

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta



Validace metody High Resolution Melting (HRM) pro účely DNA diagnostiky; mutační analýza genu cystické fibrózy a vybraných kandidátních genů u mužské infertility

Mgr. Petra Křenková

Disertační práce

Praha, 2013

Doktorský studijní program v biomedicině

Obor:	Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie
Školitel:	Doc. MUDr. Milan Macek, CSc.
Školitel konzultant:	Prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc.
Školící pracoviště:	Ústav biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice v Motole

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 25. 2. 2013

Petra Křenková

Identifikační záznam:

KŘENKOVÁ, Petra. *Validace metody High Resolution Melting (HRM) pro účely DNA diagnostiky; mutační analýza genu cystické fibrózy a vybraných kandidátních genů u mužské infertility [Validation of High Resolution Melting (HRM) for the purpose of DNA diagnostics; mutation analysis of the cystic fibrosis gene and selected candidates genes of male infertility]*. Praha, 2013, s. 149, př. 0. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK 2012. Vedoucí závěrečné práce Prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svým školitelům Prof. MUDr. Milanu Mackovi jr., DrSc. a Doc. MUDr. Milanu Mackovi, CSc. za příležitost pracovat na zajímavých projektech, za jejich ochotu a odbornou pomoc v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Za cenné odborné rady a přátelství děkuji RNDr. Peteru Vasovčákovi, PhD. a Mgr. Patricii Norambueně, PhD.

Děkuji i svým kolegům z pracoviště za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a zvláště pak svým rodičům a manželovi za jejich podporu.

ABSTRAKT

V posledních letech došlo k výraznému rozvoji molekulárně genetické diagnostiky (DNA diagnostiky). Jsou zaváděny nové metody a technologie a rozšiřováno spektrum genetických služeb. Jelikož výsledky genetických testů zárodečného genomu mohou celoživotně ovlivnit zdraví a kvalitu života pacienta i jeho rodiny, je kladen důraz na neustálé zvyšování kvality poskytovaných diagnostických služeb. Stále více laboratoří přechází z „domácích metod“ na komerční diagnostické soupravy, ale často pak svévolně modifikují protokoly výrobce. Proto je pro zajištění kvality genetických testů nezbytné všechny metody a technologie před zavedením do rutinní diagnostické praxe řádně validovat a verifikovat.

V této dizertační práci jsem se věnovala otázce vhodnosti a využitelnosti metody High Resolution Melting (HRM) v diagnostice na základě její kompletní validace dle mezinárodních požadavků normy na řízení systému jakosti (ISO 15189). Potvrdili jsme užitečnost této metody a její výhody pro mutační skenování neznámých variant i genotypizaci častých polymorfismů, a to na příkladu různých genů (*BRCA1*, *MTHFR* či *CFTR*). Zároveň jsme poskytli metodické pokyny a postupy pro usnadnění diagnostické implementace této technologie a umožnění jejího úspěšného využití i v dalších genetických laboratořích, a na příkladu validace HRM poskytli návody a model pro validaci dalších DNA diagnostických metod.

O zvýšení kvality poskytovaných genetických služeb jsme se zasadili i v oblasti diagnostiky cystické fibrózy (CF). Toto frekventované monogenní onemocnění je charakterizováno velkým množstvím identifikovaných mutací v genu *CFTR* a molekulární heterogenitou v závislosti na etnicitě probanda, proto je znalost distribuce a četnosti mutací tohoto genu v každé populaci klíčová. Molekulárně genetickými studiemi jsme zmapovali spektrum mutací u českých a ukrajinských pacientů s CF, neboť identifikace obou kauzálních mutací podpoří klinickou diagnózu, umožní předpovědět průběh onemocnění, individuálně stanovit léčbu, poskytnout spolehlivou prenatální diagnostiku a stanovit přenos těchto alel a rizik u dalších rodinných příslušníků. Vysoká populační záchytnost umožní zavedení novorozeneckého skríningu, který vyhledá postižené pacienty

v preklinickém stádiu. Včasné stanovení diagnózy a brzká aplikace léčby příznivě ovlivní průběh choroby a zároveň sníží náklady na léčbu.

V současné době je věnována velká pozornost problematice neplodnosti, neboť postihuje až 15% párů a dochází k jejímu nárůstu. Muž se na neplodnosti páru podílí v přibližně 50% případů. Po vyloučení rutinně vyšetřovaných příčin mužské neplodnosti (např. mutace v genu cystické fibrózy, Klinefelterův syndrom, strukturální abnormality Y chromozomu, prodělané záněty varlat virem příušnic, tumor atd.) nadále zůstává mnoho případů neobjasněno. Proto jsem se v rámci tohoto studia zabývala analýzou protaminových genů (*PRM1*, *PRM2*), neboť plní stěžejní funkci při diferenciaci spermií a bylo prokázáno, že myši haploinsuficientní pro jeden z protaminových genů vykazují poruchu uspořádání chromatinu, jaderné integrity a produkují spermie abnormální morfologie a snížené pohyblivosti, které nejsou schopné oplodnit oocyt. Na reprezentativním souboru německých teratozoospermických mužů s normálním počtem spermií (simulující fenotyp PRM-haploinsuficientní myši) a mužů se sníženým počtem spermií, včetně souboru normozoospermických mužů jako kontrol, byla provedena mutační analýza protaminových genů zkoumající vliv případných mutací na poruchu spermiogeneze. Podařilo se nalézt statisticky signifikantní asociaci mezi haplotypem ACC, tvořeným třemi častými polymorfismy genů *PRM1/2*, a koncentrací spermií a jejich celkovým počtem. Homozygotní nosiči haplotypu ACC měli dvojnásobně vyšší počet spermií než muži bez tohoto haplotypu ($45 \times 10^6/\text{ml}$ x $24.2 \times 10^6/\text{ml}$). Je možné, že spermie nosičů jiného než ACC haplotypu nejsou životaschopné či podléhají negativní selekci. Pro určení klinického významu tohoto zjištění a jeho případného diagnostického využití je však potřeba nález ověřit studiiemi na dalších souborech a populacích.

Klíčová slova: High Resolution Melting, HRM, validace, cystická fibróza, *CFTR* gen, mutace, mužská neplodnost, protaminy

ABSTRACT

During the last years we have observed a rapid development of molecular genetic diagnostics (DNA diagnostics). New methods and technologies are rapidly being introduced and the spectrum of genetic services is gradually extended. Since germline genetic tests might have lifelong influence health and quality of patient's life, all efforts should aim at improvement of the overall quality of provided diagnostic services. An increasing number of laboratories replace their “in-house” developed techniques by the commercial diagnostic assays, but they often modify manufacturer's instructions. Therefore, it is necessary to validate and verify all methods and techniques before their implementation into routine DNA diagnostics.

In this thesis I have focused on evaluation and application of High Resolution Melting (HRM) in clinical diagnostic practice based on its comprehensive validation, according to the major international quality assurance standard ISO 15189. On the model of selected genes (*BRCA1*, *MTHFR*, *CFTR*) we have confirmed the high utility of HRM for mutation scanning of unknown variants, as well as genotyping of common variants. Concurrently, we have provided a list of methodical guidelines which could be applied for setting up HRM in other genetic laboratories and provided a diagnostic validation strategy for other DNA diagnostic techniques.

Furthermore, we have contributed to the higher quality of genetic services in the area of diagnostics of cystic fibrosis. This common life-threatening autosomal recessive disease is known for a substantial number of mutations in the *CFTR* gene and for its molecular heterogeneity based on the patient's ethnicity. Therefore, it is important to analyse mutation distribution and frequency of *CFTR* gene mutations among different populations. In this thesis, I have presented a comprehensive overview of *CFTR* mutations at Czech and Ukrainian CF patients, since identification of both causal mutations will support a clinical diagnosis, allow clinical prognosis, individually assess appropriate medical treatment, provide a reliable prenatal diagnostics and determine the risk for other family members. The high population detection rate will enable implementation of CF newborn screening, which helps to find CF patients before symptom occurrence. Such an

early establishment of CF diagnosis and an immediate application of medical treatment favourably influence the overall clinical outcome and reduce the costs for treatment in this disease.

Human infertility is a serious medical and socio-economic issue since it currently affects approximately 15% of couples and this number is still increasing. The “male factor” in reproductive failure accounts for 50% of all cases, while many causes still remain unknown. Therefore, we performed a mutation analysis of protamine genes (*PRM1* and *PRM2*), as they play a crucial role in differentiation of spermatids. It was demonstrated that knockout (KO) of either protamine gene in mice results in male infertility due to an alteration in sperm chromatin assembly and nuclear integrity. These *Prm1* or *Prm2* haploinsufficient mice produce sperm exhibiting abnormal morphology, combined with reduced motility and are thus unable to fertilize an oocyte. We sequenced both genes in representative groups of German idiopathic infertile patients with distinct teratozoospermia and normal (resembling the phenotype of the KO mice) or reduced sperm concentration and in normozoospermic men as a control, in order to investigate the impact of protamine gene sequence variations on spermatogenesis. We have revealed a statistical significant association of ACC haplotype, formed by the three common SNPs of *PRM1/2* genes, and sperm concentration/count. Homozygous carriers of ACC haplotype had a twofold higher sperm concentration and count than men lacking this haplotype (45x10⁶/mL x 24.2x10⁶/mL). Spermatozoa without the ACC haplotype might not be viable or might be subjected to negative selection. For the clinical impact of this finding and its implementation to the diagnostics it is necessary to confirm results by other studies on different cohorts and/or populations.

Key words: High Resolution Melting, HRM, validation, cystic fibrosis, *CFTR* gene, mutations, male infertility, protamines

OBSAH

1. ÚVOD	11
1.1 IMPLEMENTACE NOVÝCH METOD DO GENETICKÉ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY NA PŘÍKLADU HRM	11
1.1.1 Validace a verifikace.....	11
1.1.2 High Resolution Melting.....	13
1.2 PORUCHY PLODNOSTI	18
1.2.1 Přehled příčin poruch plodnosti	18
1.2.2 Spermatogeneze a hodnocení spermogramu.....	24
1.2.3 Protaminy a mužská neplodnost.....	28
1.2.4 Cystická fibróza a gen CFTR.....	33
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	43
3. VÝSLEDKY, DISKUZE A PŘILOŽENÉ PUBLIKACE	45
3.1. VAN DER STOEP, ET AL. (2009) DIAGNOSTIC GUIDELINES FOR HIGH-RESOLUTION MELTING CURVE (HRM) ANALYSIS: AN INTERLABORATORY VALIDATION OF BRCA1 MUTATION SCANNING USING THE 96-WELL LIGHTSCANNER. HUM MUTAT. (IF: 5.686).....	45
3.2. NORAMBUENA, ET AL. (2009) DIAGNOSTIC METHOD VALIDATION: HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) OF SMALL AMPLICONS GENOTYPING FOR THE MOST COMMON VARIANTS IN THE MTHFR GENE. CLIN BIOCHEM. (IF: 2.076)	80
3.3. KŘENKOVÁ, ET AL. (2009) EVALUATION OF HIGH-RESOLUTION MELTING (HRM) FOR MUTATION SCANNING OF SELECTED EXONS OF THE CFTR GENE. FOLIA BIOL (PRAHA). (IF: 1.151)	91
3.4. MAKUKH ET AL. (2010) A HIGH FREQUENCY OF THE CYSTIC FIBROSIS 2184INSΔ MUTATION IN WESTERN UKRAINE: GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS, RELEVANCE FOR NEWBORN SCREENING AND GENETIC TESTING. J CYST FIBROS. (IF: 3.190).....	98
3.5. KŘENKOVÁ ET AL. (2012) DISTRIBUTION OF CFTR MUTATIONS IN THE CZECH POPULATION: POSITIVE IMPACT OF INTEGRATED CLINICAL AND LABORATORY EXPERTISE, DETECTION OF NOVEL/DE NOVO ALLELES AND RELEVANCE FOR RELATED/DERIVED POPULATIONS. J CYST FIBROS. (IF: 3.190).....	105
3.6. TÜTTELMANN ET AL. (2010) A COMMON HAPLOTYPE OF PROTAMINE 1 AND 2 GENES IS ASSOCIATED WITH HIGHER SPERM COUNTS. INT J ANDROL. (IF: 3.591)	113
4. ZÁVĚR	125
5. PŘEHLED PUBLIKACÍ, POSTERŮ A PŘEDNÁŠEK	127
5.1. PUBLIKACE	127
5.2. POSTERY	129
5.3. PŘEDNÁŠKY	132
5.4. OSTATNÍ	133
6. SEZNAM ZKRATEK	134
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	136

1. ÚVOD

1.1 Implementace nových metod do genetické laboratorní diagnostiky na příkladu HRM

Dosud se v klinické diagnostické praxi rutinně vyšetřovala pouze malá část genů u omezené skupiny známých monogenních onemocnění. Rovněž spektrum vyšetřovaných mutací bylo zpravidla menší, než počet všech známých mutací v konkrétním genu. To bylo dáno především omezenou technickou kapacitou dostupných metod či jejich finanční nákladností. Z tohoto důvodu bylo nutné rozvinout nové metody. S tím souvisí potřeba řešit problematiku organizace práce a kontrol jakosti (akreditace podle norem ISO), potřeba stanovit obecná doporučení a pokyny pro zavádění nových molekulárně genetických metod a jejich validaci.

Za tímto účelem vznikl projekt Eurogentest1 (www.eurogentest.org), který v průběhu let 2005-2010 řešil harmonizaci a standardizaci genetického testování v Evropské unii (EU) pomocí integrace roztržštěných národních aktivit v této oblasti. Projekt vytvořil potřebnou infrastrukturu a prostředky, pokyny a procedury, které měly zajistit zlepšování kvality poskytovaných genetických služeb v EU (Macek et al. 2007, Mattocks et al. 2010). V následném projektu Eurogentest2 došlo k zachycení nových trendů, tj. především zavádění sekvenování nové generace do klinicko-diagnostické praxe.

1.1.1 Validace a verifikace

Výsledky genetických testů zárodečného genomu mohou ovlivnit zdraví a kvalitu života pacienta i jeho rodiny, proto provádět DNA diagnostiku o dostatečné kvalitě je profesní povinností každé laboratoře. Dosažení těchto předpokladů napomůže zavedení akreditace, tj. zavedení systému managementu kvality, podle normy ISO 15189. Akreditace, neboli úřední potvrzení kompetence laboratoře, vyžaduje zavedení pořádku do

laboratorní dokumentace, pravidelnou údržbu a kalibraci přístrojové techniky, ale především používání řádně validovaných a verifikovaných metod.

Validace je potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Potvrzuje, že měřicí postup/systém/výrobek je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací.

Rozsah a hloubka validace musí vždy odpovídat potřebě získat dostatek údajů k rozhodnutí, zda je metoda či technologie skutečně vhodná pro zamýšlený účel. Validace nových technologií by měla být provedena před jejich zavedením do laboratorního provozu v širokém měřítku, a to nejlépe na vícero pracovištích v rámci tzv. mezilaboratorní validační studie. Důraz by měl být kladen na podrobné prozkoumání kritických parametrů a limitací metody i na identifikaci možných zdrojů interference.

Metody validované výrobcem disponující značením CE vyžadují nižší rozsah validace než metody typu „in-house“ vyvinuté samotnou laboratoří a v takovém případě provádíme pouze verifikaci, tj. ověření, že měřicí postup/systém/výrobek je ve shodě s hodnotami deklarovanými výrobcem a je plně funkční v konkrétní laboratoři. Předmětem verifikace je tedy schopnost realizovat měřicí proces v konkrétní laboratoři v daném čase a prostoru.

Molekulárně genetické testy se řadí do kategorie testů kvalitativních, jejichž diagnostická přesnost je charakterizována dvěma komponentami: 1/ senzitivitou - pravděpodobnost pozitivního výsledku testu v případě přítomnosti hledané varianty testovaného znaku, je vyjadřována jako poměr mezi správnou pozitivitou (*True Positivity TP*) a součtem správné positivity a falešné negativity (*False Negativity FN*), tj. $TP/(TP+FN)$ a 2/ specificitou - pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku, je vyjadřována jako poměr mezi správnou negativitou (*True Negativity TN*) a součtem správné negativity a falešné positivity (*False Positivity FP*), tj. $TN/(TN+FP)$. Další doporučované validační parametry jsou: 1/ opakovatelnost - preciznost měření stanovená opakováním měření za totožných podmínek v krátkém časovém úseku (stejný postup, stejný obslužný personál, stejný měřicí

system, stejné pracovní podmínky a stejné místo), 2/ reprodukovatelnost - preciznost měření v rámci různých sérií či mezi různými laboratořemi v různém čase, 3/ robustnost - schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku (např. typ izolace DNA, koncentrace DNA v reakci, změna počtu cyklů při amplifikaci atd.).

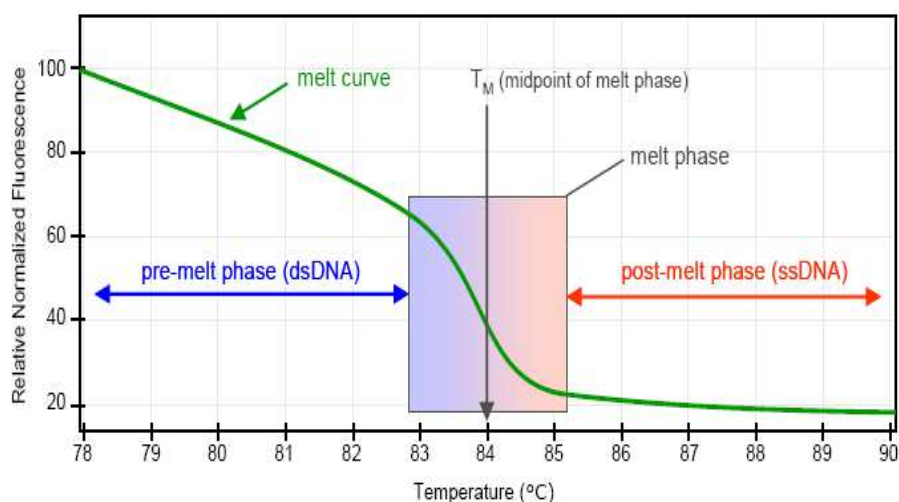
1.1.2 High Resolution Melting

Ačkoliv je Sangerovo sekvenování stále považováno za „zlatý“ standard pro záchyt neznámých mutací, je potřeba vyvíjet nové metody, které by redukovaly náklady a časovou náročnost jednotlivých vyšetření. Existuje velké množství metod, které jsou založeny na běžném laboratorním vybavení bez nutnosti nákladné počáteční investice, které zachytí změny v nukleotidové sekvenci DNA a identifikují tak oblast, ve které se mutace nachází, čímž se minimalizuje potřeba sekvenace. Jsou to například SSCP (single-strand conformation polymorphism analysis) (Orita et al. 1989), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Lerman and Silverstein 1987), TGCE (temperature gradient capillary electrophoresis) (Li et al. 2002a), TTGE (temporal temperature gradient electrophoresis), dHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) (Xiao and Oefner 2001), HA (heteroduplex analysis) (Highsmith et al. 1999) atd. Dosud bezkonkurenční alternativou na poli detekce mutací se však zdá být vysokorozlišovací analýza křivek tání (High Resolution Melting, HRM) (Wittwer et al. 2003, Erali et al. 2008), která umožňuje vysoce výkonné mutační skenování jednonukleotidových variant (SNPs, single nucleotide polymorphisms) i menších delecí a inzercí (White et al. 2006), genotypizaci (Norambuena et al. 2009) či metylační analýzu (Wojdacz and Dobrovic 2007).

Princip této metody spočívá v analýze křivek tání s vysokým rozlišením. DNA se za postupně se zvyšující teploty přeměňuje z dvouřetězcové molekuly na jednořetězcovou, kdy přítomnost mutace v heterozygotní formě v sekvenci DNA má za následek výskyt nekomplementárních bází, tj. taková molekula je méně stabilní a denaturuje při nižší teplotě. Postupným táním dvouřetězcové DNA se uvolňuje fluorescenční barvivo, jehož intenzita je snímána a zaznamenána přístrojem s citlivým fluorescenčním detektorem.

Výsledkem je tzv. křivka tání (Obr. 1), která popisuje závislost intenzity fluorescence na teplotě. Tato křivka se skládá ze třech částí. Z tzv. pre-melt fáze, kdy je v reakci přítomna DNA pouze ve dvouřetězcové formě (dsDNA) a intenzita fluorescence je nejvyšší. Postupným zvyšováním teploty dochází k denaturaci dvouřetězcových molekul, což se projeví prudkým poklesem intenzity fluorescence. Tato fáze se nazývá melt fáze, tj. fáze tání. Inflexní bod křivky je označován jako T_M (teplota tání, melting temperature). Poslední fáze, označovaná jako post-melt, je charakteristická přítomností pouze jednořetězcových molekul DNA (ssDNA) a tedy minimální fluorescence.

Obr. 1 Křivka tání



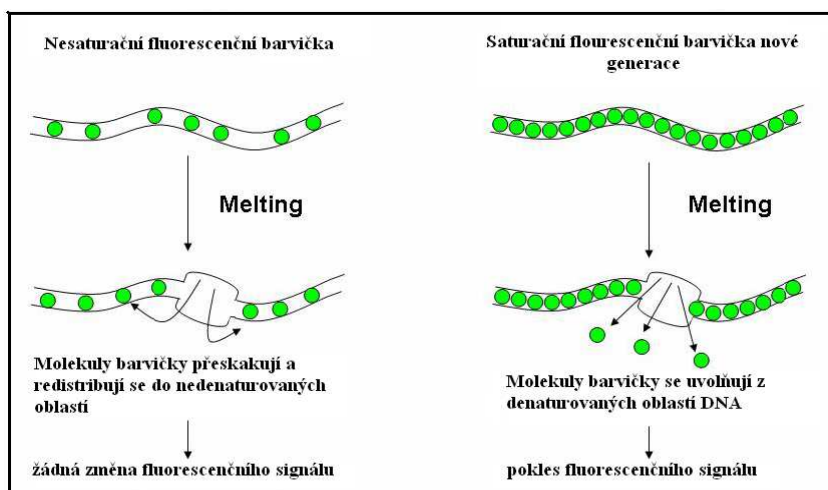
manuál CorProtocol 6000, Corbett, 2006

HRM využívá principu analýzy heteroduplexů. Po amplifikaci heterozygotního vzorku, který nese dvě alely téhož genu lišící se v jediné bázi, se provede tepelná denaturace s následnou reasociací jednotlivých řetězců. Vzniknou tak čtyři různé produkty: dva homoduplexy vykazující klasické Watson-Crickovo párování bází a dva heteroduplexy s „mismatch“ párováním bází. Všechny čtyři duplexy mají odlišné fyzikální vlastnosti, zejména se liší v teplotě, při níž dvouřetězce disociují (tj. „tají“). Vzorek se standardní „wildtype“ sekvencí či s mutací v homozygotní formě bude vytvářet pouze jeden typ homoduplexů, kde všechny báze budou párovat. Po HRM analýze bude každý duplex produkovat charakteristický disociační profil, tj. křivku tání. Přítomnost heteroduplexů v reakci se projeví snížením T_M a změnou tvaru křivky tání. Naproti tomu vzorek s mutací

v homozygotní formě se projeví pouze posunem T_m oproti křivce standardní. Tyto změny jsou malé, ale pomocí HRM přístrojů mohou být spolehlivě zachyceny (Reed and Wittwer 2004).

HRM spočívá v přípravě PCR v přítomnosti speciálního fluorescenčního barviva, které je plně saturační. Tím se redukuje redistribuce barviva během denaturace a zachytí se změny intenzity fluorescence s vysokým rozlišením. Tyto barviva lze používat v koncentracích dostatečně vysokých pro kompletní saturaci všech dvouřetězcových molekul, aniž by to inhibovalo amplifikaci (Wittwer et al. 2003) (Obr. 2).

Obr. 2 Saturační model fluorescenčního barviva používaného při HRM



White et al. 2006

HRM představuje rychlou, technicky i finančně nenáročnou, přesto vysoce výkonnou senzitivní metodu (Er and Chang 2012). Vyžaduje pouze použití standardních PCR reagensí, speciální dsDNA vázajícího fluorescenčního barviva a přístroje umožňujícího HRM. Jedná se o metodu v „uzavřené zkumavce“, tj. amplifikace i samotná analýza jsou provedeny ve stejné zkumavce bez potřeby další post-PCR manipulace, což výrazně snižuje riziko kontaminace (Gundry et al. 2003). Není třeba ani separační krok, který vyžadují ostatní skenovací metody, což snižuje časovou náročnost analýzy. Metoda je nedestruktivní, PCR produkty je možné po HRM analýze následně použít na sekvenční

analýzu. Srovnávacích studie potvrdily stejnou nebo vyšší senzitivitu HRM v porovnání se současně používanými skenovacími metodami (Chou et al. 2005, White et al. 2006).

HRM je vysoce senzitivní metoda, která umožňuje detekovat i jednonukleotidové změny. Různé SNPs však ovlivňují teplotu tání (T_m) s rozdílnou intenzitou, proto byly definovány čtyři třídy SNPs. Nejsnáze lze detekovat 1. SNP třídu, tj. substituce C>T a G>A, které způsobují největší změnu T_m – až $0,5^\circ\text{C}$. V lidském genomu se tyto změny vyskytují nejčastěji (64 %). Nejhůře se detekují substituce A>T, které způsobují velmi malou změnu T_m – méně jak $0,2^\circ\text{C}$. Naštěstí jsou tyto substituce vzácné, vyskytují se jen v 7 % případů (Venter et al. 2001).

Byl prokázán vliv délky amplikonu na senzitivitu a specifitu metody, kdy nejvhodnější pro HRM jsou produkty do 400 bp. V produktech o větší délce jsou změny v profilu tání způsobené přítomností mutací menší, což vede k falešné negativě a ke snížení detekční citlivosti metody. Zároveň výsledky naznačily, že není prokazatelný vztah mezi pozicí SNP v amplikonu a detekční citlivostí (Reed and Wittwer 2004). Jelikož T_m amplikonu se odvíjí také od iontového složení reakční směsi, je velice důležité izolovat DNA stejným extrakčním způsobem (Liew et al. 2004). DNA vzorky různého stáří a izolované rozličným způsobem se doporučují přečistit a rozpustit ve stejném pufru. Hodnotu T_m ovlivňuje i koncentrace DNA, proto je důležité použít do výchozí reakce vzorky DNA o shodných koncentracích. Výhodou je monitorování průběhu amplifikace pomocí real-time PCR (RT-PCR), jen tak je možné se ujistit, že všechny vzorky dosáhly fáze plateau a že v analyzovaných vzorcích je stejné množství DNA bez ohledu na počáteční koncentraci v reakci. Stejně tak by měla být dodržena uniformita mezi vzorky i v dalších směrech. Je nezbytné, aby měly vzorky naprosto shodný objem a aby obsahovaly stejnou koncentraci fluorescenčního barviva. Disociační chování DNA může být ovlivněno i solemi, proto musí být v reakcích přítomné stejné množství pufru i MgCl_2 . Pro robustní a reprodukovatelnou HRM je také nezbytné správné navržení primerů, kritickým parametrem je i optimalizace PCR. Přítomnost primer dimerů, některých sekvenčních motivů (např. vlásenek) a jiných sekundárních struktur, nespecifických produktů, oblastí s výrazně nízkým či naopak vysokým obsahem bazí G a C a sekvencí s opakujícími se

motivů výrazně ovlivňuje křivku tání a vede k falešně pozitivním výsledkům (Erali and Wittwer 2010).

HRM umožňuje, vyjma mutační skenování, kdy je nezbytné pozitivní záchyt sekvenovat, i genotypizaci známých mutací a polymorfismů, ať už metodou malých amplikonů (Liew et al. 2004) či s využitím nezačtených prób (Zhou et al. 2004). Oproti běžným genotypizačním metodám má HRM řadu výhod - obejde se bez potřeby fluorescenčně značených prób, nevyžaduje monitorování amplifikace pomocí RT-PCR a pomocí jedné próby může být detekováno i více alel (Zhou et al. 2004). Genotypizace metodou malých amplikonů využívá poznatku, že čím kratší je testovaný amplikon, tím zřejmější je změna T_m mezi jednotlivými genotypy. Zároveň použití malých amplikonů do 50 bp umožní zkrácení amplifikačních časů a urychlí analýzu (Liew et al. 2004).

Mnoho publikací dokumentovalo úspěchy HRM. Herrmann et al. (2006) provedli srovnávací studii za použití různých HRM přístrojů a fluorescenčních barviv. White et al. (2006) ve své studii hodnotili senzitivitu a specifitu tří přístrojů používaných pro HRM. Chou et al. (2005) provedli srovnání detekční citlivosti HRM s dHPLC. Wittwer et al. (2003), Liew et al. (2004), Reed and Wittwer (2004), Zhou et al. (2004), Graham et al. (2005), Willmore-Payne et al. (2005), Dufresne et al. (2006), Margraf et al. (2006), Montgomery et al. (2007), Gundry et al. (2008), Audrezet et al. (2008) či Grievink and Stowell (2008) popsali na příkladu různých genů úspěšné použití HRM pro mutační skenování či genotypizaci. Zhou et al. (2005) jako první popsali možné paralelní mutační skenování a genotypizaci v jedné reakci, které je umožněné použitím asymetrické PCR. Poměr primerů 1:5 až 1:10 v reakci umožní dostatečný vznik dvouřetězcových produktů pro skenování i dostatečné množství jednořetězcových produktů pro nasednutí prób.

Žádná z publikací se však nezabývá tematikou validace HRM a její implementace do diagnostické praxe dle požadavků norem řízení kvality (ISO 15189), proto jsme se věnovali této problematice v rámci evropského projektu EuroGentest. Problematika validace HRM byla na našem pracovišti dále rozvíjena na modelu genotypizace mutací c.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) a c.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A) v genu pro methylenetetrahydrofolátreduktázu (*MTHFR*) a na příkladu mutačního skenování vybraných exonů genu *CFTR* u cystické fibrózy.

1.2 Poruchy plodnosti

V posledních desetiletích dochází k nárůstu počtu párů s poruchami plodnosti. Tyto poruchy jsou Světovou zdravotnickou organizací (WHO) definovány jako stav, kdy nedojde k otěhotnění za 12 měsíců nechráněného pohlavního styku (Zegers-Hochschild et al. 2009). Udává se, že pomoc pro poruchu plodnosti vyhledá 15 % párů (De Kretser and Baker 1999), kdy se předpokládá přibližně stejný podíl ženského a mužského faktoru na příčině neplodnosti.

1.2.1 Přehled příčin poruch plodnosti

Tyto příčiny lze rozdělit do třech základních kategorií: negenetické, genetické a idiopatické.

U negenetických příčin je neplodnost způsobena fyziologickou, anatomickou, endokrinní, hematologickou či imunologickou poruchou, infekcí nebo psychosociální zátěží (Ulcova-Gallova et al. 2002, Wischmann et al. 2001, Walker 2000). U žen mezi nejdůležitější faktory ovlivňující fertilitu patří věk, jenž se odráží na zdravotním stavu ovárií, oocytů a uteru. Uplatňují se i negativní vlivy prostředí, jako například kontaminace těžkými kovy, vliv radiace, alkoholu a drog (Li et al. 2002b). I u mužů hraje věk významnou roli, kdy velké množství buněčných dělení při vzniku spermatogonií poskytuje prostor pro možné chyby v replikaci a potomci mužů nad 45 let mohou být více ohroženi autozomálně dominantními poruchami v důsledku *de novo* mutací, např. achondroplázií (Kuhnert and Nieschlag 2004). Negativní dopady na kvalitu ejakulátu a tudíž mužskou fertilitu má i zvýšený výskyt umělých estrogenů nebo estrogenům podobných látek v životním prostředí a některé virové infekce (např. příušnice).

Z genetických příčin, které mohou způsobit neschopnost otěhotnět, jsou to především numerické a strukturální odchylky gonozomů, strukturální aberace autozomů i odchylky na úrovni genů, tj. mutace.

Správná diferenciacce pohlaví, která je determinována na základě pohlavních chromozomů (X, Y), je základním krokem k dosažení fertility. Mezi nejčastější příčiny aberantní determinace pohlaví patří numerické odchylky gonozomů. Ty jsou poměrně časté, kdy mozaiky chromozomu X (45X/46XX, patologická linie do 10% všech hodnocených buněk) bývá nejčastějším cytogenetickým nálezem při vyšetřování infertilních párů. Monozomie X (45,X), tj. Turnerův syndrom, jenž je jediná monozomie slučitelná se životem, je však daleko vzácnější, protože 99% postižených plodů je spontánně potraceno. Pro fenotyp dívek s Turnerovým syndromem je typická kožní duplikatura v oblasti krku, nízká hranice vlasů, malá postava a opožděné pohlavní vyžívání. Inteligence je normální, pacientky jsou schopné plnohodnotného života, avšak z důvodu ovariální dysgeneze jsou neplodné. I syndrom 47,XXX patří mezi klinicky významné příčiny poruch fertility. Ženy s trizomií X nebývají fenotypicky abnormální a jejich funkční gonády produkují gamety, ty však ve zvýšené míře nesou nadpočetný či naopak chybějící chromozom X, což vede ke vzniku chromozomálně abnormálního potomstva a k opakovaným spontánním potratům. Nadpočetný chromozom X v buňkách s chromozomem Y vede k vývoji chlapce postiženého Klinefelterovým syndromem (47,XXY). Ti obvykle bývají vysocí, hubení, s opožděným pohlavním dozríváním a neplodní, neboť se jim v gonádách nevytváří žádné spermie. Každý další nadpočetný chromozom X způsobuje snížení intelektu, zhoršení dysmorfických znaků a vývoje sekundárních pohlavních znaků.

Strukturní abnormality pohlavních chromozomů jsou vzácnější, avšak všechny aberace vedoucí k jejich imbalanci (především delece) ohrožují fertilitu, neboť jsou zasaženy důležité oblasti nesoucí geny, které se přímo podílejí na tvorbě gonád v mužskou či ženskou pohlavní žlázu a na její schopnosti tvořit gamety. U žen je nejčastěji nalézán izochromozom dlouhého raménka X, kdy je dlouhé raménko duplikované, zatímco krátké chybí. Pacientka je postižena sterilitou v důsledku parciální monozomie krátkého raménka tohoto chromozomu. Parciální trizomie dlouhého raménka chromozomu X se nevyznačuje

abnormálním fenotypem a gametogenezi tak neovlivňuje. U mužů bývá fertilita negativně ovlivněna delecemi genu SRY („sex determining region on chromosome Y“, tj. oblasti určující pohlaví na chromozomu Y), kdy mutace nebo delece tohoto genu vedou ke zvratu mužského pohlaví na ženské. SRY je exprimován v podpůrných buňkách nediferencované gonády a aktivuje expresi genu SOX9 („SRY [sex determining region Y]-box 9“), který umožní diferenciaci těchto buněk v Sertoliho buňky. Tyto buňky plní řadu důležitých funkcí: a/ indukují diferenciaci primordiálních zárodečných buněk ve spermatogonie, b/ produkují AMH (anti-müllerický hormon), který inhibuje tvorbu Müllerova vývodu a tak zamezuje vývoji dělohy a vaječníků, c/ indukují diferenciaci Leydigových buněk, které produkují androgeny (tj. testosteron), jenž prostřednictvím androgenního receptoru (AR) částečně řídí sestup varlete a jsou tak plně odpovědné za maskulinizaci zevního genitálu. Mutace či delece genu SOX9 tedy vedou u jedinců s karyotypem 46,XY k vývoji ženského pohlaví, naopak přítomnost tohoto genu u jedinců s karyotypem 46,XX způsobí zvrát v mužské pohlaví. Mutace v genu pro AR (lokalizovaného na X chromozomu) způsobují syndrom necitlivosti k androgenům, tj. testikulární feminizaci. Jedincům s chromozomální konstitucí XY se vyvine ženský zevní genitál, přestože mají varlata a produkují testosteron. Zároveň varlata produkují AMH, díky čemuž tito jedinci nemají dělohu. Zvláštní znak je chybějící pubické a axilární ochlupení, jehož vývoj je také závislý na androgenech. Také delece jiných částí chromozomu Y mohou být příčinou mužské neplodnosti. Jsou to oblasti důležité pro správnou tvorbu spermií, označované jako azoospermické faktory AZFa, AZFb, AZFc (Poongothai et al. 2009).

Příčinou poruch reprodukce mohou být i strukturní aberace autozomů. Ty bývají balancované, tj. genetický materiál je v buňkách přítomen v nezměněném množství, avšak je odlišně uspořádán. Tyto přestavby nemají žádný fenotypický dopad, znamenají však riziko pro další generaci z důvodu vytváření nebalancovaných gamet a zvyšují riziko opakovaných spontánních potratů, intrauterinních úmrtí atd.

Významnou roli ve vzniku neplodnosti hrají i změny na úrovni genů, např. mutace genů hormonální osy „hypotalamus-hypofýza-gonáda-zevní pohlavní ústrojí“. Gonadotropiny uvolňující hormon (gonadotropin-releasing hormon, GnRH) produkovaný hypotalamem reguluje uvolňování hypofyzárních hormonů – gonadotropinů, např.

folikulostimulačního (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Tyto hormony mají důležitou roli ve stimulaci gonád, sekreci steroidních hormonů (estrogenů u žen, testosteronu u mužů) a produkci gamet (Ciccione and Kaiser 2009). Mutace v LH jsou vzácné (Achard et al. 2009) a dosud bylo popsáno jen několik málo mutací v β podjednotce LH asociovaných s infertilitou (Weiss et al. 1992, Ramanujam et al. 1999, Valdes-Socin et al. 2004, Lofrano-Porto et al. 2007, Valdes-Socin et al. 2009, Mafra et al. 2010). Také variantní β podjednotka (v-LH β), lišící se od klasické alely přítomností dvou jednonukleotidových záměn ve druhém exonu genu pro LH β způsobující záměnu Trp8Arg a Ile15Thr, byla častěji nalézána u neplodných žen (Takahashi et al. 1999, Takahashi et al. 2004, Du et al. 2012) a u žen s ovulačními poruchami (Ramanujam et al. 1999). U chlapců je tato alela spojována s pomalejším tempem pubertálního vývoje (Raivio et al. 1996). S poruchami plodnosti byly asociovány i mutace v genech pro gonadotropinové receptory - FSHR (Simoni et al. 1999, Ahda et al. 2005) a LHR, kde aktivační mutace LHR vedou k předčasné pubertě u chlapců (Nagasaki et al. 2010), inaktivační mutace mají za následek mužský pseudohermafroditismus či mikropenis (Latronico et al. 1996, Qiao et al. 2009). Polymorfismus Ser312Asn (záměna A/G v pozici 935 v 10. exonu genu LHR) je spojován s poruchou spermatogeneze u chlapců (Simoni et al. 2008). Gen pro LHR je také považován za kandidátní gen asociovaný s předčasným ovariálním selháním (Knauff et al. 2009).

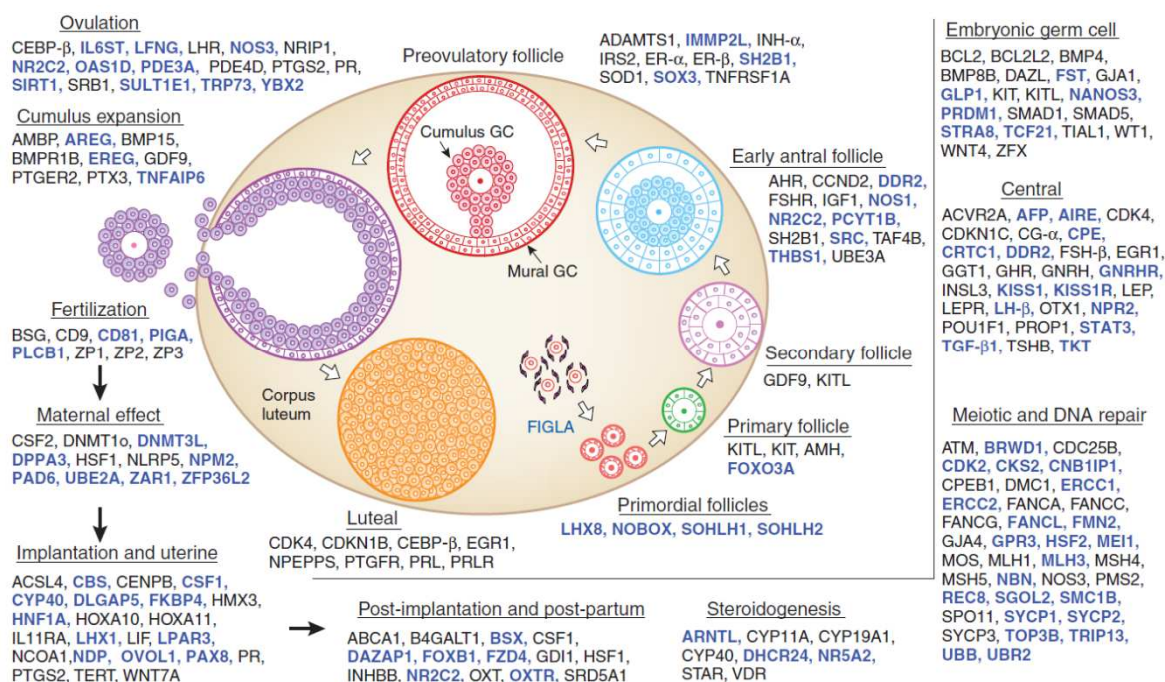
Mezi časté genetické příčiny poruch plodnosti patří i cystická fibróza, která se až u 98% nemocných mužů projevuje obstrukční azoospermií. Ta je způsobená agenezí chámovodů, v důsledku čehož je znemožněn průchod spermii z epididymis do ejakulačních vývodů (Denning et al. 1968, Ferlin et al. 2007). Cystická fibróza je dále podrobněji rozebrána v kapitole 1.2.4.

Konečně, nejen mutace ve výše uvedených genech mohou vést k reprodukčním neúspěchům, uplatňují se i mechanismy imprintingu, kdy metylace DNA určuje, zda je daný embryonální gen exprimován z maternálního či paternálního genomu a metylační profil je tak nezbytný pro správný vývoj zárodka (Emery and Carrell 2006, Kobayashi et al. 2007). Další z faktorů mužské infertility může být i aberantní mitochondriální DNA, která může způsobovat problémy s motilitou spermii (Piasecka and Kawiak 2003),

abnormální zkrácení telomer (Zalenskaya and Zalensky 2002, Hemann et al. 2001) či poruchy v kompaktaci jaderné DNA spermií (Venkatesh et al. 2011), které jsou podrobněji probrány v kapitole 1.2.3.

S ohledem na složitost procesů oogeneze a spermatogeneze a velkého množství genů, které se zde uplatňují (Obr. 3, Obr. 4) (Matzuk and Lamb 2008), je pochopitelné, že i přes aktivní snahu posledních let identifikovat všechny příčiny neplodnosti, stále velké procento případů zůstává neobjasněno (Nutti and Krausz 2008).

Obr. 3 Přehled genů uplatňujících se při oogenezi



Matzuk and Lamb 2008

Obr. 4 Přehled genů uplatňujících se při spermatogenezi

Genes					Cells	Function
<i>Acvr2a</i>	<i>Cldn11</i>	<i>Gdf1</i>	<i>Lhcgr</i>	<i>Serpina5</i>	Sertoli, peritubular, Leydig and/or interstitial cells	Growth factors and receptors Gonadotropin receptors Cell-cell adhesion Steroids and receptors Signal transduction Junctional complexes
<i>Adrab</i>	<i>Cyp17a1</i>	<i>Gdnf</i>	<i>Man2a2</i>	<i>Slc12a2</i>		
<i>Ar</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Sox8</i>		
<i>B4galnt1</i>	<i>Dhh</i>	<i>Hmga1</i>	<i>Nr0b1</i>			
<i>Bcl2l2</i>	<i>Dmr1</i>	<i>Hmgb2</i>	<i>Rbp4</i>			
<i>Cdkn2c</i>	<i>Dnaj1</i>	<i>Inha</i>	<i>Sf1</i>			
<i>Cdkn2e</i>	<i>Etv5</i>	<i>Kitl</i>	<i>Sbf1</i>			
<i>Adamts2</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Pi3K</i>	<i>Sycp2</i>	Spermatogonia (mitosis and apoptosis)	Proapoptotic, survival and cell cycle Apoptotic stem cells
<i>Apaf1</i>	<i>Dazl</i>	<i>Kit</i>	<i>Rbp4</i>	<i>Utp14b</i>		
<i>Bax</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Limk2</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Zbtb16</i>		
<i>Bmp8b</i>	<i>Dnmt3l</i>	<i>Nanos2</i>	<i>Slc19a2</i>			
<i>Csf1</i>	<i>Etv5</i>	<i>Pin1</i>	<i>Sohlh2</i>			
<i>Cdkn2d</i>	<i>Gdnf</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Stra8</i>			
<i>Adrab</i>	<i>Cdk2</i>	<i>Erc1</i>	<i>Ihpk1</i>	<i>Piwi12</i>	Spermatocytes (meiosis)	Chromosome pairing and synapsis Homologous recombination Genomic integrity DNA replication and repair
<i>Atm</i>	<i>Ccna1</i>	<i>Exo1</i>	<i>Limk2</i>	<i>Piwi14</i>		
<i>Bat3</i>	<i>Cks2</i>	<i>Fanca</i>	<i>Lmna</i>	<i>Pms2</i>		
<i>Bcl2</i>	<i>Cnb1ip1</i>	<i>Fkbp6</i>	<i>Mei1</i>	<i>Psmc3ip</i>		
<i>Bcl6</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Fus</i>	<i>Mh1</i>	<i>Rad51c</i>		
<i>Bcl2l2</i>	<i>Cpeb1</i>	<i>Gal3st1</i>	<i>Mlh3</i>	<i>Rara</i>		
<i>Bcl2l1</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Gnpat</i>	<i>Morc1</i>	<i>Rarb</i>		
<i>Bmp8a</i>	<i>Csda</i>	<i>H2afx</i>	<i>Msh4</i>	<i>Rec8</i>		
<i>Brc2</i>	<i>Dazap1</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Msh5</i>	<i>Slc25a4</i>		
<i>Btrc</i>	<i>Dmc1</i>	<i>Hsf1</i>	<i>Mybl1</i>	<i>Sgo2</i>		
<i>Bsg</i>	<i>Dmr1</i>	<i>Hsf2</i>	<i>Ovol1</i>	<i>Siah1a</i>		
<i>Bub1b</i>	<i>Egr4</i>	<i>Hspa2</i>	<i>Pafah1b2</i>	<i>Slc25a4</i>		
				<i>Smc1b</i>		
				<i>Sohlh1</i>		
				<i>Stx2</i>		
				<i>Spo11</i>		
				<i>Sycp1</i>		
				<i>Sycp2</i>		
				<i>Sycp3</i>		
				<i>Tert</i>		
				<i>Tex11</i>		
				<i>Tex14</i>		
				<i>Tex15</i>		
				<i>Trip13</i>		
				<i>Ubb</i>		
				<i>Ube2b</i>		
				<i>Ubr2</i>		
<i>Adamts2</i>	<i>Ddx25</i>	<i>Pank2</i>	<i>Ppp1cc</i>	<i>Tdrd1</i>	Spermatids (differentiation)	Cell remodeling Cytoplasmic extrusion Chromatin packaging Nuclear condensation Spermiation
<i>Bcl2l2</i>	<i>Fndc3a</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Pygo2</i>	<i>Tbpl1</i>		
<i>Cadm1</i>	<i>H1fnt</i>	<i>Pafah1b1</i>	<i>Rpb4</i>	<i>Theg</i>		
<i>Camk4</i>	<i>Hip1</i>	<i>Parp2</i>	<i>Rnf17</i>	<i>Tlp</i>		
<i>Cib1</i>	<i>Ihpk1</i>	<i>Piwi11</i>	<i>Six5</i>	<i>Tnp1</i>		
<i>Creml</i>	<i>Krt9</i>	<i>Prr1</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Tnp2</i>		
<i>Csnk2a</i>	<i>Lmtk2</i>	<i>Prr2</i>	<i>Slc4a2</i>	<i>Ube2b</i>		
<i>Cugbp1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Prnd</i>	<i>Styx</i>	<i>Ybx2</i>		
<i>Ace</i>	<i>Tekt2</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Pmd</i>	<i>Smpd1</i>	Spermatozoa (maturation, motility and fertilization)	Maturation in genital tract Capacitation Fertilization Nuclear decondensation Hyperactivated motility Sperm, zona and egg penetration
<i>Acr</i>	<i>Tekt3</i>	<i>Spag16</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Sperm1</i>		
<i>Adad1</i>	<i>Tekt4</i>	<i>Spag9</i>	<i>Spg6</i>	<i>Tssk6</i>		
<i>Adam2</i>	<i>Tnp1</i>	<i>Tsn</i>	<i>Taf7l</i>	<i>Zbbp</i>		
<i>Adam3</i>	<i>Tnp2</i>	<i>Vjpr2</i>		<i>Zbbp2</i>		
<i>Apob</i>	<i>Pcsk4</i>		Morph.			
<i>Bub1</i>	<i>Vdac3</i>		<i>Aff4</i>	Mot.		
<i>Clgn</i>		<i>Fhl5</i>	<i>Agtpbp1</i>	<i>Apob</i>		
<i>Csnk2a2</i>		<i>Gmcl1</i>	<i>Bbs2</i>	<i>Adcy3</i>		
<i>Dnahc1</i>	<i>Count</i>	<i>Nphp1</i>	<i>Bbs4</i>	<i>Adcy10</i>		
<i>Egr4</i>	<i>Adamts2</i>	<i>Nphp1</i>	<i>Cd59b</i>	<i>Akap4</i>		
<i>Inpp5b</i>	<i>Arl4</i>	<i>Prkar1a</i>	<i>Cd81</i>	<i>Agtpbp1</i>		
<i>Jund</i>	<i>Ahr</i>		<i>Csnk2a2</i>	<i>Atp2b4</i>		
<i>Klhl10</i>	<i>Apob</i>	OAT	<i>Gba2</i>	<i>Bbs1</i>		
<i>Pebp1</i>	<i>Gamt</i>	<i>Brdt</i>	<i>Gopc</i>	<i>Bbs4</i>		
<i>Prr1</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Cadm1</i>	<i>Gml01</i>	<i>CatSper1</i>		
<i>Prr2</i>	<i>Hspa4l</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Hrb</i>	<i>CatSper2</i>		
<i>Rbmx12</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Hook1</i>	<i>CatSper3</i>		
<i>Rxrb</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Gmcl1</i>	<i>I2rn</i>	<i>CatSper4</i>		
<i>Ros1</i>	<i>Rxfp1</i>	<i>Jam3</i>	<i>Sepp1</i>	<i>Cd59b</i>		
<i>Spnr</i>	<i>Sh2b1</i>	<i>Polg</i>	<i>Sept4</i>	<i>Cga</i>		
				<i>Filr</i>		
				<i>Gapdhs</i>		
				<i>Gm101</i>		
				<i>Inpp5b</i>		
				<i>Ldhc</i>		
				<i>Lrp8</i>		
				<i>Mthfr</i>		
				<i>Nsun7</i>		
				<i>Pgs1</i>		
				<i>Pitp</i>		
				<i>Pold4</i>		
				<i>Prkaca</i>		
				<i>Prkar1a</i>		
				<i>Ros1</i>		
				<i>Sirt1</i>		
				<i>Sic9a10</i>		
				<i>Smlf</i>		
				<i>Spc4</i>		
				<i>Sult1e1</i>		
				<i>Taido1</i>		
				<i>Tcf21</i>		
				<i>Tekt2</i>		
				<i>Tetk3</i>		
				<i>Tetk4</i>		
				<i>Tetk18</i>		
				<i>Tgfb1</i>		
				<i>Theg</i>		
				<i>Vdac3</i>		
				<i>Vdr</i>		
				<i>Wt1</i>		
				<i>Xist</i>		
				<i>Ybx2</i>		
				<i>Ybx3</i>		
				<i>Ybx4</i>		
				<i>Ybx5</i>		
				<i>Ybx6</i>		
				<i>Ybx7</i>		
				<i>Ybx8</i>		
				<i>Ybx9</i>		
				<i>Ybx10</i>		
				<i>Ybx11</i>		
				<i>Ybx12</i>		
				<i>Ybx13</i>		
				<i>Ybx14</i>		
				<i>Ybx15</i>		
				<i>Ybx16</i>		
				<i>Ybx17</i>		
				<i>Ybx18</i>		
				<i>Ybx19</i>		
				<i>Ybx20</i>		
				<i>Ybx21</i>		
				<i>Ybx22</i>		
				<i>Ybx23</i>		
				<i>Ybx24</i>		
				<i>Ybx25</i>		
				<i>Ybx26</i>		
				<i>Ybx27</i>		
				<i>Ybx28</i>		
				<i>Ybx29</i>		
				<i>Ybx30</i>		
				<i>Ybx31</i>		
				<i>Ybx32</i>		
				<i>Ybx33</i>		
				<i>Ybx34</i>		
				<i>Ybx35</i>		
				<i>Ybx36</i>		
				<i>Ybx37</i>		
				<i>Ybx38</i>		
				<i>Ybx39</i>		
				<i>Ybx40</i>		
				<i>Ybx41</i>		
				<i>Ybx42</i>		
				<i>Ybx43</i>		
				<i>Ybx44</i>		
				<i>Ybx45</i>		
				<i>Ybx46</i>		
				<i>Ybx47</i>		
				<i>Ybx48</i>		
				<i>Ybx49</i>		
				<i>Ybx50</i>		
				<i>Ybx51</i>		
				<i>Ybx52</i>		
				<i>Ybx53</i>		
				<i>Ybx54</i>		
				<i>Ybx55</i>		
				<i>Ybx56</i>		
				<i>Ybx57</i>		
				<i>Ybx58</i>		
				<i>Ybx59</i>		
				<i>Ybx60</i>		
				<i>Ybx61</i>		
				<i>Ybx62</i>		
				<i>Ybx63</i>		
				<i>Ybx64</i>		
				<i>Ybx65</i>		
				<i>Ybx66</i>		
				<i>Ybx67</i>		
				<i>Ybx68</i>		
				<i>Ybx69</i>		
				<i>Ybx70</i>		
				<i>Ybx71</i>		
				<i>Ybx72</i>		
				<i>Ybx73</i>		
				<i>Ybx74</i>		
				<i>Ybx75</i>		
				<i>Ybx76</i>		
				<i>Ybx77</i>		
				<i>Ybx78</i>		
				<i>Ybx79</i>		
				<i>Ybx80</i>		
				<i>Ybx81</i>		
				<i>Ybx82</i>		
				<i>Ybx83</i>		
				<i>Ybx84</i>		
				<i>Ybx85</i>		
				<i>Ybx86</i>		
				<i>Ybx87</i>		
				<i>Ybx88</i>		
				<i>Ybx89</i>		
				<i>Ybx90</i>		
				<i>Ybx91</i>		
				<i>Ybx92</i>		
				<i>Ybx93</i>		
				<i>Ybx94</i>		
				<i>Ybx95</i>		
				<i>Ybx96</i>		
				<i>Ybx97</i>		
				<i>Ybx98</i>		
				<i>Ybx99</i>		
				<i>Ybx100</i>		
				<i>Ybx101</i>		
				<i>Ybx102</i>		
				<i>Ybx103</i>		
				<i>Ybx104</i>		
				<i>Ybx105</i>		
				<i>Ybx106</i>		
				<i>Ybx107</i>		
				<i>Ybx108</i>		
				<i>Ybx109</i>		
				<i>Ybx110</i>		
				<i>Ybx111</i>		
				<i>Ybx112</i>		
				<i>Ybx113</i>		
				<i>Ybx114</i>		
				<i>Ybx115</i>		
				<i>Ybx116</i>		
				<i>Ybx117</i>		
				<i>Ybx118</i>		
				<i>Ybx119</i>		
				<i>Ybx120</i>		
				<i>Ybx121</i>		
				<i>Ybx122</i>		
				<i>Ybx123</i>		
				<i>Ybx124</i>		
				<i>Ybx125</i>		
				<i>Ybx126</i>		
				<i>Ybx127</i>		
				<i>Ybx128</i>		
				<i>Ybx129</i>		
				<i>Ybx130</i>		
				<i>Ybx131</i>		
				<i>Ybx132</i>		
				<i>Ybx133</i>		
				<i>Ybx134</i>		
				<i>Ybx135</i>		
				<i>Ybx136</i>		
				<i>Ybx137</i>		
				<i>Ybx138</i>		
				<i>Ybx139</i>		
				<i>Ybx140</i>		
				<i>Ybx141</i>		
				<i>Ybx142</i>		
				<i>Ybx143</i>		
				<i>Ybx144</i>		
				<i>Ybx145</i>		
				<i>Ybx146</i>		
				<i>Ybx147</i>		
				<i>Ybx148</i>		
				<i>Ybx149</i>		
				<i>Ybx150</i>		
				<i>Ybx151</i>		
				<i>Ybx152</i>		
				<i>Ybx153</i>		
				<i>Ybx154</i>		
				<i>Ybx155</i>		
				<i>Ybx156</i>		
				<i>Ybx157</i>		

1.2.2 Spermatogeneze a hodnocení spermogramu

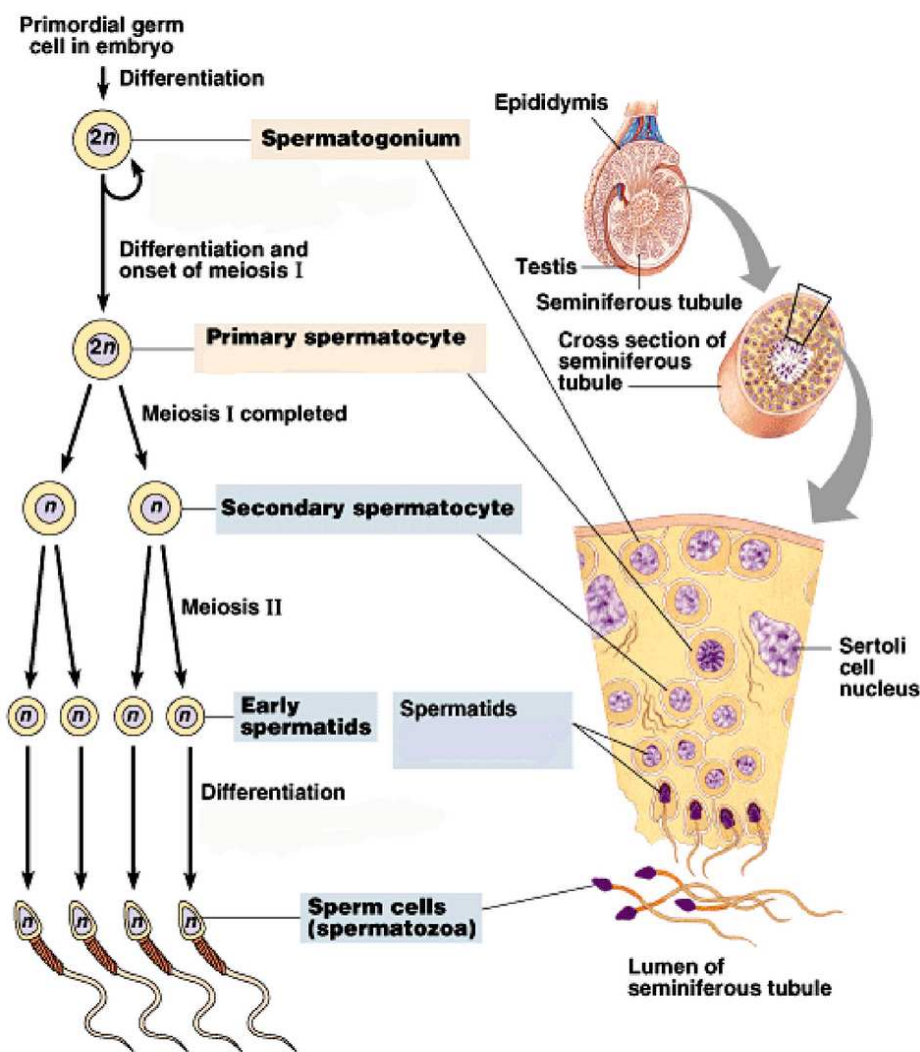
Spermatogeneze je složitý a vysoce specializovaný proces, jehož podstatou je transformace nediferencovaných pohlavních buněk (spermatogonií) ve zralé pohlavní buňky (spermie). Začíná v pubertě a za dostatečné stimulace pohlavními hormony (zejména testosteronem) probíhá po celý život muže.

Tvorba mužských pohlavních buněk probíhá za podpory Sertoliho buněk v semenotvorných kanálcích varlete mimo břišní dutinu, čímž se docílí o 2-3°C nižší teploty, která je potřebná pro správný průběh tohoto procesu. Spermie nevznikají v celém varleti naráz, ale ve vlnách v různých částech semenotvorných kanálků probíhají různé fáze vývoje (Obr. 5). Celý proces trvá přibližně 72 dní (\pm 2 dny).

Tvorba spermií má tři fáze: rozmnožovací, růstovou a zrání. Na počátku vývoje spermií jsou spermatogonie (kmenové buňky), které zůstávají v semenotvorném kanálku jedince po celý život. Mitoticky se dělí a vznikají primární spermatocyty (spermatocyty I. řádu). Ty jsou diploidní, avšak po prvním meiotickém dělení z nich vznikají haploidní sekundární spermatocyty (spermatocyty II. řádu). Ty mají stále zdvojené chromatidy, proto záhy dochází k druhému meiotickému dělení, jehož produktem jsou haploidní spermatidy. Po celou dobu zůstávají vyvíjející se pohlavní buňky navzájem propojené cytoplazmatickými můstky, což umožňuje synchronizaci vývoje vždy jedné populace pohlavních buněk. Spermatidy poté prochází procesem spermiogeneze, tj. postupné úpravy haploidní spermatidy na morfologicky zralou spermii, při které dochází k maximální kondenzaci chromatinu díky náhradě histonů za protaminy (viz. kapitola 1.2.3). Během tohoto procesu lze rozeznat tři vývojové kategorie spermatid: časné spermatidy s kruhovým jádrem, spermatidy s protáhlým jádrem a zralé spermatidy s jádrem kondenzovaným (Dadoune 1995). Vytvoří se bičík, kde centriola funguje jako templát pro jeho tvorbu. V jeho bázi se koncentrují mitochondrie a vytváří tzv. mitochondriální spirálu. Splynutím cisteren Golgiho aparátu vznikne akrozom a spermie se zbaví nadbytečné cytoplazmy, kterou odvrhuje ve formě reziduálních tělísek, která jsou fagocytována Sertoliho buňkami.

Spermie po dokončení spermiogeneze je sice morfologicky zralá (tj. vypadá jako „finální“ spermie), nicméně není schopná rozpoznat, navázat se a oplodnit tak vajíčko. Tyto schopnosti získává až v dalších maturačních procesech v nadvarleti. Dochází zde ke změnám ve složení a struktuře cytoplazmatické membrány, která je obohacena o cholesterol a další proteiny. Upravuje se také tvar a obsah akrozomu. Nakonec jsou spermie skladovány v koncové části nadvarlete („cauda epididymis“) do doby, než jsou ejakulovány.

Obr. 5 Spermatogeneze



<http://cikgurozaini.blogspot.cz/2011/06/spermatogenesis-and-oogenesis.html>

Moderní metody léčby poruch plodnosti umožňují účinně pomoci v převážné většině případů, podmínkou je však správná diagnóza. Vyšetření mužské plodnosti vychází vždy z provedení spermioqramu, tj. analýzy ejakulátu. Z hlediska vyšetřovacího algoritmu se jedná o zcela prvotní vyšetření u mužské neplodnosti.

Sperma se odebírá po dvoudenní pohlavní abstinenci (delší abstinence než 3 dny není žádoucí) při pečlivém dodržení hygieny. Kratší odstup od předchozí ejakulace může snížit objem ejakulátu a koncentraci spermií. Při delší abstinenci může být snižená motilita. Odběr je proveden do speciální jednorázové sterilní nádoby na andrologických pracovištích.

Mezi základní parametry vyšetření spermatu patří vyšetření stanovení objemu, pH, zkapalnění, dále pak počtu spermií, jejich pohyblivosti (podíl pohyblivých/nepohyblivých spermií, charakter jejich pohybu) a morfologie (podíl spermií které mají správný/špatný tvar). V rámci rozšířených vyšetření lze zjišťovat stupeň poškození DNA ve spermiích (stupeň fragmentace chromatinu) a podíl nezralých spermií.

Ke stanovení objemu ejakulátu je optimální použít váhy nebo sérologickou pipetu, která je kalibrována po 0,1 ml. Ke stanovení koncentrace spermií (počet spermií na mililitr) se používají speciální počítací komůrky pro vyšetření spermatu.

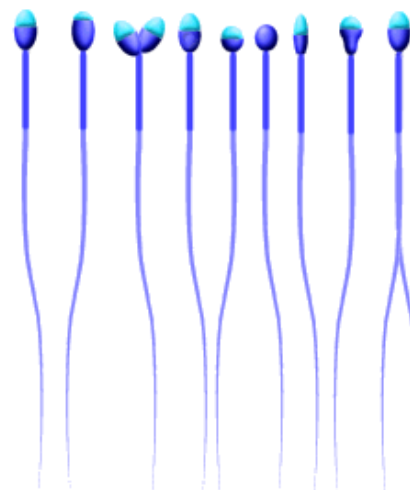
Zkapalnění je přirozená změna konzistence spermatu z polotekuté na tekutou. V gelovité matrix nejsou spermie schopny rovnoměrné distribuce, odebrané vzorky proto mají rozdílné parametry. Teprve po úplném zkapalnění se spermie uvolní a jejich rozptýlení se stane rovnoměrnější. Porucha zkapalnění ztěžuje spolehlivost vyšetření. Čerstvý ejakulát je charakterizován přítomností koagula, které je tvořeno sekretem semenných váčků. Jeho zkapalnění je výsledkem působení prostatických enzymů. Nepřítomnost koagula může být známkou absence semenných váčků. Porucha zkapalnění může být projevem deficitu prostatických enzymů. Viskozita ejakulátu se hodnotí po jeho zkapalnění jako schopnost tvořit kapky na špičce pipety. Pokud se tvoří drobné kapky a volně padají, je viskozita normální. Pokud se kapky netvoří nebo sperma nelze do pipety natáhnout, viskozita je zvýšena.

Pohyblivost spermií může být ovlivněna mnoha faktory včetně věku pacienta, jeho zdravotního stavu, doby od poslední ejakulace, expozice pacienta vlivům zevního prostředí jako je horko nebo toxické látky, dále metody odběru a způsobu zacházení se vzorkem v době od odběru do vyšetření. Vyšetřuje se systematicky minimálně 200 spermií v alespoň 5 zorných polích mikroskopu a stanoví se kategorie motility: a/ rychlý progresivní pohyb, b/ pomalý progresivní pohyb, c/ pohyb na místě a d/ nepohyblivé spermie.

Pro hodnocení morfologie spermií je potřeba minimálně dvou nátěrů. Při vyšetření se můžeme setkat s různými tvary spermií (Obr. 6).

Obr. 6 Morfologické typy spermií

(1) Normální spermie je hodnocena jako morfologicky normální, pokud jsou hlavička, krček, střední oddíl a bičík bez patologických změn. Tvar hlavičky je oválný, akrozom pokrývá 40 – 70 % hlavičky spermie, (2) spermie s malým akrozómem, (3) spermie s dvěma hlavičkami, (4) spermie s vakuolou v hlavičce, (5) spermie s kulatou hlavičkou, (6) s kulatou hlavičkou bez akrozómu, (7) se zúženou hlavičkou, (8) hruškovitou hlavičkou a (9) se dvěma bičíky (www.repromeda.cz/komplexni-diagnostika-neploidnosti.html)



Vzhledem k pomalé setrvalé tendenci ke snižování kvality mužského ejakulátu WHO pravidelně aktualizuje hodnoty pro normozoospermii (WHO, 2010): objem ejakulátu minimálně 1.5 ml, pH 7.2-8.4, koncentrace spermií minimálně 15 miliónů na mililitr, počet pohyblivých spermií minimálně 40 %, z toho progresivně se pohybujících (WHO třídy a+b) minimálně 32 %. Počet morfologicky normálních spermií nad 4%.

Závěrem spermioqramu může být diagnóza a/ normozoospermie (veškeré hodnocené parametry ejakulátu jsou normální), b/ oligozoospermie (snížený počet spermií), c/ azoospermie/aspermie (v ejakulátu nejsou žádné spermie), d/ asthenozoospermie (snížený počet pohyblivých spermií či zhoršená pohyblivost spermií), e/ teratozoospermie (snížený počet spermií, které mají normální tvar) či f/ nekrozoospermie (spermie v ejakulátu jsou mrtvé).

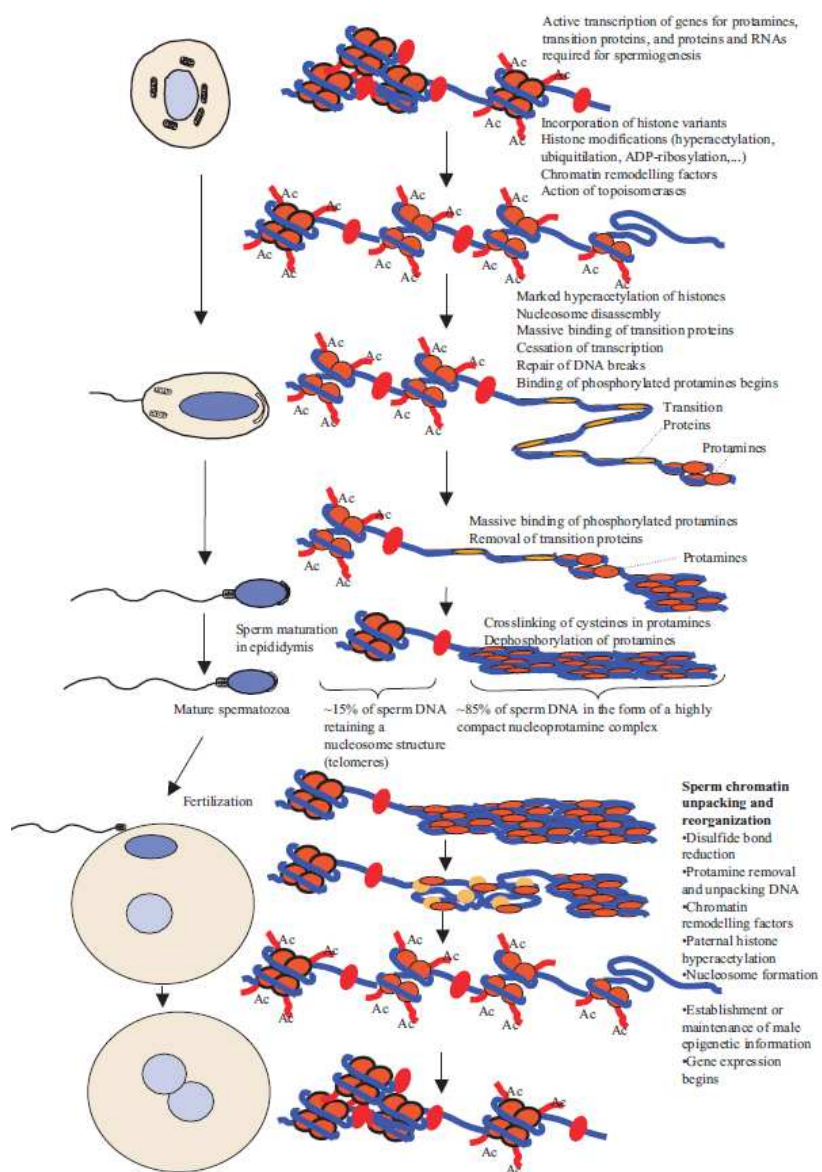
1.2.3 Protaminy a mužská neplodnost

Protaminy jsou malé bazické jaderné proteiny známé po více než století (Miescher 1874). Vyskytují se u mnoha živočišných druhů, kde hrají stěžejní roli při spermatogenezi. V hlavičkách spermií nahrazují histony a umožňují vměstnat haploidní paternální genetickou informaci do malého jádra spermií. Objem kondenzované DNA v mužských zárodečných buňkách je díky protaminům redukován na méně než 10% objemu jádra buněk somatických (Braun 2001). Tato kondenzace je nezbytná pro neporušené vyžívání spermií, transport do oocytu a schopnost jej oplodnit (Jager 1990).

Protaminy kondenzují paternální genom a jádra spermií do kompaktního hydrodynamického tvaru, což umožní rychlejší pohyb spermií a zvýší jejich pravděpodobnost oplodnit oocyt jako první. Zvýšená kondenzace chromatinu zároveň chrání paternální genetickou informaci při transportu reprodukčním traktem před vlivem nukleáz, mutagenů či jiných genotoxických faktorů a zajišťuje tak stabilitu a integritu DNA. Dále se předpokládá vliv protaminů při epigenetickém imprintingu, kdy ovlivňují reaktivaci paternální části genomu po fertilizaci a umožňující reprogramování. Protaminy se pravděpodobně uplatňují jako jeden z kontrolních bodů při spermiogenezi (Oliva 2006).

Nahrazení histonů protaminy se odehrává v postmeiotické fázi během spermiogeneze v několika postupných krocích (Obr. 7). Nejprve je aktivována transkripce protaminových genů (*PRM1* a *PRM2*) a genů pro tranziční proteiny (*TNP1* a *TNP2*). Následně dochází k modifikaci nukleozomů. Specifické lysiny histonů H3 a H4 jsou hyperacetylovány, čímž se sníží jejich pozitivní náboj a tím jejich afinita k DNA. Tato destabilizace nukleozomů umožní výměnu histonů za tranziční proteiny. Ty jsou následně nahrazeny fosforylovanými protaminy (Dadoune 1995, Kurtz et al. 2007). K jejich fosforylaci dochází v okamžiku syntézy, kdy fosforylace je pravděpodobně nezbytná pro správnou vazbu protaminů na DNA (Oliva and Dixon 1991). Maximální kondenzace DNA a finální maturace spermií je dosaženo defosforylací protaminů a stabilizací protaminových komplexů disulfidickými můstky mezi cysteiny. Po fertilizaci dojde k dekonenzaci DNA a reorganizaci chromatinu, tj. k přestavbě nukleoprotaminů na nukleohistony, čímž jsou geny opět transkripčně aktivovány (Oliva 2006).

Obr. 7 Schematické zobrazení nukleohistonovo-nukleoprotaminové přestavby



Oliva 2006

V hlavičkách spermií je protaminy nahrazeno přibližně 85% histonů, zbytek DNA zůstává asociován s histony, nejspíše z důvodu umožnění reaktivace paternálního genomu po fertilizaci či z důvodu zachování imprintingu příslušných paternálních genů (Gatewood et al. 1990).

Protaminy se vyznačují vysokým obsahem aminokyselin s pozitivním nábojem, zejména argininu (48% v lidských protaminech). V sekvenci se dále vyskytuje cystein, jenž umožňuje tvorbu disulfidických můstků mezi přilehlými molekulami protaminů, čímž dochází k maximální stabilizaci nukleoprotaminových komplexů (Vilfan et al. 2004).

Protaminové geny jsou lokalizované na chromozomu 16 (16p13.13) v sousedství genu TNP2, což umožňuje koordinaci exprese těchto genů při spermiogenezi (Viguie et al. 1990, Engel et al. 1992, Martins et al. 2004). Oba protaminové geny *PRM1* a *PRM2* se sestávají ze dvou exonů s jedním intronem o délce 91, resp. 163 bp (Domenjoud et al. 1990). Aminokyselinová sekvence *PRM1* čítá 50 aminokyselin, z nichž 24 jsou argininy a 6 cysteiny, zatímco *PRM2* je translatován jako 103 aminokyselin dlouhý protein, který na N-terminálním konci podstupuje štěpení. Finální *PRM2* protein se skládá z 57 aminokyselin, z nichž 27 jsou argininy a 5 cysteiny (Ammer et al. 1986, Carrell et al. 2007).

Předpokládá se rozdílná funkce obou protaminových proteinů, ačkoliv pro správnou diferenciaci spermatid by mělo být jejich množství v hlavičkách spermií rovnocenné v poměru 1:1 (Balhorn et al. 1988). Studie na knokautovaných myších, kdy je cíleně vyřazen z činnosti přesně určený gen, a studie pacientů s poruchou kondenzace chromatinu ve spermiích prokázaly, že deficiencie některého z protaminových genů či jejich aberantní poměr vede k poškození DNA a snížené kvalitě semenných parametrů, ke zhoršené schopnosti fertilizace, k abnormálnímu embryonálnímu vývoji a tak ke sníženým úspěchům při IVF technikách či přímo k neplodnosti (Balhorn et al. 1988, Belokopytova et al. 1993, Chevaillier et al. 1987, de Yebra et al. 1998, de Yebra et al. 1993, Khara et al. 1997, Carrell and Liu 2001, Carrell et al. 2007, Carrell et al. 2008, Steger et al. 2003, Aoki and Carrell 2003, Aoki et al. 2005, Aoki et al. 2006b, Cho et al. 2001, Cho et al. 2003, Zhang et al. 2006).

Velké množství studií se pokoušelo prokázat vztah mutací a polymorfismů protaminových genů k mužské neplodnosti (Schlicker et al. 1994, Tanaka et al. 2003, Aoki et al. 2006a, Iguchi et al. 2006, Hammoud et al. 2007, Ravel et al. 2007, Kichine et al. 2008, Gazquez et al. 2008, Imken et al. 2009, Jodar et al. 2011, Venkatesh et al. 2011).

Výsledky jsou však nejednoznačné, protichůdné a detekované varianty jsou považovány spíše za vzácnou příčinu infertility (Tab. 1, Tab. 2).

Tab. 1 Přehled variant detekovaných v genu *PRM2* v různých studiích

Nucleotide change	Region	Amino acid change	NCBI ID	Mutation described only in patients	Statistically significant differences between control vs. patients	Comments	References
c.-512 T > G	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Present work
c.-392 G > A	5' promoter region	NA		No	No	Polymorphism	Hammoud <i>et al.</i> (2007), present work
c.-389 T > C	5' promoter region	NA	rs 376374	No	No	Polymorphism	Hammoud <i>et al.</i> (2007), present work
c.-371 G > C	5' promoter region	NA	rs 8060767	No	No	Polymorphism	Hammoud <i>et al.</i> (2007), present work
c.-321 C > T	5' promoter region	NA		No	No	Polymorphism	Present work
c.-226 G > A	5' promoter region	NA	rs 74459443	No	No	Polymorphism	Hammoud <i>et al.</i> (2007), present work
c.-123 C > G	5' promoter region	NA		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c.-67 C > T	5' UTR	NA		Yes	No	Potential interference transcription	Imken <i>et al.</i> (2009)
c.66 T > C	Exon 1	None		No	No	Rare variant	Aoki <i>et al.</i> (2006a), present work
c.87 C > T	Exon 1	None		Yes	–	Rare variant	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.148 C > T	Exon 1	Gln50Ter		No	No	Rare variant	Imken <i>et al.</i> (2009)
c.201 C > T	Exon 1	None		Yes	No	Null allele	Tanaka <i>et al.</i> (2003)
				No	No	Rare variant	Aoki <i>et al.</i> (2006a), Imken <i>et al.</i> (2009), present work
				Yes	–	Rare variant	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 10 C > T	Intron	NA	rs 74007626	Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki <i>et al.</i> (2006a)
				Yes	Yes	Novel donor splice site?	Imken <i>et al.</i> (2009)
				No	No	Rare variant	Present work
				Yes	–	Rare variant	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 17 G > C	Intron	NA		No	No	Rare variant	Imken <i>et al.</i> (2009)
c.271 + 19 C > T	Intron	NA	rs 74007625	Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki <i>et al.</i> (2006a)
				No	No	Rare variant	Imken <i>et al.</i> (2009), present work
				Yes	–	Rare variant	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 27 G > C	Intron	NA	rs 1646022	No	No	Polymorphism	Tanaka <i>et al.</i> (2003), Aoki <i>et al.</i> (2006a), Imken <i>et al.</i> (2009), present work
				Yes	–	Polymorphism	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 27 G > A	Intron	NA		No	No	Rare variant	Tanaka <i>et al.</i> (2003)
c.271 + 29 A > G	Intron	NA		Yes	–	Rare variant	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 102 C > A	Intron	NA	rs 2070923	No	No	Polymorphism	Tanaka <i>et al.</i> (2003), Aoki <i>et al.</i> (2006a), Imken <i>et al.</i> (2009), present work
				Yes	–	Polymorphism	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 106 C > A	Intron	NA		Yes	–	Rare variant	Tüttelmann <i>et al.</i> (2010)
c.271 + 107 G > A	Intron	NA		Yes	No	Novel donor splice site?	Imken <i>et al.</i> (2009)
c.271 + 135 C > T	Intron	NA		Yes	No	Novel donor splice site?	Aoki <i>et al.</i> (2006a), present work
				No	No	Rare variant	Imken <i>et al.</i> (2009)
c.309*61 G > C	3' UTR	NA	rs 79674436	No	No	Abnormal P1/P2	Hammoud <i>et al.</i> (2007)
				No	No	Rare variant	Present work

Jodar *et al.* 2011

Tab. 2 Přehled variant detekovaných v genu *PRMI* v různých studiích

Nucleotide change	Region	Amino acid change	NCBI ID	Mutation described only in patients	Statistically significant differences between control vs. patients	Comments	References
c-275 G > T	5' promoter region	NA	rs 74007631	Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c-248 C > A	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007), present work
c-238 G > A	5' promoter region	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c-191 C > A	5' promoter region	NA	rs 2301365	No	No	Polymorphism	Hammoud et al. (2007), Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009)
				No	Yes	Risk factor for abnormal morphology	Gázquez et al. (2008), present work
c-114 C > T	5' promoter region	NA	rs 74007629	Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c-107 G > C	5' UTR	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
				Yes	No	Create new binding site?	Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009)
				No	No	Population-specific variant	Kichine et al. (2008)
c-102 C > T	5' UTR	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
c-42 A > G	Exon 1	None		No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
c-49 C > T	Exon 1	Arg17Cys		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c-54 G > A	Exon 1	None	rs 3526993	No	No	Rare variant	Aoki et al. (2006a), Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009)
c-65 G > A	Exon 1	Ser22Asn		Yes	-	Rare variant	Tütteleimann et al. (2010)
				Yes	No	Pathogenicity unknown	Imken et al. (2009)
c-69 C > A	Exon 1	None		No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
c-93 G > C	Exon 1	Gln31His		No	No	Rare variant	Ravel et al. (2007)
c-102 G > T	Exon 1	Arg34Ser	rs 35576928	Yes	No	Create a new site for phosphorylation?	Iguchi et al. (2006), Ravel et al. (2007)
				No	No	Rare variant	Aoki et al. (2006a), Kichine et al. (2008), present work
c-112 + 40 G > A	Intron	NA		Yes	-	Rare variant	Tütteleimann et al. (2010)
c-113 G > T	Exon 2	Arg38Met		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c-119 G > A	Exon 2	Cys40Tyr		No	No	Rare variant	Present work
c-138 G > A	Exon 2	None		Yes	No	Pathogenicity unknown	Ravel et al. (2007)
c-139 C > A	Exon 2	None	rs 737008	Yes	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003)
				No	No	Polymorphism	Tanaka et al. (2003), Iguchi et al. (2006), Aoki et al. (2006a), Ravel et al. (2007), Imken et al. (2009), present work
c-153*4 T > A	3' UTR	NA		Yes	-	Polymorphism	Tütteleimann et al. (2010)
c-153*89 C > T	3' UTR	NA		Yes	No	Pathogenicity unknown	Present work
c-153*96 A > G	3' UTR	NA		Yes	No	Rare variant	Hammoud et al. (2007)
				No	No	Rare variant	Tanaka et al. (2003), Hammoud et al. (2007), present work

1.2.4 Cystická fibróza a gen CFTR

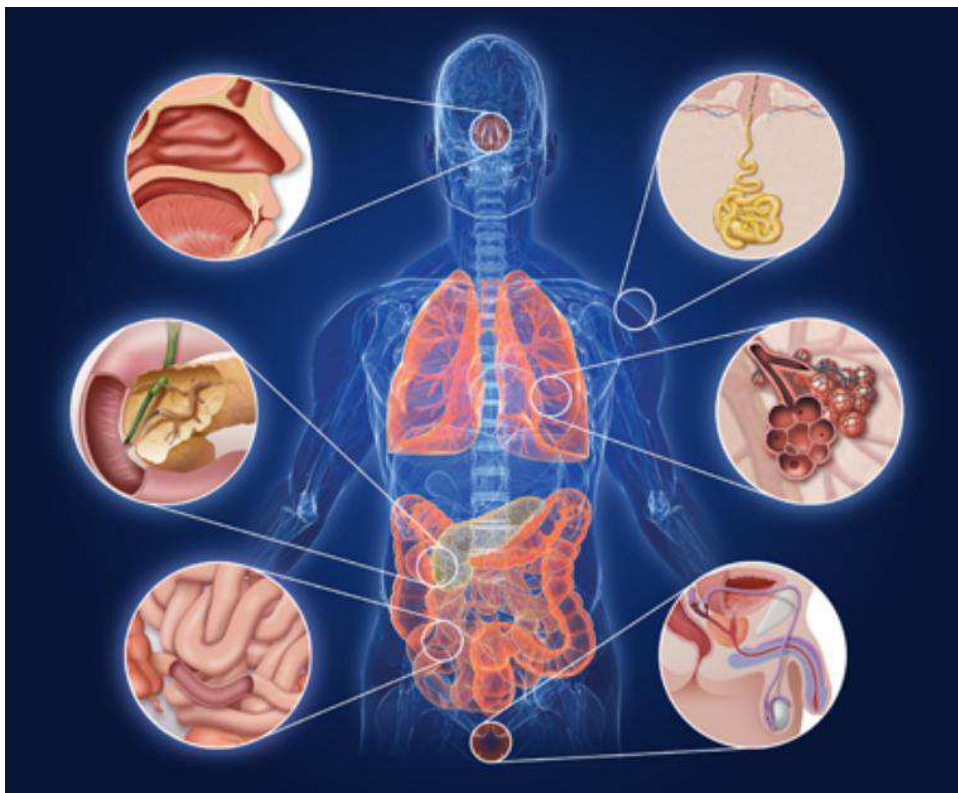
Jak již bylo uvedeno výše, mutace v genu cystické fibrózy hrají významnou roli v patogenezi mužské neplodnosti a jejich vyšetření tak bývá jedním z prvotních kroků při odhalování příčin poruch plodnosti u mužů. Tyto mutace však neovlivňují pouze reprodukci, ale u obou pohlaví i funkce celého těla - jeho růst, dýchání a trávení.

Cystická fibróza (CF) představuje jedno z nejčastějších závažných autozomálně recesivních onemocnění v evropských populacích, vyskytující se s incidencí 1:1700-7700, kde nejvyšší incidence je nalézána v Irsku, nejnižší ve Finsku (Lubamba et al. 2012). Údaje o četnosti onemocnění v České republice (ČR) se různí. Zatímco epidemiologické studie v padesátých a šedesátých letech minulého století prokázaly postižení u 1 z 2700 novorozenců (Houšťek and Vávrová 1962), nedávné studie novorozeneckého screeningu odhalily incidenci nižší – 1:4000 při započtení vlivu prenatální diagnostiky (Balascakova et al. 2009), resp. 1:5000 bez započtení tohoto vlivu (Krulisova et al. 2012). Z údajů vyplývá, že každý 26.-35. jedinec je zdravým nosičem CF a že se při průměrné roční porodnosti 110 000 novorozenců každoročně narodí v ČR 20-40 dětí s CF.

CF je závažné multisystémové onemocnění charakterizované mnohačetným orgánovým postižením respiračního, gastrointestinálního a reprodukčního systému (Obr. 8). Mezi typické klinické příznaky patří chronické sinopulmonální onemocnění projevující se chronickým kašlem s produkcí sputa. Typická je kolonizace sinobronchiálního systému bakteriálními kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* či *Burkholderia cepacia*, jež způsobují ireverzibilní poškození plic a následné respirační selhání. Dalšími klinickými projevy respiračního onemocnění jsou bronchiektázie, nosní polypy či rozvoj paličkovitých prstů. Onemocnění gastrointestinálního traktu je charakterizováno poruchou vstřebávání živin spojenou s následným neprospíváním. Tyto příznaky jsou vyvolány porušenou exokrinní sekrecí pankreatu, která postihuje až 90% nemocných. U zhruba 10-15% novorozenců s CF se nemoc projeví jako mekoniový ileus, který je způsoben střevní obstrukcí abnormálně vazkou smolkou (Vávrová et al. 2000). Reprodukční trakt je postižen u téměř všech mužů s CF (až 98%), kteří jsou v důsledku kongenitální bilaterální absence (ageneze) vas deferens

(CBAVD) neplodní (Denning et al. 1968). U žen může být snížena schopnost otěhotnět díky vazkému hlenu v děložním hrdle, který může bránit proniknutí spermií do děložní dutiny (Oppenheimer and Esterly 1970). Projevy onemocnění a jejich závažnost jsou však u jednotlivých pacientů odlišné. Značná variabilita se projevuje jak v průběhu onemocnění dýchacích cest, stejně tak v míře postižení pankreatu, kde může dojít ke kompletní ztrátě její exokrinní funkce, označované jako pankreatická insuficience, přes různé stupně poruchy sekrece až po plné zachování funkce slinivky břišní (Welsh et al. 2001). Společným klinickým příznakem pro všechny nemocné je postižení funkce potních žláz, kdy je porušena resorpce chloridů a sodíku ve vývodech potní žlázy. To vede k jejich „diagnosticky“ zvýšené koncentraci v potu, od hraničních hodnot 30-60 mmol/l u mírných/atypických forem CF až kolem 100 mmol/l u pacientů s klasickou CF (Vávrová et al. 2001, Welsh et al. 2001). Stanovení koncentrace chloridů v potu, označované jako potní test, je tak považováno za zlatý standard diagnostiky CF.

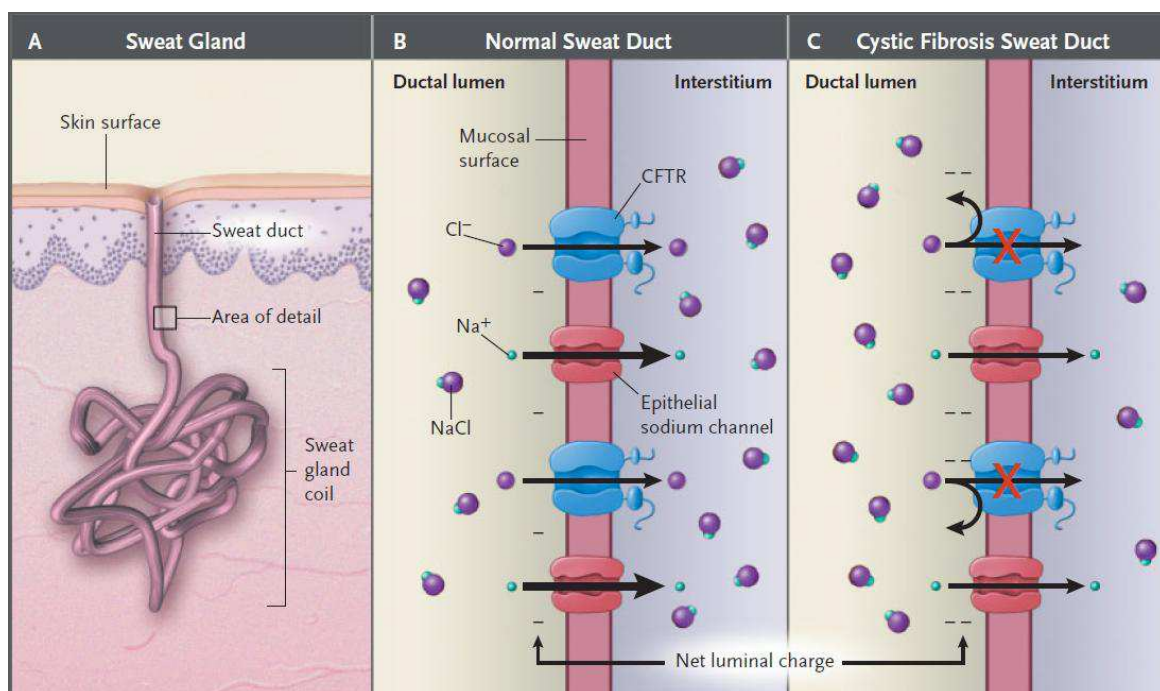
Obr. 8 Schematické znázornění rozsahu postižení u pacientů s CF



www.cftrscience.com

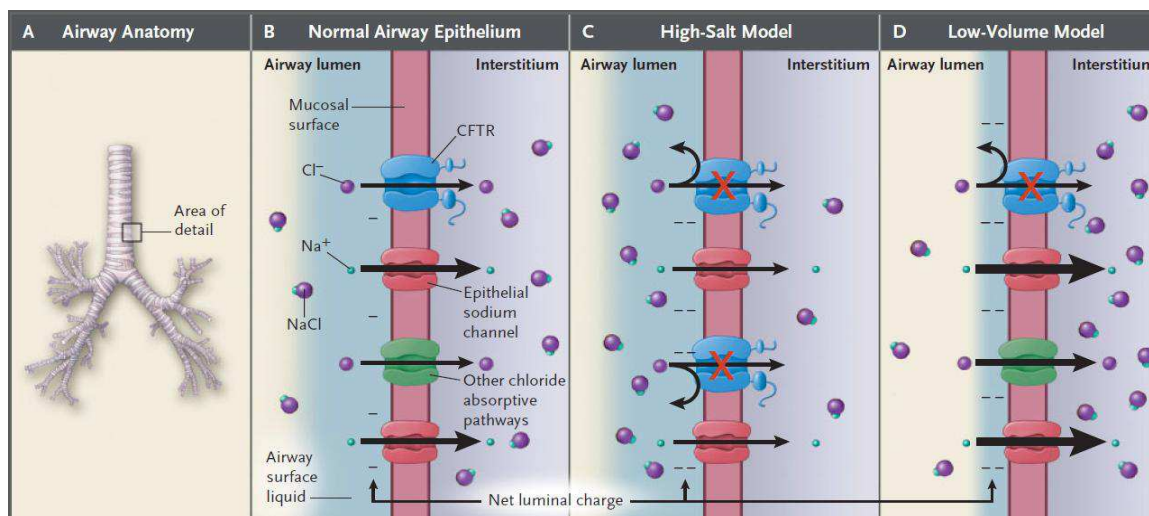
Výše popsané klinické projevy jsou důsledkem defektu v proteinu CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), který má funkci chloridového kanálu a je tak nezbytný pro transport chloridových iontů, regulaci sodíkového kanálu (epithelial sodium channel - ENaC) a dalšího chloridového kanálu (outwardly rectified chloride channel - ORCC) v epiteliálních buňkách, které vystylají sliznici respiračního traktu, pankreatické vývody a vývody potních žláz. Při absenci, redukcii či aberantní funkci chloridového kanálu v apikální membráně specializovaných epiteliálních buněk je resorpce chloridů z lumen exokrinních žláz a dýchacích cest porušena. Zároveň dochází ke zvýšené resorpci sodíku, a protože jej voda následuje do buněk, vzniká tak iontová dysbalance spojená rovněž s dehydratací sliznic exokrinních žláz. Iontová nerovnováha má rovněž za následek poruchu funkce faktorů vrozené imunity (Obr. 9, Obr. 10) (Rowe et al. 2005, Simpson 2005).

Obr. 9 Model normální (B) a porušené funkce CFTR kanálu (C) v potních žlázách



Rowe et al. 2005

Obr. 10 Model normální (B) a porušené funkce CFTR kanálu (C, D) v respiračním traktu

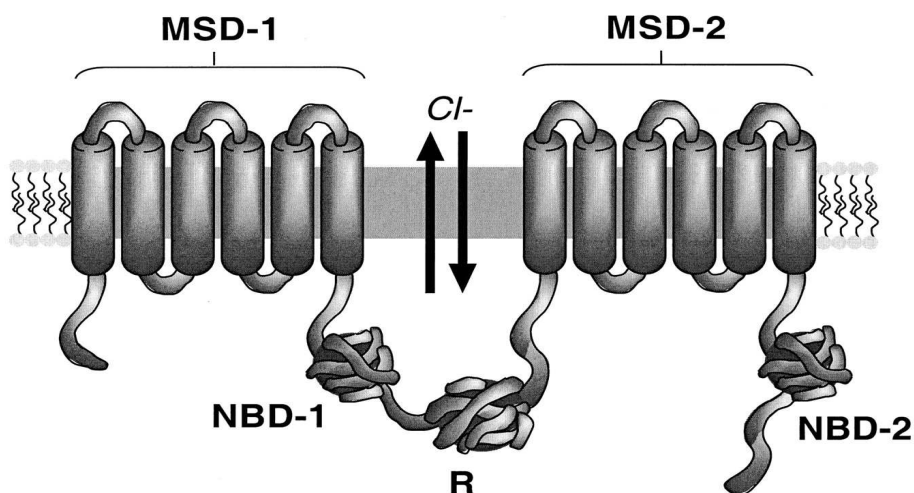


Rowe et al. 2005

Identifikace genu zodpovědného za CF je datována do roku 1989, kdy byl metodou pozičního klonování lokalizován na dlouhé raménko chromozomu 7 (7q.31.2) a nazván Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*), tj. transmembránový regulátor vodivosti (Kerem et al. 1989). Tento gen, zaujímající oblast zhruba 250 kb, má 27 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14a, 14b, 15, 16, 17a, 17b, 18, 19, 20, 21, 22, 23 a 24, nově 1-27) (Riordan et al. 1989). Z 6,2 kb dlouhé *CFTR*-mRNA vzniká translací protein o velikosti 1480 aminokyselin a molekulární hmotnosti 168 kDa (Harris 1992).

CFTR protein se skládá z pěti domén. Ze dvou transmembránových segmentů MSD1 a MSD2 (membrane spanning domains), které jsou obě tvořeny 6 α -helixy. Ty vytvářejí vlastní chloridový kanál a ukotvují ho v apikální buněčné membráně. Ze dvou ATP-vazebných domén NBD1 a NBD2 (nucleotide-binding domains), které svými konformačními změnami regulují průtok iontů chloridovým kanálem, a z regulační domény R, která obsahuje velké množství nabitých aminokyselinových zbytků, které představují potenciální místa pro fosforylaci cAMP-dependentní proteinkinázou A (PKA) (Obr. 11)/(Gadsby et al. 2006, Lyczak et al. 2002).

Obr. 11 Schematická struktura proteinu CFTR



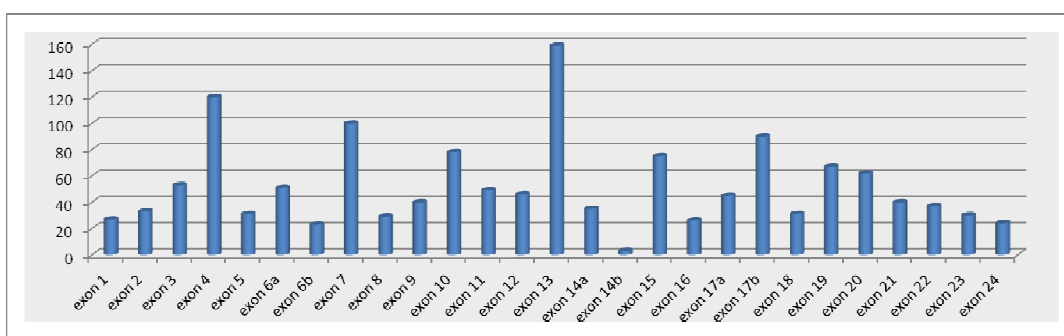
Lyczak et al. 2002

Bylo navrženo několik modelů regulace proteinu CFTR. Podle Carson et al. (1995) dochází k vazbě ATP na obě NBD domény v uzavřeném stavu. Následná hydrolyza ATP na NBD1 způsobí otevření kanálu a ionty mohou procházet pórem. Kanál je uzavřen uvolněním produktů hydrolyzy (ADP a Pi). Tento model zároveň ukazuje, že fosforylace regulační domény ovlivňuje vazbu ATP na NBD domény. Poslední výzkumy ukazují, že po navázání ATP na NBD1 a NBD2 dochází k dimerizaci těchto domén, jenž vyvolá konformační změnu transmembránových domén MSD1 a MSD2 a způsobí otevření kanálu (Gadsby et al. 2006, Hwang and Sheppard 2009). Otvírání a zavírání kanálu CFTR je pevně kontrolováno rovnováhou mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou a množstvím ATP uvnitř buňky. PKA je nejdůležitější kináza zodpovědná za regulaci chloridového kanálu, na jeho otvírání se ale může podílet i Ca^{2+} -independentní a Ca^{2+} -dependentní PKC (proteinkináza C) (Gadsby et al. 2006, Sheppard and Welsh 1999).

CF je charakterizována molekulární heterogenitou, o čem svědčí více než 1900 sekvenčních variant nalezených v genu *CFTR* v různých světových populacích (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium Database, CFGAC, nově „Databáze CFTR1“,

www.genet.sickkids.on.ca/cftr/). Většina mutací je rozložena po celé kódující sekvenci a postihuje všechny domény proteinu CFTR (Obr. 12). Mutace v exonech 3-7 postihují funkci domény MSD1, v exonech 9-12 porušují funkci domény NBD1, regulační doménu postihují mutace v exonu 13, mutace v exonech 14-18 porušují funkci domény MSD2 a v exonech 19-22 narušují fungování NBD2 domény (Zielenski 2000).

Obr. 12 Distribuce mutací v jednotlivých exonech genu *CFTR* nahlášených v mezinárodní databázi CFGAC



www.genet.sickkids.on.ca/cftr

Mutace v genu *CFTR* jsou germinální (somatické nebyly dosud v literatuře popsány) s jednoznačně ancestrální povahou v jednotlivých rodinách (Morral et al. 1994). Jejich dlouhodobý výskyt v dané populaci svědčí pro selekční výhodu nosičů, např. vyšší odolnost k nemocem, které se historicky podílely na postnatální selekci v lidských populacích (cholera, tyfus, různá průjemová onemocnění) (Pohunek and Lebl 2008). Dosud bylo popsáno pouze omezené množství *de novo* mutací s četností přibližně 1:1200 ancestrálních alel genu *CFTR* (Girodon et al. 2008). Jejich počet je však podhodnocený, protože ne všechny diagnostické laboratoře ověřují přítomnost zachycených mutací pacienta u rodičů.

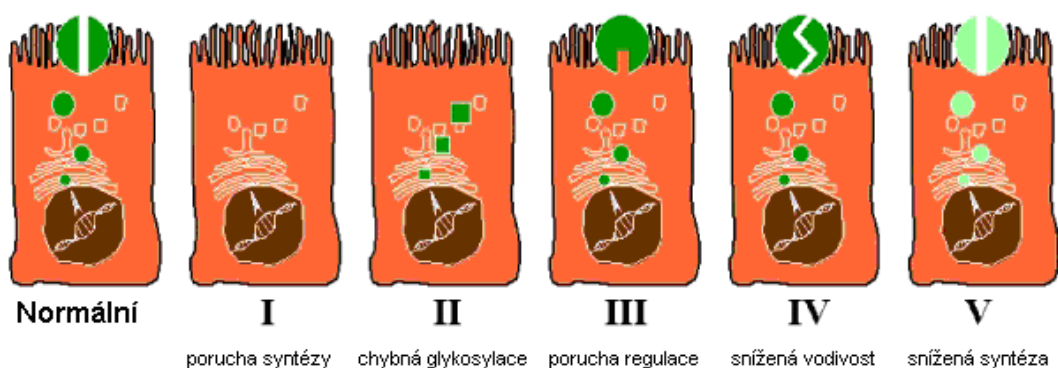
Nejčastějšími mutacemi v genu *CFTR* jsou záměny aminokyselin („missense“ mutace), které představují 40% všech dosud známých variant tohoto genu. Mutace způsobující posun čtecího rámce („frameshift“) se vyskytují v 16%, mutace způsobující abnormální sestřih exonů („splicingové“) ve 12%, nesmyslné mutace („nonsense“)

způsobující předčasné zařazení stop kodónu v 8% případů. Zhruba 3% mutací tvoří rozsáhlé intragenové delece či duplikace jednoho či více exonů. Ve 2% případů se vyskytují delece nebo inserce násobků tří párů bazí DNA, které neporušují čtecí rámeček. Typickým představitelem těchto mutací je hlavní mutace F508del, která vede ke ztrátě kodónu pro aminokyselinu fenylalanin. Zbylé alterace nukleotidové sekvence představují polymorfismy bez patogenního potenciálu (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).

Posouzení patogeneze jednotlivých mutací a predikce jejich klinického dopadu je velmi obtížné, proto byla navržena klasifikace pěti patogenetických tříd mutací na základě expresních studií či modelově předpověděném mechanismu jejich molekulárních dysfunkcí (Obr. 13) (Zielenski and Tsui 1995). Později došlo k rozšíření o další dvě třídy (Zielenski 2000). Třídy I-III jsou spojeny s minimální aktivitou anebo absencí proteinu CFTR, a tak s klasickou formou CF a nízkou variabilitou klinického průběhu CF mezi jednotlivými pacienty. Naopak mutace ze tříd IV–VII jsou spojeny s velkou variabilitou klinického průběhu CF a jsou více nalézány u atypických, monosymptomatických forem CF, včetně onemocnění příbuzných CF. Mutace z třídy I blokují syntézu proteinu CFTR z důvodu zařazení předčasného stop kodónu či chybného sestřihu. Důsledkem je nepřítomnost proteinu CFTR na apikální membráně epitelálních buněk, protože zkrácené a dysfunkční formy proteinu CFTR jsou rychle degradovány. Mutace z třídy II redukují či zcela blokují správnou posttranslační glykosylaci a výslednou terciální konformaci proteinu CFTR, která je nezbytná pro následný transport na apikální membránu. Důsledkem je absence proteinu CFTR. Do III. třídy patří mutace, které porušují regulaci proteinu CFTR, který je na apikální membráně přítomný. Jedná se hlavně o mutace, které znemožňují fosforylaci R domény nebo navázání ATP na NBD1 či NBD2 podjednotky. Důsledkem je snížený transport chloridových iontů přes epitelální membrány. Mutace třídy IV postihují MSD1 nebo MSD2 domény proteinu CFTR, které vytváří prostorově deformovaný iontový kanál, v důsledku čehož je snížena jeho propustnost. Třída V je charakterizována redukovanou syntézou, tj. sníženým množstvím plně funkčního proteinu CFTR na apikální membráně. Do třídy VI jsou řazeny mutace ovlivňující regulaci dalších iontových kanálů (ENaC nebo ORCC) a do třídy VII patří mutace způsobující sníženou stabilitu jinak plně funkčního proteinu. Jedná se zde převážně o nesmyslné a posunové mutace přítomné na konci genu *CFTR* (Zielenski and Tsui 1995, Zielenski 2000).

V poslední době došlo k systematické klasifikaci patogenetického dopadu mutací pomocí celosvětové kompilace in vitro modelací a/nebo asociovaných klinických dat v rámci mezinárodní databáze CFTR2 („Clinical and functional translation of CFTR“, www.cftr2.org), která umožňuje poměrně přesné posouzení klinického dopadu mutací u nově diagnostikovaných případů onemocnění.

Obr. 13 Základní patogenetické třídy mutací v genu *CFTR*



Zielenski 2000

Ze všech známých mutací v genu *CFTR* se pouze 5 z nich celosvětově vyskytuje s četností větší než 1% – F508del (66.8%), G542X (2.6%), N1303K (1.6%), G551D (1.5%) a W1282X (1.0%) (Estivill et al. 1997). Dalších zhruba 30 mutací má celosvětovou frekvenci mezi 0.1–1%. Ostatní jsou již vzácné a vyskytují se ojediněle v jednotlivých rodinách s CF. Některé mutace mohou dosáhnout vysokých četností v izolovaných populacích v důsledku genetického driftu, např. G551D u keltských populací, či efektu zakladatele, např. W1282X u Ashkenazi Židů (Bobadilla et al. 2002). Frekvence celosvětově nejčastější mutace F508del (delece 3pb v 10. exonu) je nejvyšší v severní Evropě (87%) a klesá až na frekvenci 21% v Turecku. Je více než 50 000 let stará a odráží společný původ populací (Morral et al. 1994).

V České republice bylo dosud nalezeno 70 mutací a podařilo se dosáhnout více jak 96% populační záchytnosti (Balaščaková et al. 2008). Genetická a etnická charakteristika nejčastějších mutací u českých pacientů s CF potvrzuje, že naše země byla křížovatkou

všech hlavních historických migrací. Znalost geografické distribuce jednotlivých mutací v genu *CFTR* je důležitá nejen pro porozumění migrací historických populací, ale hlavně pro smysluplné vyšetření pacienta s podezřením na CF, neboť dle etnického původu vyšetřované osoby lze vybrat mutace, které jsou pro příslušnou populaci relevantní.

Kvůli vysokému počtu mutací v genu *CFTR*, jejich specifické distribuci a frekvenci v jednotlivých populacích je důležité mít k dispozici spolehlivá molekulárně genetická vyšetření, která stanoví genotyp probanda. To je důležité nejen pro potvrzení klinické diagnózy onemocnění, ale i pro budoucí prenatální diagnostiku v dalších graviditách rodičů probanda, jakož i genetické vyšetření pokrevních příbuzných ke stanovení možnosti přenašečství daných mutací.

Efektivní diagnostické nástroje jsou nezbytné, neboť včasná diagnostika do dvou měsíců života významně ovlivňuje průběh a prognózu tohoto onemocnění (Sims et al. 2007). Pozdní zahájení léčby vede jednoznačně k méně příznivému celoživotnímu průběhu onemocnění s horší prognózou přežití. V roce 1959 byl medián přežívání nemocných asi 6 měsíců, v současné době v zemích s kvalitní zdravotní péčí dosahuje střední doba přežití téměř 40 let (Pohunek and Lebl 2008). V České republice však bohužel došlo v letech 1999-2004 ke zhoršení klinické diagnostiky CF ze strany praktických pediatrů. Medián věku při diagnóze se přibližně zdvojnásobil a podíl pacientů zachycených do 1 roku života poklesl. Pacienti diagnostikovaní mezi 1. -10. rokem života často přicházeli ve velmi špatném nutričním stavu či s ireverzibilními změnami plic (Vávrová 2006). Tyto skutečnosti vedly v říjnu roku 2009 k zavedení plošného novorozeneckého skríníngu CF v České republice (www.novorozenecky-screening.cz), který je založený na testování hladiny IRT (imunoreaktivní trypsinogen) a na případném molekulárně genetickém vyšetření (pouze u jedinců s pozitivními hodnotami IRT) (Krulisova et al. 2012).

V našich podmínkách používáme při molekulárně genetické diagnostice tzv. „kaskádový“ přístup, který umožňuje v sestupné řadě postupný záchyt od nejčastějších mutací až po ty relativně vzácné. Nejdříve jsou vyšetřeny nejčastější mutace genu *CFTR* pomocí komerčního kitu Elucigene CF-EU2v1Tm, kdy se simultánně testuje 50 mutací (CFTRdele2,3/21kb/, I507del, 2789+5G>A, E60X, F508del, Q890X, P67L, 1677delTA, 3120+1G>A, G85E, V520F, 3272-26A>G, 394delTT, 1717-1G>A, R1066C, 444delA,

G542X, Y1092X(C>A), R117C, S549N, M1101K, R117H, S549R(T>G), D1152H, Y122X, G551D, R1158X, 621+1G>T, R553X, R1162X, 711+1G>T, R560T, 3659delC, L206W, 1811+1.6kbA>G, 3849+10kbC>T, 1078delT, 1898+1G>A, S1251N, R334W, 2143delT, 3905insT, R347P, 2184delA, W1282X, R347H, 2347delG, N1303K, A455E, W846X, včetně variant IVS8-T(5/7/9). Pokud se nepodaří odhalit obě kauzální mutace, ale pacient vykazuje jasné klinické a laboratorní známky onemocnění, jsou indikována další rozšiřující vyšetření. A to metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, multiplexní amplifikace průb závislá na ligaci) pro vyšetření rozsáhlých intragenových přestaveb, tj. delecí či duplikací jednoho nebo vícero exonů v rámci celého genu *CFTR*, které nejsou běžnými metodami založenými na PCR technice zachytitelné. Poslední studie poukazují na fakt, že velké přestavby mohou tvořit významnou část neidentifikovaných alel (cca. 2%), hlavně u případů klasické CF i u CBAVD, zejména u mužů, kteří jsou nosiči mírné mutace genu *CFTR* (Taulan et al. 2007, Hantash et al. 2006, Niel et al. 2004). Následně používáme mutačně skenovací metodu HRM, která umožňuje detekovat jedno- i vícenukleotidové změny sekvence DNA. „Pozitivní“ exony genu *CFTR* jsou sekvenovány (dle Sanger), aby byla identifikována konkrétní mutace nebo polymorfismus, který není součástí komerčních diagnostických souprav.

Při nálezů patogenní mutace je vždy důležité vyšetřit i rodiče pacienta s CF a potvrdit tak nosičství nalezených mutací u každého z nich. Tím vyloučíme záměnu vzorků, non-paternitu a/nebo přítomnost *de novo* mutace, což je důležité pro eventuální prenatální vyšetření v postižené rodině. Přiřazení mutací k rodičům pacienta umožní také cílené vyšetření příslušné mutace u jejich pokrevních příbuzných. U složených heterozygotů lze takto odhalit, zda obě mutace náhodou neleží v pozici *cis*, tj. na jedné alele, anebo že se jedná o novou mutaci. Naopak negativní nález při kompletním vyšetření genu *CFTR* dostupnými molekulárně genetickými metodami klinickou diagnózu CF nevylučuje, neboť současně používanými analytickými postupy nelze prokázat všechny mutace *CFTR* (např. intronové sestřihové mutace).

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Molekulárně genetická diagnostika (tj. DNA diagnostika) se díky rozvoji a zavádění nových výzkumných poznatků do rutinní praxe stala v posledních letech významným oborem, který prostupuje prakticky všechny medicínské obory. Podle kvalifikovaných odhadů trpí v zemích Evropské unie geneticky podmíněnou chorobou okolo 30 milionu lidí a genetická onemocnění tak představují, díky své chronické povaze, stále větší břemeno pro zdravotnické systémy. Pozornost se proto soustřeďuje na zavádění nových technologií při současném zvyšování kvality poskytovaných genetických služeb a jejich ekonomičnosti.

Na našem pracovišti a v této dizertační práci jsme se proto věnovali posouzení metody High Resolution Melting (HRM) pro její diagnostické využití na příkladu různých genů (*BRCA1*, *MTHFR*, *CFTR*), dále DNA diagnostice cystické fibrózy u střeoevropských populací a odhalení dalších možných příčin poruch mužské plodnosti.

Cíle dizertační práce zahrnují:

1/ Posouzení využitelnosti metody HRM v diagnostice pomocí zhodnocení vybraných validačních parametrů na základě analýzy 170 variant v genu pro rakovinu prsu a ovárií (*BRCA1*), včetně shrnutí zkušeností s touto metodou a vytvoření směrnic, které by usnadnily zavedení této technologie v evropských dle ISO 15189 akreditovaných laboratořích.

2/ Poskytnutí konceptu pro validaci nových metod na příkladu genotypizace vybraných mutací v genu *MTHFR* pomocí HRM.

3/ Zhodnocení přínosu a využitelnosti metody HRM pro mutační skenování neznámých variant nejen v DNA diagnostice cystické fibrózy.

4/ Charakterizaci spektra mutací u pacientů s cystickou fibrózou na západní Ukrajině a identifikaci dalších populačně specifických CF alel, které by zvýšily detekční

záchytnost, aby byla splněna kritéria pro zavedení novorozeneckého skríníngu v této oblasti.

5/ Charakterizaci spektra mutací u pacientů s cystickou fibrózou v České republice a poskytnutí dat pro zlepšení DNA diagnostiky a/nebo novorozeneckého skríníngu ostatním českým molekulárně genetickým laboratořím, firmám zabývajících se výrobou komerčních kitů pro diagnostické účely, pro okolní etnicky příbuzné populace postrádající vlastní populační studie a pro českou komunitu žijící v zahraničí (přes 1 milión krajanů žijících převážně v Kanadě a USA).

6/ Charakterizaci spektra variant protaminových genů na souboru německých mužů (pacienti a kontroly) a objasnění jejich vztahu k poruchám spermiogeneze.

3. VÝSLEDKY, DISKUZE A PŘILOŽENÉ PUBLIKACE

3.1. van der Stoep, et al. (2009) Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner. Hum Mutat. (IF: 5.686)

V rámci své dizertační práce jsem se podílela na komplexním multicentrickém mezinárodním validačním projektu pod záštitou projektu EuroGentest, který představuje první mezilaboratorní studii zabývající se zhodnocením a validací metody HRM pro diagnostické účely dle normy ISO 15189. Tato studie byla provedena ve spolupráci našeho pracoviště s Centrem klinické genetiky v Leidenu (Holandsko) a Centrem lidské genetiky v Leuvenu (Belgie).

Pro posouzení mutačního skenování a genotypizace metodou HRM za použití platformy LightScannerTM firmy Idaho Technology byl analyzován panel klinických DNA vzorků známého genotypu - 170 variant genu *BRCA1* a 197 vzorků standardních kontrol. Ty představovaly reprezentativní výběr všech dvanácti možných typů substitucí a různých ins/del, včetně mutací v homozygotní formě. Gen *BRCA1* byl zvolen s ohledem na velké množství identifikovaných mutací (přes 1600 v roce 2009), které jsou rozptýleny po celé kódující sekvenci a jejichž detekce pro diagnostické účely vyžaduje použití rychlé, spolehlivé a ekonomické pre-sekvenační (tj. mutačně skenovací) metody. Hodnocenými validačními parametry byla senzitivita, specificita, robustnost a mezilaboratorní reprodukovatelnost.

Celkem bylo ve studii testováno částečně nově navržených 66 párů primerů, z nichž bylo vybráno 58 párů vedoucích k dobré PCR a HRM. Pro optimalizaci anelační teploty byla provedena gradientová PCR. Během tohoto rozsáhlého testování byla stanovena kritéria pro softwarové nastavení a vyhodnocování HRM. Byla stanovena doporučená pozice normalizačních oblastí a optimální šíře jejich rozpětí (1-2.5°C), což má význam pro snížení falešné positivity. Hladina senzitivity byla pro všechny testované amplikony doporučena na 3.0 při nastavení „Auto Group“ „High“. Za optimální byla považována taková

senzitivita, při které byly všechny varianty detekovány při maximálně 5% falešné pozitivitě u vzorků se standardní alelou. Specificita HRM byla hodnocena na základě analýzy 352 reakcí se standardní alelou. Z 58 amplikonů bylo na základě výsledků a stanovených kritérií zvoleno 40 nejlepších párů primerů pokrývajících celou kódující oblast genu *BRCA1*, které vykazovaly specificitu a senzitivitu 98%.

V dalším kroku bylo testováno analytické provedení a mezilaboratorní reprodukovatelnost na analýze 10 vybraných amplikonů (lišících se velikostí, obsahem GC a typem variant) za totožných podmínek. Participující laboratoře detekovaly všechny heterozygotní varianty značící dobrou reprodukovatelnost HRM. Stejně jako v případě analýzy všech 58 amplikonů, nepodařilo se detekovat homozygotní variantu c.3113A>G.

Jelikož různé varianty mohou produkovat stejný profil křivky tání, je vždy nezbytné potvrdit nález sekvenční analýzou. Některé polymorfismy se však objevují s velkou četností, proto bylo za účelem redukce sekvenování navrženo 9 neznačených prób pro detekci často se vyskytujících heterozygotních a homozygotních nepatogenních polymorfismů genu *BRCA1*. Na analýze 19 vzorků byla ilustrována úspěšná genotypizace metodou HRM, kdy všechny próby detekovaly příslušný polymorfismus.

Robustnost HRM byla demonstrována analýzou DNA vzorků izolovaných čtyřmi různými izolačními postupy. Výsledky vyloučily vliv zvolené extrakční metody na úspěšnost HRM, DNA vzorky z různých typů izolace tak mohou být analyzovány v rámci stejného běhu. Vliv výchozí koncentrace DNA v reakci neprokázal rozdíl v úspěšnosti HRM při použití až 4x méně DNA než standardně (tj. 5 ng místo 20 ng DNA v reakci), křivky tání se odchylovaly až při 2.5x vyšší výchozí koncentraci DNA (tj. při 50 ng DNA), což může ústít v navýšení falešně pozitivních výsledků.

Závěrem byla provedena zaslepená analýza 28 DNA vzorků (1120 PCR reakcí) porovnávající výsledky HRM se zlatým standardem, tj. sekvenční analýzou podle Sangera. Mutační skenování metodou HRM detekovalo všechny heterozygotní varianty se 100% senzitivitou a genotypizace devíti častých polymorfismů detekovala všechny správně, čímž se výrazně redukovala potřeba sekvenace. Pouze 5% PCR reakcí vyžadovalo následnou sekvenční analýzu (tj. vzorky s pozitivním záchytem při mutačním skenování,

kteřé nesly jiné varianty než oněch 9 genotypizovaných polymorfismů a 2 % falešně pozitivních vzorků).

Tato studie poukázala na parametry, které by měly být před následným testováním dalších genů metodou HRM zváženy. Bylo proto doporučeno zvolit rozsáhlý panel variant a standardních kontrol, se zaměřením na testování malých delecí, které se zdají být obtížněji detekovatelné, otestovat geny s nižším i vyšším obsahem bazí G a C (pod 30% a nad 60%), které by mohly negativně ovlivnit senzitivitu HRM a otestovat jiná plně saturační barviva.

V souhrnu, tato studie poskytla rozsáhlou validaci a zhodnocení metody HRM, včetně detailního doporučení pro správnou interpretaci získaných dat a pro usnadnění zavedení metody HRM v ostatních diagnostických laboratořích pro další geny. Dále poskytla panel primerů a průb pro kompletní skenování genu *BRCA1* a genotypizaci častých polymorfismů, včetně parametrů PCR, HRM a doporučení při vyhodnocování dat. Potvrdila vysokou senzitivitu (100%), specifitu (97-98%) i reprodukovatelnost HRM a tím její vhodnost pro diagnostické využití jakožto pre-sekvenační metody. Nevýhodou metody je pouze její snížená senzitivita při analyzování delších úseků nad 400 bp, jak již bylo dříve publikováno (Reed and Wittwer 2004). Z toho důvodu je při mutačním skenování potřeba rozdělit rozsáhlé exony na menší amplikony. Tím se sníží i pravděpodobnost výskytu více domén tání, které detekci mutací a interpretaci výsledků taktéž ztěžují. Velice výhodné je navrhnout všechny páry primerů tak, aby byly zakončeny univerzálním primerem M13 a aby bylo možné analyzovat všechny naráz za identických podmínek.

Výsledky této studie byly využity i pro obecná doporučení pro validaci a verifikaci všech DNA diagnostických metod v klinických laboratořích v rámci projektu Eurogentest (Mattocks et al. 2010), který však byl pouze mým vedlejším projektem a nebude proto blíže diskutován.

3.2. Norambuena, et al. (2009) Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. Clin Biochem. (IF: 2.076)

Tato práce demonstruje úspěšné využití HRM pro genotypizaci známých variant metodou malých ampliconů za použití platformy LightCycler 480 firmy Roche a poskytuje podrobné zhodnocení validačních parametrů vyžadované pro zavedení nových diagnostických metod dle normy ISO 15189. Na klinických DNA vzorcích známého genotypu, na příkladu vybraných variant v genu pro methylenetetrahydrofolátreduktázu (*MTHFR*) c.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) a c.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A), byla v rámci validace testována senzitivita a specificita HRM, dále její reprodukovatelnost, opakovatelnost a robustnost.

Mnoho publikací popsalo úspěšnou detekcí heterozygotních variant pomocí HRM (Er and Chang 2012), avšak detekce homozygotních vzorků je komplikovanější, neboť profil křivky tání se od standardních „wildtype“ vzorků neliší svým tvarem, pouze mírným posunem v teplotě tání, což může vést k falešně negativním výsledkům. Řešením je při mutačním skenování tvorba sekundárních heteroduplexů, kdy jsou testované vzorky smíchány s „wildtype“ vzorkem v poměru 1:1 a znovu zanalyzovány. V případě genotypizace navrhli elegantní řešení Grievink a Stowell (2008) použitím malých ampliconů, tj. bez potřeby přidávat exogenní DNA do reakce. Zmenšením délky analyzovaného ampliconu se zvětší rozdíl mezi profily křivek tání, což zvýší senzitivitu metody a umožní bez problému detekovat i homozygotní varianty, což se podařilo i v našem případě. Limitací genotypizace metodou malých ampliconů je možnost ovlivnění analýzy interferencí jinou neočekávanou variantou, proto je nezbytné navrhnout co možná nejkratší amplicony.

Velmi detailně se práce věnuje posouzení robustnosti metody (vlivu koncentrace DNA, změny anelační teploty a počtu cyklů PCR či vlivu operátora), jež je důležitá pro možnou implementaci metody v ostatních laboratořích, které disponují odlišným zázemím a podmínkami.

Vyjma precizního zhodnocení analytických parametrů HRM a popsání metodologie validace práce shrnula výhody této metody, která se vyznačuje vysokou detekční spolehlivostí, jednoduchostí a finanční nenáročností. To ji predisponuje k širokému rozšíření a uplatnění v rutinním provozu mnoha diagnostických laboratoří.

3.3. Křenková, et al. (2009) Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the CFTR gene. Folia Biol (Praha). (IF: 1.151)

V současné době je v genu cystické fibrózy známo více jak 1900 variant, které jsou rovnoměrně rozmístěny po celé kódující sekvenci, což při 27 exonech tohoto genu ztěžuje a prodražuje detekci vzácných mutací. V minulosti se na našem pracovišti využívaly pre-sekvenační metody, např. DGGE, jejíž nevýhodou byla především pracnost a manipulace s nebezpečnými chemikáliemi (formamid). Později byla nahrazena metodou TTGE, která byla rovněž technicky i časově náročná na přípravu a průběh, a tak se z tohoto důvodu v běžné laboratorní diagnostice téměř nevyužívala. Velký problém představovala i optimalizace podmínek elektroforézy, které byly pro jednotlivé exony genu *CFTR* rozdílné. Ani následné zavedení metody dHPLC, která umožňovala analyzovat delší fragmenty, nepřineslo výrazné zefektivnění detekce neznámých mutací v genu *CFTR*. Průlom mezi skenovacími metodami znamenal až objev nové generace plně saturačních fluorescenčních barviv, které umožnily analýzu křivek tání s vysokým rozlišením – HRM. Ta byla představena jako jednoduchá, levná a vysoce senzitivní metoda pro mutační skenování a genotypizaci (Gundry et al. 2003). Naším cílem tedy bylo ověřit spolehlivost této metody v podmínkách naší laboratoře a posoudit její využití v rutinní DNA diagnostice pro účely detekce neznámých mutací.

Pro posouzení senzitivity, specifity a opakovatelnosti metody HRM bylo za použití přístroje RotorGene6000 (Corbett Life Science) a barviva LCGreen plus (Idaho Technology) testováno devatenáct různých genotypů v šesti vybraných exonech genu *CFTR* (4, 7, 10, 11, 14b a 22). Mutace zahrnovaly všechny SNP třídy, jedno- a třínukleotidové delece a představovaly více jak 76,5% všech CF alel detekovaných u české populace. Všechny testované heterozygotní varianty byly jednoznačně odlišeny od standardních kontrol, některé mutace však vytvářely totožný profil křivky tání (G551D a R553X nebo L1335F a L1335P) způsobený proximitou těchto variant. To znamená, že ačkoliv časté polymorfismy jsou rozpoznány svým charakteristickým profilem tání, bez simultánního použití genotypizačních prób v reakci je nutné každý pozitivní nález sekvenovat. Vzorek s homozygotním genotypem pro varianty F508del/M470V vykazoval

stejný profil tání jako standardní kontrola, pouze s nepatrným posunem teploty tání. Přítomnost homozygotních variant byla potvrzena až po sekundárním vytvoření heteroduplexů, kdy byl PCR produktu smícháním s „wildtype“ PCR produktem v poměru 1:1, denaturován a opětovně zanalyzován. Poté byl profil křivky tání původně homozygotního vzorku stejný jako profil vzorku s heterozygotním genotypem F508del/M470V.

Celkem bylo pro exon 4 skenováno devět vzorků (3 heterozygotní, 6 standardních kontrol), pro exon 7 osm vzorků (4 heterozygotní, 4 standardní kontroly), pro exon 10 devět vzorků (4 heterozygotní, 1 homozygotní a 4 standardní kontroly), pro exon 11 dvanáct vzorků (7 heterozygotních, 5 standardních kontrol), pro exon 14b sedm vzorků (2 heterozygotní, 5 standardních kontrol) a pro exon 22 sedm vzorků (3 heterozygotní, 4 standardní kontroly). Ke stanovení opakovatelnosti HRM byl každý vzorek analyzován pětkrát. Celkově bylo tedy analyzováno 120 standardních křivek tání a 140 křivek tání s mutací. Bylo dosaženo 100% senzitivity a 96% specificity.

Tato studie potvrdila optimální využitelnost HRM v detekci mutací v genu *CFTR*, zároveň zhodnotila využití ne příliš rozšířené platformy RotorGene 6000, která je založena na odlišném systému, kdy místo 96-ti jamkových platíček využívá rotor se zkumavkami, který poskytuje větší teplotní a optickou uniformitu.

Konečně zkušenosti získané v rámci těchto validačních projektů byly rovněž využity i u následných populačně specifických analýz na mém domovském pracovišti (viz. dále).

3.4. Makukh et al. (2010) A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. J Cyst Fibros. (IF: 3.190)

Tato studie vznikla za podpory projektu Eurogentest, v době, kdy naše pracoviště působilo jako školící centrum pro metodiku detekce mutací v genu *CFTR* pro ostatní laboratoře zemí střední a východní Evropy. S ohledem na nedostatečnou kvalitu poskytovaných genetických služeb na Ukrajině, způsobenou podfinancováním veřejného zdravotnictví, bylo hlavním cílem zvýšit záchytnost populačně specifických CF alel. Současně jsme chtěli napomoci zavedení novorozeneckého skríningu CF na Ukrajině, neboť včasná diagnóza a léčba příznivě ovlivňuje průběh choroby a zároveň sníží náklady na léčbu tohoto onemocnění.

Incidence onemocnění na Ukrajině byla stanovena na základě náhodného DNA testování 720 jedinců na časté mutace v genu *CFTR* na 1:3300 novorozenců, což každoročně znamená narození až 150 dětí postižených CF. V západní části země, odkud pochází většina probandů z této studie, byla během let 1998-2008 stanovena diagnóza klasické CF u 132 probandů, u nichž se testováním panelu 10 nejčastějších evropských mutací podařilo identifikovat 76% CF alel (201/264).

V této studii bylo analyzováno 57 CF pacientů, u nichž nebyly identifikovány obě CF alely. Pomocí komerčního kitu Elucigene[™] CF-EU1 byl simultánně testován panel 32 CF mutací, následovaný analýzou genových přeskupení genu *CFTR* metodou MLPA a sekvenční analýzou exonů 7 a 13 tohoto genu.

Sekvence exonu 7 detekovala u jednoho pacienta novou dosud nepopsanou variantu Y362X způsobující zařazení předčasného stop kodonu. Sekvence exonu 13 odhalila neobvykle vysokou frekvenci mutace 2184insA. Ta byla detekována u 17 nepříbuzných CF pacientů, z nichž dva byli homozygoti, a navýšila populační záchytnost o 7.2% CF alel. Vzhledem ke sporadickému výskytu této mutace v okolních zemích se zdá, že má svůj původ ve slovanské populaci západní Ukrajiny a odtud se šířila dále.

Mutace 2184insA představuje druhou nejčastější mutaci na západní Ukrajině a vzhledem k velkému množství jedinců ukrajinské národnosti žijící v zahraničí (přes 4 milióny v Rusku, 2 milióny v USA a 1 milión v Kanadě) by měla být součástí testovacího panelu CF pacientů ukrajinského původu. Donedávna nebylo možné testovat ji v rámci žádného komerčně diagnostického kitu, nyní je součástí nově vyvinutých souprav Devyser CFTR Core (Devyser), CF StripAssay (ViennaLab) a v brzké době uveřejněného kitu xTAG Cystic Fibrosis 71 kit v2+16 (Luminex).

Tato studie jako první poskytla přehled spektra mutací na západní Ukrajině a přinesla detailní zhodnocení korelace mezi genotypem a fenotypem u pacientů s mutací 2184insA. Mutační záchytnost byla navýšena na téměř 84%, čímž byly splněny požadavky na zavedení dvoustupňového (IRT/DNA) novorozeneckého skríningu.

3.5. Křenková et al. (2012) Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros.* (IF: 3.190)

Identifikace obou kauzálních mutací u CF pacientů je důležitá z hlediska vztahu mezi genotypem a fenotypem, kdy znalost přesné molekulární podstaty onemocnění umožňuje předpovědět průběh onemocnění a individuálně stanovit léčbu, včetně případné mutačně specifické terapie. Znalost patogenních mutací genu *CFTR* zároveň podpoří klinickou diagnózu, umožní budoucí prenatální diagnostiku a možnost stanovení přenosu těchto alel a rizik u dalších rodinných příslušníků. Vzhledem k velkému množství dosud identifikovaných mutací v genu *CFTR* a k jejich populačně specifickému zastoupení je při molekulárně genetickém vyšetření klíčové znát etnický původ probanda a distribuci i četnost mutací v příslušné populaci.

To bylo hlavním cílem této publikace, která sumarizuje výsledky dvou dekád výzkumné a diagnostické činnosti v oblasti molekulárně genetické diagnostiky cystické fibrózy v České republice. Práce přináší přehled spektra mutací nalezených u české populace, která populační skladbou reprezentuje obyvatelstvo střední Evropy, a výsledky tak mohou být užitečné i pro okolní státy s nízkou detekční záchytností, pro velké množství krajanů žijících v Severní Americe i pro vývoj populačně-specifických diagnostických panelů.

Z téměř 3000 vyšetřovaných rodin byla jednoznačná klinická diagnóza CF stanovena u 600 nepříbuzných probandů. Vzhledem k autozomálně recesivnímu charakteru onemocnění spočívá strategie tzv. kaskádového molekulárně genetického vyšetření genu *CFTR* v postupném vylučování nejčastějších mutací v dané populaci. V současné době začínáme vyšetřením komerčního panelu 50 mutací (Elucigene CF-EU2v1TM), následovaného analýzou genových přeskupení genu *CFTR* metodou MLPA a analýzou celé kódující sekvence genu *CFTR* pomocí mutačního skenování metodou HRM a sekvenační analýzy.

Tímto přístupem se podařilo detekovat 99.50% všech CF alel (1194/1200) v české populaci. Celkem bylo nalezeno 91 různých mutací, z nichž se pouze 7 vyskytovalo ve frekvenci nad 1% (F508del - 67.42%, CFTRdele2,3(21kb) - 5.75%, G551D - 2.92%, N1303K - 2.42%, G542X - 2.0%, 3849+10kbC>T - 1.67% a 1898+1G>A - 1.42%) a celých 52 mutací se vyskytovalo privátně pouze v jedné rodině.

Podařilo se detekovat 20 nových mutací a 1 polymorfismus, které byly nahlášený do mezinárodní databáze Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium Database (CFGAC, <http://www.genet.sick-kids.on.ca/cftr/>). Poskytnutí jejich klinického dopadu na své nosiče by mohlo pomoci při predikci fenotypu v případě nálezů dané mutace u dalšího CF pacienta, neboť u vzácných mutací chybí funkční studie na proteinové úrovni demonstrující jejich patogenetický potenciál. Sdílení těchto údajů je velmi přínosné pro zhodnocení závažnosti mutací, potažmo formy onemocnění, a to především v případě prenatální diagnostiky. Jedna z těchto nových mutací vznikla na paternální alele mechanismem *de novo*, tj. ve frekvenci 1/1200 CF alel, což je ve shodě s publikovanými daty (Girodon et al. 2008). Dále byl na základě korelace mezi fenotypem a genotypem predikován nepatogenetický potenciál některých variant (V754M, S1456N).

Na základě těchto dat byla vypočtena detekční záchytnost komerčního kitu Elucigene CF-EU2v1TM, který je v českých diagnostických laboratořích hojně rozšířen, na téměř 91%. Metoda MLPA detekující delece/duplikace na úrovni celých exonů přispěla k dosažené populační záchytnosti 1% a mutační skenování se sekvenční analýzou detekovaly dalších 94 alel (7.8%). Ačkoliv komerční diagnostická souprava Elucigene CF-EU2v1TM dosahuje dostatečnou záchytnost pro využití v rutinní diagnostice i novorozeneckém skríningu CF, molekulárně genetická diagnostika u pacientů s CF by měla v každém případě zahrnovat všechny mutace, které se v příslušné populaci vyskytují s četností vyšší než 0.5 %, proto by mutace I336K a S945L měly být přidány do rutinně používaného testovacího panelu.

Konečně průběžné výsledky této studie byly použity i v rámci optimalizace alternativních protokolů novorozeneckého skríningu CF zahrnujících DNA diagnostiku mutací v genu *CFTR* v české populaci na našem pracovišti (Krulisova et al. 2012), který však byl pouze mým vedlejším projektem a nebude proto blíže diskutován.

3.6. Tüttelmann et al. (2010) A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *Int J Androl.* (IF: 3.591)

V evropských zemích je během posledních pár desetiletí sledována pomalá setrvalá tendence ke snižování kvality mužského ejakulátu. Za jednu z příčin je považován zvýšený výskyt umělých estrogenů v prostředí a další negativní civilizační vlivy. Neobjasněných příčin defektní spermatogeneze a zhoršených funkčních parametrů spermatu je však stále mnoho, a proto jsme se v naší práci zaměřili na studium příčin genetických, konkrétně na zhodnocení výskytu a stanovení frekvence mutací a polymorfismů protaminových genů (*PRM1*, *PRM2*) a objasnění vlivu těchto variant na poruchy spermiogeneze.

Předchozí studie prokázaly jednoznačný vztah aberantní exprese protaminů k mužské infertilitě, kdy správné množství obou proteinů je nezbytné pro správnou diferenciaci spermií (Carrell et al. 2008). Dále bylo prokázáno, že myši haploinsuficientní pro jeden z protaminových genů vykazují změny v uspořádání chromatinu a jaderné integritě. Tyto myši stále produkovaly spermie, ty však vykazovaly abnormální morfologii a sníženou pohyblivost a nebyly schopné oplodnit oocyt (Cho et al. 2001). Vzhledem k rozhodující roli protaminů v diferenciaci spermatid se tedy lze domnívat, že mutace těchto genů mohou vést k idiopatické infertilitě u mužů s normálním počtem spermií. Dosud publikovaná data zabývající se rolí protaminových variant a jejich asociací se semennými parametry v lidské neplodnosti jsou však neprůkazná, až rozporuplná (Jodar et al. 2011). Proto byla ve spolupráci s Univerzitou v Münsteru (Německo) provedena tato retrospektivní studie na reprezentativním souboru německých neplodných mužů a kontrol.

Sekvenční analýza (podle Sangera) obou exonů s příslušným intronem genů *PRM1* a *PRM2* byla provedena na souboru pacientů s idiopatickou infertilitou německého původu: 1/ u 88 mužů s teratozoospermii ($\leq 7\%$ morfologicky normálních forem) a normálním počtem spermií ($\geq 20 \cdot 10^6/\text{ml}$) simulující fenotyp *pr*m-haploinsuficientní myši, 2/ u 83 mužů s teratozoospermii ($\leq 7\%$ morfologicky normálních forem) a sníženým počtem spermií ($< 20 \cdot 10^6/\text{ml}$) a 3/ u 77 normozoospermických mužů ($\geq 19\%$ morfologicky normálních forem) s normálním počtem spermií ($\geq 20 \cdot 10^6/\text{ml}$).

V genu *PRMI* byly detekovány tři již publikované varianty, dvě vzácné: c.54G>A (rs35262993, exon 1, synonymní) (Aoki et al. 2006a, Ravel et al. 2007, Imken et al. 2009) a c.102G>T (rs355576928, exon 1, nesynonymní R34S) (Iguchi et al. 2006, Aoki et al. 2006a, Ravel et al. 2007, Kichine et al. 2008, Jodar et al. 2011) a jedna častá: c.139A>C/g.230A>C (rs737008, exon 2, synonymní) (Tanaka et al. 2003, Iguchi et al. 2006, Aoki et al. 2006a, Ravel et al. 2007, Imken et al. 2009, Jodar et al. 2011), a to ve shodných alelických i genotypových frekvencích u všech testovaných skupin. Frekvence variant detekovaných v *PRMI* byla srovnatelná s publikovanými studii (Tanaka et al. 2003, Aoki et al. 2006a). Výsledky této práce ohledně varianty c.102G>T, kde dochází ke změně argininu za serin, jsou ve shodě s rozsáhlou studií (Kichine et al. 2008) a popírají patologický potenciál této varianty zjištěný v dřívějších pracích (Iguchi et al. 2006, Ravel et al. 2007).

V genu *PRM2* bylo detekováno osm variant, kde šest bylo vzácných nahodile se vyskytujících v jednotlivých testovaných skupinách, jež lze považovat spíše za benigní polymorfismy: c.66T>C (exon 1, synonymní) (Aoki et al. 2006a, Jodar et al. 2011), c.201C>T (exon 1, synonymní) (Jodar et al. 2011, Imken et al. 2009, Aoki et al. 2006a), c.271+10C>T/g.281C>T (rs740007626, intron) (Aoki et al. 2006a, Imken et al. 2009, Jodar et al. 2011), c.271+19C>T/g.290C>T (rs740007625, intron) (Jodar et al. 2011, Imken et al. 2009, Aoki et al. 2006a), c.271+29A>G/g.300A>G (intron), c.271+106C>A/g.377C>T (intron), a dvě časté varianty nalezené ve shodných alelických i genotypových frekvencích u všech testovaných skupin: c.271+27G>C/g.298G>C (rs16460222; intron) (Aoki et al. 2006a, Tanaka et al. 2003, Imken et al. 2009, Jodar et al. 2011), c.271+102C>A/g.373C>A (rs2070923, intron) (Jodar et al. 2011, Tanaka et al. 2003, Aoki et al. 2006a, Imken et al. 2009).

Mezi třemi častými polymorfismy (*PRMI* g.230A>C a *PRM2* g.298G>C/g.373C>A) byla zjištěna silná vazba a byly sestaveny haplotypy, jejichž zastoupení se mezi testovanými skupinami nelišilo. Avšak při testování vlivu haplotypů na semenné parametry v skupině všech 248 mužů analyzovaných dohromady byla odhalena statisticky významná asociace. Homozygotní nosiči haplotypu ACC měli dvojnásobně vyšší počet spermií než muži bez tohoto haplotypu ($45 \times 10^6/\text{ml}$ x $24.2 \times 10^6/\text{ml}$). Je možné,

že spermie nosičů jiného než ACC haplotypu nejsou životaschopné či podléhají negativní selekci. To by signalizovala i zjištěná signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovi rovnováhy u polymorfismů tvořících haplotyp. Vliv haplotypu ACC na ostatní semenné parametry (morfologii, motilitu) nebyl prokázán.

Jelikož poměr protaminů ve spermiích nebyl měřen, nelze ověřit vliv haplotypů na jejich expresi a případný aberantní poměr PRM1/2, který byl jednoznačně asociován s mužskou neplodností (Balhorn et al. 1988).

Další výzkumy by se měly ubírat směrem k analýze variant genu *TNP2* či promotorovým variantám protaminových genů, které dosud nebyly hojně zkoumány. Dopad ACC haplotypu na spermatogenezi by měl být ověřen dalšími studii na jiných populacích, aby bylo umožněno jeho případné klinické a diagnostické využití. Pro snadnou a rychlou detekci polymorfismů tvořících tento kauzální haplotyp by bylo vhodné zavést metodu HRM (genotypizaci variant metodou malých ampliconů), která byla v této dizertační práci detailně zhodnocena a na rozličných studiích potvrzena ideálnost a vhodnost této metody pro účely detekce neznámých genových variant i cíleně analyzovaných polymorfismů/mutací.

Konečně v rámci studia mužské neplodnosti jsem se podílela na replikačních studiích frekvence mutací v genu *ART3* v české populaci neplodných mužů (Norambuena et al. 2012a) a následně u německé populace (Norambuena et al. 2012b), které však byly pouze mými vedlejšími projekty a nebudou proto blíže diskutovány.

4. ZÁVĚR

1/ Podrobným a rozsáhlým zhodnocením metody HRM a třech různých platforem umožňujících tuto metodu (LightScannerTM, LightCycler 480 a RotorGene6000) byla jednoznačně potvrzena její optimální využitelnost v detekci mutací v rutinní DNA diagnostice. HRM představuje rychlou, citlivou a finančně nenáročnou metodu, jejíž všechny kroky mohou být provedeny v jedné zkumavce v jednom přístroji, což snižuje riziko kontaminace na minimum a výrazně šetří čas. Simultánní kombinace mutačního skenování a genotypizace častých polymorfismů ještě více snižuje potřebu sekvenční analýzy. I přes rychlé rozšiřování metody sekvenování nové generace (NGS), která je charakteristická svou náročností na vybavení, náklady na provoz a obtížným vyhodnocením získaných dat, si HRM zachovává v DNA diagnostice stále své významné místo. Poskytnutím metodických pokynů, návodů a validačních koncepcí jsme se pokusili usnadnit implementaci této technologie a umožnit její úspěšné využití i v dalších laboratořích.

2/ Díky integraci přesné klinické diagnostiky a komplexního molekulárně genetického přístupu (zahrnujícího i metodu HRM) v rámci Národního centra pro diagnostiku a léčbu cystické fibrózy ve Fakultní nemocnici v Praze Motole (Věstník Ministerstva zdravotnictví č. 4/2012 z 28. května 2012) se podařilo zmapovat téměř kompletní spektrum populačně specifických mutací u českých pacientů s tímto onemocněním (>99% populační záchytnost). To má význam pro a/ zkvalitnění poskytovaných genetických služeb u pacientů s CF, b/ další rozvoj novorozeneckého skríningu CF a c/ následnou aplikaci včasné a správné léčby/terapie, což příznivě ovlivní průběh a prognózu onemocnění a umožní snížit léčebné náklady. Současně jsme přispěli ke zvýšení kvality molekulárně genetické diagnostiky CF na západní Ukrajině, kde ekonomické a metodické limitace umožňovaly testovat pouze panel světově nejčastějších mutací, a to zásluhou odhalené mutace 2184insA, která se ukázala být po mutaci F508del druhou nejfrekventovanější mutací nalézanou u CF pacientů ukrajinské národnosti. Zvýšením populační záchytnosti CF mutací byly splněny podmínky pro zavedení novorozeneckého skríningu. Vzhledem k vysokému počtu Ukrajinců pracujících a žijících

na našem území jsou zjištěné výsledky přínosné i pro české laboratoře, kdy je při testování probandů ukrajinské národnosti nezbytné myslet na testování této mutace, která není součástí celorepublikově hojně rozšířeného diagnostického kitu firmy Elucigene.

3/ Mutační analýzou kandidátních genů *PRM1* a *PRM2* pro mužskou infertilitu se potvrdilo, že mutace v těchto genech jsou vzácné a nejsou přímou příčinou poruch spermiogeneze. Podařilo se však nalézt statisticky signifikantní asociaci mezi haplotypem ACC, tvořeným třemi častými polymorfismy těchto genů, a koncentrací spermií a jejich celkovým počtem. Před praktickou implementací těchto výsledků do rutinní diagnostiky je nezbytné ověřit platnost nálezu na dalších souborech a populacích.

5. PŘEHLED PUBLIKACÍ, POSTERŮ A PŘEDNÁŠEK

5.1. Publikace

1. Křenková P, Piskáčková T, Holubová A, Balaščaková M, Krulišová V, Camajová J, Turnovec M, Libík M, Norambuena P, Stambergová A, Dvořáková L, Skalická V, Bartošová J, Kučerová T, Fila L, Zemková D, Vávrová V, Koudová M, Macek M, Krebsová A, Macek M Jr. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros*. 2012 Dec 28. doi:pii: S1569-1993(12)00235-4. 10.1016/j.jcf.2012.12.002. [Epub ahead of print]. (IF 3.190)
2. Krulišová V, Balaščaková M, Skalická V, Piskáčková T, Holubová A, Paděrová J, Křenková P, Dvořáková L, Zemková D, Kračmar P, Chovancová B, Vávrová V, Stambergová A, Votava F, Macek M Jr. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr*. 2012;171(8):1223-9. (IF 1.879)
3. Norambuena PA, Diblík J, Křenková P, Paulasová P, Macek M Sr, Macek M Jr. ADP-ribosyltransferase 3 (ART3) variant is associated with reduced sperm counts in Czech males: case/control association study replicating results from a Japanese population. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33(1):48-52. (IF 1.296)
4. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A; EuroGentest Validation Group (Mike Zoccoli, Jana Camajova, Petra Krenkova, Patricia Norambuena, Alexandra Stambergova, Milan Macek, Isabelle Moix, Patrick M. Bossuyt, Els Voorhoeve, Bert Bakker, Sarah Berwouts, Tom Janssens, Ivo Salden, Trudi McDevitt, David Barton, Jean Amos-Wilson, Ian Mann , Hans Scheffer). *Eur J Hum Genet*. 2010;18(12):1276-88. (IF 4.400), citováno: 10x

5. Makukh H, Krenková P, Tyrkus M, Bober L, Hancárová M, Hnateyko O, Macek M Jr. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *J Cyst Fibros.* 2010;9(5):371-5. (IF 3.190), citováno: 2x
6. Tüttelmann F, Křenková P, Römer S, Nestorovic AR, Ljubic M, Stambergová A, Macek Jr M, Macek Sr M, Nieschlag E, Gromoll J, Simoni M. A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *Int J Androl.* 2010;33(1):e240-8. (IF 3.591), citováno: 4x
7. Norambuena PA, Copeland JA, Krenková P, Stambergová A, Macek M Jr. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clin Biochem.* 2009 Aug;42(12):1308-16. (IF 2.076), citováno: 18x
8. Krenková P, Norambuena P, Stambergová A, Macek M Jr. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the CFTR gene. *Folia Biol (Praha).* 2009; 55(6):238-242. (IF 1.151), citováno: 3x
9. van der Stoep N, van Paridon CD, Janssens T, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Matthijs G, Bakker E. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner. *Hum Mutat.* 2009;30(6):899-909. (IF 5.686), citováno: 47x
10. Balašáková M, Piskáčková T, Holubová A, Raušová E, Kazárová V, Krebsová A, Koudová M, Štambergová A, Čamajová J, Norambuena P, Křenková P, Votava F, Vávrová V, Macek M st., Macek M ml. Současné metodické postupy a přehled preimplantační, prenatalní a postnatální DNA diagnostiky cystické fibrózy v České republice. *Česko-slovenská Pediatrie.* 2008; 63(2):62-75. (bez IF)
11. Macek M ml, Čamajová J, Křenková P, Norambuena P, Goetz P, Macek M st, Havlovicová M, Štambergová A. EuroGentest: evropský projekt zaměřený na harmonizaci a zvýšení úrovně genetických služeb. *Česko-slovenská Pediatrie.* 2007; 62(7-8):444-446. (bez IF)

5.2. Postery

1. Chrudimská Jana, Křenková Petra, Macek Milan jr., Macek Milan sr. "Distribution of the insLQ variant in luteinizing hormone receptor (LHCGR) in fertile Czech male and female controls". Ovarian Club II. Praha, listopad 2012.
2. J. Chrudimská, P. Křenková, M. Macek jr., M. Macek sr. "Distribuce polymorfismu insLQ v genu pro receptor luteinizačního hormonu (*LHCGR*) v české populaci". 11. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 22. sympozium asistované reprodukce. Brno, listopad 2012.
3. P. Norambuena, P. Krenkova, F. Tuettelmann, S. Kliesch, P. Paulasova, A. Stambergova, M. Macek Jr., M. Macek Sr. "ADP-ribosyltransferase variant (ART3) in Czech and German males with reduced sperm counts". European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Istanbul, Turecko, červenec, 2012.
4. L. Dvořáková, J. Paděrová, D. Chudoba, D. Novotná, H. Kuželová, P. Křenková, J. Drábová, Z. Zmítková, M. Macek Jr, M. Macek Sr. "Possibility of MLPA prenatal detection of the most clinically important chromosomal abnormalities". European Society of Human Genetics Conference. Norimberk, Německo, červen 2012
5. Krenkova P., Tuettelmann F., Kliesch S., Paulasova P., Diblík J., Macek M. jr, Macek M. sr. "*PRM1* and *PRM2* gene polymorphisms in Czech and German men with idiopathic oligozoospermia". European Society of Human Genetics Conference. Norimberk, Německo, červen 2012.
6. Norambuena P, Krenkova P, Stambergova A, Macek M Jr., Macek M Sr. "PARP-3 polymorphism of an ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) is associated with reduced sperm count in Czech dysfertile men". The 12th International Congress of Human Genetics (ICHG) and the American Society of Human Genetics 61st Annual Meeting (ASHG). Montreal, Kanada. říjen, 2011.
7. Krulisova V, Balascakova M, Skalicka V, Piskackova T, Holubova A, Stambergova A, Dvorakova L, Krenkova P, Zemkova D, Kracmar P, Vavrova V,

- Macek M Jr., and Votava F. "The Comparison of Parallel IRT/DNA and IRT/PAP/DNA+ST Cystic Fibrosis Newborn Screening Protocols in the Czech Republic". The 7th ISNS European Neonatal Screening Regional Meeting. Ženeva, Švýcarsko, srpen 2011.
8. Křenková P., Tuettelmann F., Paulasová P., Diblík J., Macek M. jr, Macek M. sr. "*PRM1* and *PRM2* gene polymorphisms in Czech men with idiopathic oligozoospermia, normozoospermic men and men with proven fertility". European Society of Human Genetics Conference. Amsterdam, Nizozemí, květen 2011.
 9. Křenková P., Tuettelmann F., Paulasová P., Diblík J., Macek M. jr, Macek M. sr. "*PRM1* and *PRM2* gene polymorphisms in Czech men with idiopathic oligozoospermia, normozoospermic men and men with proven fertility". Studentská vědecká konference 2.LF Univezity Karlovy. Praha, duben, 2011.
 10. Norambuena PA, Křenková P., Stambergová A, Macek M Sr and Macek M Jr. "An ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) polymorphism is associated with reduced sperm count in Czech men". Studentská vědecká konference 2.LF Univezity Karlovy. Praha, duben, 2011.
 11. Petra Krenkova, Tereza Piskackova, Miroslava Balascakova, Andrea Holubova, Jana Camajova, Miroslava Hancarova, Lenka Dvorakova, Veronika Skalicka,, Alexandra Stambergova, Vera Vavrova, Milan Macek Jr. "Spectrum of *CFTR* mutations in the Czech Republic". 33rd European Cystic Fibrosis Conference. Valencie, Španělsko, červen 2010.
 12. P. Krenkova, H. Makukh, M. Hancarova, L. Dvorakova, A. Stambergova, M. Macek Jr. "*CFTR* gene analysis in the Western-Ukrainian population: an unusually high frequency of the 2184insA mutation". 32nd European Cystic Fibrosis Conference. Brest, Francie, červen 2009.
 13. P. Krenkova, F. Tüttelmann, J. Gromoll, P. Norambuena, I. Eliasova, M. Simoni, M. Macek jr., M. Macek sr. "Comparison of *PRM1* and *PRM2* genes polymorphisms in fertile Czech and normozoospermic German men". European Society of Human Genetics Conference. Vídeň, Rakousko, květen 2009.

14. F. Tüttelmann, P. Křenková, A. Štambergová, M. Macek jr., M. Macek Sr, E. Nieschlag, J. Gromoll, M. Simoni. "Protamine 1 and 2 sequence variants in teratozoospermic men with normal vs. reduced sperm concentration and normozoospermic men". The 11th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). Paříž, Francie, listopad 2008.
15. F. Tüttelmann, P. Křenková, A. Štambergová, M. Macek jr., M. Macek Sr, E. Nieschlag, J. Gromoll, M. Simoni. "Protamine 1 and 2 sequence variants in teratozoospermic men with normal vs. reduced sperm concentration and normozoospermic men". 5th European Congress of Andrology. Řím, Itálie, listopad 2008
16. P. Křenková, F. Tüttelmann, A. Štambergová, M. Macek jr., M. Macek Sr, E. Nieschlag, J. Gromoll, M. Simoni. "Molekulárně genetická studie vztahu genů protamin 1 a protamin 2 k poruchám spermiogeneze". 7. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 18. symposium asistované reprodukce. Brno, listopad 2008.
17. Macek M Jr, Křenková P, Norambuena P and Štambergová A. "Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of the *CFTR* gene". North American CF Conference (NACFC). Orlando, Florida, USA, říjen 2008.
18. Křenková P, Štambergová A, Norambuena P and Macek M Jr. "Mutation scanning of the *CFTR* gene by high resolution melting analysis (HRM)". 31th European Cystic Fibrosis Conference. Praha, červen 2008.
19. Norambuena P, Copeland J, Křenková P, Macek M Jr and Štambergová A. "Genotyping of MTHFR 677C>T and 1298 A>C Variants by High Resolution Melting of Small Amplicons: an Example of Method Validation". European Society of Human Genetics Conference. Barcelona, Španělsko, květen-červen 2008.
20. Balašáková M, Křenková P, Norambuena P, Fialová M, Štambergová A, Macek M Jr. "Selektivní výhoda nosičství mutace F508del ve vztahu k laktóze"

intolerancí". Studentská vědecká konference 2.LF Univezity Karlovy. Praha, duben 2008.

5.3. Přednášky

1. Norambuena P, Křenková P, Štambergová A, Macek M Jr., Macek M Sr. "ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) variant is associated with idiopathic oligospermia". 10. Česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 21. Sympóziium asistované reprodukce. Brno, listopad 2011.
2. P Křenková, F Tüttelmann, S Römer, AR Nestorovic, M Ljujic, A Štambergová, M Macek Jr., E. Nieschlag, J Gromoll, M Simoni, M Macek Sr. "ACC haplotyp protaminových genů *PRM1* a *PRM2* je asociován s vyšším počtem spermií". 8. česko-slovenská konference reprodukční gynekologie a 19. symposium asistované reprodukce. Brno, 2009.
3. Norambuena P and Krenkova P. "Our experiences with HRM method evaluation for gene scanning and small amplicon genotyping". Seminar - "Roche Your Partner in Discovery". Praha, červen 2008.
4. Norambuena P, Copeland J, Krenkova P, Nestorovic A, Stambergova A and Macek M Jr. "Genotyping of MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms by High Resolution Melting of Small Amplicons". 11. celostátní konference DNA diagnostiky. Praha, prosinec 2007.
5. Křenková P, Štambergová A, Norambuena P, Macek M jr. "Využití analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (HRM) pro detekci mutací/SNP v *CFTR* a *BRCA 1* genu". Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS a 40. výroční cytogenetické konference. Praha, září 2007.
6. Štambergová A, Křenková P, Norambuena P and Macek M Jr. "Zkušeností s analyzátozem křivek tání s vysokým rozlišením (HRMCA) pro detekci mutací/SNP genu *CFTR* a *BRCA1*". "HRM – High Resolution Melting" Workshop. Genetica. Praha, květen 2007.

7. Štambergová A, Křenková P, Norambuena P. "První zkušenosti s analyzátozem křivek tání s vysokým rozlišením (HRMCA) pro detekci mutací/SNP CFTR a BRCA 1 genu". Workshop „Detekce mutací“ pořádaný firmou KRD. Praha, únor 2007.

5.4. Ostatní

1. 1. místo za nejlepší abstrakt 19. symposia asistované reprodukce, Brno, listopad 2009: P Křenková, F Tüttelmann, S Römer, AR Nestorovic, M Ljujic, A Štambergová, M Macek Jr., E. Nieschlag, J Gromoll, M Simoni, M Macek Sr. "ACC haplotyp protaminových genů *PRM1* a *PRM2* je asociován s vyšším počtem spermií".
2. Úspěšná účast v mezilaboratorní externí kontrole kvality 2012 – vyšetření nejčastějších aneuploidí chromozomů 13, 18, 21 X a Y metodou QF-PCR

6. SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMH	anti-müllerický hormon
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
AZF	azoospermický faktor
bp	base pair, pár bazí
BRCA1	breast cancer 1, gen pro karcinom prsu a ovárií
CBAVD	kongenitální bilaterální absence (ageneze) vas deferens
CF	cystická fibróza
CFGAC	Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium Database, databáze CFTR1
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, transmembránový regulátor vodivosti
CFTR2	databáze Clinical and functional translation of CFTR
ČR	Česká republika
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, denaturační gradientová gelová elektroforéza
dHPLC	denaturing High Performance Liquid Chromatography, denaturační vysoce účinná kapalinová chromatografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	double-stranded DNA, dvouřetězcová DNA
ENaC	Epithelial Sodium Channel, epitelový sodíkový kanál
EU	Evropská Unie
FN	false negativity, falešná negativita
FP	false positivity, falešná pozitivita
FSH	folikulistimulační hormon
FSHR	receptor pro folikulistimulační hormon
GnRH	gonadotropin-releasing hormon, gonadotropiny uvolňující hormon
HA	Heteroduplex Analysis, analýza heteroduplexů
HRM	High Resolution Meltig, vysokorozlišovací analýza křivek tání
IRT	imunoreaktivní trypsinogen
kb	kilobáze

kDa	kilodalton
KO	knockout, cílené vyřazení z funkce
LH	luteinizační hormon
LHR	receptor pro luteinizační hormon
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, multiplexní amplifikace prob závislá na ligaci
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MSD	Membrane Spanning Domains, transmembránová doména
MTHFR	methylenetetrahydrofolátreduktáza
NBD	Nucleotide Binding Domain, nukleotid vazebná doména
ORCC	Outwardly Rectified Chloride Channel, chloridový kanál
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PRM	protamin
R	regulační doména
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction, kvantitativní PCR v reálném čase
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms, jednonukleotidové polymorfismy
SOX9	SRY- box 9
SRY	sex determining region on chromosome Y, oblasti určující pohlaví na chromozomu Y
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism, metoda jednořetězcového konformačního polymorfismu
ssDNA	single-stranded DNA, jednořetězcová DNA
TGCE	Temperature Gradient Capillary Electrophoresis, kapilární elektroforéza s teplotním gradientem
Tm	melting temperature, teplota tání
TN	true negativity, správná negativita
TNP	tranziční protein
TP	true positivity, správná pozitivita
TTGE	Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis, elektroforéza s teplotním gradientem
USA	United States of America, Spojené státy americké
v-LHβ	variantní β podjednotka luteinizačního hormonu
WHO	World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace

7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Achard, C., C. Courtillot, O. Lahuna, G. Meduri, J. C. Soufir, P. Liere, A. Bachelot, H. Benyounes, M. Schumacher, F. Kuttann, P. Touraine & M. Misrahi (2009) Brief Report: Normal Spermatogenesis in a Man with Mutant Luteinizing Hormone. *New England Journal of Medicine*, 361, 1856-1863.
- Ahda, Y., J. Gromoll, A. Wunsch, K. Asatiani, M. Zitzmann, E. Nieschlag & M. Simoni (2005) Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in normozoospermic and azoospermic men. *Journal of Andrology*, 26, 494-499.
- Ammer, H., A. Henschen & C. H. Lee (1986) ISOLATION AND AMINO-ACID-SEQUENCE ANALYSIS OF HUMAN-SPERM PROTAMINE-P1 AND PROTAMINE-P2 - OCCURRENCE OF 2 FORMS OF PROTAMINE-P2. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 367, 515-522.
- Aoki, V. W. & D. T. Carrell (2003) Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 5, 315-324.
- Aoki, V. W., G. L. Christensen, J. F. Atkins & D. T. Carrell (2006a) Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertility and Sterility*, 86, 1416-1422.
- Aoki, V. W., L. H. Liu & D. T. Carrell (2005) Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Human Reproduction*, 20, 1298-1306.
- Aoki, V. W., L. H. Liu, K. P. Jones, H. H. Hatasaka, M. Gibson, C. M. Peterson & D. T. Carrell (2006b) Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility*, 86, 1408-1415.
- Audrezet, M. P., A. Dabricot, C. Le Marechal & C. Ferec (2008) Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10, 424-434.
- Balascakova, M., A. Holubova, V. Skalicka, D. Zemkova, P. Kracmar, L. Gonsorcikova, J. Camajova, T. Piskackova, J. Lebl, P. Drevinek, V. Gregor, V. Vavrova, F. Votava & M. Macek (2009) Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: Defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8, 224-227.
- Balaščaková, M., T. Piskáčková, A. Holubová, E. Raušová, V. Kazárová, A. Krebsová, M. Koudová, A. Štambergová, J. Čamajová, P. Norambuena, P. Křenková, F. Votava,

- V. Skalická, V. Vávrová, M. Macek st. & M. Macek ml. (2008) Současné metodické postupy a přehled preimplantační, prenatalní a postnatální DNA diagnostiky cystické fibrózy v České republice. *Česko-slovenská Pediatrie*, 63, 62-75.
- Balhorn, R., S. Reed & N. Tanphaichitr (1988) ABERRANT PROTAMINE-1 PROTAMINE-2 RATIOS IN SPERM OF INFERTILE HUMAN MALES. *Experientia*, 44, 52-55.
- Belokopytova, I. A., E. I. Kostyleva, A. N. Tomilin & V. I. Vorobev (1993) HUMAN MALE-INFERTILITY MAY BE DUE TO A DECREASE OF THE PROTAMINE-P2 CONTENT IN SPERM CHROMATIN. *Molecular Reproduction and Development*, 34, 53-57.
- Bobadilla, J. L., M. Macek, J. P. Fine & P. M. Farrell (2002) Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, 19, 575-606.
- Braun, R. E. (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics*, 28, 10-12.
- Carrell, D. T., B. R. Emery & S. Hammoud (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*, 13, 313-327.
- Carrell, D. T., B. R. Emery & S. Hammoud (2008) The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *International Journal of Andrology*, 31, 537-545.
- Carrell, D. T. & L. H. Liu (2001) Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology*, 22, 604-610.
- Carson, M. R., S. M. Travis & M. J. Welsh (1995) THE 2 NUCLEOTIDE-BINDING DOMAINS OF CYSTIC-FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR (CFTR) HAVE DISTINCT FUNCTIONS IN CONTROLLING CHANNEL ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1711-1717.
- Chevallier, P., N. Mauro, D. Feneux, P. Jouannet & G. David (1987) ANOMALOUS PROTEIN COMPLEMENT OF SPERM NUCLEI IN SOME INFERTILE MEN. *Lancet*, 2, 806-807.
- Cho, C., H. Jung-Ha, W. D. Willis, E. H. Goulding, P. Stein, Z. Xu, R. M. Schultz, N. B. Hecht & E. M. Eddy (2003) Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of Reproduction*, 69, 211-217.
- Cho, C., W. D. Willis, E. H. Goulding, J. H. Haesook, Y. C. Choi, N. B. Hecht & E. M. Eddy (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or-2 causes infertility in mice. *Nature Genetics*, 28, 82-86.

- Chou, L. S., E. Lyon & C. T. Wittwer (2005) A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning - Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *American Journal of Clinical Pathology*, 124, 330-338.
- Ciccione, N. A. & U. B. Kaiser (2009) The biology of gonadotroph regulation. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 16, 321-327.
- Dadoune, J. P. (1995) The nuclear status of human sperm cells. *Micron*, 26, 323-345.
- De Kretser, D. M. & H. W. G. Baker (1999) Infertility in men: Recent advances and continuing controversies. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 3443-3450.
- de Yebra, L., J. L. Balleca, J. A. Vanrell, L. Bassas & R. Oliva (1993) COMPLETE SELECTIVE ABSENCE OF PROTAMINE-P2 IN HUMANS. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 10553-10557.
- de Yebra, L., J. L. Balleca, J. A. Vanrell, M. Corzett, R. Balhorn & R. Oliva (1998) Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertility and Sterility*, 69, 755-759.
- Denning, C. R., S. C. Sommers & H. J. Quigley (1968) INFERTILITY IN MALE PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS. *Pediatrics*, 41, 7-&.
- Domenjoud, L., G. Nussbaum, I. M. Adham, G. Greeske & W. Engel (1990) GENOMIC SEQUENCES OF HUMAN PROTAMINES WHOSE GENES, PRM1 AND PRM2, ARE CLUSTERED. *Genomics*, 8, 127-133.
- Du, J. W., K. Y. Xu, L. Y. Fang & X. L. Qi (2012) Association between mutations of the luteinizing hormone beta subunit and female infertility. *Molecular Medicine Reports*, 5, 473-476.
- Dufresne, S. D., D. R. Belloni, W. A. Wells & G. J. Tsongalis (2006) BRCA1 and BRCA2 mutation screening using SmartCycler II high-resolution melt curve analysis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 130, 185-187.
- Emery, B. R. & D. T. Carrell (2006) The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryo-genesis. *Asian Journal of Andrology*, 8, 131-142.
- Engel, W., S. Keime, H. Kremling, H. Hameister & G. Schluter (1992) THE GENES FOR PROTAMINE-1 AND PROTAMINE-2 (PRM1 AND PRM2) AND TRANSITION PROTEIN 2 (TNP2) ARE CLOSELY LINKED IN THE MAMMALIAN GENOME. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 61, 158-159.
- Er, T. K. & J. G. Chang (2012) High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clinica Chimica Acta*, 414, 197-201.

- Erali, M., K. V. Voelkerding & C. T. Wittwer (2008) High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*, 85, 50-58.
- Erali, M. & C. T. Wittwer (2010) High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*, 50, 250-261.
- Estivill, X., C. Bancells, C. Ramos, A. Piazza, A. Carbonara, G. Mastella, A. Bonizzato, G. Castaldi, E. Dalcamo, M. Ferrari, P. Gasparini, G. Guanti, G. B. Leoni, P. F. Pignatti, P. Ronchetto, M. Seia, F. Torricelli, M. Goossens, F. ChevalierPorst, D. Bozon, B. SimonBouy, D. Feldmann, J. Elion, J. C. Kaplan, C. Ferec, M. Claustres, C. Clavel, E. Puchelle, J. Lunardi, M. Mathieu, H. Scheffer, D. J. J. Halley, A. M. W. vandenOuweland, A. Tijmensen, T. Casals, F. J. Gimenez, L. Ramos, M. Beneyto, J. Benitez, A. Palacio, B. Tummler, I. Bauer, T. Meitinger, A. Claass, M. Lindner, E. Schroder, M. Stuhmann, J. Cassiman, H. Cuppens, P. Cochaux, J. Poncin, L. Messian, V. S. Baranov, T. E. Ivaschenko, M. Bakay, J. Bal, M. Witt, M. Kanavakis, M. Tzetis, T. Antoniadis, J. Lavinha, P. Pacheco, A. Duarte, P. Loureiro, L. Kalaydjieva, D. Angelicheva, A. Jordanova, A. Savov, K. Eiklid, L. Holmberg, C. Schaedel, M. Ozguc, A. Gocmen, H. Erdern, S. LiechiGallati, M. Nemeti, G. Fekete, T. Klaassen, M. Schwarz, M. Schwartz, M. Macek, A. Krebsova, V. Vavrova, B. Kerem, D. Aveliovich, V. Ferak, L. Kadasi, H. Kayserova, D. Glavac, M. RavnikGlavac, G. D. Efremov, N. CankiKlein & J. Kere (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis in European populations. *Human Mutation*, 10, 135-154.
- Ferlin, A., F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka & C. Foresta (2007) Male infertility: role of genetic background. *Reproductive Biomedicine Online*, 14, 734-745.
- Gadsby, D. C., P. Vergani & L. Csanady (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, 440, 477-483.
- Gatewood, J. M., G. R. Cook, R. Balhorn, C. W. Schmid & E. M. Bradbury (1990) ISOLATION OF 4 CORE HISTONES FROM HUMAN SPERM CHROMATIN REPRESENTING A MINOR SUBSET OF SOMATIC HISTONES. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 20662-20666.
- Gazquez, C., J. Oriola, S. de Mateo, J. M. Vidal-Taboada, J. L. Balleca & R. Oliva (2008) A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 c -> A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *Journal of Andrology*, 29, 540-548.
- Graham, R., M. Liew, C. Meadows, E. Lyon & C. T. Wittwer (2005) Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clinical Chemistry*, 51, 1295-1298.
- Girodon, E., M. des Georges & R. Medina (2008) Occurrence of CFTR de novo mutations is not so rare. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7, Suppl 2, S6.

- Grievink, H. & K. M. Stowell (2008) Identification of ryanodine receptor 1 single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting using the LightCycler 480 System. *Analytical Biochemistry*, 374, 396-404.
- Gundry, C. N., S. F. Dobrowolski, Y. R. Martin, T. C. Robbins, L. M. Nay, N. Boyd, T. Coyne, M. D. Wall, C. T. Wittwer & D. H. F. Teng (2008) Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Research*, 36, 3401-3408.
- Gundry, C. N., J. G. Vandersteen, G. H. Reed, R. J. Pryor, J. Chen & C. T. Wittwer (2003) Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry*, 49, 396-406.
- Hammoud, S., B. R. Emery, V. W. Aoki & D. T. Carrell (2007) Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. *Archives of Andrology*, 53, 267-274.
- Hantash, F. M., J. B. Redman, K. Starn, B. Anderson, A. Buller, M. J. McGinniss, F. Quan, M. Peng, W. M. Sun & C. M. Strom (2006) Novel and recurrent rearrangements in the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening (vol 95, pg 361, 2000). *Human Genetics*, 119, 352-352.
- Harris, A. (1992) CYSTIC-FIBROSIS GENE. *British Medical Bulletin*, 48, 738-753.
- Hemann, M. T., K. L. Rudolph, M. A. Strong, R. A. DePinho, L. Chin & C. W. Greider (2001) Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 2023-2030.
- Herrmann, M. G., J. D. Durtschi, L. K. Bromley, C. T. Wittwer & K. V. Voelkerding (2006) Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry*, 52, 494-503.
- Highsmith, W. E., Q. Jin, A. J. Nataraj, J. M. O'Connor, V. D. Burland, W. R. Baubonis, F. P. Curtis, N. Kusukawa & M. M. Garner (1999) Use of a DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. I: Construction of the toolbox and evaluation of heteroduplex analysis. *Electrophoresis*, 20, 1186-1194.
- Houštek, J. & V. Vávrová (1962) K výskytu cystické fibrosy pankreatu v ČSSR. *Československá Pediatrie*, 17, 445-451.
- Hwang, T. C. & D. N. Sheppard (2009) Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *Journal of Physiology-London*, 587, 2151-2161.
- Iguchi, N., S. Yang, D. J. Lamb & N. B. Hecht (2006) An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *Journal of Medical Genetics*, 43, 382-384.

- Imken, L., H. Rouba, B. El Houate, N. Louanjli, A. Barakat, A. Chafik & K. McElreavey (2009) Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Molecular Human Reproduction*, 15, 733-738.
- Jager, S. (1990) SPERM NUCLEAR-STABILITY AND MALE-INFERTILITY. *Archives of Andrology*, 25, 253-259.
- Jodar, M., J. Oriola, G. Mestre, J. Castillo, A. Giwercman, J. M. Vidal-Taboada, J. L. Ballesca & R. Oliva (2011) Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *International Journal of Andrology*, 34, 470-485.
- Kerem, B. S., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald & L. C. Tsui (1989) IDENTIFICATION OF THE CYSTIC-FIBROSIS GENE - GENETIC-ANALYSIS. *Science*, 245, 1073-1080.
- Khara, K. K., M. Vlad, M. Griffiths & C. R. Kennedy (1997) Human protamines and male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 14, 282-290.
- Kichine, E., S. Msaidie, A. D. Bokilo, A. Ducourneau, A. Navarro, N. Levy, P. Terriou, P. Collignon, G. Boetsch, J. Chiaroni & M. J. Mitchell (2008) Low-frequency protamine 1 gene transversions c.102G -> T and c.-107G -> C do not correlate with male infertility. *Journal of Medical Genetics*, 45, 255-256.
- Knauff, E. A. H., L. Franke, M. A. van Es, L. H. van den Berg, Y. T. van der Schouw, J. S. E. Laven, C. B. Lambalk, A. Hoek, A. J. Goverde, S. Christin-Maitre, A. J. Hsueh, C. Wijmenga, B. Fauser & P. O. F. C. Dutch (2009) Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Human Reproduction*, 24, 2372-2378.
- Kobayashi, H., A. Sato, E. Otsu, H. Hiura, C. Tomatsu, T. Utsunomiya, H. Sasaki, N. Yaegashi & T. Arima (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics*, 16, 2542-2551.
- Krulisova, V., M. Balacakova, V. Skalicka, T. Piskackova, A. Holubova, J. Paderova, P. Krenkova, L. Dvorakova, D. Zemkova, P. Kracmar, B. Chovancova, V. Vavrova, A. Stambergova, F. Votava & M. Macek (2012) Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *European Journal of Pediatrics*, 171, 1223-1229.
- Kuhnert, B. & E. Nieschlag (2004) Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction Update*, 10, 327-339.
- Kurtz, K., F. Martinez-Soler, J. Ausio & M. Chiva (2007) Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 1432-1441.
- Latronico, A. C., J. Anasti, I. J. P. Arnhold, R. Rapaport, B. B. Mendonca, W. Bloise, M. Castro, C. Tsigos & G. P. Chrousos (1996) Testicular and ovarian resistance to

luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *New England Journal of Medicine*, 334, 507-512.

- Lerman, L. S. & K. Silverstein (1987) COMPUTATIONAL SIMULATION OF DNA MELTING AND ITS APPLICATION TO DENATURING GRADIENT GEL-ELECTROPHORESIS. *Methods in Enzymology*, 155, 482-501.
- Li, Q. B., Z. W. Liu, H. Monroe & C. T. Culiati (2002a) Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*, 23, 1499-1511.
- Li, T. C., M. Makris, M. Tomsu, E. Tuckerman & S. Laird (2002b) Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Human Reproduction Update*, 8, 463-481.
- Liew, M., R. Pryor, R. Palais, C. Meadows, M. Erali, E. Lyon & C. Wittwer (2004) Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50, 1156-1164.
- Lofrano-Porto, A., G. B. Barra, L. A. Giacomini, P. P. Nascimento, A. C. Latronico, L. A. Casulari & F. D. D. Neves (2007) Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. *New England Journal of Medicine*, 357, 897-904.
- Lubamba, B., B. Dhooche, S. Noel & T. Leal (2012) Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical Biochemistry*, 45, 1132-1144.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon & G. B. Pier (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 194-+.
- Macek, M. ml., J. Čamajová, P. Křenková, P. Norambuena, P. Goetz, M. Macek st., M. Havlovicová & A. Štambergová (2007) EuroGentest: evropský projekt zaměřený na harmonizaci a zvýšení úrovně genetických služeb. *Česko-slovenská Pediatrie*, 62, 444-446.
- Mafra, F. A., B. Bianco, D. M. Christofolini, A. M. B. Souza, K. Zulli & C. P. Barbosa (2010) Luteinizing hormone beta-subunit gene (LH beta) polymorphism in infertility and endometriosis-associated infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 151, 66-69.
- Margraf, R. L., R. Mao, W. E. Highsmith, L. M. Holtegaard & C. T. Wittwer (2006) Mutation scanning of the RET protooncogene using high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, 52, 138-141.
- Martins, R. P., G. C. Ostermeier & S. A. Krawetz (2004) Nuclear matrix interactions at the human protamine domain - A working model of potentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 51862-51868.

- Mattocks, C. J., M. A. Morris, G. Matthijs, E. Swinnen, A. Corveleyn, E. Dequeker, C. R. Muller, V. Pratt, A. Wallace & G. EuroGentest Validation (2010) A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics*, 18, 1276-1288.
- Matzuk, M. M. & D. J. Lamb (2008) The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, 14, 1197-1213.
- Miescher, F. (1874) Das Protamin - Eine neue organische Basis aus den Samenf - den des Rheinlachs. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 7, 376.
- Montgomery, J., C. T. Wittwer, J. O. Kent & L. M. Zhou (2007) Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clinical Chemistry*, 53, 1891-1898.
- Morral, N., J. Bertranpetit, X. Estivill, V. Nunes, T. Casals, J. Gimenez, A. Reis, R. Varonmateeva, M. Macek, L. Kalaydjieva, D. Angelicheva, R. Dancheva, G. Romeo, M. P. Russo, S. Garnerone, G. Restagno, M. Ferrari, C. Magnani, M. Claustres, M. Desgeorges, M. Schwartz, M. Schwarz, B. Dallapiccola, G. Novelli, C. Ferec, M. Dearce, M. Nemeti, T. Kere, M. Anvret, N. Dahl & L. Kadasi (1994) THE ORIGIN OF THE MAJOR CYSTIC-FIBROSIS MUTATION (DELTA-F508) IN EUROPEAN POPULATIONS. *Nature Genetics*, 7, 169-175.
- Nagasaki, K., N. Katsumata, Y. Ogawa, T. Kikuchi & M. Uchiyama (2010) Novel C617Y mutation in the 7th transmembrane segment of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in a Japanese boy with peripheral precocious puberty. *Endocrine Journal*, 57, 1055-1060.
- Niel, F., J. Martin, F. Dastot-Le Moal, B. Costes, B. Boissier, V. Delattre, M. Goossens & E. Girodon (2004) Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *Journal of Medical Genetics*, 41.
- Norambuena, P. A., J. A. Copeland, P. Krenkova, A. Stambergova & M. Macek (2009) Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clinical Biochemistry*, 42, 1308-1316.
- Norambuena, P. A., J. Diblík, P. Křenková, P. Paulasová, M. Macek Sr & M. Macek Jr (2012a) ADP-ribosyltransferase 3 (ART3) variant is associated with reduced sperm counts in Czech males: case/control association study replicating results from a Japanese population. *Neuroendocrinology Letters*, 33, 48-52.
- Norambuena, P. A., P. Křenková, F. Tuettelmann, S. Kliesch, P. Paulasová, A. Štambergová, M. Macek Sr & M. Macek Jr (2012b) ADP-ribosyltransferase variant

- (ART3) in Czech and German males with reduced sperm counts. *Human Reproduction*, 27, Suppl. 2, P018.
- Nuti, F. & C. Krausz (2008) Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 16, 504-513.
- Oliva, R. (2006) Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12, 417-435.
- Oliva, R. & G. H. Dixon (1991) VERTEBRATE PROTAMINE GENES AND THE HISTONE-TO-PROTAMINE REPLACEMENT REACTION. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 40, 25-94.
- Oppenheimer, E.H. & J. R. Esterly (1970) Observations on cystic fibrosis of the pancreas. VI. The uterine cervix. *The Journal of Pediatrics*, 77, 991-995.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi & T. Sekiya (1989) DETECTION OF POLYMORPHISMS OF HUMAN DNA BY GEL-ELECTROPHORESIS AS SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISMS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2766-2770.
- Piasecka, M. & J. Kawiak (2003) Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 41, 125-139.
- Pohunek, P. & J. Lebl (2008) Doc. Věra Vávrová a historie cystické fibrózy v České republice. *Česko-slovenská Pediatrie*, 63, 59-61.
- Poongothai, J., T. S. Gopenath & S. Manonayaki (2009) Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*, 50, 336-347.
- Qiao, J., B. Han, B. L. Liu, X. Chen, Y. Ru, K. X. Cheng, F. G. Chen, S. X. Zhao, J. Liang, Y. L. Lu, J. F. Tang, Y. X. Wu, W. L. Wu, J. L. Chen, M. D. Chen & H. D. Song (2009) A Splice Site Mutation Combined with a Novel Missense Mutation of LHCGR Cause Male Pseudohermaphroditism. *Human Mutation*, 30, E855-E865.
- Raivio, T., I. Huhtaniemi, R. Anttila, M. A. Siimes, L. Hagenas, C. Nilsson, K. Pettersson & L. Dunkel (1996) The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 3278-3282.
- Ramanujam, L. N., W. X. Liao, A. C. Roy, A. Loganath, H. H. Goh & S. C. Ng (1999) Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders. *Clinical Endocrinology*, 51, 243-246.

- Ravel, C., S. Chantot-Bastaraud, B. El Houate, I. Berthaut, L. Verstraete, V. De Larouziere, D. Lourenco, A. Dumaine, J. M. Antoine, J. Mandelbaum, J. P. Siffroi & K. McElreavey (2007) Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. *Molecular Human Reproduction*, 13, 461-464.
- Reed, G. H. & C. T. Wittwer (2004) Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, 50, 1748-1754.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. S. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, M. L. Drumm, M. C. Iannuzzi, F. S. Collins & L. C. Tsui (1989) IDENTIFICATION OF THE CYSTIC-FIBROSIS GENE - CLONING AND CHARACTERIZATION OF COMPLEMENTARY-DNA. *Science*, 245, 1066-1072.
- Rowe, S. M., S. Miller & E. J. Sorscher (2005) Mechanisms of disease: Cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 352, 1992-2001.
- Sheppard, D. & J. Welsh (1999) Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*, 79, 23-45.
- Schlicker, M., V. Schnulle, L. Schnepfel, V. I. Vorobev & W. Engel (1994) DISTURBANCES OF NUCLEAR CONDENSATION IN HUMAN SPERMATOZOA - SEARCH FOR MUTATIONS IN THE GENES FOR PROTAMINE-1, PROTAMINE-2 AND TRANSITION PROTEIN-1. *Human Reproduction*, 9, 2313-2317.
- Simoni, M., J. Gromoll, W. Hoppner, A. Kamischke, T. Krafft, D. Stahle & E. Nieschlag (1999) Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: Identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 751-755.
- Simoni, M., F. Tuttelmann, C. Michel, Y. Bockenfeld, E. Nieschlag & J. Gromoll (2008) Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with maldescended testes and male infertility. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18, 193-200.
- Simpson, J.L. (2005) Hledání významu screeningu cystické fibrózy. *Gynekologie po promoci*, 1, 26-31.
- Sims, E. J., A. Clark, J. McCormick, G. Mehta, G. Connett, A. Mehta & U. K. C. F. Database (2007) Cystic fibrosis diagnosed after 2 months of age leads to worse outcomes and requires more therapy. *Pediatrics*, 119, 19-28.

- Steger, K., L. Fink, K. Failing, R. M. Bohle, S. Kliesch, W. Weidner & M. Bergmann (2003) Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Molecular Human Reproduction*, 9, 331-336.
- Takahashi, K., K. Karino, H. Kanasakia & K. Miyazakia (2004) Altered kinetics of pituitary response to gonadotropin-releasing hormone in women with variant luteinizing hormone: correlation with ovulatory disorders. *Hormone Research*, 61, 27-32.
- Takahashi, K., T. Ozaki, M. Okada, H. Kurioka, H. Kanasaki & K. Miyazaki (1999) Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 71, 96-101.
- Tanaka, H., Y. Miyagawa, A. Tsujimura, K. Matsumiya, A. Okuyama & Y. Nishimune (2003) Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and-2 genes of fertile and infertile human male populations. *Molecular Human Reproduction*, 9, 69-73.
- Taulan, M., A. Girardet, C. Guittard, J. P. Altieri, C. Templin, C. Beroud, M. des Georges & M. Claustres (2007) Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD. *Bmc Medical Genetics*, 8.
- Ulcova-Gallova, Z., V. Bouse, L. Svabek, J. Turek & Z. Rokyta (2002) Endometriosis in reproductive immunology. *American Journal of Reproductive Immunology*, 47, 269-274.
- Valdes-Socin, H., R. Salvi, A. F. Daly, R. C. Gaillard, P. Quatresooz, P. Tebeu, F. P. Pralong & A. Beckers (2004) Brief report: Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *New England Journal of Medicine*, 351, 2619-2625.
- Valdes-Socin, H., R. Salvi, A. Thiry, A. F. Daly, F. P. Pralong, R. Gaillard & A. Beckers (2009) Testicular Effects of Isolated Luteinizing Hormone Deficiency and Reversal by Long-Term Human Chorionic Gonadotropin Treatment. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94, 3-4.
- Vávrová, V. (2006) Problémy v diagnostice cystické fibrózy – potřeba novorozeneckého screeningu. *Česko-slovenská Pediatrie*, 12, 703-709.
- Vávrová, V., D. Zemková, H. Slavíková (2001) Sweat chloride concentrations in Czech CF patients, CF carriers and apparently healthy controls. *Journal of Cystic Fibrosis*. Abstracts of the 24th European Cystic Fibrosis Conference, P51.
- Vávrová, V., D. Zemková, M. Macek, M. jr., P. Pohunek (2000) Cystická fibróza u dětí- ale nejen u nich. *Forum Medicinæ*, 3, 49-55.

- Venkatesh, S., R. Kumar, D. Deka, M. Deecaraman & R. Dada (2011) Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57, 124-132.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. Q. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. H. Zhang, G. L. G. Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, C. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. M. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. M. Ge, F. C. Gong, Z. P. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. X. Ke, K. A. Ketchum, Z. W. Lai, Y. D. Lei, Z. Y. Li, J. Y. Li, Y. Liang, X. Y. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. X. Shue, J. T. Sun, Z. Y. Wang, A. H. Wang, X. Wang, J. Wang, M. H. Wei, R. Wides, C. L. Xiao, C. H. Yan, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304-+.
- Viguie, F., L. Domenjoud, M. F. Rousseaumerck, J. P. Dadoune & P. Chevaillier (1990) CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF THE HUMAN PROTAMINE GENES, PRM1 AND PRM2, TO 16P13.3 BY INSITU HYBRIDIZATION. *Human Genetics*, 85, 171-174.
- Vilfan, I. D., C. C. Conwell & N. V. Hud (2004) Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 20088-20095.
- Walker, I. D. (2000) Thrombophilia in pregnancy. *Journal of Clinical Pathology*, 53, 573-580.
- Weiss, J., L. Axelrod, R. W. Whitcomb, P. E. Harris, W. F. Crowley & J. L. Jameson (1992) HYPOGONADISM CAUSED BY A SINGLE AMINO-ACID SUBSTITUTION IN THE BETA SUBUNIT OF LUTEINIZING-HORMONE. *New England Journal of Medicine*, 326, 179-183.
- Welsh, M.J., B. W. Ramsey, F. Accurso & G. R. Cutting (2001) Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc., Vol III, Chapter 201.

- White, H., G. L. Potts & N. C. P. Cross (2006) NGRL (Wessex) evaluation of high resolution melt curve analysis for mutation scanning. *Journal of Medical Genetics*, 43, S85-S85.
- Willmore-Payne, C., J. A. Holden, S. Tripp & L. J. Layfield (2005) Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Human Pathology*, 36, 486-493.
- Wischmann, T., H. Stammer, H. Scherg, I. Gerhard & R. Verres (2001) Psychosocial characteristics of infertile couples: a study by the 'Heidelberg Fertility Consultation Service". *Human Reproduction*, 16, 1753-1761.
- Wittwer, C. T., G. H. Reed, C. N. Gundry, J. G. Vandersteen & R. J. Pryor (2003) High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49, 853-860.
- Wojdacz, T. K. & A. Dobrovic (2007) Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research*, 35.
- Xiao, W. Z. & P. J. Oefner (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Human Mutation*, 17, 439-474.
- Zalenskaya, I. A. & A. O. Zalensky (2002) Telomeres in mammalian male germline cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 218, 218, 37-67.
- Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, S. Vanderpoel, Icmart & Who (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*, 92, 1520-1524.
- Zhang, X. Y., M. San Gabriel & A. Zini (2006) Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: Evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *Journal of Andrology*, 27, 414-420.
- Zhou, L. M., A. N. Myers, J. G. Vandersteen, L. Wang & C. T. Wittwer (2004) Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clinical Chemistry*, 50, 1328-1335.
- Zhou, L. M., L. Wang, R. Palais, R. Pryor & C. T. Wittwer (2005) High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clinical Chemistry*, 51, 1770-1777.

Zielenski, J. (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*, 67, 117-133.

Zielenski, J. & L. C. Tsui (1995) Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations. *Annual Review of Genetics*, 29, 777-807.

Manuál CorPotocol 6000, High Resolution Melt Assay Design and Analysis. Corbett, 2006.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.

<http://cikgurozaini.blogspot.cz/2011/06/spermatogenesis-and-oogenesis.html>

www.cftrscience.com

www.cftr2.org

www.eurogentest.org

www.genet.sickkids.on.ca/cftr/

www.novorozenecky-screening.cz

www.repromeda.cz/komplexni-diagnostika-neplodnosti.html