

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Anastasiya Semyakina**

Hledání nových biomarkerů neplodnosti mužů pomocí transkriptomu spermií  
Using Sperm Transcriptome in Search for Novel Biomarkers of Male Infertility

Diplomová práce

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

Praha, 2019

### **Prohlášení**

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

V Praze,

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Františku Liškovi, Ph.D za vedení práce, konzultace a veškerou pomoc v přípravě diplomové práce, také děkuji Ing. Blance Chylíkové za pomoc v laboratoři. Děkuji kolektivu laboratoří Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK. Také bych ráda poděkovala spolupracující laboratoři Laboratory of Male Fertility, Hospital de Clínicas José de San Martín, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina za poskytnutí vzorků a klinických dat.

Práce byla provedena za podpory grantu no.NT12269-5 Ministerstva zdravotnictví ČR a grantu no.UBACYT-CB06 University of Buenos Aires, Science and Technology.

## **Abstrakt**

S problémem neplodnosti se v současné době setkává 10 až 15 procent párů. Přitom přibližně v 50 procentech případů se na problému podílí mužský faktor. Většina příčin mužské neplodnosti zůstává neznámá. Proto je velmi aktuální otázka nalezení jednoduchých a v klinické praxi použitelných nástrojů diagnostiky mužské neplodnosti. V této práci jsme se na základě analýzy transkriptomu spermií pokusili najít geny, u nichž by mohl rozdíl v expresi mezi normálními a patologickými spermii poskytnout informace o molekulární podstatě patologie. Stanovení exprese takových genů by mohlo sloužit pro neinvazivní diagnostiku mužské infertility. Do této studie bylo zahrnuto 67 vzorků spermií včetně 16 kontrolních od zdravých mužů. Vzorky neplodných pacientů byly rozděleny do tří skupin podle morfologie a motility na základě údajů spermogramu. Do skupiny astenoteratozoospermie bylo zařazeno 20 vzorků vykazujících sníženou motilitu a abnormální morfologii, do skupiny astenozoospermie bylo zařazeno 15 vzorků spermií s normální morfologií, ale sníženou motilitou, do třetí skupiny, normospermie, bylo zařazeno 16 vzorků neplodných pacientů s normálním spermogramem z hlediska počtu spermií, motility i morfologie.

Dvacet čtyři vzorků ze všech čtyř skupin (tři skupiny infertilních mužů a jedna skupina kontrolní – sedm mužů s astenoteratozoospermii, pět mužů s astenozoospermii, šest infertilních mužů s normálními parametry spermogramu a šest plodných mužů jako kontrola) bylo podrobena analýze transkriptomu s využitím mikročipové technologie. Z kandidátních genů s možnou diferencíální expresí jsme potvrdili diferencíální expresi u osmi genů, u jednoho genu, *ARHGAP17*, jehož exprese byla odlišná u neplodných mužů s normálním spermogramem ve srovnání s kontrolní skupinou, jsme diferencíální expresi potvrdili na celém souboru, tj. srovnáním 16 infertilních pacientů s normospermii s 15 plodnými muži.

### **Klíčová slova:**

Neplodnost (infertilita, sterilita), genetika neplodnosti, kandidátní gen, biomarkery, diagnostika neplodnosti

## **Abstract**

Currently infertility affects 10 to 15 percent of couples. In nearly 50% of all cases male factor contributes to infertility of the couple. Majority of causes of male infertility remains unexplained. For this reason, finding simple and clinically useful tools for improving male infertility diagnostics can be important at present. Based on the analysis of sperm transcriptome, in this diploma thesis we aimed to find genes that show differential expression between normal and pathological sperm, this could provide information about molecular basis of male infertility, moreover, expression profile of such genes in sperm could be employed for noninvasive diagnosis of male infertility. This study was conducted by using 67 sperm samples, including 16 control sperm samples from fertile men. The samples of infertile patients were divided into 3 groups according to morphology and motility using results of standard sperm evaluation according to WHO.

First group included 20 patients diagnosed with asthenoteratozoospermia (low sperm motility and abnormal morphology), second group was 15 patients diagnosed with asthenozoospermia (normal morphology and low sperm motility), the third group comprised 16 samples from infertile patients with normal spermiogram. 16 control samples were from fertile men (conception of their partners in less than 12 months before sperm evaluation) with normal spermiogram.

Transcriptome analysis was performed using microarray technology on 24 semen samples from 3 groups of infertile man and one control group (7 asthenoteratozoospermic, 5 asthenozoospermic, 6 infertile with normal sperm parameters and 6 fertile controls). From candidate genes with possible differential expression, we confirmed 8 expression profiles using quantitative real-time PCR. Moreover, we confirmed differential expression of one gene, *ARHGAP17*, using the entire sample set of 16 patients with idiopathic infertility with normal spermiogram compared to 15 fertile men.

Keywords:

infertility, genetics of infertility, candidate gene, biomarkers, diagnostics of infertility

# Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce .....	12
3	Přehled literatury.....	13
3.1	Neplodnost .....	13
3.1.1	Příčiny a diagnostika mužské neplodnosti .....	13
3.1.2	Metody léčby mužské neplodnosti.....	15
3.2	Spermie – stavba, vývoj, zrání .....	16
3.2.1	Spermatocytogeneze .....	17
3.2.2	Spermiogeneze .....	17
3.3	Genomika, transkriptomika a proteomika spermii .....	17
3.3.1	DNA a RNA ve spermiiích .....	17
3.3.2	Poruchy na úrovni DNA.....	18
3.3.3	Odchytky proteinového profilu u neplodných pacientů .....	20
3.3.4	Hledání příčin neplodnosti na úrovni transkriptomu spermii.....	20
4	Materiály a metody .....	26
4.1	Mikročipová technologie pro výzkum RNA ve spermiiích .....	27
4.2	Vzorky.....	28
4.3	Izolace RNA.....	28
4.4	Měření koncentrace pomocí spektrofotometru .....	30
4.5	Ověření kvality RNA .....	30
4.6	Celogenomová analýza pomocí mikročipu .....	32
4.7	Zpracování dat.....	39
4.8	Přepis RNA do cDNA pomocí reverzní transkripce .....	39
4.9	Výběr a návrh primerů .....	40
4.10	PCR, gelová elektroforéza .....	43
4.11	Kvantitativní RT-PCR.....	44
5	Výsledky .....	48
5.1	Hledání kandidátních genů.....	48
5.2	Výsledky IPA .....	52
5.3	Kvantitativní RT-PCR na vzorcích z celogenomové analýzy.....	54

5.3.1	Porovnání skupiny astenoteratozoospermie s kontrolou .....	55
5.3.2	Porovnání skupiny astenozoospermie s kontrolou .....	56
5.3.3	Porovnání skupiny normospermie s kontrolou.....	57
5.3.4	Porovnání skupiny astenoteratozoospermie se skupinou astenozoospermie.....	58
5.4	Ověření rozdílné exprese genů na větším souboru vzorků.....	59
6	Závěr .....	70
7	Seznam použité literatury.....	71

## Seznam zkratek

<b><i>ACSL1</i></b>	acyl-CoAsynthetase long chain family member 1
<b><i>ADAM22</i></b>	ADAM metallopeptidase domain 22
<b><i>ARHGAP17</i></b>	Rho GTPase activating protein 17
<b><i>ARL17</i></b>	ADP ribosylation factor like GTPase 17 B
<b><i>CAP1</i></b>	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1
<b><i>CAPZA1</i></b>	capping actin protein of muscle Z-line alphasubunit 1
<b><i>CD45</i></b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type C
<b><i>CD46</i></b>	CD46 molecule
<b>cDNA</b>	complementary DNA – komplementární DNA
<b><i>CEP89</i></b>	centrosomal protein 89
<b><i>CNTROB</i></b>	centrobin, centriole duplication and spindle assembly protein
<b><i>CMC2</i></b>	C-X9-C motifcontaining 2
<b><i>CNGB3</i></b>	cyclic nucleotide gated channel beta 3
<b>cRNA</b>	complementary RNA – komplementární RNA
<b><i>EEF1B2</i></b>	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
<b><i>EIF4E</i></b>	eukaryotic translation initiation factor 4E
<b><i>ESPN</i></b>	espin
<b><i>GFPT1</i></b>	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1
<b><i>GOSR 1</i></b>	golgi SNAP receptor complex member
<b><i>HECTD4</i></b>	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4
<b><i>HOOK1</i></b>	hook microtubule-tethering protein 1
<b><i>IFT52</i></b>	intraflagellar transport 52
<b>IPA</b>	Ingenuity pathway analysis
<b><i>MTCH2</i></b>	mitochondrial carrier 2
<b><i>MLST8</i></b>	MTOR associated protein, LST8 homolog
<b><i>MMP2</i></b>	matrix metallopeptidase 2
<b><i>MATE2</i></b>	multidrug and toxin extrusion 2
<b>NGS</b>	Next-Generation Sequencing – sekvenování nové generace
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
<b><i>PIK3C2A</i></b>	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalyticsubunit type 2 alpha
<b><i>POLDIP2</i></b>	DNA polymerase delta interacting protein 2
<b><i>PPIL3</i></b>	Peptidyl-prolyl isomerase-like 3



<b><i>PRNT</i></b>	prion locus lnc RNA, testis expressed
<b>q-RT-PCR</b>	quantitative real time reverse transcription and polymerase chain reaction – kvantitativní reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce v reálném čase
<b><i>RAB44</i></b>	member RAS oncogene family
<b><i>RIMBP3C</i></b>	RIMS binding protein 3C
<b><i>RPL17</i></b>	ribosomal protein L17
<b><i>RPS15A</i></b>	ribosomal protein S15A
<b>SNP</b>	single-nucleotide polymorphism-jednonukleotidový polymorfismus
<b><i>SELO</i></b>	selenoprotein O
<b><i>SLAMF6</i></b>	SLAM family member 6
<b><i>SLC47A2</i></b>	solute carrier family 47 member 2
<b><i>SLC6A8</i></b>	solute carrier family 6 member 8
<b><i>SMURF2</i></b>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
<b><i>SNAP23</i></b>	synaptosome associated protein 23
<b><i>STK39</i></b>	serine/threonine kinase 39
<b><i>TDRG1</i></b>	testis development related 1
<b><i>TESK2</i></b>	testis associated actin remodelling kinase 2
<b>WHO</b>	World Health Organization – Světová zdravotnická organizace

# 1 Úvod

Za neplodnost, podle definice používané Světovou zdravotnickou organizací (WHO), se považuje onemocnění, při kterém nenastalo klinické těhotenství během 12 nebo více měsíců pravidelného a nechráněného pohlavního styku (Zegers-Hochschild et al., 2009). Podle různých dat se s tímto problémem setkává minimálně 10 % párů (Evers, 2002; Meacham et al., 2007; Řežábek, 2008). Přičemž přibližně ve třetině případů je problém na straně ženy, v další třetině je to mužský faktor a ve zbylých případech jsou problémy u obou partnerů (Meacham et al., 2007). V 37 až 70 % případů je tedy mužský faktor jednou z několika příčin neplodnosti (Agarwal et al., 2015).

Příčinu mužské neplodnosti ve 30 % (Dohle et al., 2005) až 50 % (Hotaling, 2014) případů nelze určit. Také není jasný podíl genetických a environmentálních faktorů zodpovědných za mužskou infertilitu. Analýza diferenciallyně exprimovaných genů ve spermiích by mohla pomoci odhalit společné mechanismy nebo dráhy vedoucí k mužské infertilitě. Navíc by mohly diferenciallyně exprimované geny sloužit jako kandidátní biomarkery pro neinvazivní diagnostiku mužské sterility (Yatsenko et al., 2006). Zvláště je to důležité, když na straně ženy ani muže není zjevná porucha. Dříve než žena podstoupí náročné a drahé techniky diagnostiky a pokusy o in-vitro fertilizaci, je vhodné určit, jestli není problém na straně muže a na základě toho vybrat vhodný způsob řešení problému. Z tohoto hlediska by bylo potenciálně prospěšné najít biologické markery neplodnosti pro případy, kdy spermioqram muže nejeví známky patologie.

Cílem této diplomové práce je pomocí moderních metod molekulární biologie, jako jsou celogenomová analýza na mikročipech a kvantitativní real-time PCR prozkoumat expresi genů na úrovni celého transkriptomu lidských spermií. Na základě porovnání úrovně exprese genů ve spermiích mužů trpících neplodností s genovou expresí ve spermiích plodných jedinců je cílem pokusit se odhalit společné dráhy a pokusit se najít geny s výrazným rozdílem v expresi, které by mohly mít vliv na plodnost a bylo by možné je využít v klinické diagnostice při stanovení příčin neplodnosti.

Teoretická část této práce je zaměřena na rešerše na téma moderních poznatků o RNA ve spermiích – její funkci, informaci, kterou lze získat z RNA pomocí moderních diagnostických metod a možných příčin mužské infertility, které lze odhalit na základě transkriptomu spermií.

Praktická část je věnována samotnému výzkumu RNA spermií infertilních mužů a porovnání výsledků s kontrolní skupinou plodných jedinců. Výzkum byl prováděn pomocí mikročipové technologie, ověření výsledků se provádělo pomocí kvantitativní Real Time PCR. Získaná data byla analyzována pomocí software Ingenuity Pathway Analysis.

## **2 Cíle práce**

Zavést metodu izolace RNA spermií, pomocí mikročipové technologie určit diferenciálně exprimované geny ve třech skupinách neplodných mužů a porovnat je s kontrolní skupinou fertálních jedinců. Pokusit se určit společně dráhy, které by mohly mít vliv na mužskou infertilitu a najít kandidátní geny, které by mohly být použity jako biomarkery mužské neplodnosti. Ověřit diferenciální expresi případných kandidátních genů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase na větším počtu vzorků.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Neplodnost

Neplodnost je většinou vnímána jako nemoc párů a vyšetření je prováděno u obou partnerů. Pro léčbu se používají různé metody asistované reprodukce. Proto je velmi žádoucí určit příčinu, aby bylo možné najít nejvhodnější způsob řešení problému. V určitých případech je vhodné použít pro umělé oplození spermie zdravého donora, oocyt dárkyně nebo zvážit i adopci dítěte.

Počet párů trpících problémem neplodnosti není přesně znám, různé studie uvádějí, že je to minimálně 10 % párů. Také se hodně liší data o podílu mužského a ženského faktoru a jednotlivých příčin. Rozdíly jsou pravděpodobně dány různými metodikami vyhodnocování a regionálními odlišnostmi. V dalším odstavci jsou uvedena data dvou autorů, která nezahrnují všechny možné údaje, ale ukazují typické četnosti různých příčin neplodnosti.

Mezi časté příčiny neplodnosti u žen patří problémy s ovulačním cyklem – oligoamenorea a amenorea, a to v 21–25 % případů (Hull et al., 1985; Wilkes et al., 2009), neprůchodnost vejcovodů 14–18% (Hull et al., 1985; Wilkes et al., 2009). Nejčastější poruchou na mužské straně je porucha spermatogeneze, která byla diagnostikována v 25–26% případů (Hull et al., 1985; Wilkes et al., 2009). V 28–38% případů se příčinu nepodařilo odhalit (Hull et al., 1985; Wilkes et al., 2009).

Věk partnerů také hraje velkou roli v pravděpodobnosti otěhotnět. Ženy do 30 let otěhotní s pravděpodobností 20 % až 25 % během jednoho menstruačního cyklu. V 35 letech pravděpodobnost otěhotnět klesá na 15 %, ve 42 letech se pravděpodobnost spontánního početí dítěte blíží se k nule (Řežábek, 2008). V poslední době se také často hovoří o vlivu věku otce na úspěšnost spontánního početí. Je prokázáno, že s věkem klesá kvalita spermatu. Při porovnávání vzorků od pacientů v různých věkových skupinách se zjistilo, že u 50letých mužů v porovnání s 30letými je o 22 % menší objem spermatu, motilita je nižší o 37 % a normálních spermií je méně o 18 % (Kidd et al., 2001).

#### 3.1.1 Příčiny a diagnostika mužské neplodnosti

Ačkoli problém neplodnosti je velmi aktuální a v současnosti v tomto oboru probíhá intenzivní výzkum, o příčinách mužské neplodnosti zatím nejsou naše znalosti uspokojivé. Protože původně při léčbě neplodnosti byla pozornost zaměřena na ženy, vývoj diagnostických a léčebných metod se rozvíjel zejména v tomto směru. Studiu mužské

neplodnosti bylo věnováno méně pozornosti. Kvůli tomu je i dnes o molekulárním složení spermií ještě málo známo (Garrido et al., 2013).

U mužů se vyšetřuje fyziologický stav pohlavních orgánů, aby bylo možné vyloučit možné patologie, které mohou mít vliv na plodnost. Jednou z častých patologií je varikokéla – rozšíření žilní pleteně vedle chámovodu, kvůli které se zvyšuje teplota šourku (Ding et al., 2012). V tomto případě spermie, které pro vývoj potřebují teplotu nižší, než je tělesná, vykazují patologické známky. U mužů s diagnostikovanou neplodností se tento stav vyskytuje ve 40–70 %, ale i ve skupině plodných mužů je varikokéla nalezena v 15 až 20 % (Schauer et al., 2012). Většinou se po operaci u pacienta zlepšuje kvalita spermií. Mezi dalšími příčinami ovlivňujícími plodnost jsou poškození varlat a poruchy vnějších pohlavních orgánů (Zvěřina, 2010a). Většina pacientů ale spadá do skupiny s idiopatickou neplodností.

Vyšetření ejakulátu je rutinní metodou diagnostiky v případě problémů s početím. Parametry posuzované při vyšetření spermioqramu podle WHO (WHO, 2010) s minimálními hraničními hodnotami jsou uvedeny v tabulce 1. Podle těchto parametrů spermioqramu pak je určen stav pacienta (Tab. 2).

Tab. 1 Některé parametry spermioqramu podle norem WHO z roku 2010 (WHO, 2010)

<b>Parametr</b>	<b>Dolní hranice</b>
Objem ejakulátu	1,5
Celkový počet spermií	39 mln v ejakulátu
Koncentrace spermií	15 mln na 1 ml
Celková motilita	40 %
Progresivní motilita	32 %
Vitálnost (počet živých spermií)	58 %
Spermie s normální morfologií	4 %

Tab. 2 Diagnózy stanovené na základě vyšetření spermogramu podle WHO 2010 (WHO, 2010)

Název diagnózy	Nález spermogramu
Aspermie	Není ejakulát
Astenozoospermie	Progresivní motilita pod hranicí referenční meze
Astenoteratozoospermie	Progresivní motilita a morfologie pod hranicí referenční meze
Azoospermie	Nejsou spermie v ejakulátu
Oligoastenozoospermie	Nízký celkový počet nebo koncentrace a zároveň nízká progresivní motilita
Oligoastenoteratozoospermie	Nízký celkový počet nebo koncentrace a zároveň nízké procento spermií s normální morfologií a motilitou
Teratozoospermie	Nízké procento morfologicky normálních spermií
Normospermie	Počet spermií, progresivní motilita a procento morfologicky normálních spermií nad referenční mezí

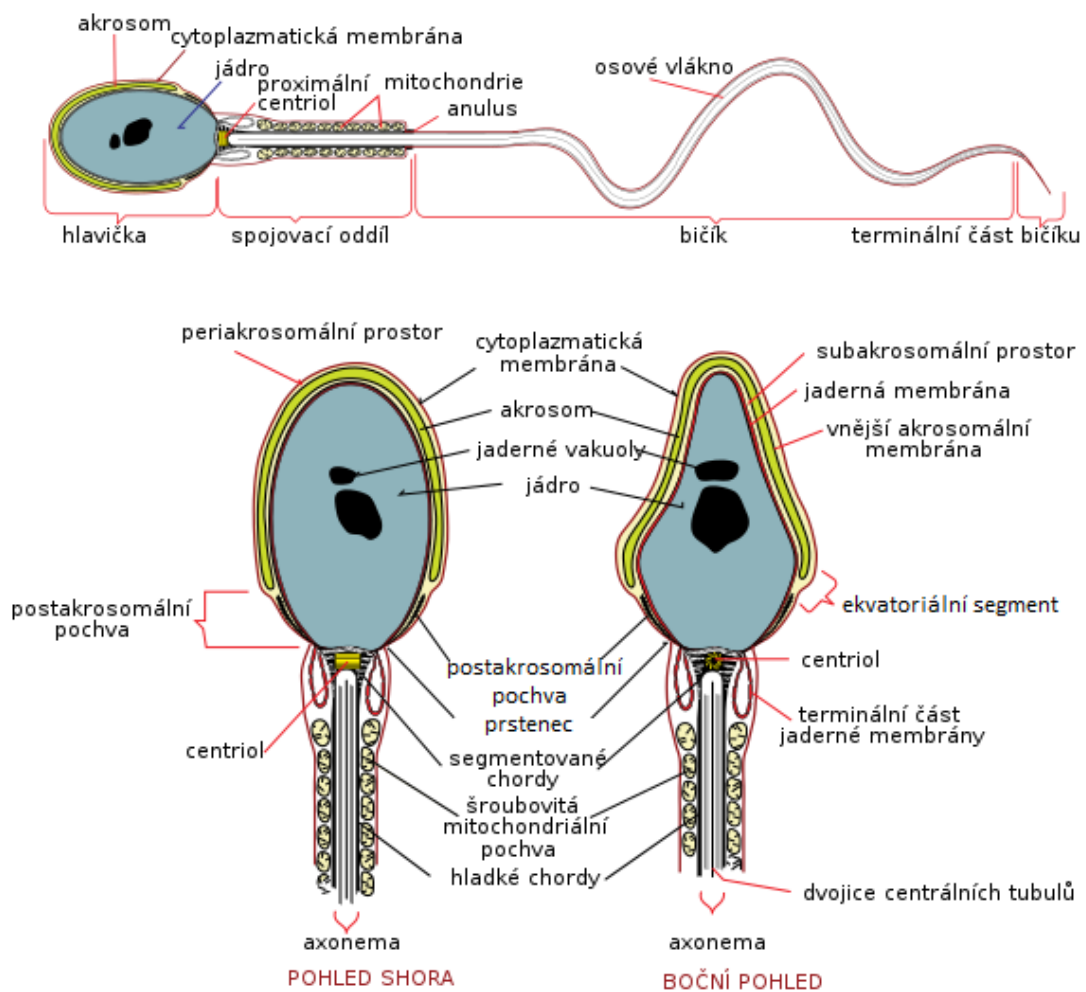
### 3.1.2 Metody léčby mužské neplodnosti

Pro léčbu mužské neplodnosti v závislosti na příčinách se používají chirurgické metody a také hormonální a nehormonální terapie. Velmi často se párům s neplodností nabízejí různé metody asistované reprodukce. V případě mužského faktoru se nejčastěji používají ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) – intracytoplasmatická injekce spermie, kdy je spermie pomocí speciální skleněné kapiláry pod mikroskopem injektována přímo do oocytu. Tato metoda dává naději na vlastního potomka mužům, kteří mají v ejakulátu spermie, ale je jich příliš málo, jsou málo pohyblivé, mají špatnou morfologii nebo nejsou schopny fertilizace. Kromě toho spermie mohou být získány z nadvarlat (MESA – Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration) nebo varlat, kdy je několik možností: TESA (Testicular Sperm Aspiration), cTESE (Conventional Testicular Sperm Extraction) a micro-TESE (Microdissection-TESE) (Bernie et al., 2015). Tyto metody jsou hodně využívány ve spojení s intracytoplasmatickou injekcí spermií u mužů s neobstrukční azoospermii, která je charakteristická nepřítomností nebo defektem germinálního epitelu a spočívá ve výrazné poruše tvorby spermií ve varlatech (Zvěřina, 2010b). Při použití těchto technik je nejvyšší pravděpodobnost získání spermií při použití micro-TESE, na druhém místě je cTESE a na třetím místě je TESA (Bernie et al., 2015).

### 3.2 Spermie – stavba, vývoj, zrání

Spermie jsou velmi specializované haploidní buňky živočišného organismu, které slouží k pohlavnímu rozmnožování. Jejich diferenciace a zrání probíhá v mužském pohlavním ústrojí. U mužů reprodukční systém zůstává funkční od puberty do pozdního stáří. Denně se vytváří 200–400 milionů spermií (Kittnar, 2011). Spermie vznikají ve varlatech. Varlata kromě toho produkují pohlavní hormony, hlavním z nich je testosteron. Pro vývoj spermií je důležitá teplota o 2–3 stupně nižší než tělesná. Samotný vznik spermií probíhá v semenotvorných kanálcích, které pak ústí do nadvarlete, kde jsou zralé spermie uskladněné. Stavba spermie je zobrazena na obrázku 1.

Obr. 1 – stavba spermie, upraveno podle <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spermie>





### **3.2.1 Spermatocytogeneze**

Spermie vznikají v semenotvorných kanálcích varlat ze spermatogonií – progenitorových diploidních buněk, které mají omezené množství dělení. V semenotvorných kanálcích se nacházejí nediferencované spermatogonie, které také zahrnují skupinu spermatogoniálních kmenových buněk, které jsou schopné dělit se a tím pádem stále doplňovat populace spermatogonií. Diploidní spermatogonie se diferencují během dalšího dělení na spermatocyty (de Rooij, 2017).

Diploidní primární spermatocyt vstupuje do prvního meiotického dělení. Vznikají sekundární spermatocyty, které pak pokračují ve druhém meiotickém dělení, po dovršení kterého vznikají haploidní buňky – spermatidy. Po celou tuto dobu jsou buňky propojené cytoplasmatickými můstky.

### **3.2.2 Spermioogeneze**

Proces přeměny spermatidy ve spermie se nazývá spermioogeneze. Kulatá spermatida se promění na spermie s bičkem. Během spermioogeneze z Golgiho aparátu buňky vzniká akrosom – specifický váček, ve kterém jsou uloženy enzymy důležité pro průnik do oocytu. Jádro je maximálně kondenzováno, buňka se diferencuje na hlavičku, spojovací oddíl a bičík. V buňce zůstává jen minimální část cytoplasmy, mitochondrie se uspořádají do těsné šroubovice a vytvoří mitochondriální pochvu (Moore and Persaud, 2002). Spermie jsou uvolněny do lumen semenotvorného kanálku.

Celý proces spermatogeneze včetně spermioogeneze trvá u člověka kolem 74 dnů. Další zrání spermie probíhá v nadvarleti během procesu zvaném epididymální maturace. Spermie, z ejakulátu ještě nejsou schopny oplození. Další příprava na oplození probíhá v ženském pohlavním ústrojí. Proces se nazývá kapacitace a trvá přibližně 7 hodin (Moore and Persaud, 2002).

## **3.3 Genomika, transkriptomika a proteomika spermii**

### **3.3.1 DNA a RNA ve spermii**

Spermie mají velmi kompaktní jádro a obsahují málo cytoplasmy. DNA zralých spermii je velice kondenzovaná. Nukleozomy – proteinové komplexy tvořené histony, které v buňkách zajišťují kondenzaci DNA do kompaktního chromatinu jsou ve spermii nahrazeny protaminy – na arginin bohatými malými proteiny, které dovolují uspořádat DNA do kompaktnější struktury. Ve zralých spermii nebyla nalezena transkripční aktivita. Kromě toho absence transkripce je zajištěna plnou inaktivací ribosomálních RNA specifickým

štěpením (Johnson et al., 2011). Nicméně, malé množství různých druhů RNA ve zralých spermiích bylo prokázáno u savců, nejprve u potkanů v roce 1989 (Pessot et al., 1989), u člověka v roce 1993 (Kumar et al., 1993).

Do spermatogeneze je zapojeno víc než 2300 genů, které musí ve správný čas a na správném místě plnit svoji funkci, aby se vytvořila diferencovaná spermie schopná oplození oocyty. (Carrell et al., 2016).

Intenzivní výzkum molekulárních příčin neplodnosti probíhá od devadesátých let 20. století a hledání genetických faktorů se provádí na základě zkoumání chromosomálních změn, mutací, jednonukleotidových polymorfizmů - SNP (single nukleotide polymorfism) a analýzy transkriptomu a proteomu (Krausz et al., 2015).

### **3.3.2 Poruchy na úrovni DNA**

Při genetickém vyšetření mužské neplodnosti se v první řadě vyšetřují odchylky v karyotypu (Klinefelterův syndrom, chromosomální translokace), mutace v genu *CFTR* - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator a mikrolece Y-chromozomu v oblasti AZFa, AZFb a AZFc. (Barratt et al., 2017). V několika studiích byl prokázán vliv variant (SNP) v genu *MTHFR* - methylenetetrahydrofolate reductase na neplodnost (Krausz et al., 2015).

Příčiny neplodnosti na úrovni DNA mohou být monogenní, způsobené velmi vzácnými alelami „velkého účinku“, nebo polygenní, způsobené alelami malého účinku, které mohou být v populaci relativně běžné. Monogenní příčiny jsou nacházeny zejména sekvenací kandidátních genů, exomu nebo genomu u postižených mužů s možnou familiární formou neplodnosti, např. u autozomálně recesivní dědičnosti jsou to dva nebo více postižených bratrů a/nebo konsangvinita rodičů. V reprodukčním fenotypu těchto mužů můžeme očekávat výrazné a neměnné poruchy všech typů, izolované i kombinované. U astenozoospermie a teratozoospermie bude postiženo vysoké procento spermií. Podle recentních přehledových článků jsou již nyní známy desítky monogenních forem neplodnosti mužů a další rychle přibývají (Mitchell et al., 2017; Ray et al., 2017). Ray a kolektiv (Ray et al., 2017) explicitně uvádí těchto 10 genů pro „kvalitativní poruchy spermií“ *AURKC*, *DPY19L2*, *SPATA16*, *SPATA6*, *DNAH1*, *SEPT12*, *CATSPER1*, *CATSPER2*, *SLC26A8* a *PLCZ1*, zatímco Mitchell s kolektivem (Mitchell et al., 2017) uvádí 7 genů spjatých s „kvantitativními poruchami“, tj. vesměs s azoospermií méně často i oligozoospermií: *MCM8*, *NPAS2*, *SYCE1*, *TAF4B*, *TEX11*, *TEX15* a *ZMYND15*. V recentnějším přehledu, který se ale primárně zabývá přínosem sekvenování nové generace pro genomiku mužské neplodnosti (Robay et al., 2018) je

uvedeno 28 genů z celkem 23 studií (*ADGRG2, CFTR, DNAH6, DNMT3L, HLA-DQA1, HLA-DRB1, MAGEB4, MEIOB, NPAS2, SIRPA, SIRPG, SPINK2, SYCE1, SYCP3, TAF4B, TDRD9, TEX14, TEX15, ZMYND15, BRDT, CEP135, DNAH1, NPHP4, SUN5, CFAP43, CFAP44, CFAP65, DNAH1, SPAG17*). Lze očekávat, že celkově takových genů budou stovky, lze-li soudit podle počtu genů, jejichž mutace vyvolávají analogický reprodukční fenotyp u myši (či vzácně u jiných modelových zvířat), viz např. (Liska, 2003). Mouse Genome Informatics obsahuje přes 1000 unikátních fenotypů spojených s neplodností samců (<http://www.informatics.jax.org/mp/annotations/MP:0001925>).

Polygenní příčiny neplodnosti jsou odhalovány zejména pomocí celogenomových asociačních studií, testováním asociace jednonukleotidových polymorfizmů – SNP (single-nucleotide polymorphism) s neplodností u velkých kohort neplodných mužů a plodných kontrol (Carrell et al., 2016). Přesto, že byla takových studií provedena celá řada, jejich výsledky jsou často nejednoznačné, mj. i kvůli malému počtu vzorků (Carrell et al., 2016).

Ve svém přehledovém článku S. Krausz (Krausz et al., 2015) uvádí 314 SNP v 123 genech, které by mohly mít vliv na neplodnost. Mezi nimi jsou jak geny, jejichž produkty se účastní obecných buněčných procesů, tak i geny se specifickou rolí ve spermatogenezi nebo endokrinních funkcích. Jen u 10 genů existují metaanalýzy - *CYP11A1, DAZL, ESR1, ESR2, MTHFR, NOS3, POLG TP53* a *USP26*, přičemž jejich výsledky nejsou jednoznačné, což může být způsobeno etnickými nebo teritoriálními trendy. Lze uzavřít, že asociační studie zatím neodhalily obecné markery infertility na úrovni SNP, kvůli obtížné replikovatelnosti výsledků (SNP odhalené v různých studiích se většinou nepřekrývají), navíc mají jednotlivé SNP jen malý účinek (nízké odds ratio) (Krausz et al., 2015). Je možné říci, že polygenní příčiny neplodnosti mužů jsou spíše na okraji zájmu, o tom vypovídá i fakt, že databáze GWAS uvádí jen dvě studie (po jedné pro klíčová slova „male fertility“ a „male infertility“, viz <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

Významná pozornost je také věnována epigenomice spermií u neplodných mužů, tj. parametrům jako je rozdílný podíl histonů k protaminům, a hypo- nebo hypermetylace DNA. Důležitost této problematiky je zřejmá v souvislosti s technikami asistované reprodukce, kdy se zvyšuje riziko chorob spjatých s epigenetickými poruchami, jako je syndrom Silver-Russell a Beckwith-Wiedemann. V této souvislosti je zajímavé, že spermie s lepší kvalitou a integritou DNA, získané pomocí centrifugace v gradientu hustoty, mají významně odlišný epigenetický profil v porovnání s netříděnými spermii. (Yu et al., 2015)

### **3.3.3 Odchytky proteinového profilu u neplodných pacientů**

Další z postupů, který by pomohl odhalit děje během spermatogeneze a navést na možné molekulární příčiny neplodnosti, je zkoumání proteinového profilu spermií a porovnání skupin neplodných jedinců s kontrolními. Proteiny, které mají vliv na úspěšné oplození nejsou jenom ze samotných spermií, ale i ze semenné tekutiny, která má důležitou funkci během maturace a kapacitace spermií (Jodar et al., 2016a).

Dosud bylo v lidských spermiích odhaleno více než 6 tisíc různých proteinů (Mohanty et al., 2014, Jodar et al., 2017). Proteiny, spojené s procesy kondenzace DNA, transportem a úpravami RNA byly nalezeny v hlavičce spermie. Kromě toho byly v hlavičce odhaleny proteiny, jejich funkce je ve spermiích blokována a spočívá v procesech spojených s replikací a opravami DNA (González-Marín et al., 2012). Nejjednodušším vysvětlením je, že se jedná o pozůstatky z procesu spermatogeneze.

Ve svém přehledu, mapujícím publikace o proteomických studiích spermií, Mohanty a kolektiv (Mohanty et al., 2015) uvádí řadu proteinů, které by mohly být možnými biomarkery neplodnosti. Tyto proteiny patří do několika skupin podle vykonávané funkce nebo mechanismu vzniku neplodnosti. Jeden z faktorů negativně ovlivňujících schopnost oplození je zvýšený oxidativní stres spermií. Mezi proteiny spojenými s oxidativním stresem byl prokázán rozdíl v expresi u MDH2, TGM4, GPX4, GLUL, HSP90B1 a HSPA5. U pacientů s astenozoospermií byl odhalen rozdílný obsah proteinů, DLD, FH a ECH1, u pacientů s globozoospermií pak ODF2, SPAM1 a SPANX.

### **3.3.4 Hledání příčin neplodnosti na úrovni transkriptomu spermií**

Tato práce je zaměřena na výzkum RNA spermií jako prostředního článku mezi nosičem informace DNA a konečným produktem – proteinem. Právě rozdíl v expresi některých genů ve skupinách infertilních mužů v porovnání se zdravými jedinci, kdy není zjevná fyziologická ani genetická porucha, by mohl přispět k pochopení mechanismu vedoucího k infertilitě, případně k pochopení molekulárních drah zúčastněných v těchto procesech.

Podle řady autorů by mohla RNA ve spermiích být nejen pozůstatkem procesu zrání spermií, ale mít i důležitou funkci v časném embryonálním vývoji jedince (Ostermeier et al., 2004). RNA ve spermiích by mohla poskytnout informace o průběhu vývoje spermií během spermatogeneze a sloužit jako biomarker při zkoumání mužské neplodnosti (Jodar et al., 2013).

### 3.3.5 RNA ve spermích a jejich role

Intenzivní transkripce při vývoji spermií probíhá ve stádiu kulatých spermatid. Pak je DNA v buňce vysoce kondenzována díky výměně histonů za protaminy a transkripce v buňce je umlčena. Ve zralých spermích lze nalézt různé RNA kódující proteiny nezbytné pro oplození a časný embryonální vývoj (Jodar et al., 2016b).

Předpokládá se, že i ve zralých spermích může být transkripční a translační aktivita, ale jen v mitochondriích a nikoliv v cytoplasmě (Miller and Ostermeier, 2006; Maclaughlin and Terner, 1973). Celkový obsah RNA v lidských spermích se odhaduje na 48–137 ng na 1 milión buněk (Goodrich et al., 2007). Více než polovina RNA ve spermích (52 %) jsou translatované RNA (mRNA) (Jodar et al., 2016b). Produkty těchto transkriptů jsou zapojeny do drah spojených se spermatogenezí, diferenciací ve spermatidy a také regulací.

Kromě toho ve spermích byly nalezeny RNA dosud neznámé funkce, které nebyly nalezeny v somatických buňkách, ale byly v relativně velkých množstvích nalezeny ve spermích, což může svědčit o jejich důležité roli právě ve funkci těchto buněk (Jodar et al., 2013).

### 3.3.6 Kódující RNA

Je prokázáno, že spermie obsahují řadu stabilních mRNA, které hrají důležitou roli v reprodukci (Garrido et al., 2013). Některé mRNA jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3 Některé druhy mRNA, nalezené ve zralých spermích (Garrido et al., 2013)

<b>mRNA</b>	<b>Autor</b>
c-MYC	Kumar et al., 1993
proteiny tepelného šoku 70 a 90	Wykes et al., 1997
beta aktin	Wykes et al., 1997
lidské leukocytární antigeny	Chiang et al., 1994
vápníkové kanály typu L	Goodwin et al., 2000
N-kadherin	Goodwin et al., 2000
estrogenové receptory	Durkee et al., 1998
cyklické nukleotidové fosfodiesterázy	Richter et al., 1999
Integriny	Lambard et al., 2004
Aromatázy	Lambard et al., 2004
syntázy oxidu dusnatého (NOS)	Lambard et al., 2004
glutathionperoxidázy 1 a 4	Garrido et al., 2004, Meseguer et al., 2004
Glutathionreduktázy	Garrido et al., 2004, Meseguer et al., 2004
transkripční faktory NF- $\kappa$ B, HOX2A, ICSBP	Dadoune et al., 2005
proteinkináza JNK2	Dadoune et al., 2005

růstový faktor HBEGF	Dadoune et al., 2005
receptory RXR $\beta$ a ErbB3	Dadoune et al., 2005

Pomocí mikročipové technologie byly nalezeny tisíce mRNA spermií, které jsou zodpovědné za velkou škálu různorodých dějů důležitých pro spermatogenezi nebo raný embryonální vývoj. Pro účast v embryonálním vývoji hovoří fakt, že část těchto RNA nebyla nalezena v neoplozeném oocytu (Garrido et al., 2013). Kromě toho se ve spermiích nalézají mRNA, jejichž produkty se podílejí na buněčné proliferaci (Ostermeier et al., 2005).

Velmi zajímavý potenciál představují kódující RNA, které nejsou asociovány s proteinovým profilem spermií, u nich se právě předpokládá, že mohou hrát roli v reaktivaci transkripce a časném vývoji (Jodar et al., 2016b).

### 3.3.7 MikroRNA (miRNA)

V poslední době velkou pozornost vědců přitahuje role miRNA ve spermiích kvůli své funkci regulátoru genové exprese. miRNA v buňce hrají důležitou roli v negativní regulaci translace mRNA. Tento děj je velmi intenzivní během diferenciaci buněk, včetně diferenciaci spermií během spermatogeneze, miRNA se však podílejí i na zachování kmenovosti spermatogonií (Mciver et al., 2012). Bylo zpracováno několik studií pro stanovení přítomnosti miRNA ve spermiích a jejich role během spermatogeneze. Bylo detekováno několik desítek miRNA s rozdílnou expresí ve skupinách neplodných mužů v porovnání s plodnými (Abu-Halima et al., 2014). Mezi nimi jsou účastníci buněčné diferenciaci, migrace, apoptózy a zachování kmenovosti buněk a regulátory buněčného cyklu (Mciver et al., 2012).

### 3.3.8 piRNA (PIWI-interacting RNAs)

Jedná se o malé nekódující RNA v buňce interagující s proteiny podskupiny piwi, které patří do skupiny Argonaut. Hlavní úlohou piRNA je potlačení exprese transpozónů, a to jak na úrovni transkripce, tak i post transkripčně (Goh et al., 2015). U savců jsou piRNA exprimovány zejména v mužských gonádách, jsou dlouhé 24 až 31 nukleotidů a v sekvenci mají na prvním místě uracil (Pantano et al., 2015). piRNA savců hrají důležitou roli během spermatogeneze. Mutace, které blokují funkce piRNA, vedou k poškození pohlavních buněk a sterilitě jak u bezobratlých, tak u obratlovců (Clark, Josef P., 2014).

### 3.3.9 RNA jako markér neplodnosti

Většinu klinických studií zacílených na výzkum transkriptomu spermií lze podle technologií rozdělit na dva typy – za použití mikročipové technologie a za použití sekvenování nové generace. První varianta je méně finančně náročná na rozdíl od

sekvenování nové generace a je jednodušší z hlediska analýzy dat. Sekvenování nové generace přitom poskytuje větší množství komplexních informací, je náročnější finančně i požadavky na zpracování dat (Carrell et al., 2016).

První pokusy prozkoumat RNA spermií pomocí mikročipové technologie byly provedeny relativně nedávno. První práce, která se zabývala transkriptomem spermií, byla studie Ostermeiera, jehož výsledky byly publikovány v roce 2002 v článku „Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men“ (Ostermeier et al., 2002). Pomocí mikročipové technologie bylo vyhodnoceno 19 vzorků varlete a devět vzorků spermatické RNA plodných mužů. Ve skupině vzorků spermií byly nalezeny geny spojené s časným vývojem embrya a předpokládá se, že RNA spermií může přispívat k vývoji zárodka před a po aktivaci embryonálního genomu. Jeho závěrem byla myšlenka, že mRNA spermií lze využít pro sledování vývoje spermií během spermatogeneze a že lze tuto technologii použít pro neinvazivní diagnostiku neplodnosti (Ostermeier et al., 2002).

V roce 2007 Adrian E. Platts a kolektiv (Platts et al., 2007) publikovali výsledky porovnání RNA spermií od 17 zdravých jedinců a 14 pacientů, jejichž spermioqram prokázal teratozoospermii. Výrazný rozdíl v expresi byl detekován u genů z ubiquitin-proteasomální dráhy. U skupiny s teratozoospermii byla exprese potlačena, což může naznačit příčinu neplodnosti v neschopnosti buňky provést cílenou degradaci proteinů během diferenciaci.

V práci Garrido a kolektivu (Garrido et al., 2009) z roku 2009 byla provedena mikročipová analýza 10 vzorků spermií, ze kterých pět bylo od mužů s idiopatickou neplodností, a dalších pět z kontrolní skupiny plodných mužů. Byly nalezeny stovky genů, jejichž exprese se lišila ve skupinách minimálně dvakrát. Většina těchto genů ve skupině infertilních mužů byla potlačena. Nalezené diferenciálně exprimované geny byly zapojeny především do drah spojených se zráním a diferenciací spermií a RNA pro ribozomální proteiny.

V roce 2011 Garcia-Herrero a kolektiv (Garcia-Herrero et al., 2011) porovnávali RNA spermií ze vzorků použitých pro ICSI v závislosti na úspěšnosti výsledků. Celkem bylo analyzováno pomocí mikročipové technologie 8 vzorků, na stejných vzorcích byly úspěšně ověřeny rozdíly v expresi 4 genů (*IFI30*, *S100A6*, *CTSZ*, *COX7B2*) pomocí q-RT-PCR.

V roce 2012 Jodar a kolektiv (Jodar et al., 2012) pomocí mikročipové technologie porovnávali RNA ze spermií mužů s diagnostikovanou asthenozoospermii s fertilitními jedinci. Celkem bylo prozkoumáno 36 vzorků, z nichž sedm tvořilo kontrolní skupinu, 17 bylo ze skupiny asthenozoospermie a 12 infertilní normospermie. Osm vzorků po čtyřech ze skupin

astenozoospermii a kontrolní byl prozkoumán pomocí mikročipové technologie. Bylo identifikováno 19 diferenciálně exprimovaných genů, ze kterých 17 bylo potlačeno a dva naopak víc exprimovány u pacientů s astenozoospermii. Kromě toho tři geny (*ANXA2*, *BRD2* a *OAZ3*) byly ověřeny na větším počtu vzorků pomocí kvantitativní RT-PCR.

Ve studii Bonache a kolektiv z roku 2012 (Bonache et al., 2012) porovnávali exprese určitých genů mužů s normospermii a jejich úspěšnost v dosažení těhotenství při intrauterinní inseminaci (technika asistované reprodukce, při které se předem dobře přečištěné spermie vnáší přímo do dělohy). Také se pokusili nalézt molekulární markery pro hodnocení fertlního statusu dárců spermií. Byly identifikovány geny *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* a *RPS27A*, jejichž úroveň exprese korelovala s úspěšností dosažení těhotenství. Tento panel podle předpokladu autorů by mohl sloužit pro vyhodnocení dárců spermií na klinikách asistované reprodukce, neboť ve studii prokázal přesnější výsledky než klasický konvenční model vyhodnocování spermogramu. Kromě toho nabízený panel testů by mohl pomoci identifikovat muže s nízkou plodností, i když podle konvenčních parametrů vypadají jako zdraví (Bonache et al., 2012).

Stanovení rozdílné exprese genů v RNA spermií mužů trpících oligozoospermii v porovnání s kontrolní skupinou plodných jedinců publikoval v roce 2012 Montjean a kolektiv (Montjean et al., 2012). Pro studii bylo použito 11 vzorků, ze kterých tři byly z kontrolní skupiny. Ve výsledku zjistili ve skupině oligozoospermie až 33krát menší expresi genů spojených se spermatogenezí a odpovědných za motilitu. Kromě toho u vzorků neplodných pacientů byly zjištěny nižší hladiny exprese genů pro reparaci DNA, regulaci oxidativního stresu a histonové modifikace. Celkem bylo nalezeno 157 transkriptů s výrazným rozdílem v expresi při porovnání s kontrolní skupinou.

V roce 2015 Bansal a kolektiv (Bansal et al., 2015) prozkoumali vzorky spermií od 60 mužů, ze kterých 20 bylo plodných (kontrolní skupina), 20 neplodných, ale s normálním spermogramem, a dalších 20 s asthenozoospermii. Analýza zjistila rozdíly mezi skupinami ve více než 2 tisících transkriptů.

Ve svém přehledovém článku z roku 2013 N. Garrido (Garrido et al., 2013) uvádí seznam diferenciálně exprimovaných genů, které byly odhaleny při porovnávání úspěšnosti různých technik asistované reprodukce – intrauterinní inseminace, in-vitro fertilizace a intracytoplazmatické injekce spermií. Přehled obsahuje stovky genů.

Přehled prací, zabývajících se transkriptomem spermií uvádím v tabulce 4.



Tab. 4 – Porovnání pracízkoumajících transkriptom spermií

Autor, rok	Celkový počet vzorků	Typ vzorků	Počet vzorků		Výsledky
			na mikročipech	na q-RT-PCR	
(Platts et al., 2007)	31	17 - kontrola, 14 – teratozoospermie	31	Neprovádělo se	Výrazný rozdíl v expresi byl detekován u genů z ubiquitin-proteasomální dráhy
(Garrido et al., 2009)	10	5-kontrola, 5 - idiopatická neplodnost	10	Neprovádělo se	Stovky genů, jejichž exprese se lišila ve skupinách minimálně dvakrát
(Garcia-Herrero et al., 2011)		Vzorky spermií, využity pro ICSI,	8 (4-úspěšná ICSI, 4 neúspěšná)	8 pro 4 geny	Desítky až stovky diferenciálně exprimovaných genů
(Jodar et al., 2012)	29	17 astenozoospermie a 12 infertilní normospermie	8 (4 a 4)	29	19 diferenciálně exprimovaných genů na mikročipech, tři geny (ANXA2, BRD2 a OAZ3) byly ověřeny na větším počtu vzorků pomocí kvantitativní RT-PCR
(Bonache et al., 2012)	68	Potenciální dárci spermií	43 TaqMan Low density Array	68	panel 4 by podle autorů mohl sloužit pro vyhodnocení dárců na klinikách asistované reprodukce
(Montjean et al., 2012)	11	3-kontrola, 8 - oligozoospermie	11	11	Celkem bylo nalezeno 157 transkriptů s výrazným rozdílem v expresi při porovnání s kontrolní skupinou.
(Bansal et al., 2015)	60	20 -kontrola, 20 - normospermie, 20 – asthenozoospermie	60	Neprovádělo se	Analýza zjistila rozdíly mezi skupinami ve více než 2 tisících transkriptů.
(Jodar et al., 2015)	72	pacienti s idiopatickou neplodností, kteří podstoupili léčbu pomocí technik asistované reprodukce			Byla použita metoda RNA-seq, Identifikovali 648 „RNA elementů spermie“ (SRE) z 285 genů, absence některých z těchto „elementů“ u pacientů snižovala úspěšnost léčby pomocí technik asistované reprodukce.

Výzkum RNA spermií pomocí sekvenování nové generace (RNA-seq) je oproti mikročipům dražší a náročnější technika, na rozdíl od mikročipů však umožňuje odhalit spoustu unikátních kódujících a nekódujících transkriptů, izoformy, které jsou specifické pro spermie a malé nekodující RNA, které ještě nebyli detekovány (Jodar et al., 2015).

Jodar a kolektiv (Jodar et al., 2015) prozkoumali pomocí RNA-seq 72 vzorků spermií od pacientů s idiopatickou neplodností, kteří podstoupili léčbu pomocí technik asistované reprodukce. Identifikovali 648 „RNA elementů spermií“ (SRE-sperm RNA elements), které klasifikovali jako nezbytné pro oplození na základě homogenní přítomnosti ve všech kontrolních vzorcích. Většina z identifikovaných elementů patřila k exonovým oblastem celkem 285 genů, ze kterých 40% je spojeno s vývojem spermií, oplozením a časným embryonálním vývojem. Absence některých s těchto „elementů“ (tj. chybějící nebo velmi nízká exprese daného genu) u pacientů snižovala úspěšnost léčby pomocí intrauterinní inseminace nebo časovaným pohlavním stykem ze 77% (u pacientů s expresí všech „elementů“) na 27%.

Burl a kolektiv (Burl et al., 2018) se pokusil zjistit vztahy mezi 648 RNA elementy zjištěnými Jodarem a kol. (Jodar et al., 2015) se zdravím jak samotného muže, tak jeho předpokládaného budoucího dítěte. Byly nalezeny korelace jak s poruchami spermatogeneze, tak mortalitou plodu a vrozenými vývojovými vadami.

## 4 Materiály a metody

Cílem mého studia bylo pokusit se, za použití technik molekulární biologie, odhalit geny, jejichž exprese se ve spermiích neplodných mužů výrazně liší od fertilních. Rozdílná exprese by mohla sloužit jako marker neplodnosti. Druhým cílem této práce bylo pokusit se nalézt společné dráhy diferenciaciálně exprimovaných genů, které by mohly mít vliv na neplodnost. Experimentální práce probíhala ve dvou etapách. V první etapě jsem pomocí celogenomové analýzy RNA izolované ze spermií porovnávala exprese v různých skupinách neplodných pacientů. Pak byla exprese vybraných genů ověřena na stejných vzorcích pomocí kvantitativní RT-PCR. Druhá část zahrnovala ověření rozdílné exprese vybraných genů na větším počtu vzorků pomocí kvantitativní RT-PCR.

Ve své práci jsem využila následující metody molekulární biologie a genetiky:

- Izolace RNA
- Měření koncentrace na spektrofotometru
- Měření kvality RNA na Bioanalyseru Agilent
- Celogenomová analýza transkriptomu na mikročipech Affymetrix

- Analýza dat za použití softwaru Ingenuity Pathway Analysis
- Kvantitativní RT-PCR

Veškeré manipulace se vzorky se prováděly v jednorázových rukavicích, pracovní plochy byly ošetřeny speciálním roztokem, aby bylo zabráněno kontaminaci vzorků DNA a RNázami. Všechny použité plastové materiály (zkumavky, špičky, destičky) byly sterilní a podle výrobce neměly obsahovat DNázy a RNázy (DNase and RNase free.) Byla použita komerčně vyrobená voda pro molekulární biologii s certifikací RNase free.

#### 4.1 Mikročipová technologie pro výzkum RNA ve spermích

Jak bylo řečeno výše (oddíl 3.3.4.5), pro studium transkriptomu je možné využít buď mikročipové nebo sekvenační technologie. Ve svojí práci jsem využila technologie mikročipové.

Mikročipová technologie je technika molekulární biologie založená na hybridizaci malých úseků DNA. Při profilování RNA se používá komplementární DNA získaná pomocí reverzní transkripce (z příslušné RNA do DNA). Na skleněné, silikonové nebo nylonové matici jsou umístěny krátké (25 nukleotidů v případě mikročipu firmy Affymetrix) jednovláknové oligonukleotidové úseky. S nimi během reakce hybridizují fluorescenčně značené úseky DNA vzorků. Pomocí laseru se provádí detekce signálu a určuje se, které úseky hybridizovaly a jak silně. Výsledkem je seznam genů nebo úseků cDNA a velikost fluorescenčního signálu. Pomocí mikročipové technologie můžeme i z malého objemu vzorku získat velký počet dat, což je velmi důležité při práci se spermii, které obsahují malé množství RNA. Také můžeme sledovat genovou expresi v různých tkáních nebo porovnávat exprese v patologických stavech s kontrolní skupinou zdravých tkání. V biomedicíně tato technologie může pomoci určit rozdíly a nabídnout markery pro diagnostiku, prognózu a terapeutické využití (Garrido et al., 2013).

Mikročipová technologie pomáhá zkoumat a analyzovat RNA ve spermích a částečně pochopit komplexitu souboru RNA zralých spermií (Hamatani, 2012). Kromě toho se podařilo najít RNA, jejichž koncentrace koreluje s neplodností. Technologie mikročipové analýzy dovoluje zkoumání tisíců různých RNA a porovnávání celých profilů RNA ve spermích (Garrido et al., 2009).

## 4.2 Vzorky

Vzorky spermií (v každém případě jeden celý ejakulát) přečištěné a uložené v RNA stabilizačním roztoku (RNAlater Solution; Ambion, USA) byly dodány spolupracující laboratoří spolu se stanovenými údaji spermioqramu.

Celkem bylo do studie zařazeno 86 vzorků. Z nich 69 vzorků bylo od pacientů s diagnostikovanou neplodností, 17 vzorků od plodných mužů (odběr vzorku spermií byl proveden do roka od otěhotnění jejich partnerek) bylo použito jako kontrolní skupina. Všechny vzorky byly poskytnuty Laboratory of Male Fertility, Hospital de Clínicas José de San Martín, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Z toho 46 vzorků bylo nově dodaných, RNA byla izolovaná a zpracovaná v rámci této diplomové práce. RNA spermií dalších 40 vzorků pocházející z předchozí práce byla využita jen pro ověření diferenciální exprese pomocí kvantitativní RT-PCR.

Vzorky pacientů s diagnostikovanou infertilitou byly rozděleny do tří skupin na základě údajů o spermioqramu podle kritérií Světové zdravotnické organizace z roku 2010 (WHO, 2010).

1. skupina – astenoteratozoospermie – spermie mají sníženou motilitu (pod 5. percentilem běžné populace, tj. progresivní motilita méně než 32%) a abnormální morfologii (podíl normálních spermií pod 5. percentilem od zdravé populace, tj. méně než 4%)

2. skupina – astenozoospermie spermie mají normální morfologii (počet normálních spermií nad 5 %), ale sníženou motilitu

3. skupina – normospermie, pacienti mají normální morfologii, motilitu i celkový počet případně koncentraci spermií, ale mají diagnostikovanou idiopatickou neplodnost.

Kvůli malému počtu vzorků jsme do studie nezahrnuli skupinu vzorků vykazujících patologickou morfologii ale víceméně dobrou motilitu ani vzorky s izolovanou oligozoospermii. Z celkového počtu vzorků bylo 19 vyřazeno kvůli velmi nízké koncentraci RNA.

## 4.3 Izolace RNA

Spermie v RNA stabilizačním roztoku byly transportovány při pokojové teplotě do laboratoře Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK. Pak byly vzorky skladovány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Pro oddělení spermií od média byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě. Každý vzorek pak byl přemístěn do nové popsané sterilní zkumavky a byla provedena centrifugace během 10 minut při 16 000 x g a teplotě 4 °C. Pro tento účel byla použita centrifuga Eppendorf 5804. RNA stabilizační roztok byl odstraněn pipetou a zbylá peleta spermií pak byla lyzována přidáním 1 ml Trizolu (Invitrogen). Po inkubaci 10 min při pokojové teplotě byl přidán 99% chloroform a dále následovala inkubace 5 min při pokojové teplotě za stálého míchání. Pak následovala centrifugace 10 minut při 16 000 xg a teplotě 4 °C, kdy se obsah zkumavky rozdělil do tří vrstev – dolní vrstva obsahovala proteiny a lipidy, střední byla vrstva DNA a v horní tekuté vrstvě byla RNA.

Supernatant s RNA byl pak přemístěn do jiné zkumavky, k němu bylo přidáno  $\frac{5}{7}$  částí 96% etanolu. Supernatanty s etanolem byly přemístěny na kolonky ze sady RNeasy Plus MicroKit (Qiagen) a to tak, že 750 µl bylo pipetováno na kolonku, následně byly stočeny na centrifuze během 15 vteřin při 11 000 x g a teplotě 25 °C. Tento krok byl opakován, dokud veškerý roztok s RNA nebyl profiltrován. Další postup byl podle standardního protokolu výrobce sady (AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Handbook 09/2012).

- na kolonku bylo přidáno 500µl pufru RPE a pak byly kolonky stočeny během 15 vteřin při 11 000 xg a teplotě 25 °C
- byl připraven roztok DNázy tak, že se rozpustila lyofilizovaná DNáza ve vodě neobsahující RNázu (RNase-free water)
- byl připraven roztok v oddělené zkumavce podle přepočtu na počet vzorku +1 navíc
- na jeden vzorek: 10µl roztoku DNázy I a 70µl pufru RDD, směs byla opatrně promíchána, aby se předešlo denuraci DNázy a pak byla stočena na centrifuze
- připravený roztok byl aplikován na membránu kolonek s RNA (80 ul) a inkubován při pokojové teplotě 15 minut
- pak byl přidán do kolonek pufr FRN v množství 500 µl a kolonky byly stočeny na centrifuze 15 vteřin při 11 000 x g a pokojové teplotě
- pak byly kolonky přemístěny do nových 2ml zkumavek, a protože roztok, který zůstal ve zkumavce v předchozím kroku, mohl obsahovat malé RNA, ten byl aplikován na kolonku, která pak byla stočena na centrifuze během 15 vteřin při 11 000 x g a pokojové teplotě
- zkumavky pod kolonkou byly vyměněny za nové a na membrány bylo přidáno 500µl etanolu (96%). Pak byly kolonky stočeny na centrifuze při 16 000 x g 2 minuty

- kolonky byly umístěny do nových 1,5ml zkumavek a na membrány bylo přidáno 15  $\mu$ l vody (RNase-free water), kolonky byly stočeny 1 minutu při 8 000 x g a pokojové teplotě.

#### 4.4 Měření koncentrace pomocí spektrofotometru

Pro kontrolu kvality a měření koncentrace získané RNA byl použit spektrofotometr Eppendorf BioPhotometer 6131 s kyvetou Hellma TrayCell. Tento set na základě spektrometrického měření dovoluje určit jak koncentrace vzorku, tak jeho kvalitu a možné kontaminace. Výhoda tohoto přístroje je také v tom, že se používají menší objemy vzorků. Z každého vzorku bylo použito 2 $\mu$ l.

#### 4.5 Ověření kvality RNA

Pro další vyhodnocení kvality vyzolované RNA byla použita metoda elektroforézy na mikročipech. Tato metoda je založena na klasické elektroforéze, která se provádí v mikrofluidickém systému a spotřebuje se minimum materiálu a vzorků. K tomuto účelu byl použit přístroj Agilent 2100 Bioanalyser, který umožňuje při malém množství vzorku určit koncentrace a integritu DNA, RNA nebo proteinů. Kvalita vzorků byla zanalyzovaná pomocí Total RNA 6000 Nano nebo Pico sady v závislosti na koncentraci vzorků změřených na spektrofotometru. Při koncentraci RNA vyšší než 40ng/ $\mu$ l byla použita sada Total RNA 6000 Nano, při nižší koncentraci byla použita sada Total RNA 6000 Pico s ředěním RNA na cca 3 ng/ $\mu$ l (3000 pg/ $\mu$ l). Příprava vzorků a měření se prováděly podle protokolu výrobce.

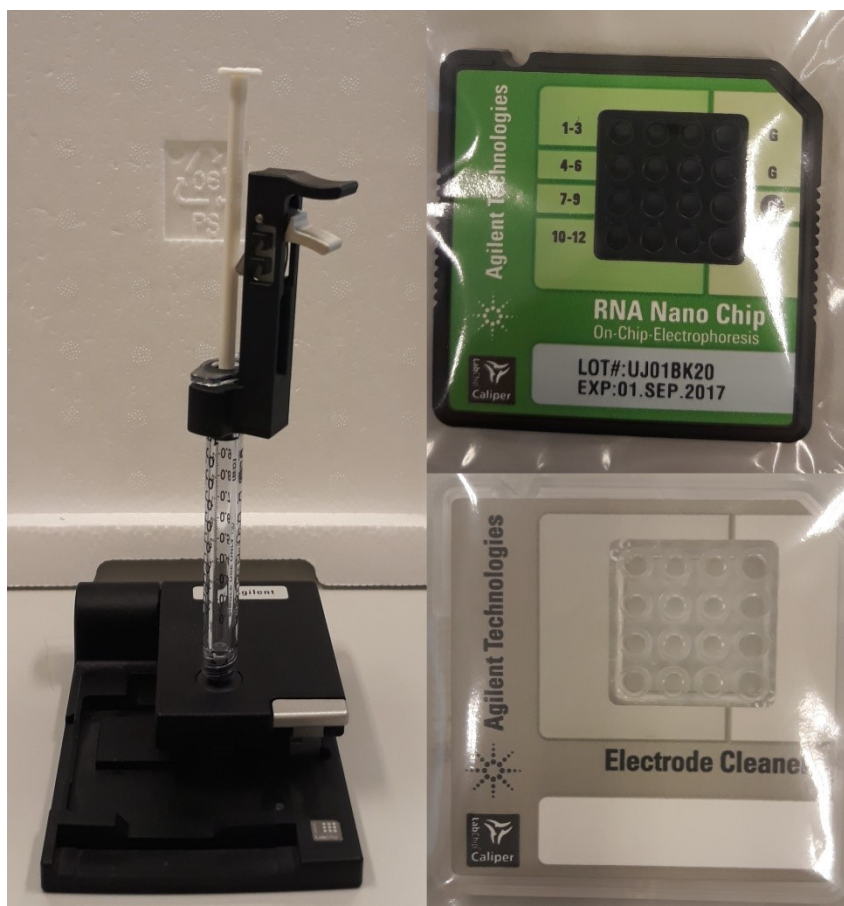
Všechny používané chemikálie byly vyndány z lednice a ponechány při pokojové teplotě 30 minut před začátkem práce. Pro filtraci gelu bylo do horní části centrifugačního filtru napipetováno 550  $\mu$ l Agilent RNA 6000 Nano gel matrix. Zkumavka s filtrem byla stočena na centrifuze 10 minut na 1500 x g. Tento přefiltrovaný gel byl rozdělen na alikvoty po 65  $\mu$ l, které pak byly skladovány v 0,5ml zkumavkách při 4 °C pro další použití.

Zkumavka s barvivem – RNA 6000 Nano dye concentrate – byla promíchána pomocí vortexu a pak krátce stočena na centrifuze. K 65  $\mu$ l přefiltrovaného gelu byl přidán 1  $\mu$ l barviva. Směs byla dobře promíchána pomocí vortexu a pak stočena na centrifuze 10 min při 13 000 x g.

Čip vyjmutý z ochranné fólie byl umístěn do rozevřené speciální plastové komůrky s integrovanou plastovou stříkačkou (Obr. 2). Do malého otvoru v čipu s označením G bylo pipetováno 9  $\mu$ l gelu s barvivem. Komůrka se uzavřela a píst stříkačky se zatlačil dolů, aby

tlakem vzduchu vyplnil volný prostor. Po 30 vteřinách byl píst volně puštěn a po 5 vteřinách postupně vytlačen do označení v 1 ml. Pak byla komůrka otevřena a do dalších dvou jamek bylo přidáno po 9  $\mu$ l gelu s barvivem. Do jamek pro žebříček a pro 12 vzorků pak bylo přidáno 5  $\mu$ l RNA 6000 Nano markeru.

Obr. 2. Plastová komůrka s integrovanou plastovou stříkačkou pro natlačení gelu do čipu (vlevo), RNA 6000 Nanočip (vpravo nahoře), čip pro promývání elektrod (vpravo dole).



Před nanášením na čip byly vzorky ohřáty na 70 °C během 2 minut, aby došlo k denaturaci sekundárních struktur. Do označené jamky byl přidán žebříček – RNA ladder, 1  $\mu$ l. Do jamek pro vzorky – po 1  $\mu$ l vzorku RNA. Čip byl umístěn do vortexu speciálně tvarovaného pro čip na 1 min na 2400 rpm. Před umístěním čipu s vzorky do bioanalyzáru byly elektrody promyty 350  $\mu$ l roztokem ZAP pro odstranění nukleových kyselin a RNáz a pak dvakrát vodou pro molekulární biologii. Pak byl čip vložen do bioanalyzáru a spuštěn příslušný program.

Při používání Pico sady byl postup podle komerčního protokolu Agilent RNA 6000 Pico, který je velmi obdobný. Vzorky RNA byly ředěny na cca 3 ng/μl (3000 pg/ul) podle koncentrace změřené na spektrofotometru.

Na základě údajů bioanalyzátoru byly vybrány vzorky s vyhovující kvalitou a dostačující koncentrací RNA pro následující analýzu na mikročipech.

#### 4.6 Celogenomová analýza pomocí mikročipu

Pro celogenomovou analýzu na mikročipech bylo vybráno 24 vzorků, které nejlépe odpovídaly kvalitě a kvantitě RNA. Z toho bylo 18 vzorků od mužů s diagnostikovanou neplodností (7 – astenoteratozoospermie, 5 – astenozoospermie, 6 – normospermie) a šest vzorků od plodných mužů s normospermií bylo použito jako kontrolní skupina. Vzorky od plodných mužů byly získány do 1 roku od otěhotnění jejich partnerek. Analýza se prováděla za použití Affymetrix HuGene2.1ST Array. Pro přípravu RNA byla použita sada reagentů WT PLUS Reagent Kit a systém přístrojů GeneAtlas sestavený z počítače, hybridizační stanice, promývací stanice a zobrazovacího zařízení (Obr.3). Pro registraci čipu v počítačovém systému se používá čtečka na čárový kód.

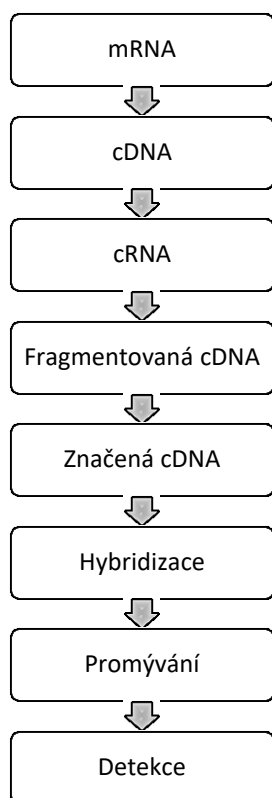
Obr.3. Hybridizační stanice (vlevo), promývací stanice (uprostřed) a zobrazovací zařízení Affymetrix (vpravo)



Celogenomová analýza transkriptomu je založena na technologii mikročipu. Krátký postup je zobrazen na obrázku 4.



Obr.4 Schéma pracovního postupu pro analýzu exprese genů na mikročipech



Izolovaná RNA ze vzorku je přepsaná reverzní transkripcí do komplementární dvouvláknové DNA (dále cDNA). Tato DNA je pomocí RNA polymerázy přepsána do komplementární RNA (dále cRNA), která je pak znovu přepsána do další komplementární DNA.

Tato jednořetězcová cDNA je fragmentována a označena biotinem, následně hybridizuje na mikročipech s napojenými jednořetězcovými oligonukleotidovými sondami. Úseky naštěpené cDNA se spojují s komplementárními vlákny na mikročipu a pak jsou detekovány pomocí fluorescenčního barviva navázaného na reagens vážící se k biotinu („Stain Coctail“) a vyhodnoceny za použití speciálního fluorescenčního mikroskopu a počítačového programu GeneAtlas Instrument Control Software.

Celý postup byl proveden podle dodaného protokolu a rozdělen do tří dnů podle doporučení výrobce. V jednom běhu na mikročipu lze analyzovat čtyři vzorky. Pro analýzu na mikročipech jsme vybrali 24 vzorků. Proto se tento postup opakoval 6krát.

### Den 1

Příprava cDNA pro celogenovou analýzu se prováděla pomocí WT PLUS Reagent Kit. První den byla provedena syntéza obou vláken cDNA, která pak byla použita pro syntézu cRNA pomocí in-vitro transkripce.

Příprava pozitivní kontroly: dodaná RNA v reagenční sadě kontrolní byla rozpouštěna ve vodě (2  $\mu$ l RNA a 78  $\mu$ l vody).

RNA byla naředěna tak, aby každý vzorek s objemem 3  $\mu$ l obsahoval 50 ng RNA.

Následovala příprava poly-A kontroly, což jsou pozitivní exogenní kontroly, které slouží jako indikátory značení. Je to několik sond pro geny bakterie *Bacillus subtilis*, které nejsou v eukaryotických buňkách. Směs byla připravena pomocí ředící řady. Po každém ředění byl roztok důkladně promíchán a krátce stočen na centrifuze. V prvním ředění se ředilo 1 : 20, 2  $\mu$ l Poly-A Control Stock byly přidány k 38  $\mu$ l Poly-A Control Dil Buffer. Ve druhém a třetím ředění se ředilo 1 : 50 přidáním 2  $\mu$ l z předchozího ředění do 98  $\mu$ l Poly-A Control Dil Buffer. Čtvrté ředění bylo 1 : 20, 2  $\mu$ l roztoku třetího ředění bylo přidáno k 38  $\mu$ l Poly-A Control Dil Buffer. Do každého vzorku RNA byly přidány 2  $\mu$ l připravené směsi z posledního, čtvrtého, ředění pro Poly-A kontroly.

Všechny směsi reagensů se připravovaly v přepočtu na počet vzorků (4) a byly zvětšeny o 10 % objemu pro případné ztráty při pipetování. Jsou uvedeny objemy použité na jeden vzorek.

Pro syntézu jednovláknové cDNA byla připravena směs z First-Strand Buffer Mix a First-Strand Enzyme Mix (4  $\mu$ l a 1  $\mu$ l na každý ze čtyř vzorků). Směs byla promíchána a krátce stočena na centrifuze. Do zkumavek pro PCR, umístěných na led, bylo přidáno 5  $\mu$ l připravené směsi a 5  $\mu$ l směsi RNA a poly-A kontroly. Vzorky byly promíchány a krátce stočeny na centrifuze. Dále následovala inkubace v termocykleru (Biometra) jednu hodinu na 25 °C, pak jednu hodinu na 42 °C a ochlazení na 4 °C na 2 minuty. Hned po inkubaci byly vzorky krátce stočeny a pak na 2 minuty umístěny na led.

Pro syntézu druhého vlákna cDNA byla připravena na ledu směs z enzymu s pufrém. Na jeden vzorek bylo použito 18  $\mu$ l Second-Strand Buffer Mix, 2  $\mu$ l Second-Strand Enzyme Mix. Směs byla opatrně promíchána a krátce stočena na centrifuze. Do každého vzorku na ledu bylo přidáno 20  $\mu$ l směsi pro syntézu druhého vlákna. Pak byly vzorky s přidaným mixem opatrně promíchány pomocí vortexu a krátce stočeny na centrifuze.

Vzorky byly umístěny do termocykleru vychlazeného na 16 °C, kde se inkubovaly jednu hodinu na 16 °C, pak 10 minut při teplotě 65 °C, pak byly ochlazeny na 4 °C na 2 minuty. Dalším krokem hned po inkubaci byla transkripce cRNA v podmínkách in-vitro pomocí T7 RNA polymerázy. Při pokojové teplotě byla připravena směs z IVT Buffer Mix (24  $\mu$ l na jeden vzorek) a IVT Enzyme Mix (6  $\mu$ l na jeden vzorek). Směs byla promíchána

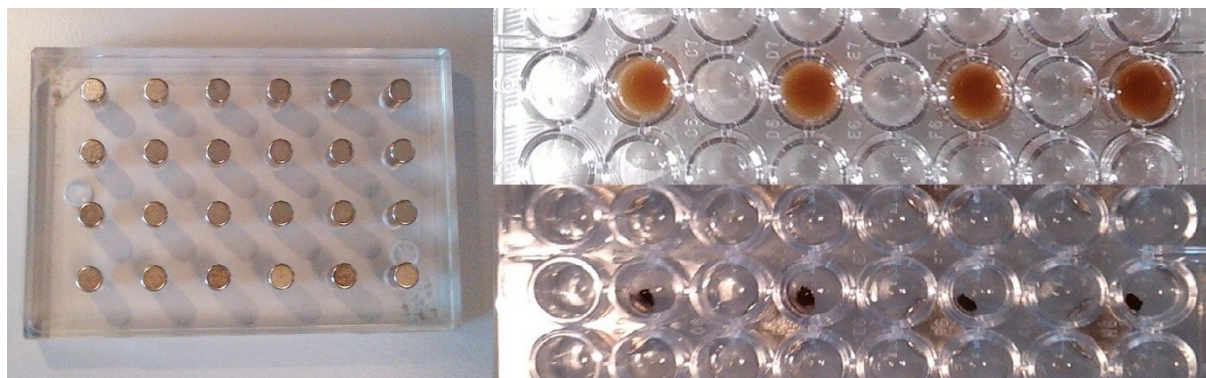
vortexem, stočena na centrifuze. Vzorky byly nechány při pokojové teplotě 5 min. Pak do každého vzorku bylo přidáno 30  $\mu$ l směsi. Vzorky byly promíchány pomocí vortexu a stočeny na centrifuze. Inkubace v termocykleru probíhala přes noc 16 hodin na 40 °C a pak následovalo ochlazení na 4 °C.

## Den 2

Následující den ráno byly vzorky stočeny na centrifuze a následovalo přečištění cRNA a syntéza nové, jednovláknové cDNA, degradace cRNA, fragmentace cDNA a pak značení získaných fragmentů.

Prvním krokem druhého dne bylo přečištění cRNA od enzymů, solí a zbylých ribonukleotidů a vyhodnocení kvality a kvantity. Zkumavka s roztokem magnetických kuliček (Purification Beads) byla nechána při pokojové teplotě pro ohřátí, pak byla dobře promíchána pomocí vortexu. Do vzorku cRNA bylo přidáno 100  $\mu$ l tohoto roztoku. Promíchávalo se pomocí pipetování. Vzorky pak byly přeneseny na destičku (U-Bottom Plate) a po následném promíchání pipetováním se inkubovalo 10 minut při pokojové teplotě, aby se cRNA navázala na kuličky. Destička pak byla přemístěna na magnetický stojánek (obrázek 5).

Obr. 5 – Magnetický stojánek Ambion Magnetic Stand – 96 (vlevo), rozpouštěné kuličky v jamkách destičky (vpravo nahoře), shluk kuliček v jamkách destičky na magnetickém stojánku (vpravo dole).



Během pěti minut se kuličky s navázanou cRNA shlukovaly po straně jamek. Čirý roztok pak byl odstraněn pipetou. Do každé jamky se vzorkem v destičce, přímo na magnetickém stojánku bylo přidáno 200  $\mu$ l 80% etanolu a inkubovalo se 30 s. Pak byl roztok etanolu opatrně odstraněn. Postup promývání kuliček (od přidání roztoku etanolu do odstranění tekutiny) byl opakován ještě jednou.

Pro vysušení kuliček byla destička nechána 5 minut, až peleta z kuliček přestala být lesklá. Pak byla destička sejmuta z magnetického stojánu a pro eluci cRNA z kuliček byla přidána voda přehřátá na 65 °C, 27 µl na každý vzorek. Po pětiminutové inkubaci byla voda s rozpouštěnou cRNA odpipetována do nových 0,2 ml zkumavek pro PCR.

Hned po měření koncentrace byla provedena syntéza jednovláknové cDNA druhého cyklu reverzní transkripce. cRNA byla na ledu naředěna na koncentraci 625 ng/µl do celkového objemu 24µl. Ke každému vzorku cRNA (24µl) bylo přidáno 4µl roztoku s primery 2nd-Cycle Primers. Vzorky se opatrně promíchaly pomocí vortexu a byly krátce stočeny na centrifuze. Pak byly zkumavky umístěny do cykleru a tam inkubovány na 70 °C 5 minut, pak na 25 °C 5 minut a na konci 2 minuty na 4 °C. Pak byly vzorky znovu stočeny na centrifuze a umístěny na led.

Na ledu se smíchaly 2nd-Cycle ss-cDNA Buffer 8 µl a 2nd-Cycle ss-cDNA Enzyme 4 µl na každý vzorek. Směs se opatrně promíchala a byla krátce stočena na centrifuze.

Na ledu bylo do každého vzorku s primery přidáno po 12 µl připravené směsi. Po opatrném promíchání a stočení byly zkumavky umístěny do termocykleru. Vzorky se inkubovaly na začátku 10 min na 25 °C, pak na 42 °C během 90 minut a dále na 70 °C během 10 minut. Na konci se vzorky zchladily na 4 °C během 2 minut. Po inkubaci byly zkumavky s vzorky stočeny na centrifuze.

Vzorky byly umístěny na led a přidalo se do nich po 4µl RNase H, která rozštěpila cRNA a uvolnila jednořetězcovou cDNA. Po přidání se směs opatrně promíchala pomocí vortexu a byla krátce stočena na centrifuze. Následovala inkubace v termocykleru během 45 minut na 37 °C, pak během 5 minut na 95 °C a pak zchlazení během 2 minut na 4 °C. Po inkubaci byly vzorky stočeny na centrifuze a umístěny na led.

Do každého vzorku bylo přidáno 11 µl vody, zkumavky byly promíchány a stočeny na centrifuze. Dalším krokem bylo přečištění jednovláknové cDNA od enzymů, solí a zbylých deoxyribonukleotidů.

Zkumavka s roztokem magnetických kuliček (Purification Beads) byla promíchána pomocí vortexu. Do vzorku ss-cDNA bylo přidáno 100 µl tohoto roztoku. Promíchávalo se pomocí pipetování. Vzorky pak byly přineseny na destičku (U-Bottom Plate). Do každé jamky se vzorkem bylo přidáno 150 µl 100% etanolu. Promíchávalo se pipetováním nahoru-dolů 10krát. Následovala inkubace 20 minut při pokojové teplotě, aby se ss-cDNA navázala na kuličky. Destička pak byla přemístěna na magnetický stojánek. Během 5 minut se kuličky s navázanou ss-cDNA shlukovaly po straně jamek. Čirý roztok pak byl odstraněn pipetou. Do

každé jamky se vzorkem v destičce, přímo na magnetickém stojánku bylo přidáno 200  $\mu$ l 80% etanolu a inkubovalo se 30 s. Pak roztok etanolu byl opatrně odstraněn. Postup promývání kuliček (od přidání roztoku etanolu do odstranění tekutiny) byl opakován ještě jednou.

Pro vysušení kuliček byla destička nechána 5 minut, až se peleta z kuliček přestala lesklout. Pak byla destička odstraněna z magnetického stojánku a pro eluci ss-cDNA z kuliček byla přidána voda předeřhátá na 65 °C, 30  $\mu$ l na každý vzorek. Po inkubaci jednu minutu byla voda s ss-cDNA odpipetována do nových zkumavek.

Koncentrace ss-cDNA byla změřena pomocí spektrofotometru s nastavením na měření ssDNA.

Hned po měření koncentrace následovala fragmentace cDNA. cDNA byla naředěna do striptubes tak, že se objem odpovídající 5,5  $\mu$ g ss-cDNA naředil vodou (RNase-free) do celkového objemu 31,2  $\mu$ l. Na ledu byla připravena směs v přepočtu na počet vzorků plus 10% z 10  $\mu$ l vody (RNase free), 4,8  $\mu$ l 10x koncentrovaného fragmentačního pufru (10X cDNA Fragmentation Buffer), 1  $\mu$ l UDG (10 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l APE1 (1,000 U/ $\mu$ l). Do každého vzorku na ledu bylo přidáno 16,8  $\mu$ l připravené směsi. Vzorky byly opatrně promíchány pomocí vortexu a pak stočeny na centrifuze. Inkubace probíhala v termocykleru 60 minut při 37 °C, pak 2 minuty při 93 °C a pak 2 minuty při 4 °C. Po inkubaci byl obsah zkumavek promíchán a krátce stočen na centrifuze. Zkumavky byly umístěny na led. Pak se 45  $\mu$ l každého vzorku na ledu přepipetovalo do nové zkumavky pro další analýzu.

Pro označení fragmentované ss-cDNA byla připravena směs (uvedený objem na jeden vzorek) z 12  $\mu$ l 5xTdT Buffer, 2  $\mu$ l TdT (30U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l DNA Labeling Reagent (5mM). Zkumavka s připravenou směsí byla promíchána a stočena. Na ledu bylo přidáno 15  $\mu$ l do 45  $\mu$ l fragmentované ss-cDNA. Roztok byl lehce promíchán a stočen. Pak se vzorky inkubovaly 60 minut při 37 °C, pak 10 minut při 70 °C a 2 minuty při 4 °C.

Dále následovala hybridizace na mikročipech. Strip se čtyřmi mikročipy, který se skladuje v lednici, byl vyjmut, aby se ohřál na pokojovou teplotu. Spolu s ním byly do pokojové teploty přemístěny z lednice promývací roztoky a barvicí roztoky: 5X WT Hyb Add 1, 15X WT Hyb Add 4, 2.5X WT Hyb Add 6, Control Oligonucleotide B2 (3 nM) a 20X Eukaryotic Hybridization Controls. Po 30 minutách v pokojové teplotě se zkumavky promíchaly pomocí vortexu a pak byly stočeny na centrifuze.

Zkumavky s roztoky Control Oligonucleotide B2 (3 nM) a 20X Eukaryotic Hybridization Controls pak byly umístěny na led.

Roztok 20X Hybridization Controls byl ohřát v termocykleru na 65 °C na 5 minut.

Pak byly smíchány roztoky podle počtu vzorků +10% (objemy jsou uvedeny na jeden vzorek): 30  $\mu$ l 5X WT Hyb Add 1, 1,5  $\mu$ l Control Oligonucleotide B2, 7,5  $\mu$ l 20X Hybridization Controls a 10  $\mu$ l 15X WT Add 4. Směs byla promíchána pomocí vortexu a stočena na centrifuze.

Pak byl pro každý vzorek připraven hybridizační koktejl. Do zkumavek do každého vzorku zvlášť bylo přidáno 49  $\mu$ l směsi připravené v předchozím kroku, 41  $\mu$ l vzorku fragmentované a značené ss-cDNA a 60  $\mu$ l 2.5X WT Hyb Add 6. Po promíchání pomocí vortexu a stočení se zkumavky inkubovaly 5 minut při 99 °C. Po inkubaci byly zkumavky stočeny na centrifuze.

Do hybridizační vaničky bylo přidáno po 120  $\mu$ l vzorků ss-cDNA, každý do jiné jamky. Pak byla vanička přiklopena stripem se čtyřmi mikročipy (Arraystrip, obr. 6). Strip s vaničkou pak byl umístěn do hybridizační stanice, kde se inkuboval během 20 h při 48 °C.

Obr. 6 Arraystrip (nahore), hybridizační vanička (uprostřed), Arraystrip v hybridizační vaničce (dole).



### Den 3

Po hybridizaci byl strip registrován pomocí čárového kódu v programu GeneAtlas Instrument Control Software. Potom byly podle nákresu dodaného výrobcem napipetovány roztoky do promývací a barvicí destičky, promývací vaničky a zobrazovací vaničky, které

byly umístěny do promývací stanice. Přidán byl také strip z hybridizační komůrky. Na počítači byl spuštěn program promývání a barvení, který trvá 1,5 hodiny. Po jeho skončení byl strip vyndán, znovu registrován pomocí čárového kódu a umístěn do zobrazovacího zařízení. Na počítači v GeneAtlas Instrument Control Software pak byl puštěn zobrazovací program, během kterého se vzorky 30 minut prosvěćují a jsou detekovány navázané úseky na oligonukleotidy čipu značené cDNA vzorky. Intenzity fluorescence pro každý čip byly zapsány do souboru (jeden soubor na čip, koncovka .cel).

#### **4.7 Zpracování dat**

Soubory .cel byly dále zpracovány pomocí programu Partek, který umožňuje porovnat skupiny vzorků mezi sebou, např. vzorky neplodných mužů s kontrolami. Byla zvolena kvantilová normalizace dat. Statistické hodnocení diferenciální exprese ve všech skupinách bylo provedeno analýzou rozptylu (analysis of variance = ANOVA), post-hoc srovnání jednotlivých skupin pomocí Studentova t-testu. Korekce dat na mnohočetná porovnání se prováděla pomocí *Benjamini-Hochbergovy* metody (také FDR – false Discovery rate). Výstupem z programu Partek, je tabulka, která pro každý gen umístěný na mikročipu zaznamenává logaritmus normalizované hodnoty exprese pro každý vzorek, podíl exprese a z něj vycházející „fold change“ při porovnání dvou skupin a nekorigovanou hodnotu dosažené hladiny statistické významnosti(P). Seznam transkriptů je uveden v příloze 1.

Část genů, o kterých jsme usoudili, že jsou diferenciálně exprimovány, jsme pak analyzovali pomocí Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen). IPA je sekundární analytický nástroj, který hledá souvislosti mezi diferenciálně exprimovanými geny na základě našich dat a v databázích uložených vztahů z literatury. Umožňuje nám tak lépe porozumět, které biologické procesy v buňce mohou být zasaženy diferenciální expresí genů u spermií neplodných mužů ve srovnání s kontrolami.

#### **4.8 Přepis RNA do cDNA pomocí reverzní transkripce**

Pro ověření rozdílné exprese genů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase a pro kontrolu kontaminace vzorků leukocyty a DNA, izolovaných ze spermií byla RNA přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce za použití reverzní transkriptázy SuperScript III (Invitrogen). Kromě vzorku izolované RNA byla použita voda jako negativní kontrola.

Vzorky RNA byly naředěny na koncentrace 250 ng/ul, aby do reakce vstoupilo 1000 ng. Na každý vzorek bylo použito:

- Oligo(dT) Primer – 1  $\mu$ l
- 10 mM dNTP Mix – 1  $\mu$ l
- Voda – 7  $\mu$ l
- RNA (250 ng/ $\mu$ l) – 4  $\mu$ l

Pro tuto reakci byl použit termocykler LabCycler (SensoQuest). Denaturace RNA bylo dosaženo inkubací 5 minut při 65 °C. Pak byly vzorky umístěny na led a do každého vzorku bylo přidáno 7  $\mu$ l následující směsi:

- 5x First-Strand Buffer – 4  $\mu$ l
- 0,1 M DTT – 1  $\mu$ l
- RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) – 1  $\mu$ l
- SuperScript III RT (200 U/ $\mu$ l) – 1  $\mu$ l

Následovala inkubace během 60 minut na 50 °C, pak na 70 °C během 15 minut. Dále se vzorky ochladily na 4 °C. Připravená cDNA byla naředěna přidáním 80  $\mu$ l vody a zamrazena.

#### 4.9 Výběr a návrh primerů

Po analýze dat IPA bylo vybráno 35 potenciálně diferenciatně exprimovaných genů, které jsme chtěli ověřit kvantitativní RT-PCR. Také byly navrženy primery pro potvrzení přítomnosti cDNA vzniklé reverzní transkripcí z RNA (HOOK1), pro zjištění případné kontaminace genomovou DNA (CNTROB) a pro detekci případné kontaminace leukocytovou cDNA (CD45).

Primery byly navrhovány pomocí programu Primer3 (Untergasser et al., 2012) a jejich specifita ověřena pomocí PrimerBLAST, Primer3 je součástí programu PrimerBLAST (Ye et al., 2012). Délka primerů byla 19-24 nt, délka produktu byla zvolena do 150 bp. Kvůli omezení amplifikace případné kontaminující genomické DNA byly primery navrženy tak, aby mezi nimi ležel alespoň jeden intron délky alespoň 500 bp. Syntéza primerů byla provedena firmou Integrated DNA Technologies, Inc. Primery byly nejprve otestovány na standardním vzorku cDNA v pěti dvojnásobných ředěních (16, 8, 4, 2 a 1 ng původní násady celkové RNA na vzorek, v triplicátech). K dalším experimentům jsme použili primery splňující podmínku směrnice regresní přímky -1,1 až -0,9 (osa x: log<sub>2</sub> koncentrace, osa y: Ct) a podmínku regresního koeficientu  $R^2 > 0,96$ ). Další podmínkou u detekce SYBRgreen byla monokomponentní disociační křivka s  $T_m$  (teplota tání dvoušroubovice) v souladu s očekávanou délkou produktu. Jako endogenní kontrola byl zvolen gen *EIF4E*. Ten byl



vybrán pomocí analýzy dat z mikročipů, podle kritérií 1) fold-change < 1,2 v porovnání všech skupin (skutečná maximální hodnota pro *EIF4E* byla 1,17); 2) molekulární funkce genu je obecná ve všech buňkách (jedná se o iniciační faktor translace); 3)  $P_{ANOVA} > 0,05$  (skutečná hodnota 0,65); 4) vysoká hladina exprese. Stabilita exprese byla ověřena qPCR, směrodatná odchylka Ct = 0,54.

Tab.4 Seznam použitých primerů

Gen	Název primeru	Sekvence primeru
<i>ACSL1</i>	ACSL1_e20F	TGAACAGGTCAAAGGCATCA
	ACSL1_e21R	GTCATCTATCTGCGACCTGAAATA
<i>ARHGAP17</i>	ARHGAP17_q1522F	GGAAACGACTCTGACTCGGG
	ARHGAP17_q1663R	TATTTAGAGTGCCACCCCGC
<i>ARL17</i>	ARL17_c247F	ATTGAAGCTGGGGGAGACTG
	ARL17_c377R	GCTGCCACAGAGGTCTGATT
<i>CAP1</i>	CAP1_c175F	CGGAGAGCGGCTGATCG
	CAP1_c334R	AGCTGCTCCTGCTTTTGAAG
<i>CAPZA1</i>	CAPZA1_c1071R	CCTTGGCAGTTTGGGCTTCA
	CAPZA1_c891F	AACTTCTGGAATGGTCGTTGG
<i>CD45</i>	CD45_c174R	GACAACGGTGACAGAGCTGG
	CD45_c59F	GACCAATGGCTCTGCCCTG
<i>CD46</i>	CD46_c778F	ACTTATTGGAGAGAGCACGATTTA
	CD46_c813pF	ATTCAGTGTGGAGTCGTGCTGCTC
	CD46_c865R	AATCGACATTTGACCACTTTACAC
<i>CEP893C</i>	CEP89_q1251F	CTGTCACCATTGTTGCTGGC
	CEP89_q1361R	TCACCACTTCTTGGACTCGC
<i>CMC2</i>	CMC2_c322F	TCGGGAGTTGAGAAAATGCCT
	CMC2_c396R	ATTGCAATGCCATGCTCCCT
<i>CNGB3</i>	CNGB3_c1761F	TCTTGGAGGCCCTGATGGTA
	CNGB3_c1875R	CACCACATTGGCAGTTCGAC
<i>EEF1B2</i>	EEF1B2_c526F	CCGACTTGTGTCATGCCCT
	EEF1B2_c632R	GGCAGGACCATATTTGCCCA
<i>EIF4E</i>	EIF4E_c1701F	CTGCGGCTGATCTCCAAGTT
	EIF4E_c1797R	AGTAGTCACAGCCAGGCATT
<i>ESPN</i>	ESPN_q1096F	GACCTGTCGGACTTCAACGG
	ESPN_q1239R	GGGTGAGGACATGCCTGAAT
<i>GFPT1</i>	GFPT1_c1636F	GGTCCTGAGATTGGTGTGGC
	GFPT1_c1781R	TCAGGCAGCCGTTTCAATCC
<i>GOSR1</i>	GOSR1_q432F	GGCAATACGGGAAAGGGAGA
	GOSR1_q561R	TGAGTTTCGAAGGTGGTCATGT
<i>HECTD4</i>	HECTD4_q10934F	AAGGGAGCCCAGGGTTAGAA
	HECTD4_q11059R	TCAGCGTCTGCTCTGAATGG
<i>IFT52</i>	IFT52_q1519F	CGGCTGGCTCAGATTACCAA

	IFT52_q1634R	TTGGCATCCTGTTGGTCCTT
<i>MTCH2</i>	MTCH2_q927F	CAACAACCTGTGGTCTTGCTGG
	MTCH2_q1068R	CTTCCCAAAGGGGACCTTCC
<i>MLST8</i>	MLST8_c1017R	TGGGTCACCTCGTCACCAAT
	MLST8_c899F	GAGGTCTCCATCACGTCCG
<i>MMP2</i>	MMP2_q2013F	ATAACCTGGATGCCGTCGTG
	MMP2_q2148R	CAGCCTAGCCAGTCGGATTT
<i>PIK3C2A</i>	PIK3C2A_4144F	CCCCAACTACAGACGCAGAA
	PIK3C2A_4215R	GGCAATGCTTCCCAAACCTGA
<i>POLDIP2</i>	POLDIP2_1076F	AGCCTGCGTTCAGTATAGC
	POLDIP2_1174R	CAAAGTGGGAGCCATCAGGT
<i>PPIL3</i>	PPIL3_q453F	GGGGCAAGAAGTTTGAGGATG
	PPIL3_q581R	GTGGCTGTTTGCCATAGGTG
<i>PRNT</i>	PRNT_c169R	GGCACTGAAGGGTGTTAGGA
	PRNT_c36F	CTGCAGAGAGGAGAGCAAGG
<i>RAB44</i>	RAB44_q2662F	TGACAGCTACCGTGGGAGTA
	RAB44_q2780R	CTGTGCGGTCATACTGTGGT
<i>RIMBP3C</i>	RIMBP3_qF	TGCTAAGAGTGTGGGGCTCT
	RIMBP3_qR	CTCCATCTCAGCCACTAGGC
<i>RPL17</i>	RPL17_c759F	ACAGAGCTCATGGTCCGGATT
	RPL17_c903R	TGTTTCTTCAGTTTCTTCTGGGA
<i>RPS15A</i>	RPS15A_c150R	CACAGTGAGAAACCGGACGA
	RPS15A_c1F	CTCTTTCCGCCATCTTTCCG
<i>SELO</i>	SELO_q781F	CACGGTTGTGTTGCGTGTAG
	SELO_q899R	CTCGAATGTCGTTCCCTCCCC
<i>SLAMF6</i>	SLAMF6_q897F	CAGTGTCTCCAACGAACAACAC
	SLAMF6_q1046	TTGCCCTGGAAAAAGTGGGT
<i>SLC47A2</i>	SLC47A2_q994F	TGAGATCGGGAGCTTCCTCA
	SLC47A2_q1067R	CCACCTCGTAGATGACAGCC
<i>SLC6A8</i>	SLC6A8_c1787F	CATGGACGACATTGCCTGTA
	SLC6A8_c1828pF	CCTGGATGAAATGGTGCTGGTCCT
	SLC6A8_c1887R	GATGAAGATGCCCATGCAGA
<i>SMURF2</i>	SMURF2_c2376F	TTGATGAAGAGCGACGAGCA
	SMURF2_c2509R	AGTGCAGGCATCAATCTGGT
<i>SNAP23</i>	SNAP23_c1007R	CTGTTGGTGTGTCAGCCTTGT
	SNAP23_c888F	CTGACTCAAGTGGGCAGTATC
	SNAP23_c923pF	AGACATGGCCCTGAACATAGGCAA
<i>STK39</i>	STK39_1510F	TGCCGTGAACCTCGTTTTGA
	STK39_1648R	ATCGTGACCATCCACCAAGC
<i>TDRG1</i>	TDRG1_c407F	CAGCCCATCTCTGAAACCTC
	TDRG1_c523R	ACTGCCTCCCTCCTTTCAT
<i>TESK2</i>	TESK2_c1038R	TCACTCCCCATGCTGACATC
	TESK2_c844F	TTTGCTTGGACTGTGAGGG
<i>HOOK</i>	HOOK1_c2_632F	GGTTGTGCGATCAACTGTGA
	HOOK1_c2_1271R	GCTTGCGAAGGTCATTCAG

<i>CNTROB</i>	CNTROB_e12_13245F	TCCCTTCTGGCTCTTTTTAGC
	CNTROB_e12_13616R	AGGAGTTCGAGGCTGCAAT

#### 4.10 PCR, gelová elektroforéza

PCR – polymerázová řetězová reakce je amplifikace úseku DNA. V diplomové práci byla použita tato metoda pro kontrolu, zda je izolovaná RNA skutečně ze spermií a neobsahuje příměs leukocytové RNA nebo genomové DNA. Protože je koncentrace RNA ve spermiích nízká, je velmi důležité vyloučit, že tato RNA neprochází ze somatických buněk. Pro tento účel byla provedena PCR s primery detekujícími cDNA genu *CD45*, který je markerem leukocytu (Hamatani, 2012) s detekcí produktu PCR pomocí elektroforézy. Jako pozitivní kontrola byla použita cDNA vzniklá reverzní transkripcí RNA izolované z lidské krve. PCR s primery specifickými pro cDNA genu *HOOK1*, který je exprimován ve spermiích a zároveň není exprimován v leukocytech, byla použita pro kontrolu přepisu RNA do cDNA. Pro kontrolu kontaminace genomickou DNA byla použita PCR s primery pro gen *CNTROB* – seznam a sekvence všech použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 4.

Směsi pro PCR-reakce byly připraveny podle následující receptury (je uveden objem na jeden vzorek, při přípravě pro více vzorků byly objemy přepočítány na počet vzorků +10% na případné ztráty během pipetování):

- Voda – 1,8 µl
- Betain 5M– 4 µl
- Směs deoxyribonukleotidtrifosfátů 1 mM – 4 µl
- 5x Phusion GC Buffer – 4 µl
- Primer F 10 µM– 1 µl
- Primer R 10 µM– 1 µl
- Phusion DNA Polymeráza – 0,2 µl
- cDNA – 2 µl
- Celkový objem – 20 µl

Zkumavky byly umístěny do termocykleru LabCycler (SensoQuest). Program pro PCR-reakce je uveden v tabulce 5.

Tab. 5 Program PCR pro *CD45*, *CNTROB*, *HOOK1*

PCR procedura		Teplota °C	Čas
Počáteční denaturace		98	30 s
30 cyklů	Denaturace	98	10 s
	Nasednutí primerů (Annealing)	63	30 s
	Syntéza DNA (Elongace)	72	15 s
Závěrečná elongace		63	5 min
Ochlazení		4	∞

Následující gelová elektroforéza probíhala ve 2% agarozovém gelu. Pro přípravu 80 ml gelu bylo použito 1,6 g agarozy, 16 ml 5x koncentrovaného pufru TBE (Tris-Borate-EDTA) a 64 ml destilované vody. Agarosa byla rozpouštěna zahřátím v mikrovlnné troubě. Pak byl roztok ochlazen na 60 °C a bylo přidáno 5 µl roztoku Ethidium bromidu. Gel byl nalit do speciální misky s hřebínky a pak ponechán při pokojové teplotě ztuhnout po dobu 30 minut. Po ztuhnutí byly vyjmuty hřebínky a gel byl umístěn do elektroforetické vaničky, do které pak byl přidán 1x TBE pufr.

Pro ověření velikosti PCR-produktu byl použit na začátku řady komerční žebříček GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoScientific) – 3 µl. Každý vzorek PCR-produktu byl použit v objemu 5 µl. Po nanesení vzorku byla elektroforetická vanička připojena k přístroji pro elektroforézu Biometra P25. Napětí bylo nastaveno na 85 V, čas na 40 min. DNA byla detekována pomocí fluorescence ethidium bromidu v UV-světle za použití přístroje Syngene G:Box a počítačového programu GeneSnap.

#### 4.11 Kvantitativní RT-PCR

Pro ověření diferenciální exprese vybraných genů byla použita metoda kvantitativní RT-PCR. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase je metoda, kdy během amplifikace probíhá detekce množství produktu v každém cyklu (na základě fluorescence). Pomocí této metody můžeme porovnávat původní množství kopií genů v různých vzorcích mezi sebou.

Byly použity dva druhy detekce. U většiny genů byla použita detekce na základě fluorescenčního barviva SYBR Green, které se inkorporuje do dvouřetězcové DNA, a tak vysílá tím větší signál, čím je více DNA v roztoku. U genů *CD46*, *SLC6A8*, *SNAP23* byly použity TaqMan sondy, které fungují na základě exonukleázové aktivity DNA-polymerázy. Na 5' konci sondy je napojena molekula fluorescenčního barviva, a na 3' je molekula, která

pohlcuje fluorescence. Pokud je sonda intaktní, fluorescence je utlumena, během elongace je však sonda odbourána DNA-polymerázou, fluorescenční barvivo se odpojuje a začíná svítit. Na základě intenzity fluorescence v každém cyklu můžeme stanovit relativní množství PCR-produktu.

Primery navržené pomocí programu Primer 3 byly objednány u firmy Integrated DNA Technologies (USA). Primery dodané v lyofilizované formě byly naředěny vodou na koncentraci 0,1 mM a pak pro přípravu mixu byly dále ředěny na pracovní roztoky o koncentraci 10  $\mu$ M. Sondy TaqMan se ředily na pracovní roztoky o koncentraci 10  $\mu$ M.

V první etapě tohoto studia byly použity stejné vzorky, které byly použity pro analýzu na mikročipech. Pro druhou etapu studia byly použity kromě těchto vzorků také zbylé vzorky, u kterých byla vyizolovaná RNA a také vzorky z předchozího studia. Ve druhé etapě studia se porovnával větší počet vzorků, proto byla použita automatická pipetovací stanice Eppendorf epMotion 5075 (Obr.7). Při vyhodnocování vzorků byl použit referenční gen, který měl vysokou a stabilní úroveň exprese. Referenční gen byl vybrán z několika různých genů, které vykazovaly vysokou a stabilní expresi v datech z mikročipů. Primery pro tyto geny byly vyzkoušeny na real-time PCR a pak byl vybrán jeden gen –*EIF4E*, který na daném souboru genů vykazoval vysokou stabilní expresi. Běžně používané geny, např. *GAPDH*, nebyly z různých důvodů vhodné, zejména pro nízkou a příliš variabilní expresi mezi jednotlivými vzorky (viz též kapitola Výběr a návrh primerů). Ve všech experimentech jsme prováděli q-RT-PCR v triplikátech (tj. ve třech technických replikátech pro každý vzorek).

Obr.7– Pipetovací stanice EppendorfepMotion 5075



Postup:

1. část

Reakce probíhala v objemu 20 µl na 96jamkové destičce. cDNA z krve sloužila jako pozitivní kontrola, jako negativní kontrola sloužila voda. Směs pro reakce s detekcí pomocí SYBR Green byla připravena podle tabulky 6 v přepočtu na počet vzorku +10 % pro případné ztráty během pipetování.

Tab.6 Receptura pro přípravu směsi na q-RT-PCR (SYBR Green)

Reagencie	Objem pro 1 vzorek
2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)	10 µl
Primer F	0,6 µl
Primer R	0,6 µl
Voda	0,8 µl
cDNA	8 µl

Směs pro detekci sondami Taqman byla připravena podle tabulky 7 v přepočtu na počet vzorků +10% pro případné ztráty během pipetování.

Tab. 7 Receptura pro přípravu směsi na q-RT-PCR (Taqman)

Reagencie	Objem pro 1 vzorek
2xTaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	10 µl
Primer F	1,8 µl
Primer R	1,8 µl
Sonda	0,5 µl
cDNA	5,9 µl

Byl použit PCR systém AppliedBiosystems 7000 nebo AppliedBiosystems 7900HT Real-Time PCR. Pro vzorky s detektorem SYBR green se po skončení standardního programu provádělo stanovení disociační křivky, aby bylo možné potvrdit přítomnost specifického produktu PCR v jamce (krok 4.).

q-RT-PCR program zahrnoval čtyři kroky:

1. 50 °C – 2 min
2. 95 °C - 10 min
3. (opakování 40x) 95°C – 15s, pak 60 °C 1 min
4. 95 °C – 15s, 60 °C –15 s, pak pomalu (2% maximální rychlosti) na 95%.

## 2. část

Ve druhé části studia reakce probíhala v 12  $\mu\text{l}$  a pipetování se provádělo automaticky. Každý vzorek byl změřen ve třech technických replikátech a porovnán s endogenní kontrolou – *EIF4E*. Sériově 8x ředěná cDNA z krve byla použita jako standard při testování primerů před vlastním měřením cDNA ze spermií.

Jako negativní kontroly byly použity: směs s vodou místo cDNA, pro vyloučení kontaminace genomovou DNA byla ještě použita negativní kontrola, získaná během přepisu RNA do cDNA s přidáním RNA, ale bez reverzní transkriptázy. Směs se připravovala podle receptury uvedené v tabulkách 8 (SYBR Green) a 9 (Taqman).

Tab. 8 Receptura pro přípravu směsi na q-RT-PCR (SYBR Green)

Reagencie	Objem pro 1 vzorek
2x FAST qPCR Master Mix (Applied Biosystems)	6 $\mu\text{l}$
Primer F	0,36 $\mu\text{l}$
Primer R	0,36 $\mu\text{l}$
Voda	1,28 $\mu\text{l}$
cDNA	4 $\mu\text{l}$

Tab. 9 Receptura pro přípravu směsi na q-RT-PCR (Taqman)

Reagencie	Objem pro 1 vzorek
2xTaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	6 $\mu\text{l}$
Primer F	1,08 $\mu\text{l}$
Primer R	1,08 $\mu\text{l}$
Sonda	0,3 $\mu\text{l}$
cDNA	3,54 $\mu\text{l}$

Byl použit PCR systém Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR, teplotní profil byl stejný, jako předchozí části této práce.

### Zpracování dat q-RT-PCR

Použili jsme  $\Delta\Delta\text{Ct}$  metodu. Nejprve jsme pro každý triplikát daného vzorku vypočítali aritmetický průměr hodnot  $\text{Ct}$  pro testovaný a kontrolní gen. Pak jsme pro každý vzorek vypočítali hodnotu  $\Delta\text{Ct}$ :

$$\Delta\text{Ct}_{\text{gen}} = \text{Ct}_{\text{gen}} - \text{Ct}_{\text{endokontrola (EIF4E)}}$$

Aritmetický průměr hodnot  $\Delta Ct$  pro skupinu plodných mužů s normálním spermiogramem (tj. pro kontrolní skupinu) jsme odečetli od  $\Delta Ct$  pro každý vzorek, tím jsme získali hodnotu  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta\Delta Ct_{\text{gen}} = \Delta Ct_{\text{gen}} - \Delta Ct_{\text{gen, průměr kontrolní skupiny}}$$

Hodnoty  $\Delta\Delta Ct$  by měly být normálně rozdělené. To jsme si ověřili pomocí normálních grafů („normal probability plot“) v programu STATISTICA. Kontrolní skupinu a skupinu neplodných mužů jsme pak porovnali oboustranným dvouvýběrovým Studentovým t-testem.

Hodnotu relativní exprese (RQ = relative quantity) jsme počítali podle vztahu:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 5 Výsledky

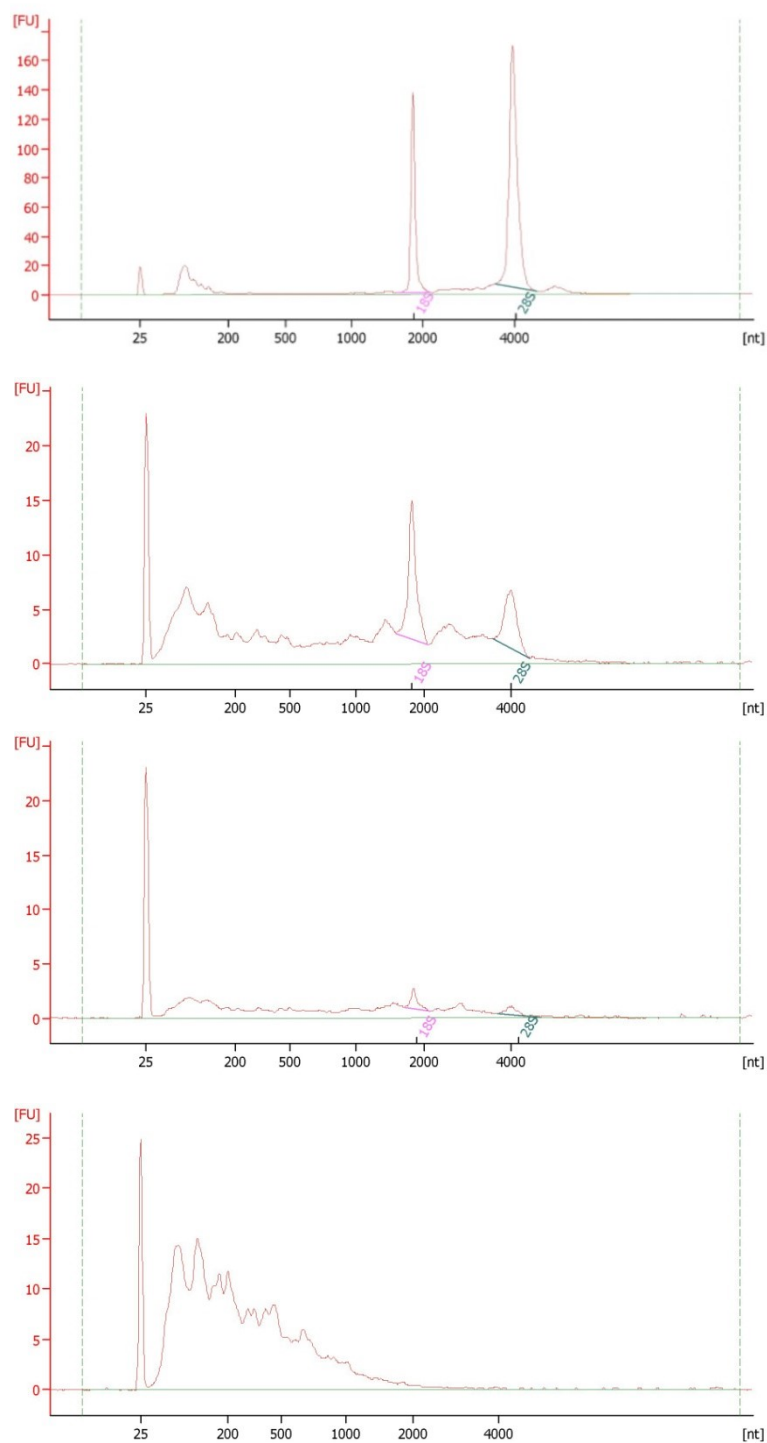
### 5.1 Hledání kandidátních genů

Studie byla rozdělena do dvou etap. Během první etapy jsme hledali kandidátní geny a možné vztahy mezi diferenciálně exprimovanými geny. V první etapě byla izolována RNA ze 41 vzorků. U všech byla následně změřena koncentrace a vyhodnocena kvalita RNA pomocí spektrofotometru Eppendorf Bio Photometer s kyvetou Hellma TrayCell.

Koncentrace vyizolované RNA se pohybovala od 11,6 do 394 ng/ $\mu$ l. Poměr absorbance 260/280 byl od 1,25 do 2,35, 260/230 od 0,04 do 2,03. Jak je tedy patrné, kvalita RNA nebyla u všech vzorků optimální. Proto jsme na základě těchto parametrů a také rozložení RNA podle velikosti z dat Bioanalyseru (Obr. 8) vybrali 24 vzorků, které byly nejkvalitnější. Ty jsme použili pro celogenomovou analýzu na mikročipech. RNA ve spermiích se vyznačuje částečnou degradací ribozomálních RNA, vzhledem k celkově nízké koncentraci RNA je také vyšší pravděpodobnost kontaminace genomickou DNA. Proto jsme při izolaci inkubovali kolonku s navázanými nukleovými kyselinami DNázou I (protokol modifikován podle Cappallo-Obermann et al., 2011).



Obr. 8 – Příklady elektroforeogramu na Agilent 2100 Bioanalyzer. Na horním obrázku je RNA, vyizolovaná ze somatických buněk (tkání), dva prostřední panely ukazují úspěšně vyizolovanou RNA spermii s viditelným signálem 28S a 18S rRNA, poměr koncentrace 28S rRNA k 18S rRNA je oproti somatickým buňkám nižší. Dolní panel ukazuje RNA vzorek degradovaný, případně kontaminovaný degradovanou genomovou DNA



Pro potvrzení přítomnosti skutečně RNA ze spermií a vyloučení kontaminace DNA a případnou RNA z jiných typu buněk, jsme provedli PCR s následující elektroforézou v agarovém gelu pro *CNTROB*, *HOOK1*, *CD45*. Fotografie gelů jsou na obrázku 9.

Gen *HOOK1* je exprimován ve spermiích, je tedy pozitivní kontrolou přítomnosti cDNA spermií (stejně jako v případě primerů pro q-RT-PCR byly primery pro *HOOK1* navrženy v různých exonech, délka produktu pro genomickou DNA je příliš velká pro amplifikaci).

PCR pro gen *CNTROB* slouží k odhalení případné kontaminace genomovou DNA. Primery hybridizují v oblasti intronu (forward intron 11, reverze intron 12) a proto produkt vzniká jen z genomické DNA a nikoli z cDNA.

*CD45* (Jodar et al., 2012) se exprimuje v buňkách imunního systému (T a B lymfocyty, NK-buňkami, eozinofily, bazofily, dendritické buňky). Nepřítomnost signálu vylučuje kontaminaci vzorků těmito buňkami.

Výsledky ověření cDNA spermií pomocí PCR s následující elektroforézou jsou na obrázku 9.

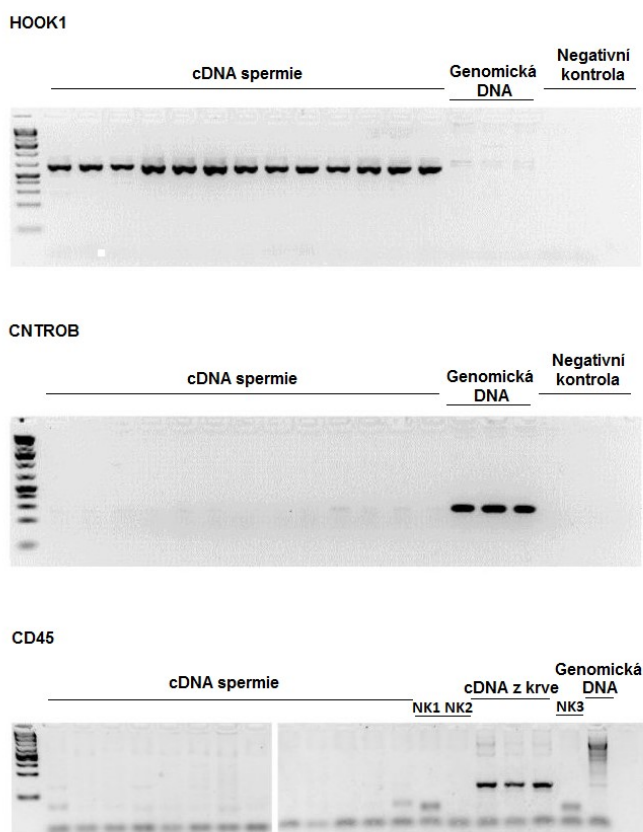
Obr. 9. Fotografie gelů po elektroforéze

1. *HOOK1* – potvrzení přítomnosti cDNA spermií po reverzní transkripci z celkové RNA, primery pro *HOOK1* byly navrženy v různých exonech, délka produktu pro genomovou DNA je příliš velká pro amplifikaci za daných podmínek.

2. *CNTROB* – ukazuje nepřítomnost kontaminace genomovou DNA, navržené primery nasedají v intronových oblastech a proto nedochází k amplifikaci cDNA.

3. Chybějící amplifikace *CD45* potvrzuje nepřítomnost kontaminace vzorku buňkami imunního systému (T a B limfocyty, NK-buňkami, eozinofily, bazofily, dendritickými buňkami).

NK1- negativní kontrola RNA spermie bez reverzní transkriptázy, NK2- negativní kontrola bez RNA, NK3 - negativní kontrola RNA z krve bez reverzní transkriptázy.



Na mikročipech byly k dispozici sondy pro testování celkem 53617 genů. Porovnávali jsme každou skupinu infertilních pacientů s kontrolní skupinou a také skupiny s různou patologií mezi sebou.

Na celogenomové úrovni (po korekci na mnohonásobné porovnání) nebyl nalezen žádný diferencially exprimovaný transkript. Přesto jsme pokračovali v analýze, přičemž jsme

nejprve zvolili arbitrální kritérium  $p < 0,005$  pro analýzu sítí takto „diferenciálně exprimovaných“ genů, s tím, že se pokusíme pro některé zajímavé geny ověřit diferenciální expresi pomocí kvantitativní RT-PCR v reálném čase.

V tabulce 10 jsou uvedeny skupiny vzorků a počet transkriptů odpovídajících kritériu  $p < 0,005$ .

Tab. 10 Počet diferenciálně exprimovaných genů na základě celogenomové analýzy 24 vzorků, seznam genů je uveden v příloze 1.

<b>Skupiny vzorků</b>	<b>Počet transkriptů <math>P &lt; 0,005</math></b>
Astenoteratozoospermie vs kontrola	381
Astenozoospermie vs kontrola	969
Normospermie vs kontrola	110
Astenoteratozoospermie vs astenozoospermie	499

## **5.2 Výsledky IPA**

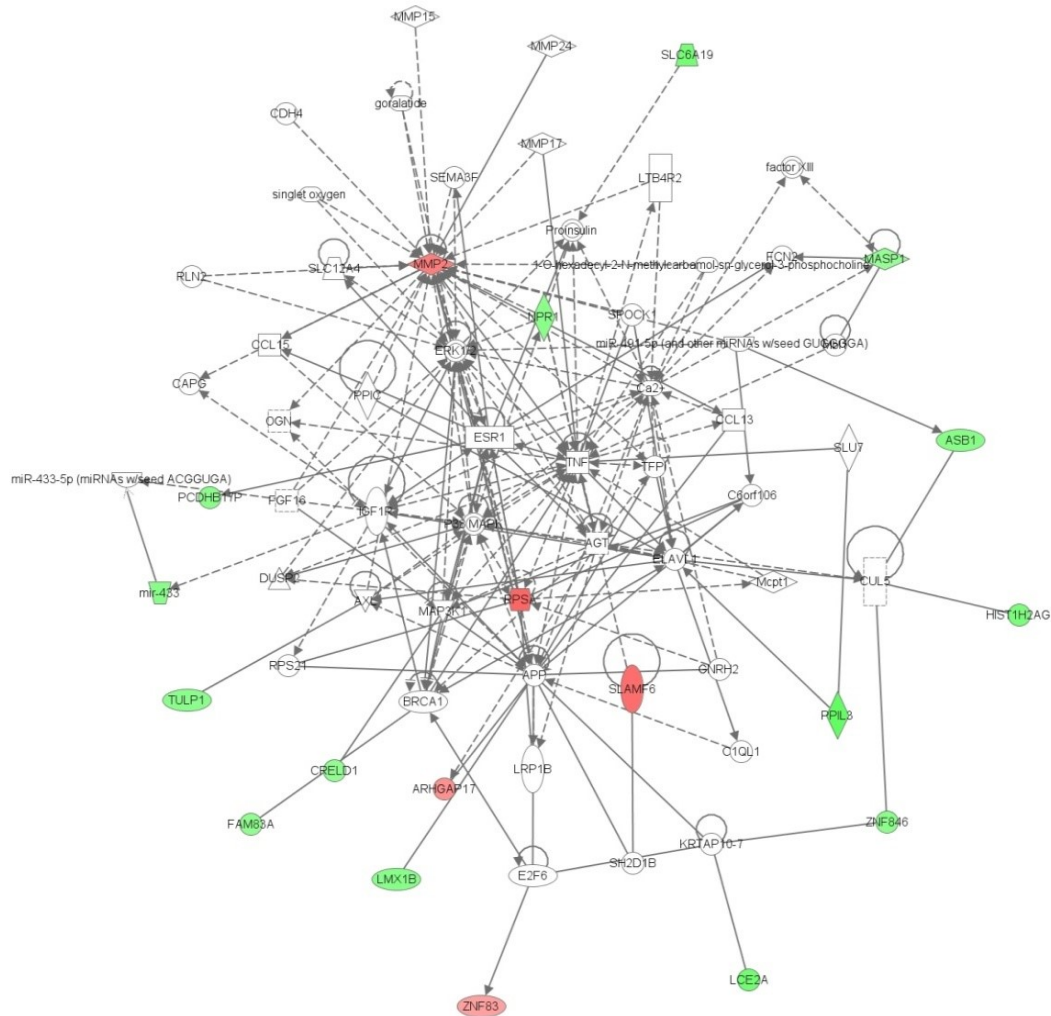
Výsledky získané pomocí celogenomové analýzy pak byly zpracovány za použití softwaru Ingenuity Pathway Analysis (IPA, viz metody).

### **Normospermie v porovnání s kontrolou**

Při porovnání skupiny normospermie s kontrolou jsme našli celkem devět sítí. Většina genů z těchto sítí – 19 z 26 spadala do dvou sítí. Jedna z nich je spojena s abnormalitami organismu, volnými radikály a molekulárním transportem. Ve druhé síti se spojily dráhy odpovídající za pohyb buněk, vývoj kardiovaskulárního systému a morfologii orgánů. Tyto dvě sítě jsou zobrazeny na obrázku 10.

Obr.10 Dvě největší sítě diferenciálně exprimovaných genů při porovnání kontrolní skupiny se skupinou normospermie. Zelenou barvou jsou vyznačené geny vykazující sníženou expresí u normospermických neplodných mužů, červenou barvou jsou označeny geny s expresí sníženou. Čím sytější barva, tím je větší rozdíl v expresi. Hrany znamenají nalezené vztahy mezi geny.

Networks 1,2 Merged 2



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

### Astenoteratozoospermie a astenozoospermie v porovnání s kontrolou

U skupin astenoteratozoospermie a astenozoospermie při porovnání každé s kontrolou pozorujeme určité shody v diferenciální expresi genů: mají společné dva geny z 10 se zvýšenou expresí a dva z 10 se sníženou expresí (Obr.11).

Obr. 11 Seznam genů s největším rozdílem v expresi při porovnání skupin astenoteratozoospermie (vlevo) a astenozoospermie (vpravo) s kontrolou

Exp Fold Change up-regulated		Exp Fold Change up-regulated	
Molecules	Exp. Value	Molecules	Exp. Value
<a href="#">OR8H2</a>	↑ 4,712	<a href="#">EEF1B2</a>	↑ 4,405
<a href="#">LOC388692</a>	↑ 4,677	<a href="#">RPL17</a>	↑ 4,109
<a href="#">RPL17</a>	↑ 4,642	<a href="#">LOC388692</a>	↑ 3,730
<a href="#">OR6C74</a>	↑ 4,081	<a href="#">DUX4</a>	↑ 3,279
<a href="#">mir-548</a>	↑ 3,575	<a href="#">MIR3161</a>	↑ 2,896
<a href="#">MIR2113</a>	↑ 3,348	<a href="#">RPSA</a>	↑ 2,723
<a href="#">OR511</a>	↑ 2,734	<a href="#">MIR4253</a>	↑ 2,534
<a href="#">OR10A7</a>	↑ 2,692	<a href="#">PROL1</a>	↑ 2,326
<a href="#">LOC101930023</a>	↑ 2,409	<a href="#">CACNA1C-AS2</a>	↑ 2,143
<a href="#">OR4X2</a>	↑ 2,322	<a href="#">RNU6-69P*</a>	↑ 2,084
Exp Fold Change down-regulated		Exp Fold Change down-regulated	
Molecules	Exp. Value	Molecules	Exp. Value
<a href="#">GFPT1</a>	↓ -5,271	<a href="#">RPS15A</a>	↓ -5,818
<a href="#">SMURF2*</a>	↓ -5,085	<a href="#">CNGB3</a>	↓ -5,452
<a href="#">SELO</a>	↓ -4,575	<a href="#">UPK3B</a>	↓ -5,315
<a href="#">CMC2</a>	↓ -4,464	<a href="#">KLHL6-AS1</a>	↓ -5,114
<a href="#">CCT4</a>	↓ -4,263	<a href="#">RIMBP3 (includes others)</a>	↓ -3,720
<a href="#">POLDIP2</a>	↓ -4,164	<a href="#">LOC101928014</a>	↓ -3,551
<a href="#">ATF6</a>	↓ -4,007	<a href="#">SELO</a>	↓ -3,172
<a href="#">TOMM22</a>	↓ -3,966	<a href="#">CIRH1A</a>	↓ -2,721
<a href="#">PLEKHM1</a>	↓ -3,944	<a href="#">SMURF2</a>	↓ -2,713
<a href="#">MTCH2</a>	↓ -3,931	<a href="#">LOC102723951*</a>	↓ -2,419

### 5.3 Kvantitativní RT-PCR na vzorcích z celogenomové analýzy

V první etapě jsme ověřovali exprese 36 vybraných genů pomocí kvantitativní RT-PCR na vzorcích, použitých pro celogenomovou analýzu. Geny byly vybrány na základě p-hodnoty, fold-change a funkce těchto genů. Výsledky q-RT-PCR jsou zahrnuty v tabulce 11.

Tab. 11 Výsledky kvantitativní RT-PCR na 24 vzorcích, AT-astenoteratozoospermie, A-astenozoospermie, N-normospermie, K-kontrolní skupina.

Gen	Skupina	ttest $\Delta\Delta C_t$
<i>ACSL1</i>	AT-A	0,00649
<i>ADAM22</i>	AT-A	0,82127
<i>ARHGAP17</i>	N-K	0,02222
<i>ARL17</i>	AT-K	0,17883
<i>CAP1</i>	AT-A	0,10745
<i>CAPZA1</i>	AT-A	0,04758

<i>CD46</i>	AT-A	0,02899
<i>CEP893C</i>	AT-K	0,324668
<i>CMC2</i>	A-K	0,11886
<i>CNGB3</i>	AT-K	0,05687
<i>EEF1B2</i>	AT-K	0,525137
<i>ESPN</i>	A-K	0,923005
<i>ESPN</i>	AT-K	0,25889
<i>GFPT1</i>	A-K	0,22651
<i>GOSR</i>	A-K	0,596727
<i>HECTD4</i>	A-K	0,78816
<i>HECTD4</i>	AT-K	0,207181
<i>IFT52</i>	A-K	0,483731
<i>IFT52</i>	AT-K	0,695438
<i>MLST8</i>	AT-K	0,059738
<i>MMP2</i>	N-K	0,002108
<i>MTCH2</i>	A-K	0,450516
<i>PIK3C2A</i>	A-K	0,587306
<i>POLDIP2</i>	A-K	0,110081
<i>PPIL3</i>	N-K	0,684854
<i>PRNT</i>	AT-A	0,162517
<i>RAB44</i>	N-K	0,093902
<i>RIMBP3C</i>	AT-K	0,595623
<i>RPL17-7</i>	AT-K	0,056941
<i>RPS15A</i>	AT-K	0,611347
<i>SELO</i>	A-K	0,981854
<i>SELO</i>	AT-K	0,063221
<i>SLAMF6</i>	N-K	0,004648
<i>SLC47A2</i>	A-K	0,912966
<i>SLC47A2</i>	AT-K	0,017998
<i>SLC6A8</i>	AT-A	0,116496
<i>SMURF2</i>	A-K	0,158164
<i>SNAP23</i>	AT-A	0,015948
<i>STK39</i>	A-K	0,686097
<i>TESK2</i>	AT-A	0,116155

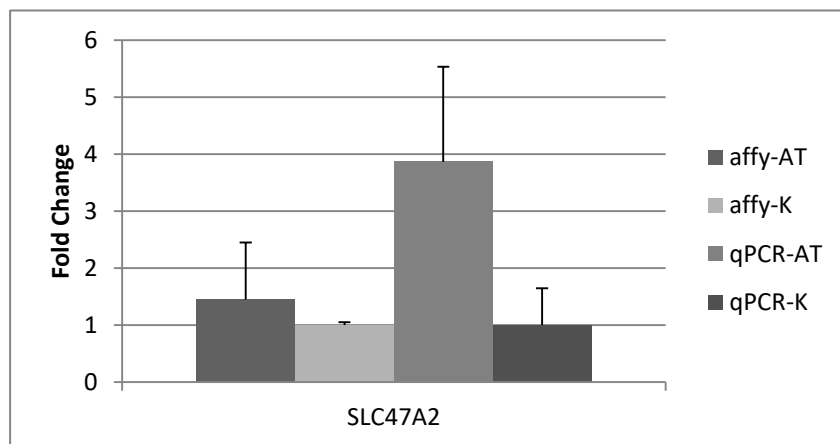
V první etapě nám vyšlo osm genů se signifikantním rozdílem v expresi.

### 5.3.1 Porovnání skupiny astenoteratozoospermie s kontrolou

V této skupině jsme našli pomocí mikročipové analýzy 381 diferenciólně exprimovaných genů, (p-hodnota menší než 0,005). V porovnání s fertílní kontrolou jsme ve vzorku ze skupiny astenozoospermíí našli 117 genů, jejichž exprese byla snížena (down

regulované), u ostatních 264 množství RNA příslušného genu byla zvýšena. Z genů s rozdílnou expresí jsme pomocí kvantitativní RT-PCR ověřili exprese 13 genů, a to: *ARL17*, *CEP893C*, *CNGB3*, *EEF1B2*, *ESPN*, *HECTD4*, *IFT52*, *MLST8*, *RIMBP3C*, *RPL17-7*, *RPS15A*, *SELO*, *SLC47A2*. Z těchto genů se nám podařilo potvrdit diferenciální exprese jednoho genu *SLC47A2*, který prokázal zvýšenou expresi u skupiny astenoteratozoospermii. Porovnání výsledku q-RT-PCR s výsledkem mikročipové analýzy je na obrázku 12.

Obr.12 – graf, vykazující vyšší exprese genu *SLC47A2* ve skupině astenoteratozoospermie (AT) v porovnání s kontrolami (K) na zaklade výsledku mikročipové analýzy (affy) a q-RT-PCR (qPCR)



*SLC47A2* – solute carrier family 47 member 2, alternativní název tohoto genu je *MATE2* (Multidrug and Toxin Extrusion 2). Tento gen je známý jako specifický antiporter kationtu, exprimovaný především v ledvinách (Masuda et al., 2006). Ve spermích ani v mužském pohlavním systému zatím nebyl zkoumán a jeho funkce tak není známá.

### 5.3.2 Porovnání skupiny astenozoospermie s kontrolou

Při porovnávání skupiny astenozoospermii s fertillní kontrolou jsme našli 969 genů s diferenciální expresí, kde p-hodnota byla menší než 0,005. Z nich 387 genů vykazovalo sníženou expresi ve skupině astenozoospermii, ostatních 582 vykazovalo vyšší expresi. Pomocí kvantitativní RT-PCR jsme ověřili expresi 13 genů, a to *CMC2*, *ESPN*, *GFPT1*, *GOSR*, *HECTD4*, *IFT52*, *MICU2*, *PIK3C2A*, *POLDIP2*, *SELO*, *SLC47A2*, *SMURF2*, *STK39*. Ani v jednom případě se nám však nepodařilo potvrdit diferenciální exprese pomocí q-RT-PCR.

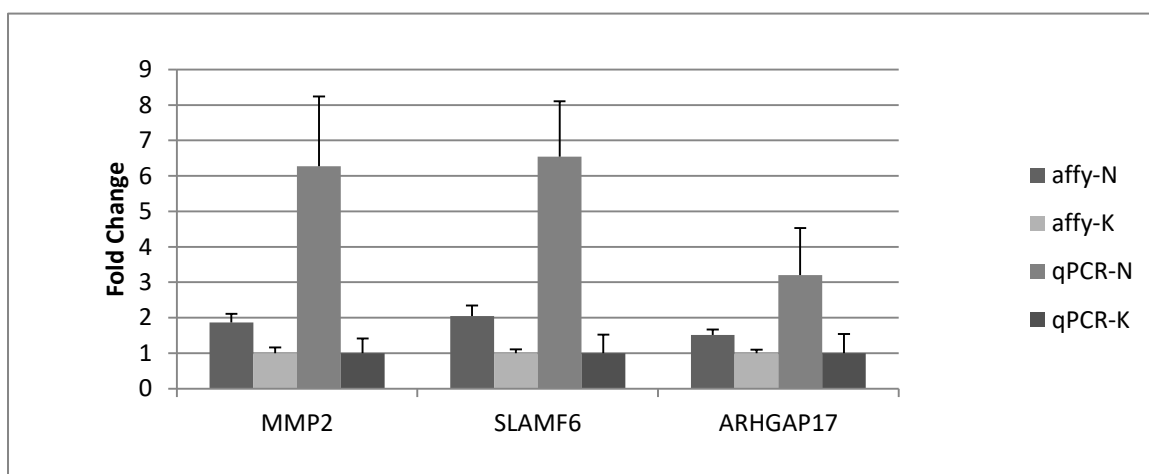


### 5.3.3 Porovnání skupiny normospermie s kontrolou

Při porovnávání skupiny normospermii s kontrolou jsme našli 110 diferencielně exprimovaných genů. Z nich bylo 76 se sníženou expresí ve skupině infertilních pacientů a 34 vykazovalo zvýšenou expresi. Pomocí kvantitativní RT-PCR jsme ověřili expresi pěti

genů, a to *ARHGAP17*, *MMP2*, *PPIL3*, *RAB44*, *SLAMF6*. Z těchto genů se nám podařilo prokázat diferencielní expresi u třech genů: *ARHGAP17*, *MMP2*, *SLAMF6*, všechny ukazují zvýšenou expresi ve skupině patologických spermií (obr.13).

Obr. 13 – Zvýšená exprese genů *ARHGAP17*, *MMP2*, *SLAMF6* ve skupině normospermie (N) v porovnání s kontrolou (K). Výsledky získané pomocí mikročipu (affy) a q-RT-PCR (qPCR).



*ARHGAP17* – Rho GTPase activating protein 17, také v literatuře nazývaný *Rich1* a *Nadrin*. Tento protein hraje roli v regulaci exocytózy (Harada et al., 2000), regulace polarity buněk (Wells et al., 2006) a také jako regulátor buněčné adheze a proliferace (Zhang et al., 2015).

*MMP2* – matrix metalloproteinase 2 – Protein, kódovaný tímto genem, je pravděpodobně lokalizovaný na vnější membráně akrosomu. Hraje důležitou roli během oplození, a to při štěpení zona pellucida při penetraci oocytu (Ferrer et al., 2012).

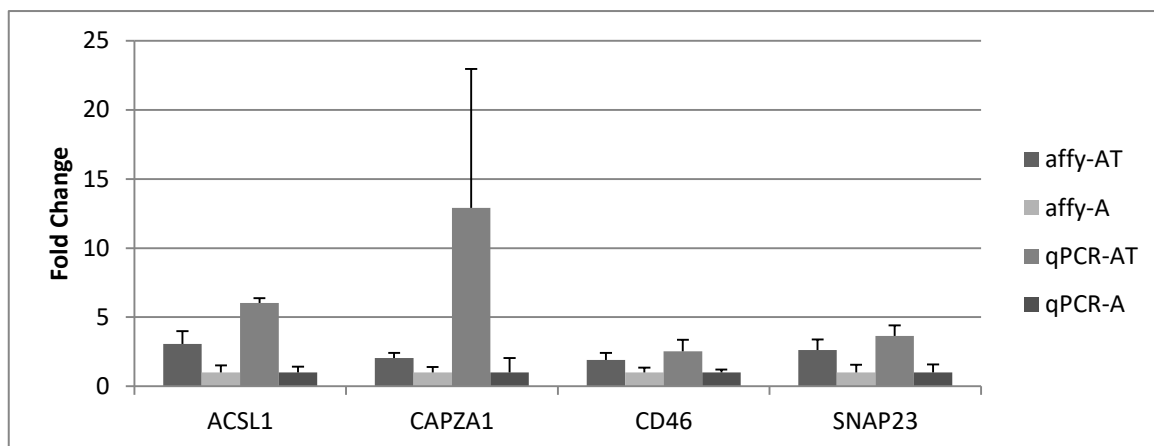
*SLAMF6* – SLAM family member 6 je členem rodiny SLAM, transmembránový receptor, z imunoglobulinové superrodiny, který je exprimován v buňkách imunitního systému, konkrétně v přirozených zabíječích (NK buňkách), T a B lymfocytech (Chatterjee et al., 2011). Jeho funkce ve spermiích není známá.

### 5.3.4 Porovnání skupiny astenoteratozoospermie se skupinou astenozoospermie

Při porovnávání dvou skupin vzorků s patologickými spermii mezi sebou jsme našli celkem 499 diferenciólně exprimovaných genů; 298 z nich vykazovalo u skupiny astenozoospermii zvýšenou expresi v porovnání se skupinou astenospermii a 201 genů vykazovalo nižší expresi.

Pomocí kvantitativní RT-PCR jsme ověřili exprese devíti genů, a to: *ACSL1*, *ADAM22*, *CAP1*, *CAPZA1*, *CD46*, *PRNT*, *SLC6A8*, *SNAP23*, *TESK2*. Z nich u čtyřech genů – *ACSL1*, *CAPZA1*, *CD46* a *SNAP23* se nám podařilo potvrdit diferenciólní expresi. Ve všech případech ve skupině astenoteratozoospermie vybrané geny vykazovaly zvýšenou expresi (obr.14).

Obrázek 14 – zvýšená expresi genu *ACSL1*, *CAPZA1*, *CD46* a *SNAP23* u skupiny astenoteratozoospermie (AT) v porovnání s astenozoospermii (A). Výsledky získané pomocí mikročipu (affy) a q-RT-PCR (qPCR).



*ACSL1* je acyl-CoA synthetase long-chain family member, 1 hraje roli v syntéze mastných kyselin v mitochondrii (Schneider et al., 2014), jeho role ve spermii není známá.

*CAPZA1*– capping actin protein of muscle Z-line alpha subunit 1 je protein regulující sestavení aktinových mikrofilament (Maun et al., 1996). Jeho role ve spermii není známá, ale existuje homologní gen *CAPZA3*, který hraje roli ve vývoji spermatid a jehož mutace je spojena s abnormalitami vývoje spermii u myši (Geyer et al., 2009).

*CD46* je membránový protein spojený s funkcí oplození spermii a zúčastní se interakce spermie s oocytem (Fábryová and Simon, 2009).

*SNAP 23*–synaptosome associated protein 23 je důležitý protein pro splynutí membrán během akrozomální reakce (Tomes et al., 2002).

## 5.4 Ověření rozdílné exprese genů na větším souboru vzorků

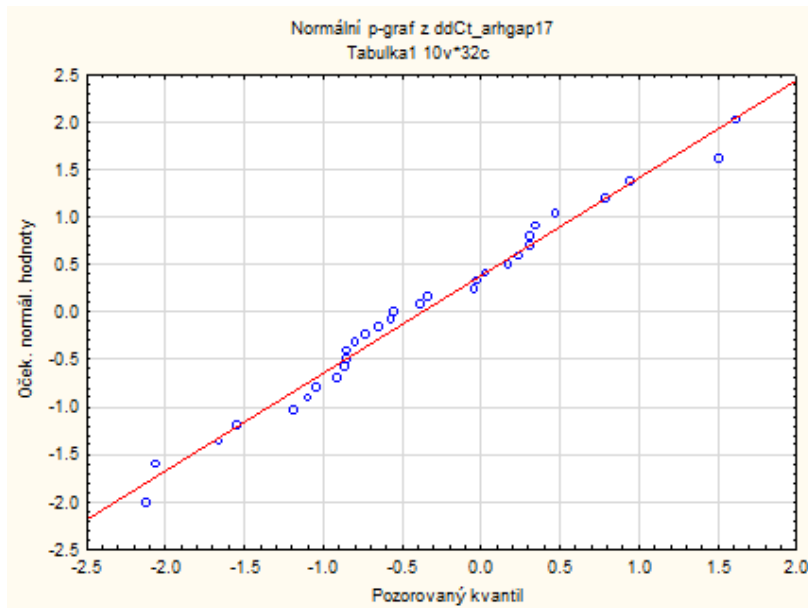
Do druhé etapy studia pro testování různé exprese genů jsme zařadili do porovnávání další vzorky, které byly izolovány v tomto studiu, a k nim jsme přidali vzorky z předchozí práce, které byly poskytnuty stejnou laboratoří a zpracovány stejným způsobem. Celkem soubor zahrnoval 67 vzorků spermií, a to ze skupiny astenoteratozoospermie – 20, astenozoospermie – 15, normospermie – 16 a z kontrolní skupiny – 16. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12. Celkem bylo testováno 10 genů.

Tab. 12 Výsledky kvantitativní RT-PCR na větším souboru vzorku

Gen	skupina	ttest $\Delta\Delta Ct$
<i>ACSL1</i>	A-AT	0,534585
<i>ARHGAP17</i>	N-C	0,025203
<i>CD46</i>	A-AT	0,228274
<i>CNGB3</i>	AT-C	0,148624
<i>MLST8</i>	AT-C	0,77833
<i>MMP2</i>	N-K	0,951331
<i>RPL17-7</i>	AT-C	0,784044
<i>SELO</i>	AT-C	0,250436
<i>SLC47A2</i>	AT-C	0,05662
<i>SNAP23</i>	A-AT	0,327474

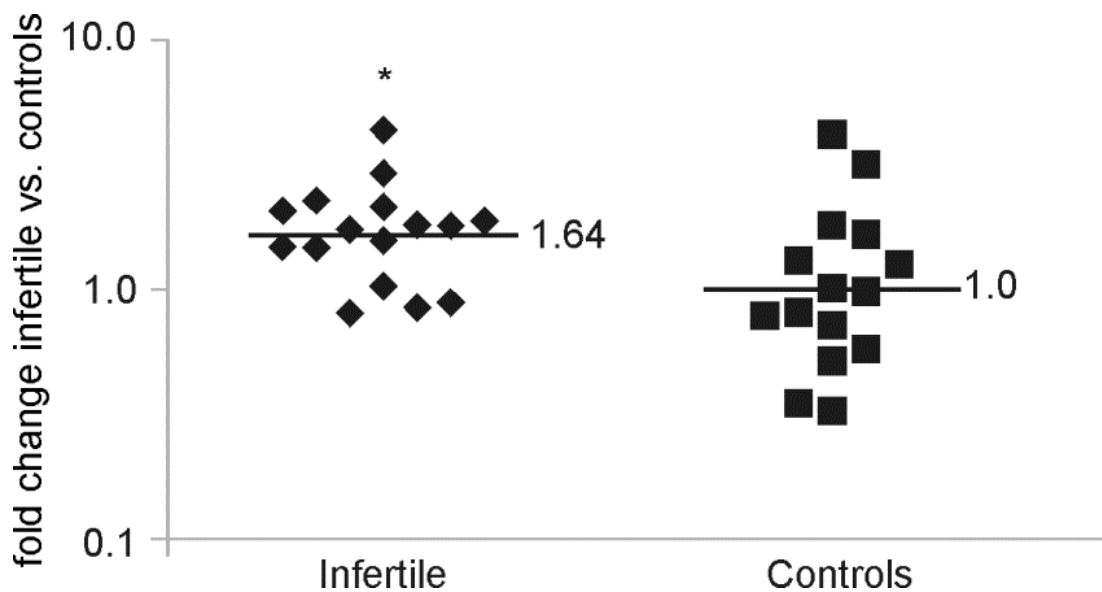
Na větším počtu vzorků se nám podařilo potvrdit diferenciální expresi genu *ARHGAP17* u skupiny normospermických infertilních mužů v porovnání s kontrolní skupinou. Ověření rozložení dat se provádělo pomocí normálního p-grafu. Na obrázku 12 je normální p-graf pro ověření rozložení dat výsledky  $\Delta\Delta Ct$  z 31 vzorků pro gen *ARHGAP17*, získaných pomocí q-RT-PCR. Jeden vzorek z kontrolní skupiny byl z výpočtu vyřazen kvůli velmi nízkému signálu.

Obrázek 15 – normální p-graf rozdělení vzorků výsledných dat z qPCR (přepočítaných na  $\Delta\Delta Ct$ )



Podle výsledku q-RT PCR na větším souboru vzorků, u skupiny infertilních mužů byla exprese genu *ARHGAP17* 1,64krát vyšší, než ve skupině plodných jedinců. Rozložení hodnot fold change jednotlivých vzorků ze skupiny infertilních mužů v porovnání s kontrolou jsou uvedeny na grafu na obrázku 16.

Obrázek 16 – rozložení hodnot fold change genu *ARHGAP17* u infertilních mužů v porovnání s kontrolou.



## Diskuze

Cílem diplomové práce bylo pokusit se najít kandidátní geny jako markery mužské neplodnosti na základě porovnání rozdílné exprese genů ve skupinách pacientů s diagnostikovanou infertilitou s kontrolní skupinou plodných mužů.

V posledních desetiletích probíhá v této oblasti intenzivní výzkum podpořený i technologickým rozvojem genomiky, epigenomiky, transkriptomiky a proteomiky, přesto však zůstávají příčiny mužské neplodnosti z velké části neznámé (Bracke et al., 2018). Pro práci na tomto výzkumném projektu byla vybrána metoda mikročipové celogenomové analýzy transkriptomu, která se ve světovém měřítku pro výzkum RNA spermií běžně používá (Tab. 4), je relativně jednoduchá pro statistické zpracování a finančně dostupná pro větší množství vzorků. Novější technologie – sekvenování nové generace – je zatím méně rozšířena, zejména kvůli vyšším nárokům na finance a statistické zpracování výsledků. Skutečnost, že většina prací podobných této studii, zabývajících se výzkumem transkriptomu spermií, využívá technologii mikročipu a q-RT-PCR, by mohla do budoucna usnadnit porovnání a případnou metaanalýzu. Nicméně k tomuto účelu je třeba spíše než technologickou shodu mít shodu fenotypu v cílových populacích neplodných mužů a způsob výběru kontrolních skupin. Práce s RNA spermií je bez ohledu na použitou transkriptomickou metodu velmi náročná, zejména díky přirozeně nízké koncentraci a velké fragmentaci RNA ve spermiích (Mao et al., 2014). To je ještě víc problematické u neplodných pacientů, často s velmi nízkým počtem spermií v ejakulátu.

Do této studie bylo zahrnuto celkem 67 pacientů, z nich celogenomová analýza se prováděla na 24 vzorcích, ověření pomocí q-RT-PCR se provádělo na všech 67 vzorcích.

Při celogenomové analýze našich 24 vzorků nedosahovaly rozdíly v genové expresi celogenomové signifikance (FDR 10%, Benjamini-Hochberg). Proto jsme zvolili arbitrální hodnotu  $p < 0,005$  pro vyhledání kandidátních genů, u nichž by bylo možné ověřit diferenciální expresi pomocí q-RT-PCR. Tomuto kritériu odpovídalo 1959 transkriptů. Z nich 989 mělo přiřazen název genu (gene symbol). Při porovnání výsledků z celogenomové analýzy s jinými dostupnými daty (Platts et al., 2007, Bansal et al., 2016) jsem zjistila, že 16% z námi nalezených genů (158) se překrývá s diferenciálně exprimovanými geny z práce Plattse a spol. (Platts et al., 2007), kde bylo pomocí mikročipu analyzováno 31 vzorků spermií od 17 kontrol a 14 pacientů s teratozoospermií. Při porovnání našich výsledků s druhou velkou studií se zjistilo, že 7% genů (72) je společných s výsledky Bansal a kolektiv (Bansal et al., 2015). Tato práce porovnávala plodné muže (20) s neplodnými pacienty s normálním

spermiogramem (20) a pacienty s asthenozoospermií (20). Porovnání výsledků naší práce s nálezy těchto autorů jsou v příloze 2.

Z hlediska počtu vzorků v porovnání s ostatními je naše studie průměrně velká. Ze sedmi obdobných výzkumných projektů, provedených podobnou metodou, ve třech byla analýza transkriptomu na mikročipech provedena na více než 24 vzorcích. V jedné z prvních srovnatelných prací (Platts et al., 2007) se porovnávaly RNA z 31 vzorků, ze kterých 17 bylo v kontrolní skupině a 14 od pacientů s diagnostikovanou teratozoospermií. V této studii se další ověření dat na základě q-RT-PCR neprovádělo. Z analýzy funkcí diferenciálně exprimovaných genů vyplynul výrazný rozdíl v expresi u genů z ubiquitin-proteasomální dráhy, kde ve skupině patologických spermií tyto transkripty byly výrazně potlačeny. V našich výsledcích bylo detekováno celkem 24 genů z ubiquitin-proteasomální dráhy, ve skupině astenozoospermických pacientů bylo nalezeno 14 genů, ze kterých transkripce u 13 byla potlačena v porovnání s kontrolou. Pět z těchto transkriptů patří do skupiny E3-ubiquitin ligáz a všechny vykazují sníženou expresi v patologických spermiích. Obdobné výsledky u transkriptů z řady E3-ubiquitin ligáz byly zaznamenány i v práci Platts a spol. (Platts et al., 2007). Co se týče celkového profilu, byla v této práci celkem detekována snížená exprese u 80% z nalezených diferenciálně exprimovaných genů ve skupině patologických spermií. V naší studii jsme ale získali opačné výsledky. Při porovnání skupin astenoteratozoospermie a astenozoospermie s kontrolou měly téměř dvě třetiny diferenciálně exprimovaných transkriptů (264 z 381 u astenoteratozoospermie a 582 z 969 u astenozoospermie) zvýšenou expresi u patologických spermií.

V práci Garrido a kolektivu (Garrido et al., 2009) z roku 2009 bylo analyzováno 10 vzorků spermií pomocí mikročipové analýzy. Porovnávalo se 5 vzorků od pacientů s idiopatickou neplodností s 5 vzorky od plodných mužů. Expese většiny z nalezených diferenciálně exprimovaných genů byla snížena u neplodných jedinců. To se shoduje i s našimi výsledky, kde při porovnání skupiny infertilních pacientů s kontrolní skupinou vykazovalo potlačenou expresi 76 z celkového počtu 110 transkriptů. Diferenciálně exprimované geny nalezené Garrido a spol. (Garrido et al., 2009) byly zapojeny do drah spojených se zráním a diferenciací spermií a RNA pro ribozomální proteiny. V naší studii jsme našli desítky transkriptů s odlišnou expresí, které mohou být spojené s ribozomy: při porovnání skupiny astenoteratozoospermie s kontrolou bylo nalezeno 9 transkriptů, třetina z nich byla ve skupině neplodných pacientů potlačena, zbylých 6 vykazovalo zvýšenou expresi. U transkriptů se zvýšenou expresí 5 z 6 bylo identifikováno jako pseudogeny. Za

pseudogeny se považují sekvence DNA, podobné genům, které ale kvůli mutacím už tuto funkci nemají. Mohou však hrát roli v regulaci (potlačení) exprese jim podobných funkčních genů (Grander and Johnsson, 2015). Ve skupině astenozoospermie z 20 nalezených transkriptů souvisejících s ribozomy, u 11 byla exprese snížena v porovnání s kontrolou, u 9 transkriptů byla naopak exprese zvýšená. Mezi těmito 9 transkripty je 8 pseudogenů. Při porovnávání skupiny normospermických mužů s kontrolou bylo nalezeno celkem 5 transkriptů s rozdílnou expresí, z nich 3 vykazovaly 4 až 5krát zvýšenou expresi u infertilních pacientů a všechny byly pseudogeny. Další pseudogen vykazoval také zvýšenou expresi, i když méně výrazně a jeden gen byl potlačen ve skupině normospermických pacientů. Podle výše zmíněné hypotézy by nalezené pseudogeny mohly mít vliv na potlačení exprese „pravých“ genů pro ribozomální proteiny, což se shoduje i s pozorováním (Garrido et al., 2009). Výrazný rozdíl v transkriptech pro ribozomální proteiny byl detekován ve studii Bansal a kolektiv z roku 2015, (Bansal et al., 2015), kde pozorovali sníženou expresi RNA pro ribozomální proteiny u astenozoospermických pacientů v porovnání s kontrolou.

V práci z roku 2012 Jodar a kolektiv (Jodar et al., 2012) bylo nalezeno 19 transkriptů s rozdílnou expresí při porovnání RNA ve spermiích od 17 astenozoospermických pacientů s 12 vzorky od plodných jedinců. Analýza se prováděla na začátku na menším počtu vzorků (4 a 4) pomocí mikročipové technologie. Pět genů pak bylo vybráno pro ověření pomocí kvantitativní RT-PCR. Z pěti transkriptů, u tří (*ANXA2*, *BRD2* a *OAZ3*) byla potvrzena rozdílná exprese. Ani jeden z 19 transkriptů z této práce se v našem souboru nevyskytuje.

V práci (Bonache et al., 2012), kde se mikročipová analýza prováděla na 43 vzorcích a pak následovala q-RT-PCR na 68 vzorcích se porovnávali dárci spermatu a jejich úspěšnost pro využití na klinikách asistované reprodukce. Byly identifikovány geny *EIF5A*, *RPL13*, *RPL23A* a *RPS27A*, jejichž úroveň exprese korelovala s úspěšností dosažení těhotenství. Ani jeden s těchto genů se opět nevyskytuje v naší studii, je však zajímavé, že všechny tyto geny souvisí s funkcí ribozomu (jeden iniciační faktor pro translaci a 3 ribozomální proteiny).

V další velké studii z roku 2015 (Bansal et al., 2015) bylo pro celogenomovou analýzu použito 60 vzorků spermií, ze kterých 20 bylo z kontrolní skupiny, 20 s normospermií a 20 s astenozoospermií. Bylo nalezeno 2081 diferenciólně exprimovaných genů, ověření diferenciólní exprese pomocí q-RT-PCR se však neprovádělo. V našich výsledcích jsme našli 72 stejných diferenciólně exprimovaných genů.

V poslední době se pro výzkum transkriptomu spermií začíná používat sekvenování nové generace. Jedna z prvních prací tohoto typu je (Jodar et al., 2015), kde se autoři pokusili

zjistit, jestli je tato metoda vhodná jednak pro získání základních poznatků o transkriptomu spermie, jednak pro predikci úspěšnosti léčby neplodnosti. Do studie bylo zahrnuto 72 vzorků spermií od pacientů s idiopatickou neplodností, kteří podstoupili léčbu pomocí technik asistované reprodukce. Bylo nalezeno 648 „RNA elementů spermie“ (SRE-sperm RNA elements), které vykazovaly vysokou stabilní expresi u kontrolních vzorků a jejichž absence (tedy velmi nízká nebo chybějící exprese některých z nich) korelovala s nižší úspěšností léčby neplodnosti. Většina z detekovaných elementů patřila k exonovým oblastem celkem 285 genů, 40% z těchto genů je spojeno s vývojem spermie, oplozením a časným embryonálním vývojem. Bohužel, jsme nemohli provést přímé srovnání s našimi výsledky, protože práce (Jodar et al., 2015) neobsahuje seznam genů spjatých s SRE v článku ani v suplementárních datech. Pouze databáze GEO obsahuje pod identifikačním číslem GSE65683 zpracovaná data klusterů ze všech vzorků, ovšem bez vyznačení 648 SRE.

Velké rozdíly ve výsledcích různých studií, včetně naší, mohou svědčit o velké heterogenitě jak příčin neplodnosti, tak i samotných experimentálních populací. Druhým jmenovaným faktorem by bylo možno vysvětlit nižší shodu se studií Bansala a kolektivu, která pochází z indické populace (Bansal et al., 2015).

Hledání společných drah nám nepřineslo spolehlivé výsledky, s největší pravděpodobností především kvůli malému počtu heterogenních vzorků, ale i v našem souboru jsme našli geny, spojené s oxidativním stresem, které u patologických spermií vykazují zvýšenou expresi (Montjean et al., 2012).

Z námi nalezených potenciálně diferenciatně exprimovaných transkriptů pak byly vybrány s našeho hlediska nejzajímavější geny, jejichž rozdílnou expresi jsme se pokusili ověřit pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězcové reakce v reálném čase.

Ve skupinách s astenozoospermií a astenoteratozoospermií jsme potvrdili diferenciatní expresi celkem u čtyř genů. Všechny čtyři geny vykazovaly vyšší expresi ve skupině astenoteratozoospermií. Z těchto genů je u dvou prokázána role jejich produktu při oplození. Protein kódovaný genem *CD46* hraje roli v interakci spermie s oocytem a protein kódovaný genem *SNAP23* je důležitý pro fúzi membrán. Kromě toho gen *CAPZA1*, který reguluje sestavení aktinových mikrofilament ve spermiích, by mohl být přítomen v subakrosomálním prostoru nazývaném akroploxom, který je bohatý na aktinová vlákna (Kierszenbaum, 2003). Geny *SNAP23* a *CAPZA1* vykazovaly sníženou expresi ve výsledcích studie Platts a kolektiv (Platts et al., 2007) ve skupině teratozoospermiků (nízké procento morfologicky normálních spermií) v porovnání s kontrolou. To je obráceně v porovnání s našimi výsledky. Příčinou



může být jiný způsob srovnání (v našem případě k mužům jen s astenozoospermii). Zvýšená exprese těchto genů ve skupině s abnormální morfologií také může svědčit a tom, že spermie byly nezralé a příslušná RNA nebyla degradovaná. Nezralost spermií mohla být způsobena patologickými mechanizmy, které vedou k selhání některých procesů tak, že spermie nemohou dokončit svůj vývoj. Pak by mohla být opožděna nebo nedokončena i degradace RNA, ke které normálně dochází. Skutečně, v našem srovnání astenoteratozoospermie vs. astenozoospermie byla hladina exprese většího počtu genů vyšší v první skupině. Tento trend jsme pozorovali i při porovnávání skupin astenoteratozoospermie a astenozoospermie s kontrolní skupinou. Nalezli jsme 264 transkriptů se zvýšenou expresí z celkových 381 s rozdílnou expresí u skupiny astenoteratozoospermie a 387 transkriptů se zvýšenou expresí z celkového počtu 582 u astenozoospermie. Ve skupině normospermických pacientů ale pozorujeme opačný trend, kdy z celkového počtu 110 transkriptů s rozdílnou expresí 76 vykazuje u neplodných pacientů potlačenou expresi. Snížená exprese v této skupině svědčí spíše proti prosté nezralosti spermií, kdy by docházelo k nedostatečnému odbourání nepotřebných RNA. To není překvapivé uvědomíme-li si, že v této skupině jsou spermie s morfologického hlediska normální a mají i normální motilitu.

Při porovnání skupiny astenoteratozoospermie s kontrolami se nám podařilo potvrdit zvýšenou expresi u skupiny genu *SLC47A2* u první skupiny. Tento gen se ani v jedné ze srovnatelných studií nevyskytuje a jeho možná funkce v spermiích zatím není známá. Produktem tohoto genu je transporter endogenních a exogenních organických iontů (jak mnoha kationtů, tak i některých aniontů), vč. toxických elektrolytů, který je především exprimován v ledvinách (Tanihara et al., 2007). Jakou roli by mohl hrát během spermiogeneze není jasné.

Ve skupině normospermických infertilních pacientů jsme potvrdili zvýšenou expresi genů *MMP2*, *SLAMF6* a *ARHGAP17* v porovnání s fertillními. Právě pro tuto kategorii pacientů by bylo nalezení transkriptomických markerů nejvíc prospěšné, protože by dovolilo zachytit molekulární patologii u mužů, kde vyšetření spermiogramu nevykazuje odchylku od normy a může vést k zbytečnému hledání příčiny neplodnosti na straně partnerky. Zvýšená transkripce metaloproteinasy *MMP2* u neplodných mužů s normálním spermiogramem by mohla vést ke zvýšené koncentraci kódovaného proteinu, který se ve spermiích nachází v akrosomu a může hrát roli při oplození (Ferrer et al., 2012). Role proteinu kódovaného genem *ARHGAP17* ve spermiích zatím není známá. Ani v jedné z porovnávaných transkriptomických studií nalezen nebyl. Tento protein patří do rodiny malých GTPáz, které

hrají regulační roli v signálních drahách. Právě u tohoto genu se nám podařilo potvrdit diferenciální expresi na rozšířeném panelu vzorků neplodných mužů s normálním spermioqramem a plodných kontrol.

Zvýšená exprese *ARHGAP17* u skupiny neplodných pacientů s normálním spermioqramem by podle naší hypotézy mohla mít vliv na oplození, protože protein kódovaný tímto genem se zúčastní exocytózy (Harada et al., 2000). Podle dalších výsledků hraje protein *ARHGAP17* přes jiné proteiny – CIP4, RAC1 a CDC42 – roli v remodelaci cytoskeletu trombocytu (Nagy et al., 2015). Podle posledních výsledků naší spolupracující laboratoře (Laboratory of Male Fertility, Hospital de Clínicas José de San Martín, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina) byla pomocí imunofluorescenčního značení proteinu *ARHGAP17* nalezena imunoreaktivita proti *ARHGAP17* v bazální oblasti hlavního segmentu bičíku, u abnormálních spermií byla pak pozorována „mezera“ v místě spojení bičíku a hlavičky u patologických spermií. Tato mezera není v normálních spermiích. Podle jedné z hypotéz tato „mezera“ může být místem zlomu spermií a absence proteinu *ARHGAP17* by se mohla podílet na větší křehkosti bičíku. V epiteliálních buňkách je up-regulace *ARHGAP17* spojena také s poklesem množství F-aktinu (Zhang et al., 2015), což by mohlo také podporovat naši teorii, kde před „mezerou“ je ze strany hlavičky u patologických spermií detekováno nahromadění proteinu.

Jak v naší, tak i jiných studiích, nebyla víc než polovina diferenciálně exprimovaných genů charakteristických pro spermii a jejich role v těchto buňkách zatím není známá (Jodar et al., 2012), odhalení funkcí těchto RNA a jimi kódovaných proteinů ve spermii dává prostor pro další výzkum.

Výhodou zvolené metody analýzy transkriptomu pomocí mikročipů je malé vstupní množství RNA, které je postačující pro komplexní analýzu celého transkriptomu. Potřeba minimálního množství RNA je při práci se spermii klíčová, zejména kvůli velmi malému množství RNA v cytoplazmě spermie, ale také díky malému množství spermií u některých neplodných pacientů, zvláště s teratozoospermii, kteří mají zároveň často těžkou oligozoospermii. Vzorky takových pacientů byly často z analýzy transkriptomu vyřazeny. Již předem jsou přirozeně vyřazeny také vzorky pacientů s azoospermii, kterých může být přibližně 10-20% (Jarow et al., 1989) ze všech neplodných mužů. Mezi další komplikace naší práce patřila také nízká kvalita vyizolované RNA. Bohužel z řady vzorků, které jsme obdrželi, byla získána RNA v nedostatečné kvalitě a nemohla tedy být pro analýzy použita. Do naší celogenomové analýzy byl tedy zařazen relativně malý počet vzorků, zvláště ale kvůli

náročnému sběru materiálu. Rozsah celogenomové analýzy transkriptomu byl také omezen finančními náklady.

Kromě výše zmíněných komplikací s množstvím a kvalitou materiálu je třeba zmínit, že u plodných kontrol přísná kritéria výběru neumožnila shromáždit více vzorků, protože podmínkou zařazení bylo otěhotnění partnerky do roku před odběrem vzorku. Z pochopitelných důvodů se takoví muži neobracejí často na centra asistované reprodukce. Mezi další komplikace při vyhodnocování vzorku byl výběr housekeeping genu jako endogenní kontroly, ke které by se vztahovala exprese testovaných genů. Byli vyzkoušeny některé geny běžně používané v naší laboratoři jako endokontroly pro stanovení exprese v somatických buňkách/tkáních *GAPDH*, *PPIA*, *HPRT1*, *ACTB*, *PRNT* a *TDRG*, ale ty vykazovaly příliš nízkou a/nebo velmi nerovnoměrnou expresi v našich vzorcích. V některých případech bylo možné špatnou použitelnost endokontroly očekávat, např. je známo, že spermie exprimují zvláštní formu *GAPDH* – *GAPDHS* (Shchutskaya et al., 2008). Proto byl referenční gen vybrán z řady genů, jejichž exprese vykazovala co nejmenší rozdíly mezi testovanými skupinami na základě celogenomové analýzy na mikročipech (viz metody). Tento postup byl také použit v práci Montjen a kolektiv, kde byl na základě celogenomové analýzy transkriptomu vybrán gen *SAP130* (Montjean et al., 2012) a Bonache se spolupracovníky (Bonache et al., 2012), kde ani jeden z 8 běžně používaných genů nebylo možné využít jako referenční pro RNA spermií. Proto byly jako nejstabilnější geny na základě výsledků z mikročipu použity *RPS17* a *RPL29*. V práci Jodar a kolektiv (Jodar et al., 2012) byl jako housekeeping gen použit běžně používaný *ACTB*, v našem případě ale tento gen na q-RT-PCR vykazoval příliš nízkou expresi.

Námi vybrané geny jsme vyzkoušeli na q-RT-PCR a vybrán byl jeden s vysokou a stabilní expresí – *EIF4A*. Z 35 vybraných genů pro ověření pomocí q-RT-PCR se nám podařilo potvrdit rozdílnou expresi jen u 8 genů, u dalších 4 byl rozdíl v expresi blízko hranice pro statistickou významnost. Jen jeden (*ARHGAP17*) byl potvrzen i na větší skupině vzorků. Nejpravděpodobnějším vysvětlením tak nízké reprodukovatelnosti je fakt, že výsledky z analýzy mikročipů nedosáhly statistické významnosti po korekci na mnohočetná porovnání, a jedná se tedy o pozorování na hranici statistické chyby. Přesto nález diferenciální exprese genu *ARHGAP17* by mohl být cenný, neboť byl potvrzen s použitím i jiných vzorků, než které byly na mikročipu. Je-li možno soudit podle práce Jodar a spol. (Jodar et al., 2015) využívající RNA-seq, komplikujícím faktorem může být vysoká přirozená variabilita hladin exprese genů ve spermiích, kterou ve výše jmenované studii řešili autoři

definováním stabilně exprimovaných genů v kontrolních vzorcích. Pro takovou analýzu však měla naše studie příliš málo kontrolních vzorků. Nevýhodou tohoto designu byla pak pro autory (Jodar et al., 2015) nutnost sledovat jen downregulované geny u vzorků od infertilních mužů. Jako příčinu nízké reprodukovatelnosti mezi mikročipem a q-RT-PCR nelze vyloučit ani technické/systematické chyby, kdy byly pro obě metody vyizolované RNA zpracovány zcela odlišným způsobem, avšak za normálních okolností by měl být zachován relativní poměr mezi různými transkripty.

Většina studií zabývajících se transkriptomem spermií, včetně té naší, je relativně malého rozsahu. Pro získání lepšího obrazu diferenciální exprese u různých fenotypů neplodných mužů by bylo třeba uspořádat studie rozsáhlejší, na větších kohortách pacientů a kontrol z různých etnických a teritoriálních skupin. Takto rozsáhlé studie ale už přesahují rámec tohoto projektu.

Transkriptomika v posledních letech masivně přechází od mikročipových technik k sekvenování nové generace. První výsledky v oblasti transkriptomu spermií (Mao et al., 2014, Jodar et al., 2016, Burl et al., 2018) ukazují, že RNA-seq pomáhá odhalit složitý soubor unikátních transkriptů a izoform, specifických pro spermie, které mají vliv na zrání spermií, oplození a časný embryonální vývoj. Podle názoru (Jodar et al., 2015) NGS na rozdíl od mikročipu poskytuje více dat a dá se tak lépe využít pro predikci úspěšnosti léčby idiopatické neplodnosti pomocí metod asistované reprodukce. Kromě toho jsou i náznaky, že analýzu RNA spermií by bylo možné používat i jako nástroj pro predikci dalších důležitých aspektů úspěšnosti reprodukce – tedy nejen úspěšnosti dosažení těhotenství, ale také rizika vrozených vývojových vad, neonatální mortality a možných dalších nemocí předpokládaného potomka. Transkriptom by tak mohl být vhodným nástrojem pro analýzu příspěvku otce k formování zdraví potomka (Burl et al., 2018).

Nicméně zatím nebyly publikovány další práce analyzující transkriptom lidských spermií pomocí NGS. Kromě již uvedených triviálních příčin (cena, náročnost hodnocení) Mao a spol. (Mao et al., 2014) v článku, zabývajícím porovnáním různých protokolů RNA-seq spermií upozorňuje na to, že způsob amplifikace při přípravě vzorku hraje zásadní roli pro výsledný profil, a tak volba nevhodné strategie může vést k chybným závěrům. Proto je důležité prozkoumat vliv jednotlivých metod a pochopit jejich vliv na výslednou analýzu výsledků (Mao et al., 2014).

Někteří autoři se domnívají, že pomocí celogenomového sekvenování bude možné identifikovat všechny genetické odchylky způsobující neplodnost, jejich lokalizaci a velikost

(Mitchell et al., 2017). Předpokládá se, že desítky nebo stovky genových defektů, které souvisí s abnormálním vývojem spermií budou odhaleny v nejbližší budoucnosti (Ray et al., 2017). Jiní autoři ale nejsou tak optimističtí ohledně odhalení příčin mužské neplodnosti, a proto má význam věnovat se výzkumu molekulárních odlišností spermií neplodných mužů, zejména tam, kde vyšetření spermiogramu neukáže abnormální výsledek. Transkriptomika má v tomto snažení bezpochyby své místo. Více než 10letý výzkum transkriptomu spermií přinesl své výsledky, např. odhalil kolem třech tisíc diferenciólně exprimovaných RNA různých typů lišících se u vzorků neplodných mužů od plodných kontrol, ale zatím není pozorována vysoká korelace mezi výsledky různých studií. Do budoucna bude patrně potřeba standardizovat metodiky výběru pacientů i analýzy RNA, aby bylo možné sdružovat výsledky různých studií do metaanalýz a tak překonat omezení daná malými počty vzorků.

## 6 Závěr

Během této práce byla prozkoumána RNA spermií neplodných mužů a porovnávána s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Celkem byla provedena celogenomová analýza 24 vzorků, ze kterých šest představovalo kontrolní skupinu. Po analýze bylo vybráno 35 genů s rozdílnou expresí pro ověření pomocí q-RT-PCR, u osmi genů se podařilo rozdílnou expresí potvrdit. U jednoho genu – *ARHGAP17* – se nám podařilo potvrdit zvýšenou expresi u skupiny mužů s idiopatickou neplodností na větším počtu vzorků (16 neplodných a 15 zdravých jedinců). Na základě těchto údajů můžeme předpokládat, že gen *ARHGAP17* je jedním z genů, které by mohly sloužit jako marker neplodnosti v případech, kdy parametry spermogramu nevykazují patologii, ale zdá se, že neplodnost je na straně muže. Molekulární role *ARHGAP17* ve spermiích není známá, tato studie by tedy mohla stimulovat jeho detailní výzkum.

## 7 Seznam použité literatury

1. Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A.M., Keller, A., and Meese, E. (2014). Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil. Steril.* *102*, 989–997.e1.
2. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., and Chyatte, M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *13*, 37.
3. Bansal, S.K., Gupta, N., Sankhwar, S.N., and Rajender, S. (2015). Differential genes expression between fertile and infertile spermatozoa revealed by transcriptome analysis. *PLoS One* *10*, 1–21.
4. Barratt, C.L.R., Björndahl, L., Jonge, C.J. De, Lamb, D.J., Martini, F.O., Mclachlan, R., Oates, R.D., Poel, S. Van Der, John, B.S., Sigman, M., et al. (2017). The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance — challenges and future research opportunities. *Hum. Reprod. Update* *23*, 660–680.
5. Bernie, A.M., Mata, D.A., Ramasamy, R., and Schlegel, P.N. (2015). Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* *104*, 1099–1103.
6. Bonache, S., Mata, A., Ramos, M.D., Bassas, L., and Larriba, S. (2012). Sperm gene expression profile is related to pregnancy rate after insemination and is predictive of low fecundity in normozoospermic men. *Hum. Reprod.* *27*, 1556–1567.
7. Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., and Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod. Biomed. Online*.
8. Burl, R.B., Clough, S., Sandler, E., Estill, M., and Krawetz, S.A. (2018). Sperm RNA elements as markers of health. *Syst. Biol. Reprod. Med.* *64*, 25–38.
9. Cappallo-Obermann, H., Schulze, W., Jastrow, H., Baukloh, V., and Spiess, A.N. (2011). Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol. Hum. Reprod.* *17*, 669–678.
10. Carrell, D.T., Aston, K.I., Oliva, R., Emery, B.R., and De Jonge, C.J. (2016). The

- “omics” of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. *Cell Tissue Res.* *363*, 295–312.
11. Chatterjee, M., Kis-Toth, K., Thai, T.H., Terhorst, C., and Tsokos, G.C. (2011). SLAMF6-driven co-stimulation of human peripheral T cells is defective in SLE T cells. *Autoimmunity* *44*, 211–218.
  12. Chiang, M.H., Steuerwald, N., Lambert, H., Main, E.K., and Steinleitner, A. (1994). Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. *Fertil Steril* *61*, 276–280.
  13. Clark, Josef P., and N.C.L. (2014). Systems Biology of RNA Binding Proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* *825*, 159–197.
  14. Dadoune, J.P., Pawlak, A., Alfonsi, M.F., and Siffroi, J.P. (2005). Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 133–140.
  15. Ding, H., Tian, J., Du, W., Zhang, L., Wang, H., and Wang, Z. (2012). Open non-microsurgical, laparoscopic or open microsurgical varicocelectomy for male infertility: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BJU Int.* *110*, 1536–1542.
  16. Dohle, G.R., Colpi, G.M., Hargreave, T.B., Papp, G.K., Jungwirth, A., Weidner, W., on Male Infertility, E.A.U.W.G., and others (2005). EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.* *48*, 703–711.
  17. Durkee, T.J., Mueller, M., and Zinaman, M. (1998). Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *178*, 1288–1297.
  18. Evers, J.L.H. (2002). Female subfertility. *Lancet* *360*, 151–159.
  19. Fábryová, K., and Simon, M. (2009). Function of cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *Gen. Physiol. Biophys.* *28*, 1–7.
  20. Ferrer, M., Rodriguez, H., Zara, L., Yu, Y., Xu, W., and Oko, R. (2012). MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res.* *349*, 881–895.
  21. Garcia-Herrero, S., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Remohi, J., Pellicer, A., and Meseguer, M. (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod. Biomed. Online* *22*, 25–36.



22. Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simón, C., Pellicer, A., and Remohí, J. (2004). Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 82, 1059–1066.
23. Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Jauregui, J., Horcajadas, J.A., Simón, C., Remohí, J., and Meseguer, M. (2009). Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil. Steril.* 91, 1307–1310.
24. Garrido, N., García-Herrero, S., and Meseguer, M. (2013). Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertil. Steril.* 99, 1008–1022.
25. Geyer, C.B., Inselman, A.L., Sunman, J.A., Bornstein, S., Handel, M.A., and Eddy, E.M. (2009). A missense mutation in the *Capza3* gene and disruption of F-actin organization in spermatids of *repro32* infertile male mice. *Dev. Biol.* 330, 142–152.
26. Goh, W.S.S., Falcatori, I., Tam, O.H., Burgess, R., Meikar, O., Kotaja, N., Hammell, M., and Hannon, G.J. (2015). PiRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. *Genes Dev.* 29, 1032–1044.
27. González-Marín, C., Gosálvez, J., and Roy, R. (2012). Types , Causes , Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14026–14052.
28. Goodrich, R., Johnson, G., Krawetz, S.A., and Goodrich, R. (2007). The Preparation of Human Spermatozoal RNA for Clinical Analysis Applications Notes : Protocol The Preparation of Human Spermatozoal RNA for Clinical Analysis. *Arch. Androl.* 53:3, 161–167.
29. Goodwin, L.O., Karabinus, D.S., and Pergolizzi, R.G. (2000). Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 487–497.
30. Grander, D., and Johnsson, P. (2015). Pseudogene-Expressed RNAs: Emerging Roles in Gene Regulation and Disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 394, 111–126.
31. Hamatani, T. (2012). Human spermatozoal RNAs. *Fertil. Steril.* 97, 275–281.
32. Harada, A., Furuta, B., Takeuchi, K.I., Itakura, M., Takahashi, M., and Umeda, M. (2000). Nadrin, a novel neuron-specific GTPase-activating protein involved in regulated exocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 36885–36891.
33. Hotaling, J.M. (2014). Genetics of Male Infertility. *Urol. Clin. North Am.* 41, 1–17.
34. Hull, M.G.R., Glazener, C.M.A., Kelly, N.J., Conway, D.I., Foster, P.A., Hinton,

- R.A., Coulson, C., Lambert, P.A., Watt, E.M., and Desai, K.M. (1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br. Med. J.* *291*, 1693–1697.
35. Jarow, J.P., Espeland, M.A., and Lipshultz, L.I. (1989). Evaluation of the azoospermic patient. *J. Urol.* *142*, 62–65.
36. Jodar, M., Kalko, S., Castillo, J., Balleascà, J.L., and Oliva, R. (2012). Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum. Reprod.* *27*, 1431–1438.
37. Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum. Reprod. Update* *19*, 604–624.
38. Jodar, M., Sendler, E., Moskovtsev, S.I., Librach, C.L., Goodrich, R., Swanson, S., Hauser, R., and Diamond, M.P. (2015). Absence of Sperm Rna Elements Correlates With Idiopathic Male Infertility. *Sci. Transl. Med.* *7*.
39. Jodar, M., Soler-ventura, A., and Oliva, R. (2016a). Semen proteomics and male infertility. *J. Proteomics* *162*, 125–134.
40. Jodar, M., Sendler, E., and Krawetz, S.A. (2016b). The protein and transcript profiles of human semen. *Cell Tissue Res.* *363*, 85–96.
41. Johnson, G.D., Sendler, E., Lalancette, C., Hauser, R., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2011). Cleavage of rRNA ensures translational cessation in sperm at fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* *17*, 721–726.
42. Kidd, S.A., Eskenazi, B., and Wyrobek, A.J. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: A review of the literature. *Fertil. Steril.* *75*, 237–248.
43. Kierszenbaum, A.L. (2003). Acroplaxome, an F-Actin-Keratin-containing Plate, Anchors the Acrosome to the Nucleus during Shaping of the Spermatid Head. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4628–4640.
44. Kittnar Otomar, K. (2011). *Lékařská fyziologie* (Grada Publishing).
45. Krausz, C., Escamilla, A.R., and Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction* *150*, 159–174.
46. Kumar, G., Patel, D., and Naz, R.K. (1993). c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res* *39*, 111–117.
47. Lambard, S., Martin, G., Levy, R., Chocat, A., and Carreau, S. (2004). Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 535–541.

48. Liska, F. (2003). Selected genetic aspects of male infertility--what animal models tell us. *Folia Biol. (Praha)*. *49*, 129–141.
49. Maclaughlin, B.J., and Turner, C. (1973). Ribonucleic Acid Synthesis by Spermatozoa from the Rat and Hamster. *Biochem. J.* 635–639.
50. Mao, S., Sandler, E., Goodrich, R.J., Hauser, R., Stephen, A., Obstetrics, M., Service, G., and Hospital, M.G. (2014). A Comparison of Sperm RNA-Seq Methods. *Syst. Biol. Reprod. Med.* *60*, 308–315.
51. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Kishimoto, K., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K. (2006). Identification and Functional Characterization of a New Human Kidney-Specific H<sup>+</sup>/Organic Cation Antiporter, Kidney-Specific Multidrug and Toxin Extrusion 2. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 2127–2135.
52. Maun, N.A., Speicher, D.W., DiNubile, M.J., and Southwick, F.S. (1996). Purification and properties of a Ca(2+)-independent barbed-end actin filament capping protein, CapZ, from human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemistry* *35*, 3518–3524.
53. Mciver, S.C., Roman, S.D., Nixon, B., and Mclaughlin, E.A. (2012). miRNA and mammalian male germ cells. *Hum. Reprod. Update* *18*, 44–59.
54. Meacham, R.B., Joyce, G.F., Wise, M., Kparker, A., and Niederberger, C. (2007). Male Infertility. *J. Urol.* *177*, 2058–2066.
55. Meseguer, M., Garrido, N., Simón, C., Pellicer, A., and Remohí, J. (2004). Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J. Androl.* *25*, 773–780.
56. Miller, D., and Ostermeier, G.C. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update* *12*, 757–767.
57. Mitchell, M.J., Metzler-Guillemain, C., Toure, A., Coutton, C., Arnoult, C., and Ray, P.F. (2017). Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clin. Genet.* *91*, 208–216.
58. Mohanty, G., Swain, N., and Samanta, L. (2015). Sperm Proteome: What Is on the Horizon? *Reprod. Sci.* *22*, 638–653.
59. Montjean, D., De La Grange, P., Gentien, D., Rapinat, A., Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., Menezo, Y., and Benkhalifa, M. (2012). Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* *29*, 3–10.
60. Moore, K.L., and Persaud, T.V.N. (2002). *Zrození člověka* (Praha: ISV).

61. Nagy, Z., Wynne, K., Gambaryan, S., and Smolenski, A. (2015). Cyclic Nucleotide-dependent Protein Kinases Target ARHGAP17 and ARHGEF6 Complexes in Platelets \*. *J. Biol. Chem.* *290*, 29974–29983.
62. Ostermeier, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P., and Krawetz, S.A. (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* *360*, 772–777.
63. Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2004). Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* *429*, 154–154.
64. Ostermeier, G.C., Goodrich, R.J., Moldenhauer, J.S., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2005). A Suite of Novel Human Spermatozoal RNAs. *J. Androl.* *26*, 70–74.
65. Pantano, L., Jodar, M., Bak, M., Ballescà, J.L., Tommerup, N., Oliva, R., and Vavouri, T. (2015). The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes. *RNA* *21*, 1085–1095.
66. Pessot, C.A., Brito, M., Figueroa, J., Concha, I.I., Yañez, A., and Burzio, L.O. (1989). Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *158*, 272–278.
67. Platts, A.E., Dix, D.J., Chemes, H.E., Thompson, K.E., Goodrich, R., Rockett, J.C., Rawe, V.Y., Quintana, S., Diamond, M.P., Strader, L.F., et al. (2007). Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 763–773.
68. Ray, P.F., Toure, A., Metzler-Guillemain, C., Mitchell, M.J., Arnoult, C., and Coutton, C. (2017). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin. Genet.* *91*, 217–232.
69. Řežábek, K. (2008). Asistovaná reprodukce (Maxdorf).
70. Richter, W., Dettmer, D., and Glander, H.J. (1999). Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *5*, 732–736.
71. Robay, A., Abbasi, S., Akil, A., and El-bardisi, H. (2018). A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing. *Arab J. Urol.* *16*, 53–64.
72. de Rooij, D.G. (2017). The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development* *144*, 3022–3030.
73. Schauer, I., Madersbacher, S., Jost, R., Hübner, W.A., and Imhof, M. (2012). The

- Impact of Varicocele on Sperm Parameters: A Meta-Analysis. *J. Urol.* *187*, 1540–1547.
74. Schneider, H., Staudacher, S., Poppelreuther, M., Stremmel, W., Eehalt, R., and Füllekrug, J. (2014). Protein mediated fatty acid uptake: Synergy between CD36/FAT-facilitated transport and acyl-CoA synthetase-driven metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* *546*, 8–18.
  75. Shchutskaya, Y.Y., Elkina, Y.L., Kuravsky, M.L., Bragina, E.E., and Schmalhausen, E. V (2008). Investigation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human sperms. *Biochemistry. (Mosc).* *73*, 185–191.
  76. Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K.-I. (2007). Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 359–371.
  77. Tomes, C.N., Michaut, M., Blas, G. De, Visconti, P., Matti, U., and Mayorga, L.S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* *243*, 326–338.
  78. Wells, C.D., Fawcett, J.P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., et al. (2006). A Rich1/Amot Complex Regulates the Cdc42 GTPase and Apical-Polarity Proteins in Epithelial Cells. *Cell* *125*, 535–548.
  79. WHO (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.
  80. Wilkes, S., Chinn, D.J., Murdoch, A., and Rubin, G. (2009). Epidemiology and management of infertility: A population-based study in UK primary care. *Fam. Pract.* *26*, 269–274.
  81. Wykes, S., Visscher, D., and Krawetz, S. (1997). Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *3*, 15–19.
  82. Yatsenko, A.N., Roy, A., Chen, R., Ma, L., Murthy, L.J., Yan, W., Lamb, D.J., and Matzuk, M.M. (2006). Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL 10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 3411–3419.
  83. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* *13*, 134.

84. Yu, B., Zhou, H., Liu, M., Zheng, T., Jiang, L., and Zhao, M. (2015). Epigenetic Alterations in Density Selected Human Spermatozoa for Assisted Reproduction. *PLoS One* 10.
85. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., and Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009\*. *Fertil. Steril.* 92, 1520–1524.
86. Zhang, J., Wang, J., Zhou, Y.F., Ren, X.Y., Lin, M.M., Zhang, Q.Q., Wang, Y.H., and Li, X. (2015). Rich1 negatively regulates the epithelial cell cycle, proliferation and adhesion by CDC42/RAC1-PAK1-Erk1/2 pathway. *Cell. Signal.* 27, 1703–1712.
87. Zvěřina, J. (2010a). Poruchy mužské plodnosti. *Urol. pro Praxi* 11, 196–199.
88. Zvěřina, J. (2010b). Azoospermie v reprodukční medicíně. *Urol. pro Praxi* 11, 313–315.