1. chromozomu (1p36.1) a skládá se z 8 exonů. Je dlouhý 40317 bp. Bývá označován také jako *G25K* nebo *CDC42Hs*. Protein kódovaný tímto genem je malá GTPáza ze skupiny Rho proteinů, která reguluje signální dráhy řídící různé buněčné procesy, včetně buněčné morfologie, migrace, endocytózy a buněčného cyklu. Alternativním sestřihem vzniká několik variant transkriptů. Na chromozomech 3, 4, 5, 7, 8, a 20 byly identifikovány pseudogeny tohoto genu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4.4 Gen *CNTROB*

Gen *CNTROB* - *centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein* se nachází na 17. chromozomu (17p13.1) má 19 exonů a je dlouhý 17796 bp. Bývá také označován jako LIP8 nebo PP1221. Tento gen kóduje protein centrobin, který je nutný pro duplikaci centrioly a cytokinezi. Byly popsány různé izoformy tohoto genu vzniklé na základě alternativního sestřihu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Byl popsán model selhání spermiogeneze u potkana s mutací *hd*, se ztrátou funkce genu *Cntrob*. Nefunkční centrobin vede u potkana k narušení spermatogeneze a neplodnosti samců, současně dochází k poškození vývoje končetin. Centrobin se podílí na tvarování hlavičky spermie a na mechanismu spojujícím hlavičku s bičíkem. Výsledkem mutovaného centrobinu je oligoospermie, teratozoospermie, abnormální tvar hlavičky a oddělení hlavičky a bičíku (Liška *et al.* 2009, Wang *et al.* 2010).

2.4.5 Gen *CSNK2A2*

Gen *CSNK2A2* - *casein kinase 2, alpha prime polypeptide* se nachází na 16. chromozomu (16q21), má 12 exonů a může být označován také jako *CK2A2* nebo *CSNK2A1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tento gen kóduje α' katalytickou podjednotku enzymu kasein kináza 2, což cyklická-AMP a kalcium independentní serin-threonin kináza. Tato proteinkináza se uplatňuje při replikaci DNA, při regulaci transkripce a translace. *Csnk2a2* je exprimován ve varlatech v pozdních stádiích spermatogeneze u myších samců. U myší se ztrátou funkce tohoto genu dochází k oligozoospermii a globozoospermii a následné neplodnosti samců (Xu *et al.* 1999). Dochází k abnormálním tvarům jádra spermatidy, byly odhaleny rozsáhlé degradační procesy ve všech fázích spermatogeneze, buňky byly postiženy v rozmezí od spermatogonií po časně spermie (Escalier *et al.* 2003).

2.4.6 Gen *GOPC*

Gen *GOPC* – *golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing* je lokalizován na 6. chromozomu (6q21), má 9 exonů a je dlouhý 42274 bp. Tento gen kóduje Golgi protein s PDZ doménou. Proteiny s PDZ doménou jsou schopné vázat další proteiny prostřednictvím krátkých motivů blízko C konce. U myší s defektním proteinem vzniká globozoospermie a jsou neplodné (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Akrozom je velmi důležitá část spermie, uplatňuje se při oplození oocyty a je odvozen z Golgiho aparátu. Při porušení genu *GOPC*, který kóduje Golgi protein, u myších samců

dochází k narušení akrozomu u spermií. Také byly nalezeny jaderné malformace a abnormální uspořádání mitochondrií. Myší modely s defektním genem *GOPC* poskytují užitečný nástroj ke studiu a porozumění mechanismům základní spermatogeneze a můžou být cenným modelem pro globozoospermii u člověka (Yao et al. 2002).

2.4.7 Gen *HOOK1*

Gen *HOOK1* - *hook microtubule-tethering protein 1* se nachází na 1. chromozomu (1p32.1), je dlouhý 61518 bp a má 23 exonů. Může být označen také jako HK1. Gen kóduje jeden z proteinů hook rodiny. Jde o proteiny, které se vážou na mikrotubuly a organely pomocí jejich N a C koncových domén. Na základě alternativního sestřihu bylo identifikováno několik variant transkriptů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Studium genu *Hook1* u myši bylo zjištěno, že je exprimován převážně v haploidních samčích zárodečných buňkách a je zodpovědný za vazbu mikrotubulů a bičiku na buněčné struktury. Ztráta funkce Hook1 proteinu vede k abnormálnímu tvaru hlavičky spermií a k dekapitaci (Mendoza-Lujambio et al. 2002).

2.4.8 Gen *HRB*

Gen *HRB* - *ArfGAP with FG repeats 1* je lokalizován na 2. chromozomu (2q36.3), má 17 exonů a je dlouhý 89051 bp. Pro tento gen se používá také označení *AGFG1*, *RAB* nebo *RIP*. Kódovaný protein patří mezi nukleoporiny, což jsou proteiny zajišťující transport mezi jádrem a cytoplazmou. Bylo identifikováno více transkripčních variant tohoto genu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Studii na myších bylo zjištěno, že samci myši s mutovaným genem jsou neplodní a vyskytují se u nich spermie bez akrozomu, také dochází ke snížené pohyblivosti spermií a strukturálním abnormalitám. Bylo zjištěno, že gen *HRB* má zásadní úlohu při tvorbě akrozomu během časně spermiogeneze u myši (Kang-Decker et al. 2001, Kierszenbaum et al. 2004).

2.4.9 Gen *OAZ3*

Gen *OAZ3* - *ornithine decarboxylase antizyme 3* je lokalizován na 1. chromozomu (1q21.3), je dlouhý 8362 bp a má 7 exonů. Označuje se také jako AZ3, OAZ-t, TISP15. Tento gen kóduje antizym 3, což je třetí člen antizymové rodiny. Antizym 1 a 2 mají širokou tkáňovou distribuci, ale antizym 3 je exprimován hlavně ve varlatech v haploidních

zárodečných buňkách, což naznačuje význam tohoto antizymu ve spermatogenezi. Studie na myších ukázaly, že homozygotní mutanty myší jsou neplodné. Hlavní úloha tohoto genu spočívá ve formování spojení mezi hlavičkou a bičíkem spermie v průběhu spermatogeneze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Ivanov *et al.* 2000).

2.4.10 Gen *ODF1*

Gen *ODF1* - *outer dense fiber of sperm tails 1* je lokalizován na 8. chromozomu (8q22.3), má 2 exony a je dlouhý 9398 bp. Gen kóduje vlákna, která se nachází ve střední části bičíku, tato vlákna udržují pružnost bičíku. Defekt vláken vede k abnormální morfologii spermií, dekapitaci a neplodnosti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Transkripce a translace genu *Odf1* při spermatogenezi byla studována na modelových zvířatech a bylo zjištěno, že ve fázi zrání spermií dochází k nárůstu hladiny proteinu *Odf1* (Burmester a Hoyer-Fender 1996). Cílená delece *Odf1* u myší vede k porušení plodnosti samců. Heterozygotní myši zůstávají plně fertlní, ale homozygotní formy jsou neplodné, dochází k narušení spojení hlavičky a bičíku a vede až k dekapitaci spermie (Yang *et al.* 2014).

2.4.11 Gen *RIMBP3*

Gen *RIMBP3* - *RIMS binding protein 3* je lokalizován na 22. chromozomu (22q11.21). Má pouze jeden exon a je dlouhý 5796 bp. Také bývá označován jako RIM-BP3, RIMBP3A, RIMBP3.1, RIM-BP3.1 a RIM-BP3.A. Tento gen je v genomu triplikován (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gen kóduje RIMS vázající protein, který patří do rodiny RIM-vázajících proteinů, ty se uplatňují při fúzi a uvolnění vezikulů. Gen *RIMBP3* je exprimován téměř výlučně ve varlatech a bylo zjištěno, že je nezbytný pro normální morfologii spermií a plodnost samců. Gen je konzervovaný u lidí a očekává se, že má podobnou funkci ve spermiogenezi, může tedy sloužit jako kandidátní gen pro mutační analýzy u neplodných mužů (Zhou *et al.* 2009).

2.4.12 Gen *SPATA16*

Gen *SPATA16* - *spermatogenesis associated 16* se nachází na 3. chromozomu (3q26.31). Má 14 exonů a je dlouhý 251912 bp. Gen kóduje specifický protein varlat, je lokalizován do Golgiho aparátu a má význam ve spermatogenezi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Studiemi na zvířatech byl potvrzen vliv na spermatogenezi.

Bylo zjištěno, že *SPATA16* se účastní tvorby akrozomu a mutace v tomto genu vedou k neplodnosti (Dam *et al.* 2007).

2.5 Sekvenování nové generace – platforma GS Junior (Roche)

Sekvenování nové generace je založeno na masivním paralelním sekvenování. Oproti klasickým sekvenačním metodám umožňuje zásadní navýšení kapacity a snížení ceny. V roce 2005 byl představen první komerčně dostupný sekvenátor nové generace společností 454 Life Sciences. (Margulies *et al.* 2005). Roche Diagnostics v roce 2007 společnost 454 Life Sciences odkoupil a v současné době jsou na trhu dostupné dva přístroje od firmy Roche: GS Junior a GS FLX System. GS FLX System je navržen pro větší genomové projekty, v jednom běhu poskytuje až 1 milion čtení dlouhých až 1000 bází. Naopak GS Junior je stolní (tzv. benchtop) sekvenátor s nižší kapacitou vhodný do rutinních laboratoří. Přístroj GS Junior umožňuje 100 000 (teoreticky až 250 000) čtení v jednom běhu dlouhých 400 bp a doba jednoho běhu je 10 hodin. Oba přístroje pracují na principu pyrosekvenování a využívají emulzní PCR k amplifikaci fragmentů DNA (<http://www.454.com>).

2.5.1 Pyrosekvenování

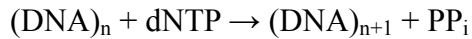
Platforma GS Junior funguje na principu pyrosekvenování. Podobně jako klasická Sangerova metoda je pyrosekvenování založeno na syntéze nových sekvencí DNA, ale liší se způsobem detekce začleňování nových nukleotidů. Název metody je odvozen od základní enzymatické reakce, kdy dochází k uvolnění pyrofosfátu z nově začleněného nukleotidu. Zjednodušeně jde o sled enzymatických reakcí, během kterých dochází k syntéze řetězce DNA, přičemž dochází k emisi viditelného světla a množství uvolněného světla je úměrné počtu začleněných nukleotidů.

V roce 1985 byl poprvé popsán princip detekce pyrofosfátu, který je základem této metody (Nyrén a Lundin 1985). O dva roky později v roce 1987 byla vyvinuta metoda pro sledování aktivity DNA polymerázy s využitím enzymatické metody detekce pyrofosfátu, za použití enzymů ATP sulfurylázy a luciferázy (Nyrén 1987) a konečně v roce 1996 byla uvedena metoda sekvenování DNA pomocí detekce pyrofosfátu, vhodná k automatizovanému paralelnímu zpracování vzorků (Ronaghi *et al.* 1996).

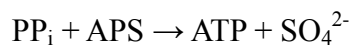
Základem pyrosekvenování jsou 4 enzymy: DNA polymeráza, ATP sulfuryláza, luciferáza, apyráza a ze substrátů adenosinofosfosulfát (APS), luciferin a sekvenovaný templát s primerem. K této směsi jsou cyklicky jeden po druhém přidávány nukleotidy – dATP, dGTP, dCTP, dTTP. Pokud se do vznikajícího řetězce začlení jeden nebo více nukleotidů, dojde

k uvolnění světelného záření, které je detekováno kamerou (Ahmadian *et al.* 2006). Přesný sled reakcí je popsán v následujících bodech a schematicky znázorněn na obr. 2.2.

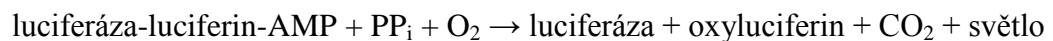
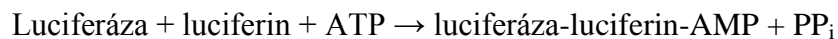
1. reakce – pomocí DNA polymerázy dochází k zařazení příslušného nukleotidu do rostoucího DNA řetězce a uvolnění pyrofosfátu (PP_i).



2. reakce – uvolněný pyrofosfát slouží jako substrát pro ATP sulfurylázu a vzniká ATP.



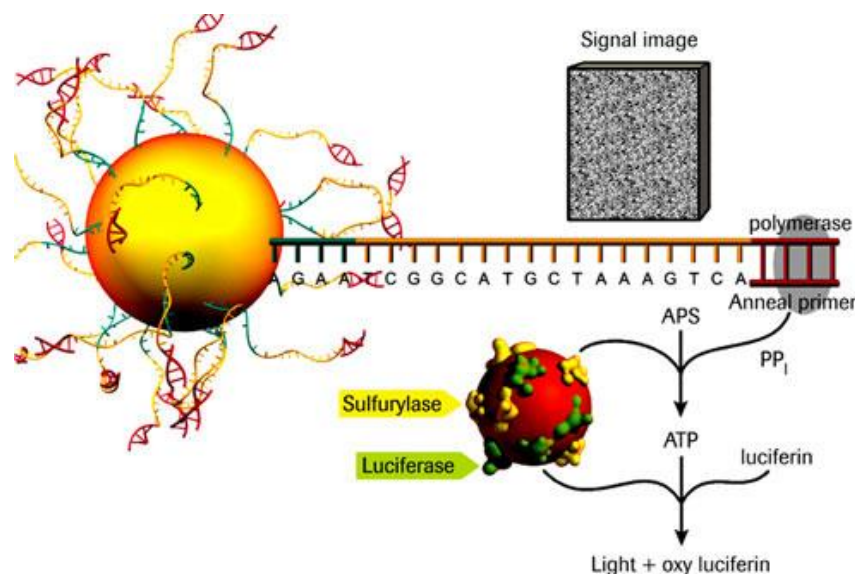
3. reakce – ATP aktivuje přeměnu luciferinu na oxyluciferin, který produkuje světelný signál pomocí enzymu luciferáza. Světelný signál je detekován kamerou a vyhodnocen.



4. reakce – dochází k degradaci nespotřebovaného nukleotidu a ATP pomocí apyrázy (Ahmadian *et al.* 2006).

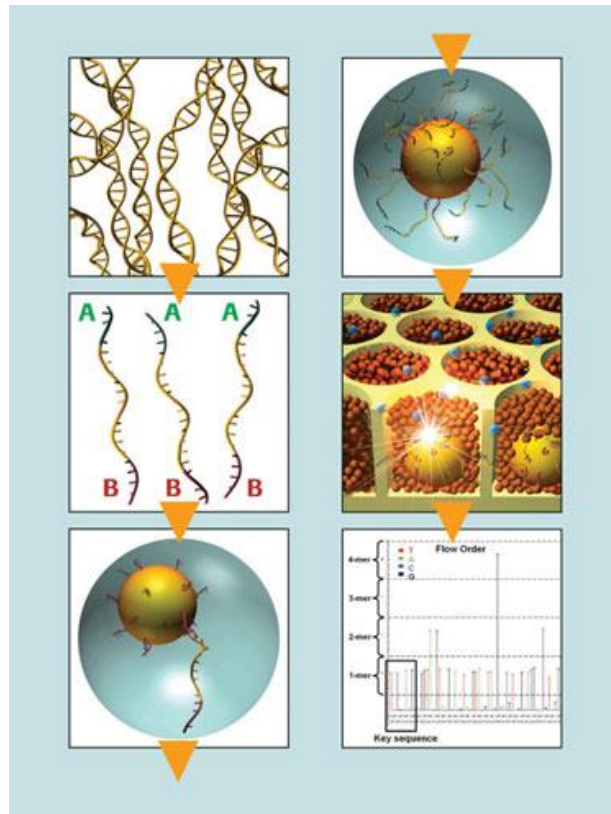


Obr. 2.3. Schéma pyrosekvenování – DNA polymeráza zařadí některý ze čtyř dNTP do komplementárního řetězce k sekvenované DNA, dojde k uvolnění pyrofosfátu z nově začleněného nukleotidu, ten je převeden na ATP pomocí enzymu sulfurylázy, ATP je spotřebováno luciferázou k oxidaci luciferinu, vzniká oxyluciferin a dojde k uvolnění světelného signálu, ten je detekován CCD kamerou. Převzato z (<http://www.454.com>).



2.5.2 Základní protokol metody

Na začátku je vzorek DNA mechanicky naštěpen na kratší fragmenty o délce 300-800 bp. Při sekvenování kratších vzorků není fragmentace nutná. Následuje příprava knihovny, kdy jsou vytvořeny jednořetězcové fragmenty sekvenované DNA s A a B adaptory na obou koncích. Specifické adapterové molekuly (A a B) jsou důležité v dalších krocích, při purifikaci, amplifikaci a při vlastní sekvenaci. Připravená DNA knihovna se hybridizací přichytí ke speciální mikrokuličce o velikosti 28 μm . V ideálním případě je na každou kuličku navázán právě jeden fragment jednořetězcové DNA. Následuje amplifikace fragmentů pomocí emulzní PCR. PCR probíhá v roztoku oleje a vody, které vytvoří emulzi. Kapky této emulze fungují jako mikroreaktory, v kterých jsou fragmenty DNA knihovny přichycené na kuličkách amplifikovány. Součástí reakce jsou nezbytné složky pro normální PCR, jako DNA polymeráza, primery, nukleotidy a pufr. Na konci PCR je na povrchu mikrokuličky přichyceno v průměru 10 milionů identických kopií původní jednořetězcové DNA, které zůstávají přichycené na kuličce i po uvolnění z emulze. Kuličky jsou vpraveny do jamek pikotitrační destičky (PTP – PicoTiterPlate), do jedné jamky se ideálně vejde jedna DNA mikrokulička. PTP o velikosti 60x60 mm^2 je tvořena optickými vlákny. Enzymy nezbytné pro pyrosekvenační reakci jsou přichyceny na dalších menších kuličkách, které zároveň mají za úkol DNA kuličky v jamkách PTP imobilizovat. Takto naplněná pikotitrační destička je vložena do přístroje, který řídí průtok jednotlivých dNTP nad otevřeným povrchem destičky. Přidáním komplementárního nukleotidu k sekvenovanému fragmentu dojde k chemiluminiscenční reakci a uvolnění světelného signálu, který je zachycen CCD kamerou (CCD – charge-coupled device), ta převádí světelné signály z každé jamky do počítače, který je převede na sekvenci DNA. Získaná data jsou analyzována různými filtry kvality, tak aby byly odstraněny sekvence s nízkou kvalitou (Margulies *et al.* 2005, <http://www.454.com>). Popsaný postup je znázorněn na obrázku 2.3.

Obr. 2.3. Průběh sekvenování GS Junior. Převzato z (<http://www.454.com>).

2.5.3 Výhody, nevýhody a využití

Jako všechny dnes dostupné platformy má i GS Junior své výhody a nevýhody. Hlavní limitací je problém s detekcí homopolymerních úseků DNA. Při zařazení více nukleotidů stejného typu dochází k chybám, protože počet začleněných nukleotidů je detekován pouze pomocí množství emitovaného světla, s přibývajícím délkou homopolymeru se rozdíl v intenzitě signálu pro sekvence různých podobných délek stávají nerozlišitelnými. Vznikne-li tedy chyba v počtu začleněných nukleotidů, vyskytují se inserce nebo delecce v homopolymerních úsecích, spíše než substituce. Další nevýhoda je vysoká cena reagentů a pracnost. Výhodou metody je v porovnání s ostatními platformami poskytnutí dlouhých čtení, přesnost a rychlost – jeden běh trvá 10hod (Zhou *et al.* 2010).

Platforma GS Junior má širokou škálu využití, hodí se pro sekvenování genomů virů, bakterií a dalších mikroobů, plísni, zvířat a rostlin. Je možné sekvenovat části nebo celé genomy, dále plazmidy, umělé bakteriální chromozomy a fosmidy. Hodí se pro resekvenování, analýzu transkriptomů, metagenomické studie, pro analýzu regulace genů a epigenetických změn. Dále sekvenování amplikonů umožňuje genotypizaci, detekci vzácných variant a sekvenování kandidátních genů nejrůznějších onemocnění (<http://www.454.com>).

3 Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo stanovit sekvence dvanácti kandidátních genů u neplodných mužů s poruchou spermatogeneze a prokázat nález, případně absenci patogenních mutací v těchto genech. Nalezená mutace by byla vlastní etiologií neplodnosti. Postup dosažení vytčeného cíle byl následující:

1. S použitím cDNA a genomické DNA z periferní krve pacientů s poruchou spermatogeneze optimalizovat PCR reakci pro 12 kandidátních genů: *CAPZA3*, *CDC14B*, *CDC42*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *HOOK1*, *HRB*, *OAZ3*, *ODF1*, *RIMBP3*, *SPATA16*.
2. Připravit PCR produkty vhodné pro sekvenování nové generace u všech dvanácti genů.
3. Stanovit sekvenci připravených produktů PCR pomocí sekvenování nové generace na platformě GS Junior.
4. Vyhodnotit získané výsledky a porovnat s klinickými daty pacientů získanými při rutinní genetické diagnostice.

4 Materiál a metody

4.1 Experimentální skupina

Do diplomové práce bylo zahrnuto 73 pacientů a 7 kontrol. Jedná se o pacienty vyšetřené v Centru asistované reprodukce VFN a 1. LF UK, kteří mají poruchu spermatogeneze. U všech pacientů byla provedena genetická konzultace a rutinní laboratorní genetická diagnostika na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (ÚBLG 1. LF a VFN), která zahrnuje stanovení karyotypu, vyloučení mikrodelecí chromozomu Y a mutací v *CFTR* genu. Všichni pacienti souhlasili s využitím nespotřebovaného vzorku pro výzkumné účely. Kontrolní skupinu tvoří muži s normálním spermioqramem, kteří prošli genetickou konzultací a jsou prokazatelně plodní. Kontrolní skupina slouží ke sledování kvality sekvenování, jinak je kontrolou normální genom a jeho normální variabilita (*dbSNP-The Single Nucleotide Polymorphism Database*). Větší rozsah kontrolního souboru by byl nutný při zachycení nových podezřelých mutací.

Od každého pacienta i kontroly byl izolován vzorek RNA i DNA z periferní krve odebrané do zkumavek s přídavkem EDTA. Izolace byla provedena pracovníky laboratoře molekulární genetiky ÚBLG 1. LF a VFN za použití standardních postupů. Pro izolaci RNA z periferní krve byl použit komerční kit *Tempus™ Spin RNA Isolation Kit* (Applied Biosystems) a izolace DNA byla provedena pomocí kitu *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen).

4.2 Stanovení koncentrace RNA a reverzní transkripce

U všech vzorků RNA byla nejprve spektrofotometricky stanovena koncentrace. Dle stanovené koncentrace byly vzorky rozděleny do skupin čítajících 12 vzorků, z toho 11 pacientů a 1 kontrola. Toto rozdělení bylo zvoleno kvůli sekvenátoru GS Junior, protože v jednom běhu je možné sekvenovat maximálně 12 vzorků. Při stanovení počtu pacientů, kteří se sekvenovali najednou v jednom běhu se také vycházelo z celkové délky stanovované sekvence u každého pacienta a z požadavku přečtení každé sekvence v průměru 100x. Ve skupině 12 vzorků byly RNA naředěny vodou na nejnižší naměřenou koncentraci.

Reverzní transkripce (RT) slouží k přepisu genetické informace z RNA do cDNA. Po naředění vzorků RNA byla provedena reverzní transkripce za použití těchto komerčních chemikálií: *SuperScript™ III Reverse Transcriptase*, *Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer*, *10 mM dNTP Mix*, *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, vše od firmy Invitrogen™. Použité plasty (zkumavky, špičky) byly sterilní a certifikovány jako DNase a RNase free. Voda užívaná pro ředění RNA, při RT a ve všech dalších metodách je ultračistá voda určená pro

použití v molekulární biologii, dále jen voda. Byly dodrženy zásady sterilní práce, veškerá manipulace s RNA byla prováděna na ledu, pracovní plocha byla před prací s RNA důkladně očištěna, vždy se pracovalo v jednorázových rukavicích. RT probíhala v termocykleru LabCycler (SensoQuest).

Pracovní postup RT

Do popsaných mikroskopavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 11 μ l předem naředěné RNA a přidán *Oligo(dT) Primer* a *10 mM dNTP Mix* dle tabulky 4.1. Součástí RT byla vždy negativní kontrola, kde RNA byla nahrazena vodou.

Tab. 4.1. Receptura 1. reakce RT.

Reagencie	Objem (μ l)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	1
10 mM dNTP Mix	1
Naředěná RNA	11
Celkový objem reakce	13

Vzniklá směs byla inkubována v termocykleru 5 minut při 65 °C. Po inkubaci byly zkumavky ihned zchlazeny na ledu. Ke každému vzorku (i ke kontrole) bylo přidáno 7 μ l mixu, který byl připraven dle tabulky 4.2.

Tab. 4.2. Reagencie 2. reakce RT.

Reagencie	Objem (μ l)
5x First-Strand Buffer	4
0,1 M DTT	1
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1
SuperScript™ III RT (200 U/ μ l)	1
Celkový objem mixu	7

Po přidání mixu a promíchání byly zkumavky inkubovány v termocykleru 60 minut při 50 °C a následně byla reakce zastavena zahřátím na 70 °C na 15 minut, poté byly vzorky zchlazeny na 4 °C. Po RT byly všechny vzorky naředěny přidáním 80 μ l vody, aby byl výsledný objem 100 μ l. Po naředění byla cDNA ihned použita pro PCR nebo do dalšího použití zamrazena.

4.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje zmnožení specifické oblasti DNA v podmínkách *in vitro*. Cílem PCR bylo získat produkty vhodné k sekvenaci na platformě GS Junior u všech dvanácti kandidátních genů. Nejprve bylo potřeba optimalizovat PCR tak, aby bylo dosaženo maximálního množství co nejčistšího produktu. Pomocí teplotního gradientu

byla stanovena vhodná teplota pro dosednutí primerů (annealing). Termocykler umožňuje nastavení různých teplot v různých místech výhřevné destičky a lze tedy současně testovat několik teplot annealingu. Po vynesení na agarózový gel byla vybrána nejvhodnější teplota pro daný primer. Doba elongace byla stanovena podle délky PCR produktu, přibližně 30 sekund na 1 kb. Počet cyklů amplifikace byl u většiny genů 30, jen u některých se osvědčilo zvýšení na 35 cyklů (viz tabulka 4.3). Podmínky uvedené v tabulce 4.3 platí vždy pro všechny primery daného genu.

Tab. 4.3. Optimální teplota annealingu, doba elongace a počet cyklů pro všechny primery daného genu.

Gen	Teplota annealingu (°C)	Čas elongace	Počet cyklů
<i>CAPZA3</i>	63	1 min	30
<i>CDC14B</i>	60	30 s	30
<i>CDC42</i>	63	30 s	30
<i>CNTROB</i>	66	1 min 40 s	35
<i>CSNK2A2</i>	63	1 min	35
<i>GOPC</i>	63	1 min	35
<i>HOOK1</i>	63	30 s	30
<i>HRB</i>	60	30 s	30
<i>OAZ3</i>	60	30 s	35
<i>ODF1</i>	60	30 s	30
<i>RIMBP3</i>	63	3 min 20 s	30
<i>SPATA16</i>	60	30 s	30

Primery použité pro PCR byly navrženy mým školitelem v programu Primer3 a objednány u firmy Integrated DNA Technologies, USA. Primery byly dodány v lyofilizovaném stavu, naředěny vodou na koncentraci 0,1 mM. Z 0,1 mM zásobního roztoku byl primer dále ředěn 10x a tak byl získán pracovní roztok o koncentraci 10 μ M. Finální koncentrace každého z primerů v reakci byla 500 nM. Zásobní roztoky primerů byly uchovávány při -70 °C a v případě potřeby z nich byl pracovní roztok doředěn. Všechny použité primery, jejich sekvence a velikost produktů jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tab. 4.4. Přehled použitých primerů a jejich sekvence.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Velikost produktu (bp)
<i>CAPZA3</i>	CAPZA3_cg1_20F	gactgctgctttcatggat	1245
	CAPZA3_g3_1264R	ggtcaccaccatgaaacaca	
<i>CDC14B</i>	CDC14B_g1aF	tttccaggacttggggactt	410
	CDC14B_g1aR	gagcgtgtagcccagag	
	CDC14B_g2F	cccacccaaatagccagaat	390
	CDC14B_g2R	caggtgaaaacaagcatcc	
	CDC14B_g3F	attggccataacaatttgg	449
	CDC14B_g3R	gcttttcaagtatttgggcatc	
	CDC14B_g4F	tgaatggttatgggatttggga	429
	CDC14B_g4R	cccagcagtttttaggttca	
CDC14B_g5F	gcaaacacagaaaccagca	401	

	CDC14B_g5R	tggtggtattttgcgctcatc	
	CDC14B_g6F	ttgatccaggccccataaaac	422
	CDC14B_g6R	aatggagcacctctgtcacc	
	CDC14B_g7F	cccacttccctttgaaagctg	418
	CDC14B_g7R	catcacacacgccccaaaagac	
	CDC14B_g8+9F	cagtcttgagtagagaggttggtg	791
	CDC14B_g8+9R	aaggcagtttcatgttctgaca	
	CDC14B_g10+11F	ctgcctgccccaaacaaaat	598
	CDC14B_g10+11R	ccctgacaggttctcaatagc	
	CDC14B_g12F	tgctgctgtgttctctctga	394
	CDC14B_g12R	atgggcttgcaactatggag	
	CDC14B_g13mF	atggcaaaactccatccttg	382
	CDC14B_g13mR	aaacatgcattgtgggaacc	
	CDC14B_g13F	aggccttgatgtgaaaatgtg	375
	CDC14B_g13R	tttcatgtcagctcagagg	
	CDC14B_g14F	gttgccctccttgtctttga	428
	CDC14B_g14R	acacacatgcaccacagacc	
CDC42	CDC42_c1_13F	acccaactgtgctctcct	627
	CDC42_c6_639R	tgagtcccaacaagcaagaa	
	CDC42_c5_557F	tcatttgaaaacgtgaaagaaaag	650
	CDC42_c7_1206R	tgttacagagtcatccacaagca	
	CDC42_c5_557F	tcatttgaaaacgtgaaagaaaag	485
	CDC42_c7a_1041R	ggacattcttaaagccagacca	
CNTROB	CNTROB_c1_838F	tccgtgaacttttctcctg	2833
	CNTROB_c19_3670R	caacaatgagagaacaaagaggag	
CSNK2A2	CSNK2A2_cf_178F	ctacgccgaggtgaacagtc	1282
	CSNK2A2_cf_1459R	cttcacattccccatgcttt	
GOPC	GOPC_cf_47F	cctcagcttcagcctcgтта	1830
	GOPC_cf_1876R	tttgggaaacacatgctttg	
HOOK1	HOOK1_c1_143F	ggcctggtaccgagcttt	634
	HOOK1_c1_776R	caacagcatcatttgaggga	
	HOOK1_c2_632F	ggttggtgcgatcaactgtga	640
	HOOK1_c2_1271R	gcttgcgagggtcattcag	
	HOOK1_c3_1105F	cgaattccagcataggaatga	595
	HOOK1_c3_1699R	ttgctgtaagcgaagcatct	
	HOOK1_c4_1562F	caacaggaccacctaaccxaa	622
	HOOK1_c4_2183R	tctctttctctgccaactgct	
	HOOK1_c5_2045F	gaagatatgaaagcaatggagga	522
	HOOK1_c5_2566R	aatacctgatatcccgcacatca	
HRB	HRB_g2F	tgtttcaagtttgtgtgttggtt	414
	HRB_g2R	catttcacctcagatttacgg	
	HRB_g3F	accccaggctcctctgaaatc	449
	HRB_g3R	tccttcattgtgtcagactaacc	
	HRB_g4F	tctgtgtgagagggttttcaga	395
	HRB_g4R	tgccatacaagattatgctgct	
	HRB_g5F	tgtgttttaagtttgagatagtttt	443
	HRB_g5R	tcatgccaaccgacattaaa	
	HRB_g6F	tggttacatgctggtaggg	427
	HRB_g6R	ttcccagagcttttgaaga	
	HRB_g7F	tctgtgcaggaattggtggtt	406
	HRB_g7R	ttggaagagatttttatgaagga	
	HRB_g8F	aaaagccattgccagtcatt	448
	HRB_g8R	tgagaaaagtgtagcatgttcaga	
	HRB_g9F	cctgtgtttcatggcaaatg	400
	HRB_g9R	ttcaaattcctcaatttacaaaa	

	HRB_g10+11F	tggctaccctgtaaactcgtt	528
	HRB_g10+11R	ccccattttctgggtgttctt	
	HRB_g12F	tttgaattaaccctgccttt	381
	HRB_g12R	gaaaagtcttctgccaag	
	HRB_g13F	ttgctgctctggttaggaatg	359
	HRB_g13R	aggatcacacataatggctctg	
	HRB_g14F	tgaaagacgtagcacagttca	426
	HRB_g14R	ccctcggttttgcacatatt	
OAZ3	OAZ3_m2c1_74F	cggtgcctccaccagcttat	427
	OAZ3_c1_500-535R	ccctgattccatgtgtcaag	
	OAZ3_c2_400-435F	taaacctctgccaccacct	426
	OAZ3_c825-860R	tggaaagtgtcctgaatcaca	
	OAZ3_g1_1F	gggtcacaaatgccaccag	338
	OAZ3_g1_1R	ttgccatttgggaaattctt	
ODF1	ODF1_g1F	tcccaaagggtactcacagaaca	415
	ODF1_g1R	ttccaacttataaggctaataaccg	
	ODF1_g2aF	gcttctcaagctgtgtctgg	327
	ODF1_g2aR	ccgagcccataggagtatgt	
	ODF1_g2bF	ctgcaaagagttcagcttgc	323
	ODF1_g2bR	tgggaaggagaggagaaaca	
RIMBP3	RIMBP3_cgf1_5F	ccacctgacccaaatacacc	5712
	RIMBP3_cgf1_5716R	acacacattggccacagaaa	
SPATA16	SPATA16_g2F	ggtgagttttgagactgacaca	933
	SPATA16_g2R	cctcacctcatgatcactgct	
	SPATA16_g3F	cgcaaaacatataagcaagca	429
	SPATA16_g3R	ggtctccatgattgcctcac	
	SPATA16_g4F	gggaagggtcctttcacta	377
	SPATA16_g4R	aattgctggtttgacgttga	
	SPATA16_g5F	ttggtttatctacctcccaaaa	387
	SPATA16_g5R	tgcccagagctacctttttc	
	SPATA16_g6F	gaccaaaatatgttatccttgcagt	419
	SPATA16_g6R	ttctttccgtttcaagtcatca	
	SPATA16_g7F	tttccaagtacaattcctgaaatc	406
	SPATA16_g7R	tgtgtgtgttcttggggaaa	
	SPATA16_g8F	cagcatctcctctgcctttc	415
	SPATA16_g8R	gaacgtttccaaatccccta	
	SPATA16_g9F	cgttatcacaaagccctgact	369
	SPATA16_g9R	tttgcctcaggctacattt	
	SPATA16_g10F	tattcggcaatgacaagcaa	409
	SPATA16_g10R	cacacttccagggagagagc	
SPATA16_g11F	ttctgccagttctgttccaa	392	
SPATA16_g11R	agatgaactgaggggaatacca		

Byl kladen důraz na kvalitu PCR produktu, proto byla použita polymeráza *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, USA). Tato DNA polymeráza zajišťuje vysokou přesnost, robustnost a procesivitu. Má 50x nižší chybovost než *Taq* DNA polymeráza, je tedy jednou z nejpřesnějších termostabilních polymeráz. *Phusion* polymeráza má 5' → 3' polymerázovou aktivitu, 3' → 5' exonukleázovou aktivitu („proofreading“) a vytváří produkty s tupými konci. Součástí kitu byl používaný pufr *5x Phusion GC Buffer*,

který je vhodný zejména pro oblasti bohaté na G a C a poskytuje lepší výtěžky než alternativní pufr v kitu *5x Phusion HF Buffer*.

Pro zjištění případné kontaminace reakce byla vždy součástí PCR negativní kontrola, kdy cDNA/DNA byla nahrazena vodou. Při práci byly dodržovány standardní postupy: použití jednorázových rukavic, dezinfekce pracovní plochy, plasty (zkumavky, špičky, destičky) byly sterilní a certifikovány jako DNase a RNase free. Byly používány termocykly LabCycler (SensoQuest) a Biometra T-Gradient (Biometra).

Pracovní postup PCR

PCR probíhala v mikrozkušavkách o objemu 0,2 µl nebo v 96 jamkové destičce. Nejprve se připravila směs vody, betainu, dNTP, pufru, primerů („forward“ a „reverse“ primer) a nakonec se přidala DNA polymeráza. Reakční směs se důkladně promíchala a rozpipetovala do mikrozkušavek či destičky, poté se přidala cDNA resp. DNA (přesná receptura reakce s cDNA a DNA viz tabulka 4.5). V negativní kontrole byla cDNA/DNA nahrazena vodou.

Tab. 4.5. Receptura PCR reakce s cDNA a DNA.

Reagencie	PCR s cDNA (µl)	PCR s DNA (µl)
Voda	1,8	3,8
Betain	4	4
dNTP	4	4
5x Phusion GC Buffer	4	4
Primer F (10 µM)	1	1
Primer R (10 µM)	1	1
Phusion DNA Polymerase	0,2	0,2
cDNA/DNA	4	2
Celkový objem reakce	20	20

Poté se mikrozkušavky či destička ihned vložily do termocyklyeru a nastavil se vhodný program (viz tabulka 4.6). Vždy bylo potřeba upravit teplotu annealingu, čas elongace a počet cyklů podle právě použitého primeru. Po skončení PCR byly vzorky vyneseny na agarózový gel a poté do dalšího použití zamrazeny při -20 °C.

Tab. 4.6. Nastavení termocyklyeru pro PCR.

Fáze PCR	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	30-35
Annealing	60-66	30 s	
Elongace	72	30 s - 3 min 20 s	
Závěrečná elongace	72	5 min	1
Ochlazení	4	∞	1

4.4 Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která umožňuje dělení látek v elektrickém poli podle jejich velikosti a náboje. Nukleové kyseliny nesou díky fosfátové skupině záporný náboj a putují ke kladně nabitě elektrodě. Elektroforéza probíhá na agarózových nebo polyakrylamidových gelech. Gel působí jako molekulární síto a větší molekuly procházejí pomaleji než menší.

V našem případě byla použita agarózová elektroforéza k ověření velikosti, kvality a množství PCR produktu. Velikost PCR produktů byla ověřena porovnáním s komerčním standardem *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific™). Použitá agaróza byla 1% nebo 2%, podle délky DNA fragmentů. Byly používány aparatury pro horizontální gelovou elektroforézu ve dvou velikostech, pro agarózový gel o objemu 80 ml a 500 ml v 1x TBE (Tris-Borate-EDTA) pufru. TBE pufr byl připravován 5x koncentrovaný. Při vynášení vzorků na gel byly používány špičky s filtrem, aby nedošlo ke kontaminaci PCR produktu a používaných pipet. Pro vizualizaci DNA fragmentů bylo přidáno fluorescenční barvivo ethidium bromid. Gel byl detekován kamerou na UV transiluminátoru přístroje G:Box od firmy Syngene s použitím softwaru GeneSnap. Rozlišení snímků 1392x1040 bodů.

Pracovní postup

Agarózový gel byl připraven rozvařením agarózy v 5x TBE pufru a destilované vodě a poté byl přidán ethidium bromid. Po zchlazení pod tekoucí vodou na teplotu kolem 60 °C byla agaróza nalita do elektroforetické misky s hřebínky. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyndány a elektroforetická miska s agarózou umístěna do elektroforetické vany a zalita TBE pufrům zředěným na koncentraci 1x. Vždy bylo nanášeno 5 µl PCR produktu a do první jamky vyneseny 3 µl standardu pro kontrolu velikosti PCR produktu. Poté byla elektroforetická vana uzavřena víkem, připojena ke zdroji napětí a nastaveno 85 V na 40-60 minut u malé agarózy a u velké agarózy 200 V na 45 minut. Následně byl gel detekován v UV světle pomocí systému Syngene G:Box a softwaru GeneSnap. Gely o různé koncentraci agarózy byly připraveny podle tabulky 4.7.

Tab. 4.7. Příprava agarózového gelu.

Chemikálie	1% agaróza 80 ml	2% agaróza 80 ml	2% agaróza 500 ml
Agaróza	0,8 g	1,6 g	10 g
5x TBE pufr	16 ml	16 ml	100 ml
Destilovaná voda	64 ml	64 ml	400 ml
Ethidium bromid	1,7 µl	1,7 µl	11 µl

4.5 Sekvenování na platformě GS Junior (Roche)

Tato kapitola shrnuje poměrně rozsáhlý pracovní postup sekvenování a použité komerční kity, reagentie a přístroje. Principu metody sekvenování na platformě GS Junior a sekvenování nové generace obecně je věnována kapitola 2.5.

Celkem bylo provedeno 7 sekvenačních běhů, vždy po dvanácti vzorcích (11 pacientů a 1 kontrola), protože kity dodávané firmou Roche umožňují přípravu knihovny maximálně pro 12 vzorků.

4.5.1 Reagentie, pomůcky a přístroje

Použité kity od firmy Roche jsou uvedeny v tabulce 4.8. Další používané kity včetně výrobce shrnuje tabulka 4.10 a v tabulce 4.9 jsou uvedeny přístroje, použitý model a výrobce.

Tab. 4.8. Použité kity (Roche, USA).

Příprava knihovny	
GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit	- Rapid Library Buffers
	- Rapid Library Nebulizers
	- Rapid Library Reagents
GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors	
Emlzní PCR	
GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking	
GS Junior Titanium emPCR Kit emPCR Reagents (Lib-L)	
GS Junior Titanium emPCR Kit Bead Recovery Reagents	
Sekvenování	
GS Junior Titanium Sequencing Kit	- Sequencing Kit Buffers
	- Sequencing Kit Packing Beads and Supplement CB
	- Sequencing Kit Reagents and Enzymes
GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit	
Údržba	
GS Junior Maintenance Wash Kit	

Tab. 4.9. Použité přístroje a výrobce.

Přístroj	Výrobce
Fluorometr Hoefer DQ300	Hoefer
Tlaková lahev s dusíkem a redukční ventil	Linde
Laboratorní vakuové čerpadlo typ N 86.KN.18	Boeckel & Co.
Magnetický stojánek	Invitrogen
Mini LabRoller Rotator	Labnet
Termocykler LabCycler	SensoQuest
Ultra-Turrax® Tube Drive control	IKA®
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf
Centrifuga 5430	Eppendorf
Sekvenátor GS Junior	Roche

Tab. 4.10. Použité kity a výrobce.

Název kitu	Výrobce
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen

Veškeré použité plasty byly sterilní a certifikovány jako DNase a RNase free. Pracovalo se v jednorázových rukavicích a dbalo se na čistotu práce.

4.5.2 Metodický postup

1. Smíchání PCR produktů, přečištění, stanovení koncentrace fluorometricky

Připravené PCR produkty od každého pacienta a kontroly musely být smíchány do jedné zkumavky. A to tak, že zvlášť geny, u nichž byl připraven jeden dlouhý PCR produkt (u genů *CAPZA3*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *RIMBP3*) a geny, u kterých bylo připraveno více kratších PCR produktů (u genů *CDC14B*, *CDC42*, *HOOK1*, *OAZ3*, *ODF1*, *HRB*, *SPATA16*). Nejprve se připravilo 12 zkumavek (pro 11 pacientů a 1 kontrolu) o objemu 1,5 ml pro krátké PCR produkty a 12 pro dlouhé, tj. celkem připraveno 24 zkumavek. Počet μl odebraných od každého PCR produktu byl u prvního sekvenačního běhu přibližně 1 μl na 500 bp produktu. U všech dalších sekvenací byly zpipetované μl upravovány s ohledem na výsledky posledního sekvenování. U každého primeru byl hodnocen počet čtení na 100 bp. Pokud bylo čtení málo, tak byly μl přidány a naopak. Dále se počet zpipetovaných μl řídil podle síly PCR produktu na agarózovém gelu.

Po smíchání PCR produktů u všech genů byly produkty přečištěny pomocí komerční soupravy *QIAquick PCR Purification Kit*. Přečištění probíhalo na kolonce s membránou, na kterou se váže DNA/cDNA a po přečištění se uvolnila elučním pufrém. Podle příloženého protokolu byly všechny vzorky přečištěny a nakonec eluovány do 30 μl TE pufru, který byl součástí kitu *Rapid Library Buffers*.

Dále byla fluorometricky stanovena koncentrace přečištěných vzorků. Metoda využívá fluorescenčních látek, v tomto případě PicoGreen, který byl součástí použitého kitu *Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit*. Nejprve byla připravena a změřena kalibrační řada a poté vzorky. Naměřené hodnoty fluorescence kalibrační řady a vzorků byly zapsány a vloženy do připravené tabulky v programu Microsoft Excel, kde byly podle vzorce vypočteny koncentrace v $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2. Příprava knihovny

Při přípravě knihovny bylo postupováno podle protokolu *Rapid Library Preparation Method Manual GS Junior Titanium Series* (454 Sequencing Roche, 2010). Prvním krokem byla nebulizace, která slouží k rozbití DNA/cDNA na fragmenty o velikosti 300-800 bp pomocí tekutého dusíku. Nebulizovány byly pouze dlouhé PCR produkty, tedy geny *CAPZA3*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *RIMBP3*. Krátké PCR produkty byly mezitím uchovány v chladničce. Počáteční koncentrace nutná pro nebulizaci byla dle protokolu 500 ng. Bylo vypočteno potřebné množství PCR produktu a doplněno TE pufrem do 100 μ l a napipetováno do nebulizačního kelímku. Dále bylo přidáno 500 μ l Nebulizačního pufru, promícháno a nebulizováno 1 minutu při 30 psi (2,1 bar). Obsah nebulizačního kelímku byl přečištěn pomocí soupravy *MinElute PCR Purification Kit* (Quiagen). Do kelímku bylo přidáno 2,5 ml PBI pufru, promícháno a postupně přečištěno přes kolonku, poté bylo na kolonku napipetováno 750 μ l PE pufru, přečištěno a nakonec eluováno s 16 μ l TE pufru. Po nebulizaci a přečištění dlouhých PCR produktů byla opět fluorometricky stanovena koncentrace a pro kontrolu, zda nebulizace proběhla v pořádku, byly vzorky vyneseny na 2% agarózový gel (připraven dle postupu v kapitole 4.4.). Byly vyneseny 3 μ l vzorku smíchané s 0,5 μ l bromfenolové modři a také standard pro kontrolu velikosti znebulizovaného produktu, elektroforéza byla spuštěna na 15-25 minut při napětí 85 V.

Dále bylo potřeba smíchat znebulizované dlouhé PCR produkty a krátké PCR produkty u každého pacienta a jedné kontroly. Na základě součtu velikosti (bp) krátkých a dlouhých produktů byl vypočten poměr - dlouhé PCR produkty/krátké PCR produkty. Součet velikosti krátkých produktů se rovnal 22530 bp a součet dlouhých produktů byl 12902 bp. Poměr dlouhé:krátké produkty tedy byl 1:1,75. V tomto poměru byly produkty smíchány. Podle naměřené koncentrace v ng/ μ l a zvoleného poměru 1:1,75 byl vypočten objem μ l u krátkých a dlouhých produktů. Celkový objem vzorku po smíchání musel být 16 μ l.

Dalším krokem podle protokolu byla oprava konců fragmentů. Do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 16 μ l vzorku (již smíchané krátké a znebulizované dlouhé fragmenty). Byla připravena směs dle tabulky 4.11 (použité reagentie byly součástí kitu *Rapid Library Reagents*) a ke každému vzorku přidáno 9 μ l této směsi, promícháno, stočeno v centrifuze a inkubováno v termocykleru 20 minut při 25 °C, 20 minut při 72 °C a zchlazeno na 4 °C.

Tab. 4.11. Receptura směsi pro opravu konců fragmentů.

Reagencie	Objem (μl)
RL 10x Buffer	2,5
RL ATP	2,5
RL dNTP	1
RL T4 Polymerase	1
RL PNK	1
RL Taq Polymerase	1
Celkový objem reakce	9

Než skončila reakce v termocykleru, mezitím byly připraveny *AMPure Bead*, což jsou magnetické kuličky, které vážou DNA/cDNA. Zásobní lahvička s *AMPure Bead* byla důkladně promíchána a do připravených dvanácti zkumavek o objemu 1,5 ml byl odebrán alikvot 75 μl. Zkumavky byly umístěny na magnetický stojánek a *AMPure Bead* promyty pomocí *Sizing solution*.

Po skončení programu v termocykleru proběhla ligace adapterů. Do každé z dvanácti zkumavek byl přidán 1 μl *RL MID Adaptor*. MID adaptory později slouží k rozlišení jednotlivých dvanácti vzorků, proto je velmi důležité zapsat si číslo vzorku a číslo přidaného MID adapteru (1-12). Kromě adapteru byl do zkumavek přidán 1 μl *RL Ligase*, vše promícháno a inkubováno v termocykleru 10 minut při 25°C. Přidaná ligáza je enzym, který slouží k připojení adapteru na molekulu DNA/cDNA. Po naligování adapterů proběhlo odstranění krátkých fragmentů za použití magnetických *AMPure Bead* a magnetického stojánek. Vzorky byly přidány k předem připraveným kuličkám, inkubovány 10 minut při pokojové teplotě a poté umístěny na magnetický stojánek. Kuličky se oddělily od roztoku a vytvořily na stěně zkumavky peletu, byl opatrně odpipetován supernatant a přidáno 200 μl 70% etanolu, promícháno a opět inkubováno na magnetickém stojánek 1 minut, tento krok byl opakován ještě jednou. Po druhém promytí, po odpipetování supernatantu se zkumavky nechaly na magnetickém stojánek s otevřenými víčky a peleta na stěně zkumavky se nechala na vzduchu oschnout přibližně 2 minuty. Zkumavky byly sundány z magnetického stojánek a přidáno 25 μl TE pufru, promíchány, stočeny v centrifuze a umístěny opět na magnetický stojánek. Přidaný TE pufr slouží k uvolnění DNA z kuliček. Poté co se vytvořila peleta na stěně zkumavky, byl odebrán supernatant obsahující knihovnu o objemu přibližně 25 μl do nové zkumavky. Zkumavky s *AMPure Bead* byly vyhozeny.

Po odstranění krátkých fragmentů byla opět u všech dvanácti vzorků fluorometricky stanovena koncentrace a vzorky byly vyneseny na 2% agarózový gel pro kontrolu, zda byly krátké fragmenty odstraněny. Bylo vyneseno 5 μl vzorku a 0,8 μl bromfenolové modři a

standard. Podle naměřené koncentrace byla vypočtena ředící řada, která určí počet molekul DNA na kuličku. V ideálním případě připadá na jednu kuličku jedna molekula DNA. Poté byl odebrán stanovený objem od každého vzorku a smíchán do jedné zkumavky. Tato celková knihovna byla použita do emulzní PCR.

3. Emulzní PCR (emPCR)

Reagencie pro emPCR byly vyndány z mrazáku a ponechány při pokojové teplotě, aby rozmrzly. Všechny reagencie byly stočeny v centrifuze, enzymy byly uskladněny na ledu a ostatní reagencie ponechány při pokojové teplotě. Aditivum bylo zahřáto v termobloku na 5 minut při 55 °C, aby se rozpustilo. Postupovalo se podle protokolu *emPCR Amplification Method Manual – Lib-L GS Junior Titanium Series* (454 Sequencing Roche, 2010).

Nejprve byl připraven *Mock Mix* (430 μ l *Mock Mix* a 1,72 ml vody), poté byly 2 ml *Mock Mixu* smíchány s 4 ml emulzního oleje ve speciální zkumavce, která byla upevněna do přístroje *Ultra Turrax Tube Drive*, který slouží k homogenizaci směsi. Přístroj byl nastaven na 4000 rpm na 5 minut. Dále byl připraven mix pro emPCR podle tabulky 4.12, promíchán a uchován na ledu.

Tab. 4.12. Receptura mixu pro emPCR.

Reagencie	Objem (μ l)
Voda	410
Additive	515
Amp Mix	270
Amp Primer	80
Enzyme Mix	70
PPiase	2
Celkový objem reakce	1347

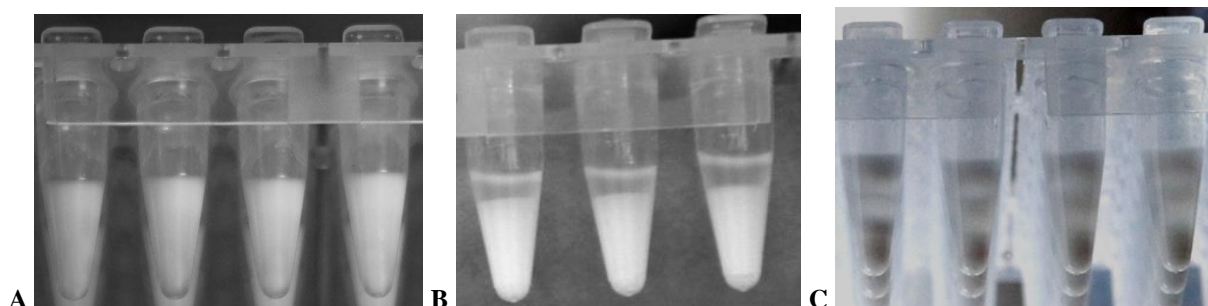
Dále byly připraveny *Capture Beads*, což jsou kuličky, na které se adaptory vážou fragmenty DNA a na jejich povrchu dochází při emPCR k amplifikaci fragmentů. *Capture Beads* byly dvakrát promyty 1 ml *1x Wash Buffer* (byl připraven z 0,5 ml *Wash Buffer* a 4,5 ml vody). Ke kuličkám bylo přidáno vypočtené množství DNA knihovny, promícháno a 1,2 ml předem připraveného mixu pro emPCR, promícháno a vše přepipetováno do zkumavky s emulzí v přístroji *Ultra Turrax Tube Drive* a nastaveno 2000 rpm na 5 minut. Vzniklá emulzní směs byla rozplněna po 80 μ l do 96 jamkové destičky (obr. 4.1 A), uzavřena víčkem a vložena do termocykleru. Bylo nastaveno teplotní schéma pro emPCR viz tabulka 4.13.

Tab. 4.13. Nastavení termocyklieru pro emPCR.

Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
94	4 min	1
94	30 s	50
58	4,5 min	
68	30 s	
10	∞	1

Program běží přibližně 6 hodin, emPCR byla vždy spuštěna během odpoledne a ponechána v termocyklieru přes noc (emulze lze uchovávat při 10 °C až 16 hodin). Následující den ráno byla destička s emulzí vyndána z termocyklieru a zkontrolována. Emulze musí být homogenní a nad emulzí je jen tenká vrstva čiré nebo mléčně zakalené tekutiny (obr. 4.1 B), nesmí být rozdělena do několika vrstev (obr. 4.1 C).

Obr. 4.1. emPCR: na obr. A je homogenní emulze před vložením do termocyklieru, na obr. B je neporušená emulze s čirou nebo mléčně zakalenou fází na povrchu po vyndání z termocyklieru, na obr. C je nepoužitelná emulze rozbitá do několika vrstev. Převzato a upraveno podle (*emPCR Amplification Method Manual – Lib-L GS Junior Titanium Series*, Roche, 2010).



Dalším krokem bylo vypipetování emulzní směsi z destičky a důkladné vyčištění kuliček od emulze. K tomu sloužila vakuová pumpa a speciální nástavec na vysátí emulze z destičky, který byl součástí kitu *GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking*. Pomocí tohoto nástavce byla emulze nasáta do připojené 50 ml zkumavky. Poté co byla emulze kompletně odsáta ze všech jamek destičky, byl nástavec promyt isopropanolem a všechny jamky byly 2x promyty 100 μ l isopropanolu a odsáty do zkumavky. Vzhledem k použití isopropanolu byl tento krok prováděn v digestoři. Následně proběhlo vyčištění kuliček od emulzního oleje pomocí několika promývacích kroků. Zkumavka o objemu 50 ml s odsátou směsí kuliček, emulze a isopropanolu byla doplněna isopropanolem na objem 35 ml, důkladně promíchána a centrifugována 5 min při 930 x g, poté byl opatrně odlit supernatant a přidáno 10 ml *Enhancing Buffer* a promícháno, pokud peleta držela na dně zkumavky příliš pevně, tak

byla rozbita pomocí sterilní plastové špachtle. Následně byla zkumavka doplněna isopropanolem do 40 ml a centrifugována 5 min při 930 x g. Supernatant byl odstraněn a zkumavka doplněna do 35 ml isopropanolem, vše promícháno a opět centrifugováno 5 min při 930 x g a poté supernatant opět odstraněn. Byl přidán etanol do výsledného objemu 35 ml, důkladně promícháno a centrifugováno 5 min při 930 x g, odstraněn supernatant a přidán *Enhancing Buffer* do 35 ml a naposled centrifugace 5 min při 930 x g. Poté byl odstraněn supernatant tak, aby ve zkumavce zbyly asi 2 ml *Enhancing Buffer*. Suspenze kuliček a *Enhancing Buffer* byla přepipetována do nové zkumavky o objemu 1,7 ml a centrifugována „*spin-rotate-spin*“ (což znamená centrifugaci asi 15 s, poté otočení zkumavky o 180° a znovu centrifugace asi 15 s), aby se vytvořila peleta z kuliček a hladina pelety byla rovnoměrně rozložena, poté byl supernatant odstraněn. 50 ml zkumavka byla ještě 2x vypláchnuta 1 ml *Enhancing Buffer* a ten byl přidán do 1,7 ml zkumavky a opět „*spin-rotate-spin*“ a odstraněn supernatant.

Dalším krokem bylo obohacení kuliček knihovny DNA. Bylo připraveno *Melt Solution* (125 μ l NaOH (10 N) a 9,875 ml vody) a přidán 1 ml ke kuličkám, promícháno a inkubováno 2 minuty při pokojové teplotě, poté „*spin-rotate-spin*“ a supernatant byl odstraněn. Tento krok byl opakován ještě jednou a poté byly kuličky 3x promyty 1 ml *Annealing Buffer*, vše promícháno, „*spin-rotate-spin*“ a odstraněn supernatant. Poté bylo přidáno 45 μ l *Annealing Buffer* a 25 μ l *Enrich Primer*, promícháno a inkubováno v předehřátém termobloku na 65 °C 5 minut a následně zkumavka zchlazena 2 minuty na ledu. Dále byly kuličky 3x promyty 1 ml *Enhancing Buffer* a ponechány při pokojové teplotě do dalšího použití.

Byly připraveny magnetické hnědé kuličky – *Enrichment Beads*, byly 2x promyty přidáním 500 μ l *Enhancing Buffer*, za použití magnetického stojánu. Po druhém promytí a odstranění supernatantu bylo přidáno 80 μ l *Enhancing Buffer* a promícháno. Následně bylo 80 μ l promytých hnědých kuliček přidáno k bílým kuličkám obsahujícím knihovnu a promícháno, aby došlo k důkladnému promísení obou druhů kuliček a zkumavka byla umístěna na 5 minut do rotačního stojanu a poté 3-5 minut na magnetickém stojánu, aby se vytvořila peleta. Magnetický stojánek byl několikrát invertován, aby došlo k zachycení všech hnědých *Enrichment Beads*. Poté byl opatrně odstraněn supernatant tak, aby nedošlo ke stržení hnědých kuliček z pelety. Do zkumavky byl přidáván 1 ml *Enhancing Buffer*, promícháno a umístěno na magnetický stojánek. Po vytvoření pelety byl odstraněn supernatant. Tento krok byl opakován 6-10x, dokud byly v supernatantu přítomny bílé kuličky. Jakmile byl odstraněn supernatant čirý bez bílých kuliček, tak bylo přidáno 700 μ l

Melt Solution, promícháno, aby se resuspendovala peleta a umístěno na magnetický stojánek. *Melt Solution* způsobí uvolnění bílých kuliček z hnědých *Enrichment Beads*. Po usazení pelety byl odpipetován supernatant obsahující bílé kuličky s knihovnou a přenesen do nové zkumavky. Tento krok byl opakován ještě jednou. Poté co byly všechny bílé kuličky přeneseny do nové zkumavky, byla zkumavka s hnědými kuličkami vyhozena.

Bílé kuličky byly 3x promyty 1 ml *Annealing Buffer*, promíchány, „*spin-rotate-spin*“ a odstraněn supernatant. V dalším kroku byl navázán sekvenční primer. Po třetím promytí bylo přidáno 100 µl *Annealing Buffer* a 25 µl *Seq Primeru*, promícháno a inkubováno v termobloku 5 minut při 65 °C, poté zchlazeno 2 minuty na ledu, poté 3x promyto přidáním 1 ml *Annealing Buffer*, promícháno a „*spin-rotate-spin*“. Po třetím promytí byl přidán 1 ml *Annealing Buffer*, „*spin-rotate-spin*“ a zkumavka byla vložena do „počítadla kuliček“ (*GS Junior Bead Counter*) na obr. 4.2, který orientačně určí počet získaných kuliček. Hladina pelety by měla být v okně, pokud je kuliček málo a jsou pod hranou okna nelze je použít. Sekvenátor GS Junior vyžaduje pro úspěšný běh alespoň 500 000 kuliček. Spodní hrana okna definuje 500 000 kuliček a horní hrana definuje 2 miliony kuliček (viz obr. 4.2). Takto připravené kuličky je možné uchovat při teplotě 2-8 °C po dobu dvou týdnů.

Obr. 4.2. „Počítadlo kuliček“ *GS Junior Bead Counter*. Převzato a upraveno podle (*emPCR Amplification Method Manual – Lib-L GS Junior Titanium Series*, Roche, 2010).

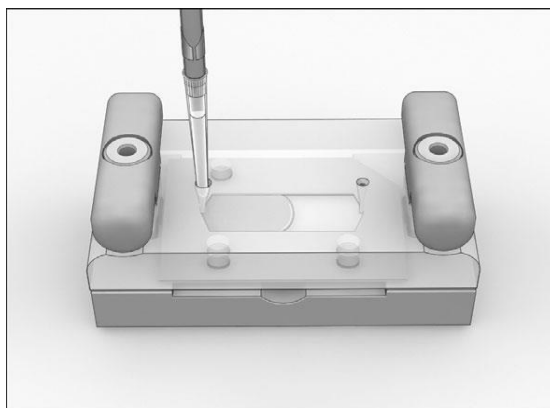


4. Sekvenování

Postupovalo se podle protokolu *Sequencing Method Manual GS Junior Titanium Series* (454 Sequencing Roche, 2010). Nejprve byly připraveny potřebné kity a rozmrazeny reagensie. Prvním krokem bylo promytí přístroje před novým během. Z přístroje byla vyndána stará reagenční kazeta a vložena promývací kazeta naplněná promývacím pufrem a byl spuštěn program promývání, který trval 30 minut.

Mezitím než skončilo promývání, byla připravena pikotitrační destička. Jde o čip z optických vláken, ve kterém jsou jamky, jejichž objem je v pl a do těchto jamek zapadají kuličky. Na destičku byly postupně pipetovány jednotlivé vrstvy kuliček a mezitím centrifugováno, aby kuličky zapadly do jamek. Na povrchu některých kuliček byly imobilizované enzymy potřebné pro reakci. Nejprve byl připraven *Bead Buffer 2* (BB2) přidáním 6,6 ml *Supplement CB* do láhve s CB pufrem, důkladně promícháno a odebráno 40 ml do nové 50 ml zkumavky a přidáno 6,5 μ l předem stočené Apyrázy, zkumavka s hotovým BB2 byla promíchána a umístěna na led. Součástí kitu *GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit* je pikotitrační destička, která má na sobě identifikační číslo, které je potřeba si poznamenat, protože se později zadává do počítače při spuštění běhu. Dále jsou součástí kitu těsnění, která byla opláchnuta promývacím pufrem a také bylo opláchnuto zařízení sloužící k naplnění kuliček do pikotitrační destičky – *Bead Deposition Device* (BDD). Poté byla pikotitrační destička, těsnění a BDD složeny a napipetováno 360 μ l BB2 do destičky, jak je vidět na obr. 4.3. Po naplnění následovala centrifugace 5 minut při 1620 RCF.

Obr. 4.3. Zařízení k naplnění pikotitrační destičky - *Bead Deposition Device* – BDD. Převzato z *Sequencing Method Manual GS Junior Titanium Series*, Roche 2010.



Dále byly připraveny kuličky pro jednotlivé vrstvy, které se postupně pipetují do destičky. Naplnění destičky probíhá ve čtyřech krocích: 1. vrstva enzymové kuličky, 2. vrstva DNA a pěchovací kuličky (*Packing Beads*), 3. vrstva opět enzymové kuličky a 4. vrstva PPIase kuličky.

První byla připravena vrstva DNA kuliček, kdy byly použity kuličky z emPCR s amplifikovanou DNA, ke kterým bylo přidáno 6 μl *Control Beads XLTF* a 500 μl BB2, promícháno a inkubováno 20 minut při pokojové teplotě na rotačním stojanu. Mezitím byly připraveny další vrstvy kuliček. *Packing Beads* byly připraveny přidáním 1 ml BB2 do zkumavky s kuličkami a 3x promyty 1 ml BB2, mezi každým promytím centrifugováno 5 minut při 9300 RCF. Po třetím promytí bylo přidáno 200 μl BB2, promícháno a ponecháno na ledu. Dále byly připraveny enzymové a PPIase kuličky, které byly připravovány současně a za použití magnetického stojánku. Do obou zkumavek byl přidán 1 ml BB2, promíchány a umístěny na magnetický stojánek, po usazení pelety byl opatrně odpipetován supernatant, tento krok byl opakován 3x vždy s 1 ml BB2. Po třetím promytí bylo k enzymovým kuličkám přidáno 400 μl BB2 a k PPIase kuličkám 410 μl BB2. Enzymové kuličky byly rozděleny na 2 vrstvy, do dvou nových zkumavek bylo napipetováno BB2 a enzymové kuličky, podle tabulky 4.14. Poté byly kuličky ponechány na ledu.

Tab. 4.14. Rozdělení enzymových kuliček na 2 vrstvy.

Reagencie	BB2	Enzymové kuličky	Celkový objem
Enzymová pre-vrstva	300 μl	110 μl	410 μl
Enzymová post-vrstva	180 μl	230 μl	410 μl

DNA kuličky byly sundány z rotačního stojanu a centrifugovány 10 s při 9300 RCF, aby se vytvořila peleta a byl odpipetován supernatant tak, aby ve zkumavce zbylo asi 50 μl a bylo přidáno 40 μl polymerázy, 20 μl kofaktoru polymerázy a 65 μl BB2, promícháno a inkubováno 10 minut při pokojové teplotě na rotačním stojanu. Po inkubaci bylo přidáno 175 μl pěchovacích kuliček (*Packing Beads*) a opět inkubováno 5 minut na rotátoru.

V tuto chvíli byly připraveny všechny vrstvy k naplnění pikotitrační destičky a byly postupně pipetovány. V tab. 4.15 je pořadí a podmínky centrifugace jednotlivých vrstev. Vždy bylo pipetováno 360 μl a po centrifugaci byla předchozí vrstva odpipetována. Před napipetováním byly kuličky ještě promíchány, aby byly v pikotitrační destičce rovnoměrně rozloženy. Pipetovalo se velmi opatrně, aby se nevytvořila bublina.

Tab. 4.15. Pořadí vrstev kuliček v pikotitrační destičce a podmínky centrifugace.

Vrstva	Typ kuliček	Centrifugace
1.	Enzymové kuličky - pre	1620 RCF 5 min
2.	DNA a pýchovací kuličky	1620 RCF 10 min
3.	Enzymové kuličky - post	1620 RCF 10 min
4.	PPiase kuličky	1620 RCF 5 min

Byl připraven CB pufř, přidáním 1 ml DTT a 44 ml TW substrátu do láhve s pufřem a důkladně promícháno. Dále bylo nutné připravit sekvenátor na nový běh. Byla odstraněna promývací kazeta a láhev s promývacím pufřem. Místo nich byla umístěna reagenční kazeta a láhev s CB pufřem. Nakonec byla umístěna do sekvenátoru pikotitrační destička. Ze sekvenátoru byla odstraněna stará destička s těsněním z předchozího běhu a vše očištěno 50% etanolem a poté 10% Tween-20. Také byla otřena kamera speciálními ubrousky. Po odstranění přebytečného pufřu bylo rozloženo zařízení k naplnění destičky a pikotitrační destička a nové těsnění byly vloženy do sekvenátoru. Během těchto kroků byly několikrát měněny jednorázové rukavice, přesně podle návodu, aby nedošlo ke kontaminaci. Nakonec byly v obslužném počítači sekvenátoru nastaveny potřebné parametry, vloženo identifikační číslo destičky, název běhu a sekvenace byla spuštěna. Výsledky byly staženy následující den.

Jednou za měsíc je nutné provést údržbu přístroje pomocí kitu *GS Junior Maintenance Wash Kit*. Tento kit obsahuje kazetu s dezinfekčním prostředkem, která je vložena do přístroje a spustí se program pro údržbu.

4.6 Zpracování výsledků

Následující den po spuštění sekvenátoru bylo zkontrolováno, zda sekvenace proběhla v pořádku a byly zkopírovány výsledky. Veškerá získaná data jsou uložena na obslužném počítači sekvenátoru. Zpracování se skládá z řady automatických kroků, které slouží ke korekci dat. Získaná čtení procházejí řadou filtrů kvality, přičemž čtení s nízkou kvalitou jsou identifikována a oddělena. Do obslužného počítače byla nahrána srovnávací referenční sekvenace a získané sekvenace byly mapovány proti referenčním sekvencím pomocí softwaru *GS Reference Mapper*. Konečná výstupní sekvenace je ve FASTA formátu. Získaná data byla zkopírována a dále upravována mimo obslužný počítač sekvenátoru.

Dále byla sledována kvalita sekvencí, tedy počet čtení u každého pacienta v jednom sekvenčním běhu. Po každém sekvenování bylo toto vyhodnoceno a v dalším sekvenování při přípravě nových vzorků byl případně upraven počet μ l odebraných při zpipetování PCR

produktů. V případě nevyhovující kvality nebo nízkého počtu čtení některého amplikonu bylo provedeno Sangerovo sekvenování.

Byla vytvořena tabulka v programu Microsoft Excel, do které byly zaneseny známé SNP (*single nucleotide polymorphism*) z databáze UCSC - University of California Santa Cruz (<http://www.genome.ucsc.edu/>), byla použita verze dbSNP 137 (*The Single Nucleotide Polymorphism Database*). Do této tabulky byly kopírovány výsledky ze souboru HCDiffs (ze sekvenátoru) a u známých variant k nim byla v tabulce automaticky přiřazena funkce. Neznámé varianty byly dohledány. Pomocí BLAT Search Genome v databázi UCSC bylo ověřeno, zda je varianta opravdu neznámá. Pokud funkce byla neznámá, byla dohledána pomocí PROVEAN Human Genome Variants (http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php) nebo pomocí PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). S použitím těchto programů byla identifikována funkce zachycené varianty a doplněna do tabulky. V tabulce Microsoft Excel byly získané varianty dále tříděny podle typu mutace a podle frekvence.

5 Výsledky

Celkem bylo osekvenováno 12 genů (*CAPZA3*, *CDC14B*, *CDC42*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *HOOK1*, *HRB*, *OAZ3*, *ODF1*, *RIMBP3*, *SPATA16*) u 73 pacientů a 7 kontrolních vzorků. Důvodem nízkého počtu kontrol je, že slouží pouze pro sledování kvality sekvenování. Jinak je kontrolou normální genom a jeho normální variabilita. Celý rozsah kontrolního souboru by byl nutný jen u nových podezřelých mutací. Laboratorní zpracování vzorků bylo anonymní, proto vzorky pacientů i kontrol byly označeny kódem, pacienti písmenem Y a číslem, kontroly mají písmeno N a číslo. Čísla nemají žádný specifický význam, byla přiřazována postupně, jak byly vzorky sbírány. Na ÚBLG 1. LF a VFN byla provedena rutinní diagnostika pacientů, tedy stanovení karyotypu, vyloučení mikrodelece chromozomu Y a mutací v *CFTR* genu. U genu *CFTR* byly také vyšetřeny T polymorfizmy. V genu *CFTR* nebyla nalezena mutace u žádného z pacientů. Při vyšetření T polymorfizmů byly u 55 pacientů nalezeny alely T7/T7, u 10 pacientů T7/T9, u 6 pacientů T5/T7 a varianty T5/T9 a T9/T9 každá u jednoho pacienta. Mikrodelece chromozomu Y byla identifikována pouze u jednoho pacienta (Y494) a to v oblasti AZFb. Při cytogenetickém vyšetření mělo normální karyotyp 46,XY 60 pacientů. Karyotyp 47,XXY, tedy Klinefelterův syndrom byl diagnostikován u 6 pacientů, z toho v jednom případě šlo o mozaiku 84,5 % 47,XXY a 15,5 % 46,XY. U 3 pacientů byla inverze na 9. chromozomu - 46,XY,inv(9)(p12q13), u jednoho pacienta byla nalezena translokace mezi 8. a 22. chromozomem - 46,XY,t(8;22)(q21.2;q11.1). Nálezy 47,XYX a 45,XY,der(13;14)(q10;q10) byly detekovány každý v jednom případě. U pacienta Y486 cytogenetické vyšetření chybí. U všech sedmi kontrolních vzorků byl karyotyp 46,XY. Zmíněné nálezy jsou uvedeny v tabulce 5.1 pro pacienty a v tabulce 5.2 pro kontroly. V tabulkách je dále uvedena stanovená diagnóza. Všechny kontrolní vzorky měly normozoospermie. U pacientů byla v 31 případech oligoasthenozoospermie, u 20 pacientů azoospermie, dále 12 pacientů s oligoasthenoteratozoospermii. U 3 pacientů byla nalezena oligozoospermie a také u 3 oligoteratozoospermie. Asthenozoospermie a kryptozoospermie se vyskytovaly každá u jednoho pacienta. U 2 pacientů byla diagnózou sterilita. Procentuální rozložení diagnóz v souboru pacientů je znázorněno na obr. 5.1. Z celkového souboru 73 pacientů bylo 12 pacientů po rutinním genetickém vyšetření vyloučeno a výsledky sekvenace u těchto pacientů nebyly do výsledného součtu zachycených nových i známých variant zahrnuty. Jedná se o tyto pacienty: Y449, Y455, Y456, Y466, Y474, Y486, Y494, Y526, Y527, Y534, Y550, Y552 v tabulce 5.1 jsou označeni červeně. Důvodem vyřazení je, že u těchto dvanácti pacientů byla při rutinním genetickém vyšetření

stanovena pravděpodobná příčina neplodnosti. Proto při případném nálezu mutace by nebylo možné vyhodnotit, zda je mutace příčinou neplodnosti. Podrobněji se těmto vyřazeným pacientům věnuji v diskuzi.

Tab. 5.1. Výsledky rutinní laboratorní diagnostiky a stanovená diagnóza u 73 pacientů. Červeně označení pacienti byli ze souboru vyřazeni.

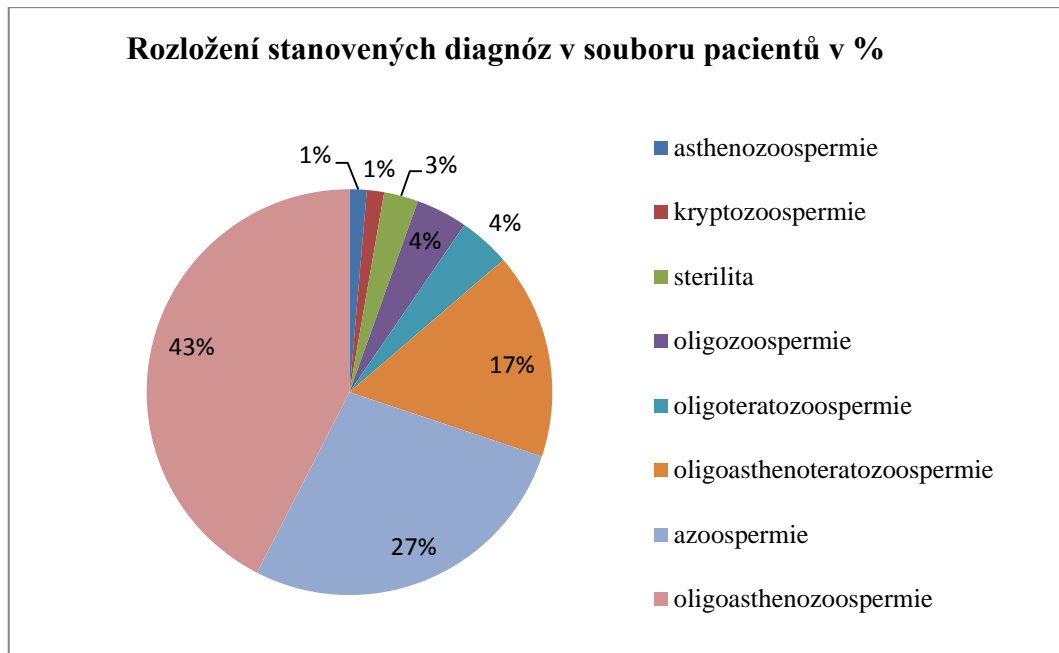
Kód pacienta	Mutace CFTR genu	Alely genu CFTR	Mikrodelece chromozomu Y	Karyotyp	Diagnóza	
Y447	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y448	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y449	negativní	T7	T7	negativní	47,XXY(8)/46,XY(2)	oligoasthenozoospermie
Y450	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y451	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y452	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y453	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y454	negativní	T5	T9	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y455	negativní	T7	T7	negativní	47,XXY	azoospermie
Y456	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	sterilita
Y459	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y461	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y463	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y464	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y465	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y466	negativní	T7	T7	negativní	47,XXY	azoospermie
Y467	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y469	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y470	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y472	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y474	negativní	T7	T9	negativní	47,XXY	azoospermie
Y479	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y481	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y482	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	asthenozoospermie
Y483	negativní	T7	T7	negativní	47,XXY	azoospermie
Y484	negativní	T5	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y485	negativní	T7	T7	negativní	46,XY,inv(9)(p12q13)	kryptozoospermie
Y486	negativní	T7	T9	negativní	nebyl vyšetřen	oligoasthenozoospermie
Y487	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y492	negativní	T9	T9	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y494	negativní	T7	T7	delece AZFb	46,XY	azoospermie
Y495	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligozoospermie
Y498	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y499	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoteratozoospermie
Y500	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoteratozoospermie
Y501	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y502	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie/ oligoasthenozoospermie
Y503	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie

Y504	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y505	negativní	T7	T9	negativní	46,XY,inv(9)(p12q13)	oligoasthenozoospermie
Y506	negativní	T5	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y507	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y508	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y509	negativní	T5	T7	negativní	46,XY,inv(9)(p12q13)	oligoasthenozoospermie
Y510	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y512	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y513	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y514	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y515	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y517	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y518	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y519	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y520	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y521	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligozoospermie
Y522	negativní	T5	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y523	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y525	negativní	T5	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y526	negativní	T7	T7	negativní	47,XXY	azoospermie
Y527	negativní	T7	T7	negativní	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	oligoasthenozoospermie
Y528	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	oligoteratozoospermie
Y530	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie
Y532	negativní	T5	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y533	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y534	negativní	T7	T7	negativní	46,XY,t(8;22)(q21.2;q11.1)	oligoasthenoteratozoospermie
Y538	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	azoospermie
Y540	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y541	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligozoospermie
Y542	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y545	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	oligoasthenozoospermie
Y550	negativní	T7	T7	negativní	47,XXY	azoospermie
Y551	negativní	T7	T9	negativní	46,XY	azoospermie
Y552	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	sterilita
Y553	negativní	T7	T7	negativní	46,XY	oligoasthenoteratozoospermie

Tab. 5.2. Karyotyp a diagnóza u 7 kontrolních vzorků.

Kód kontroly	Karyotyp	Diagnóza
N24	46,XY	normozoospermie
N25	46,XY	normozoospermie
N31	46,XY	normozoospermie
N50	46,XY	normozoospermie
N51	46,XY	normozoospermie
N67	46,XY	normozoospermie
N68	46,XY	normozoospermie

Obr. 5.1. Rozložení stanovených diagnóz v souboru 73 pacientů.

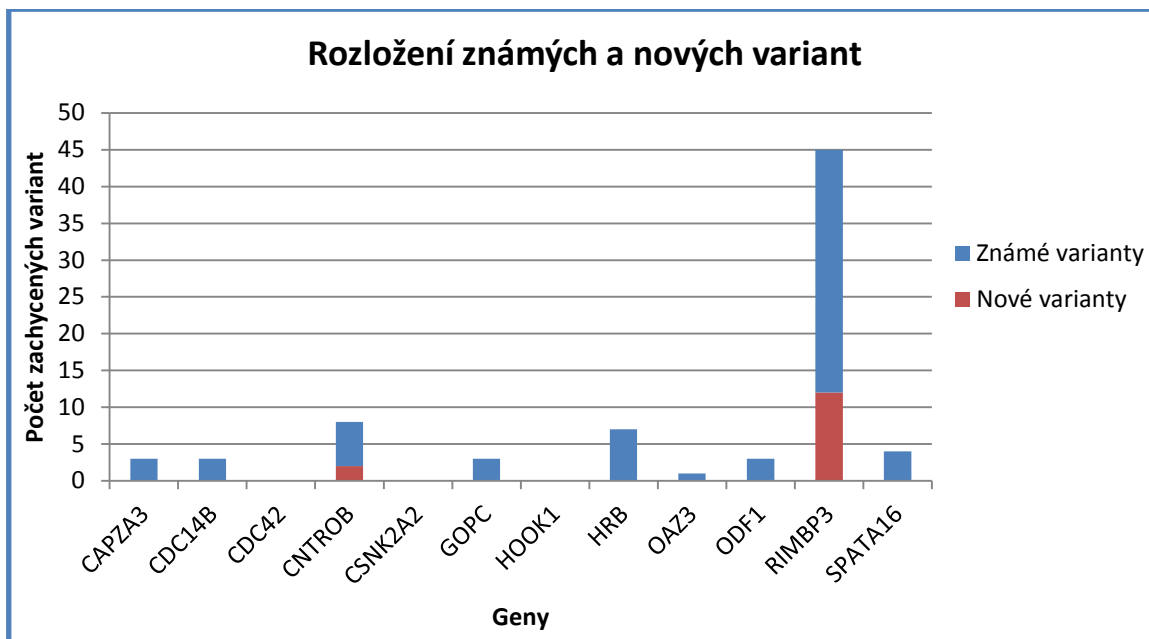


Z celkového počtu 73 pacientů po vyřazení 12 pacientů zbylo 61 pacientů, u kterých byly vyhodnoceny a sečteny nalezené sekvenční varianty. Zachycené varianty byly rozděleny na nové a známé. Celkem bylo nalezeno 14 nových variant u genů *CNTROB* (2 variant), *RIMBP3* (12 variant) a 63 známých variant. U genu *RIMBP3* některé varianty pravděpodobně nepředstavují skutečnou variantu, ale rozdíl mezi jednotlivými kopiemi *RIMBP3* genu, jelikož tento gen je v genomu triplikován. Přehled nalezených sekvenčních variant je uveden v tabulce 5.3 a rozložení variant mezi jednotlivé geny je graficky znázorněno na obr. 5.2.

Tab. 5.3. Přehled nalezených sekvenčních variant u 61 neplodných pacientů.

Gen	Nová varianta	Známa varianta
<i>CAPZA3</i>	0	3
<i>CDC14B</i>	0	3
<i>CDC42</i>	0	0
<i>CNTROB</i>	2	6
<i>CSNK2A2</i>	0	0
<i>GOPC</i>	0	3
<i>HOOK1</i>	0	0
<i>HRB</i>	0	7
<i>OAZ3</i>	0	1
<i>ODF1</i>	0	3
<i>RIMBP3</i>	12	33
<i>SPATA16</i>	0	4
Celkem	14	63

Obr. 5.2. Rozložení zachycených známých a nových variant v kandidátních genech u neplodných mužů.



Nalezené známé varianty byly tříděny podle typu mutace na missense a synonymní a také na intronové, 5'UTR a 3'UTR (UTR - *untranslated region*). U 61 neplodných mužů bylo nalezeno 35 substitučních bodových mutací (missense), 18 synonymních mutací, 6 intronových a po 2 variantách v 5'UTR a 3'UTR oblasti. Rozložení známých variant mezi 12 kandidátních genů je uvedeno v tabulce 5.4.

Tab. 5.4. Rozložení nalezených známých variant u neplodných pacientů

Rozložení známých variant					
Gen	missense	synonymní	intronová	5'UTR	3'UTR
<i>CAPZA3</i>	3	0	0*	0	0
<i>CDC14B</i>	0	0	2	0	1
<i>CDC42</i>	0	0	0	0	0
<i>CNTROB</i>	4	2	0	0	0
<i>CSNK2A2</i>	0	0	0	0	0
<i>GOPC</i>	0	2	0	1	0
<i>HOOK1</i>	0	0	0	0	0
<i>HRB</i>	2	3	2	0	0
<i>OAZ3</i>	0	1	0	0	0
<i>ODF1</i>	1	2	0	0	0
<i>RIMBP3</i> **	23	8	0*	1	1
<i>SPATA16</i>	2	0	2	0	0
Celkem	35	18	6	2	2

*Tyto geny nemají introny. **Některé varianty pravděpodobně nepředstavují skutečnou variantu, ale rozdíl mezi jednotlivými kopiemi *RIMBP3* genu.

Nové zachycené varianty u genů *CNTROB* a *RIMBP3* jsou uvedeny v tabulce 5.5. U genu *CNTROB* byly identifikovány 2 nové varianty, jedna missense a jedna synonymní. U genu *RIMBP3* bylo zachyceno 12 nových variant. Z toho 7x missense, 3x synonymní mutace, 1x inzerce dvou aminokyselin a 1x inzerce rušící čtecí rámeček.

Tab. 5.5. Zachycené nové varianty u genů *CNTROB* a *RIMBP3* u neplodných mužů.

Nalezené nové varianty				
Gen	Funkce	Pozice mutace	Pozice AMK	Nalezeno u pacientů
<i>CNTROB</i>	missense	c.2156C>T	p.Arg413Trp	Y479 ^b
	synonymní	c.3379G>A	p.Gly820Gly	Y512 ^b
<i>RIMBP3</i>	inzerce, ruší rámeček	c.2444-2445insCC	p.Ser653fs	Y469 ^b , Y450 ^b , Y465 ^b , Y510 ^b
	inzerce 2 aminokyselin	c.3651insCAGGTG	p.insGlnVal	Y469 ^b , Y450 ^b , Y528 ^b , Y521 ^b , Y518 ^b
	synonymní	c.5360G>T	p.Leu1625Leu	Y469 ^b
	synonymní	c.2456C>G	p.Ala657Ala	Y515 ^b
	synonymní	c.3773C>T	p.Arg1096Arg	Y463 ^b
	missense	c.5367G>A	p.Ala1628Thr	Y472 ^b
	missense	c.2097C>T	p.Arg538Cys	Y509 ^b , Y542 ^b
	missense	c.1771G>A	p.Arg429Gln	Y482 ^b , Y459 ^b
	missense	c.3082A>G	p.Tyr866Cys	Y482 ^b
	missense	c.1642T>C	p.Val386Ala	Y520 ^b
	missense	c.4303G>A	p.Ser1273Asn	Y454 ^b
	missense	c.2622C>A	p.Pro713Thr	Y459 ^b

a – homozygot, b - heterozygot

Zachycené nové varianty nejsou patogenní, všechny se vyskytují u pacientů v heterozygotní formě, kdy ztrátová alela je úplně recesivní. Ze 14 nalezených nových variant jsou 4 varianty synonymní (2 u genu *CNTROB* a 2 u genu *RIMBP3*), jde tedy o tichou mutaci, která nemění aminokyselinu a není patogenní. Dále bylo zachyceno 8 variant missense mutace. Tato mutace vede ke změně aminokyseliny a může být patogenní. U těchto zachycených variant byla ověřena jejich patogenita. Pomocí programů PROVEAN Human Genome Variants (http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php) nebo pomocí PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) bylo zjištěno, zda je zachycená varianta škodlivá. U žádné z osmi missense mutací to nebylo prokázáno. U genu *RIMBP3* byly nalezeny dvě inzerce. V 1. případě šlo o inzerci dvou nukleotidů CC a v 2. případě došlo k inzerci šesti nukleotidů CAGGTG, která vede k inzerci dvou aminokyselin – glutaminu a valinu. Opět byla ověřena patogenita varianty a nebyla prokázána.

Ve vyšetřeném souboru neplodných mužů s poruchou spermatogeneze nebyla zachycena žádná patogenní mutace prokazatelně způsobující neplodnost. Všechny nalezené varianty byly shledány za nepatogenní a nepodařilo se prokázat, že by mutace ve vybraných kandidátních genech (*CAPZA3*, *CDC14B*, *CDC42*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *HOOK1*, *HRB*, *OAZ3*, *ODF1*, *RIMBP3*, *SPATA16*) vedla k narušení spermatogeneze a byla tedy příčinou neplodnosti mužů.

6 Diskuze

Cílem diplomové práce byla sekvenční analýza dvanácti kandidátních genů potencionálně zodpovědných za neplodnost mužů u pacientů s poruchou spermatogeneze. Práce má tedy charakter mutačního screeningu, který má za úkol vyhledat mutace zodpovědné za monogenně podmíněnou neplodnost. Studií tohoto typu byla ve světě provedena celá řada, vždy s menším či větším úspěchem odhalení mutací. Kunz *et al.* testovali u 214 pacientů s azoospermií a oligozoospermií přítomnost mutací v genu *NANOS3*. Jde o gen, který je zodpovědný za mužskou neplodnost, všichni testovaní pacienti měli normální karyotyp 46,XY a neměli mutaci v AZF oblasti. Výsledky srovnávali s kontrolní skupinou, která byla tvořena normálně plodnými muži. Identifikovali šest typů variant, ale pouze jedna varianta (delece jednoho nukleotidu g.655delG) u pacienta s azoospermií nebyla přítomna také v kontrolní skupině. Nebylo však prokázáno, že tato mutace vede k mužské neplodnosti (Kusz *et al.* 2009). Dalším příkladem je studie Sua *et al.*, kteří provedli mutační screening genu *TSSK6* na souboru 519 pacientů s azoospermií nebo těžkou oligozoospermií a 359 kontrol s normozoospermií. Byl identifikován jeden polymorfismus, jehož frekvence významně vzrostla ve skupině neplodných mužů ve srovnání s kontrolami, výsledkem tedy bylo určení alely, která může být rizikovým faktorem pro mužskou neplodnost (Su *et al.* 2010). Zhang *et al.* provedli studii zaměřenou na gen *FKBP6* a zkoumali souvislost genu s poruchou spermatogeneze u člověka. Na souboru 323 pacientů s azoospermií nebo těžkou oligozoospermií a 205 kontrol byly identifikovány 4 nové a jedna známá varianta, které jsou potenciálně patogenní. Bylo zjištěno, že studovaný gen se může uplatňovat při porušení spermatogeneze u člověka (Zhang *et al.* 2007). V některých případech se mutace ve vybraných genech odhalit nepodaří. Zhoucun *et al.* provedli screening mutací genu pro cyklin A1, který se uplatňuje při meióze. Cílem bylo ověřit, zda mutace genu nemají vliv na poruchu spermatogeneze u člověka. Bylo testováno 347 neplodných pacientů s azoospermií nebo oligozoospermií a 210 kontrol. Byly identifikovány čtyři bodové mutace, ale žádný vztah s poruchou spermatogeneze nebyl prokázán, což naznačuje, že mutace v genu pro cyklin A1 nejsou obvyklou genetickou příčinou zodpovědnou za poruchu spermatogeneze u člověka. (Zhoucun *et al.* 2009). Zmíněné studie jsou velmi podobné jako v našem případě. Zaměřují se sice na jiné geny, ale jde také o geny, jejichž mutace způsobují poruchu spermatogeneze u zvířecích modelů a předpokládá se podobný efekt těchto genů i u člověka. Studie vypovídají o tom, že i když je vyšetřen podstatně větší soubor pacientů, nemusí být mutace nutně odhalena.

Výhodou naší studie je stanovení sekvencí více genů najednou, což zvyšuje pravděpodobnost, že zachytíme patogenní mutace, pokud by měly ve sledované populaci neplodných mužů frekvenci alespoň v řádu procent. Přesto v našem souboru nebyla prokázána patogenní mutace, která by byla příčinou neplodnosti. Jedním z důvodů je pravděpodobně velikost testovaného souboru. Je možné usuzovat, že při vyšetření většího souboru pacientů a při testování většího panelu kandidátních genů by byla větší pravděpodobnost zachycení patogenních mutací. Je zřejmé, i vzhledem k pokroku v metodách sekvenace DNA, že podobné studie se musí v budoucnosti zaměřit nejen na shromáždění dostatečného množství pacientů, ale i na stanovení sekvence většího množství (spíše stovek než desítek) genů.

Na základě rutinního laboratorního vyšetření jsme 12 pacientů vyřadili a výsledky sekvenování u těchto pacientů nebyly do celkového přehledu zachycených nových a známých variant zařazeny. O které pacienty se jedná, je uvedeno v kapitole Výsledky. Tito pacienti byli vyřazeni, protože na základě rutinního genetického vyšetření byla stanovena pravděpodobná příčina neplodnosti, dále u jednoho pacienta (Y486) byl důvodem vyřazení dosud nevyšetřený karyotyp a u dvou pacientů (Y456, Y552) diagnóza sterilita. Při případném nálezů mutace u těchto pacientů by nebylo možné vyhodnotit, zda by mutace mohla být samostatnou příčinou neplodnosti, i kdyby nebyla zároveň přítomna jiná známá příčina. U šesti pacientů byl důvodem vyřazení karyotyp 47,XXY. Jde o pacienty s Klinefelterovým syndromem (viz kap. 2.2.1). Výskyt tohoto syndromu je poměrně častý, asi 1:1 000 narozených chlapců. Téměř 100 % mužů s tímto karyotypem má azoospermii způsobenou právě aneuploidií pohlavního chromozomu. U jednoho pacienta nebyl vyšetřen karyotyp, proto byl ze souboru vyřazen. Nelze u něj vyloučit přítomnost patologického nálezu v karyotypu, který by objasnil příčinu neplodnosti. U dvou pacientů byla diagnostikována sterilita. Nemohli být do souboru zařazeni, protože u nich nebyla prokázána porucha spermatogeneze. U dalších dvou pacientů byl důvodem vyřazení karyotyp 45,XY,der(13;14)(q10;q10) a 46,XY,t(8;22)(q21.2;q11.1). U těchto karyotypů není jisté, zda vedou k porušení spermatogeneze, jsou však natolik závažné, že vliv na plodnost nelze vyloučit. Z toho důvodu byli ze souboru vyřazeni. U jednoho pacienta byla nalezena mikrolece oblasti AZFb na chromozomu Y, která vede k narušení spermatogeneze a proto byl pacient vyřazen.

V souboru pacientů se kromě normálního karyotypu 46,XY vyskytly ještě dva další nálezy, které ale nebyly důvodem pro vyřazení. U jednoho z pacientů byl stanoven karyotyp 47,XYY, což je syndrom supermale. Pacient ze souboru vyřazen nebyl, protože u pacientů s tímto syndromem je plodnost zachována, může být však velmi variabilní, vyskytují se

nálezů od normozoospermie až po téměř azoospermii. U potomků mužů s tímto syndromem nebyla zaznamenána zvýšená incidence chromozomálních abnormalit v porovnání s běžnou populací (Mardešić *et al.* 2013). U tří pacientů byla při vyšetření karyotypu nalezena inverze na 9. chromozomu - 46,XY,inv(9)(p12q13). Pacienti nebyli ze souboru vyřazeni, protože inverze na 9. chromozomu zahrnuje pouze heterochromatinovou oblast. Vliv této přestavby na plodnost nebyl prokázán, je však diskutabilní a je předmětem studií. Tato inverze je nejčastějším typem chromozomové přestavby v normální populaci, představuje až 1,5 % a u párů s poruchou plodnosti se vyskytuje ve zvýšené míře, až 2,5-3 % (Mardešić *et al.* 2013).

Tato diplomová práce je součástí většího projektu, konkrétně pětiletého grantu, jehož hlavním řešitelem je můj školitel doc. MUDr. František Liška, Ph.D. (grant Ministerstva zdravotnictví ČR č. NT/12269-5). Zmíněný grant je výsledkem spolupráce ÚBLG 1. LF a VFN a Centra asistované reprodukce VFN, které poskytuje vzorky pacientů. Celková velikost souboru nyní činí 146 neplodných pacientů a cca 100 kontrolních vzorků, v současné době je osekvenováno 94 pacientů a 13 kontrol (z toho 73 pacientů a 7 kontrol jsou mnou připravené vzorky). Na ÚBLG na 1. LF se problematice neplodnosti věnují již delší dobu. Dříve byl výzkum zaměřen na gen *Cntrob* kódující protein centrobín, který se podílí na správném vývoji spermie. Na modelu potkana s mutací *hd* byl popsán nový model selhání spermiogeneze. Výsledkem mutace centrobínu je oligozoospermie, abnormální tvar hlavičky spermie a oddělení hlavičky od bičíku (Liška *et al.* 2009). V návaznosti na tuto práci byl gen *CNTROB* také zařazen mezi 12 kandidátních genů. Neplodnost mužů s poruchou spermiogeneze bude i do budoucna předmětem dalšího výzkumu na tomto pracovišti. Uvažuje se o rozšíření souboru pacientů s poruchou spermiogeneze a také rozšíření skupiny kandidátních genů pro neplodnost. Součástí nové studie by mohlo být testování řádově stovek kandidátních genů. V souvislosti s rozšířením testovaných genů bude vhodné přejít na jinou platformu sekvenování nové generace. Platforma GS Junior používaná nyní má totiž několik limitujících faktorů. Jedním z nich je pracnost metody, vlastní příprava vzorků (nebulizace, příprava knihovny, emPCR a nasazení vzorků do sekvenátoru) na sekvenování trvá 4 dny. Dále vysoká cena reagentů a možnost sekvenovat najednou poměrně omezený počet vzorků. Cílem rozšíření studie by bylo zvýšit pravděpodobnost záchytu kauzálních mutací způsobujících neplodnost a rozšířit znalosti o etiologii mužské neplodnosti. Vzhledem k velkému množství genů ovlivňujících plodnost a celkové složitosti reprodukčního systému bude ještě nějakou dobu trvat, než bude možné diagnostikovat a léčit všechny případy

nepločnosti a jistě v tom svoji roli sehraje i rozvoj diagnostických technologií a nové možnosti analýzy získaných dat.

7 Souhrn

Předkládaná diplomová práce se snaží pomocí mutačního screeningu odhalit relativně vzácné patogenní mutace zodpovědné za monogenně podmíněnou neplodnost u mužů s poruchou spermiogeneze. Vzorky cDNA a genomické DNA z periferní krve byly amplifikovány pomocí PCR. Byly připraveny PCR produkty u těchto dvanácti genů: *CAPZA3*, *CDC14B*, *CDC42*, *CNTROB*, *CSNK2A2*, *GOPC*, *HOOK1*, *HRB*, *OAZ3*, *ODF1*, *RIMBP3*, *SPATA16*. Pomocí metody sekvenování nové generace na platformě GS Junior bylo sekvenováno 12 kandidátních genů, jejichž mutace způsobují poruchu spermiogeneze s následnou neplodností u zvířecích modelů. Celkem bylo osekvenováno 73 pacientů s poruchou spermiogeneze a 7 kontrolních vzorků s normozoospermie. Výsledky sekvenování byly porovnány s klinickými daty pacientů, která zahrnují vyšetření mutace v *CFTR* genu včetně vyšetření T polymorfizmu u genu *CFTR*, dále stanovení mikroleceí chromozomu Y v oblasti AZF a vyšetření karyotypu. Součástí rutinní diagnostiky byl také spermioqram, kde byla nejčastěji nalezena oligoasthenozoospermie a azoospermie. Ve vyšetřeném souboru pacientů nabyla prokázána kauzální mutace pro neplodnost. Pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu mutace by bylo třeba rozšířit počet testovaných pacientů a v ideálním případě testovat více kandidátních genů. Nalezení kauzálních mutací a objasnění genetické etiologie neplodnosti by vedlo k ověření úlohy daného genu u člověka a ke zlepšení diagnostiky a genetického poradenství u neplodných párů.

8 Seznam použité literatury

1. Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S. (2006): Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin. Chim. Acta* 363: 83-94.
2. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., Nygren, K.G. (2007): International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod.* 22: 1506-1512.
3. Burmester, S., Hoyer-Fender, S. (1996): Transcription and translation of the outer dense fiber gene (*Odf1*) during spermiogenesis in the rat. A Study by in situ analyses and polysome fractionation. *Mol. Reprod. Dev.* 45:10-20.
4. Dam, A.H., Kosciński, I., Kremer, J.A., Moutou, C., Jaeger, A.S., Oudakker, A.R., Tournaye, H., Charlet, N., Lagier-Tourenne, C., van Bokhoven, H., Viville, S. (2007): Homozygous mutation in *SPATA16* is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 813-820.
5. Escalier, D., Silvius, D., Xu. X. (2003): Spermatogenesis of mice lacking *CK2alpha*: failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 190-201.
6. Ferlin, A., Arredi, B., Foresta, C. (2006): Genetic causes of male infertility. *Reprod. Toxicol.* 22: 133-141.
7. Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka G., Foresta, C. (2007): Male infertility: role of genetic background. *Reprod. BioMed. Online* 14: 734-745.
8. Field, P.D., Martin, N.J. (2011): CFTR mutation screening in an assisted reproductive clinic. *ANZJOG* 51: 536-539.
9. Gaillyová, R., Valášková, I., Beharka, R., Pacík, D., Crha, I., Ventruba, P. (2007): Výsledky vyšetření mikroleceí oblasti AZF(Yq) u mužů s reprodukčními problémy. *Urol. List.* 5: 18-21.
10. Geyer, C.B., Inselman, A.L., Sunman, J.A., Bornstein, S., Handel, M.A., Eddy, E.M. (2009): A missense mutation in the *Capza3* gene and disruption of F-actin organization in spermatids of *repro32* infertile male mice. *Dev. Biol.* 330: 142-152.
11. Hrdlička, I. (2008): Dilemma of the results interpretation of molecular genetic analysis with a focus on CFTR gene mutations in men with reproductive disorders and in gamete donors. *Česká Gynekol.* 73: 323-327.

12. Ivanov, I.P., Rohrwasser, A., Terreros, D.A., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. (2000): Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: Antizyme 3. PNAS 97: 4808-4813.
13. Kang-Decker, N., Mantchev, G.T., Juneja, S.C., McNiven, M.A., van Deursen, J.M. (2001): Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. Science 294: 1531-1533.
14. Kara, E., Simoni, M. (2010): Genetic screening for infertility: When should it be done?. Middle East Fertility Society Journal 15: 139-145.
15. Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L., Rivkin, E., Kang-Decker, N., van Deursen, J.M. (2004): The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b- containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. Biol. Reprod. 70: 1400-1410.
16. Kittnar, O. *et al.* (2011): Lékařská fyziologie. 1. vyd. Grada Publishing, Praha.
17. Kočárek, E., Pánek, M., Novotná, D. (2010): Klinická cytogenetika I. Úvod do klinické cytogenetiky Vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. Karolinum, Praha.
18. Kusz, K., Tomczyk, L., Spik, A., Latos-Bielenska, A., Jedrzejczak, P., Pawelczyk, L., Jaruzelska, J. (2009): NANOS3 gene mutations in men with isolated sterility phenotype. Mol. Reprod. Dev. 76: 804.
19. Liška, F. (2003): Selected genetic aspects of male infertility-what animal models tell us. Folia Biol. (Praha) 49: 129-141.
20. Liška, F., Gosele, C., Rivkin, E., Tres, L., Cardoso, M.C., Domaing, P., Krejčí, E., Šnajdr, P., Lee-Kirsch, M.A., de Rooij, D.G., Křen, V., Křenová, D., Kierszenbaum, A.L., Hubner, N. (2009): Rat hd mutation reveals an essential role of centrobilin in spermatid head shaping and assembly of the head-tail coupling apparatus. Biol. Reprod. 81: 1196-1205.
21. Mardešić, T. *et al.* (2013): Diagnostika a léčba poruch plodnosti. 1. vyd. Grada Publishing, Praha.
22. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bembien, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Goodwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P.,

- Begley, R.F., Rothberg, J.M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
23. Matzuk, M.M., Lamb D.J. (2008): The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* 14: 1197-1213.
24. Matzuk, M.M., Lamb, D.J. (2002): Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat. Cell Biol.* 4 Suppl: s41-49.
25. Mendoza-Lujambio, I., Burfeind, P., Dixkens, C., Meinhardt, A., Hoyer-Fender, S., Engel, W., Neesen, J. (2002): The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1647-1658.
26. Nieschlag, E. (2010): Scope and goals of andrology. In: Nieschlag, E., Behre, H.M., Nieschlag, S. (eds.): *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-10.
27. Nieschlag, E., Behre, H.M., Wieacker, P., Meschede, D., Kamischke, A., Kliesch, S. (2010): Disorders at the testicular level. In: Nieschlag, E., Behre, H.M., Nieschlag, S. (eds.): *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-10.
28. Nyrén, P. (1987): Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal. Biochem.* 167: 235-238.
29. Nyrén, P. a Lundin, A. (1985): Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal. Biochem.* 151: 504–509.
30. O'Flynn O'Brien, K.L., Varghese, A.C., Agarwal, A. (2010): The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil. Steril.* 93: 1-12.
31. Otová, B. *et al.* (2010): *Lékařská biologie a genetika 1. díl*. Karolinum, Praha.
32. Poongothai, J., Gopenath T.S., Manonayaki S. (2009): Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.* 50: 336-347.
33. Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. (1996): Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242: 84–89.
34. Roztočil, A. *et al.* (2011): *Moderní gynekologie*. 1. vyd. Grada Publishing, Praha.
35. Singh, P., Gupta, R., Patidar, D., Singh, R.K. (2014): Male infertility: causes and contributors. *IJPSR* 5: 2095-2112.
36. Su, D., Zhang, W., Yang, Y., Zhang, H., Liu, Y.Q., Bai, G., Ma, Y.X., Peng, Y., Zhang, S.Z. (2010): c.822+126T>G/C: a novel triallelic polymorphism of the TSSK6 gene associated with spermatogenic impairment in a Chinese population. *Asian J. Androl.* 12: 234-239.

37. Tomaiuolo, R., Fausto, M., Elce, A., Strina, I., Ranieri, A., Amato, F., Castaldo, G., De Placido, G., Alviggi, C. (2011): Enhanced frequency of *CFTR* gene variants in couples who are candidates for assisted reproductive technology treatment. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49: 1289-1293.
38. Tumurbaatar, I., Cizmecioglu, O., Hoffmann, I., Grummt, I., Voit, R. (2011): Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/Cyclin B activity. *PLoS One* 6: e14711.
39. Vacek, Z. (2006): *Embryologie*. Grada Publishing, Praha.
40. Wang, Y., Liška, F., Gosele, C., Šedová, L., Křen, V., Křenova, D, Ivics, Z., Hubner, N., Izsvák, Z. (2010): A novel active endogenous retrovirus family contributes to genome variability in rat inbred strains. *Genome Res.* 20: 19-27.
41. World Health Organization (2010): *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed., WHO, Geneva.
42. Xu, X., Toselli, P.A., Russell, L.D., Seldin, D.C. (1999): Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.* 23: 118-121.
43. Yang, K., Grzmil, P., Meinhardt, A., Hoyer-Fender, S. (2014): Haplo-deficiency of ODF1/HSPB10 in mouse sperm causes relaxation of head-to-tail linkage. *Reproduction* 148: 499-506.
44. Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., Yanagida, K., Sato, A., Toshimori, K., Noda, T. (2002): Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 11211-11216.
45. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., van der Poel, S. on behalf of ICMART and WHO (2009): The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum. Reprod.* 24: 2683-2687
46. Zhang, W., Zhang, S., Xiao, C., Yang, Y., Zhoucun, A. (2007): Mutation screening of the FKBP6 gene and its association study with spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. *Reproduction* 133: 511-516.
47. Zhou, J., Du, Y.R., Qin, W.H., Hu, Y.G., Huang, Y.N., Bao, L., Han, D., Mansouri, A., Xu, G.L. (2009): RIM-BP3 is a manchette-associated protein essential for spermiogenesis. *Development* 136: 373-382.
48. Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y., Yu, J. (2010): The next-generation sequencing technology and application. *Protein Cell* 1: 520-536.

49. Zhoucun, A., Zhang, S., Yang, Y. (2009): Mutations of the cyclin A1 gene are not a common cause of male infertility. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 55: 125-128.
50. Zvěřina, J. (2010): Poruchy mužské plodnosti. *Urolog. Pro Praxi* 11: 196-199.