

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Vliv sekvenční, repetiční a expresní variability genu TSPY v normálních a
patologických buňkách**

Olomouc 2011

Mgr. Veronika Svačinová

Prohlášení

Prohlašuji, že dizertační práce byla vypracována samostatně pod vedením Mgr. Radka Vodičky, Ph.D. a v seznamu literatury jsou uvedeny všechny použité literární a odborné zdroje.

V Olomouci

Veronika Svačinová

Poděkování

Chci moc poděkovat především svému školiteli Mgr. Radku Vodičkovi, Ph.D. za cenné rady, zkušenosti a trpělivost, stejně tak doc. RNDr. Radku Vrtělovi, Ph.D. a prof. MUDr. Jiřímu Šantavému, CSc. za odbornou pomoc.

Dále jsem vděčná za podporu a pomoc svým kolegům MUDr. Markovi Godavovi, Evě Krejčířikové, Mgr. Marcele Kvapilové a celému oddělení Lékařské genetiky a fetální medicíny ve FN Olomouc.

Práce byla podpořena grantovou agenturou IGA MZ CZ, Grant č 7821-3/2004 – 2006.

Obsah:

	Úvod	7
1.	Úvod do problematiky	8
1.1.	Chromozom Y	8
1.1.1.	Historie a původ chromozomu Y	8
1.1.2.	Savčí gonozomy X a Y	9
1.1.3.	Diferenciace X a Y chromozomu	9
1.1.4.	Struktura Y chromozomu	9
1.1.5.	Degenerace chromozomu Y	12
1.1.6.	Mechanismy zachování Y chromozomu	13
1.2.	Neplodnost	14
1.2.1.	Neplodnost, definice	14
1.2.2.	Příčiny	14
1.2.3.	Diagnostika mužské neplodnosti	15
1.2.4.	Mužská neplodnost a její genetické příčiny	17
1.2.4.1.	Genetika neplodnosti	17
1.2.4.2.	Chromozomální aberace	17
1.2.4.3.	Autozomální aberace	17
1.2.4.4.	Gonozomální aberace	18
1.2.4.5.	Delece v AZF oblasti	20
1.3.	TSPY	25
1.3.1.	Gen TSPY	25
1.3.2.	Organizace genu TSPY	25
1.3.3.	TSPY promotor	26
1.3.4.	Transkripce a exprese	27
1.3.5.	Funkce	29
1.3.6.	Patologický význam TSPY	30
1.4.	TSPY-like geny	32
1.4.1.	TSPY-like 1	32
1.4.2.	TSPY-like 2	33
1.4.3.	TSPY-like 3	33
1.4.4.	TSPY-like 4	33

1.4.5.	TSPY-like 5	34
1.4.6.	TSPY-like 6	34
2.	Cíle disertační práce	35
3.	Materiál a metodika	36
3.1.	Sekvenační analýza	36
3.1.1.	Izolace DNA	37
3.1.2.	PCR, primery	37
3.1.3.	Verifikace PCR produktů	38
3.1.4.	Post PCR purifikace	38
3.1.5.	Sekvenační PCR	38
3.1.6.	Post-sekvenační purifikace	39
3.1.7.	Separace v kapilární elektroforéze	39
3.2.	Statistika sekvenační analýzy	41
3.3.	Molekulárně-cytogenetická kvantifikace genu TSPY	42
3.3.1.	In situ PCR (PRINS)	42
3.3.2.	Imunofluorescenční analýza	44
3.3.2.1.	Příprava mikroskopických preparátů	45
4.	Výsledky	49
4.1.	Sekvenační analýza genu TSPY	49
4.1.1.	5'UTR	49
4.1.2.	Intronové oblasti	52
4.1.3.	Kódující oblasti – Exon 1	55
4.1.3.1.	Infertilní muži	55
4.1.3.1.1.	První podskupina	55
4.1.3.1.2.	Druhá podskupina	58
4.1.3.1.3.	Výsledky spermogramu u infertilních mužů	64
4.1.3.1.4.	Srovnání počtu kopií genu TSPY vzhledem k uvažovaným skupinám	65
4.1.3.2.	Kontroly	66
4.1.3.3.	Pacienti se seminomem	66
4.1.3.4.	Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem	66
4.1.4.	Kódující oblasti – Exony 2, 3, 4, 5, 6	66
4.2.	PCR in situ	67

4.3.	Imunofluorescence - posouzení exprese TSPY genu v tumorózních a fyziologických tkáních	68
5.	Diskuze a závěry	72
5.1.	Promotorová oblast (5'UTR)	73
5.2.	První exon TSPY genu	73
5.3.	Exony 2, 3, 4, 5 a 6	76
5.4.	Intronové oblasti	76
5.5.	Hodnocení korelace sekvenčních změn a spermiogramu	77
5.6.	Srovnání počtu kopií TSPY a genového polymorfismu v podskupinách infertilních jedinců	77
5.7.	Srovnání spermiogramu a zásadních změn vedoucích k posunu čtecího rámce u infertilních mužů	78
5.8.	Posouzení exprese TSPY genu imunofluorescenční detekcí a PCR in situ	78
6.	Souhrn	79
	Summary	80
7.	Literatura	81
8.	Seznam použitých zkratk	90
9.	Přílohy	93
10.	Seznam prezentací	95

Úvod

U přibližně 10 % neplodných mužů bývá nalezen konkrétní genetický problém, jako například chromozomální abnormality či různé mutace v genech ovlivňující spermatogenezi či plodnost obecně. Nalezení genetické příčiny je pro další postup v léčbě neplodnosti klíčové.

Díky testes specifické expresi a podílu na regulaci spermatogeneze se stal gen TSPY jedním z kandidátů pro asociaci mezi změnami v genu a poruchami spermatogeneze.

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1. CHROMOZOM Y

Chromozom Y je jedním ze dvou pohlavních chromozomů (gonozomů) a patří k nejmenším z nich v lidském genomu. Jeho přítomnost, respektive genu SRY (Sex determining Region on chromosome Y), určuje mužské pohlaví jedince. Vzhledem k tomu, že se vyskytuje jen u mužů, lze vyvodit, že geny zde přítomné nejsou nutné pro životaschopnost organismu (Skaletsky et al. 2003).

1.1.1. Historie a původ chromozomu Y

Chromozom Y patřil ještě donedávna k nejméně prostudovaným chromozomům. V první polovině minulého století se dokonce předpokládalo, že tento chromozom nenese vůbec žádnou informaci a není tudíž nijak významný nebo že nese geny pro různé kožní vlastnosti - suchá šupinatá kůže, chlupaté uši a podobně.

V roce 1959 demonstrovali Jacobs a Ford na svých studiích Klinefelta a Turnerova syndromu že Y chromozom nese klíčový gen rozhodující o pohlaví (Jacobs et al. 1959, Ford et al. 1959). I přes tento významný objev byl stále pokládán za pustý, jinak nevýznamný chromozom. V poslední čtvrtině 20. století se nakonec pomocí objevu PCR a rekombinantních technik podařilo odhalit strukturu chromozomu a tím i víceméně jeho význam, ale vzhledem k jeho množství repetice a amplikonů to nebylo snadné. Jeho první molekulární mapu vytvořil v roce 1986 Vergnaud a jeho kolektiv.

Původ chromozomu Y je úzce spjat s chromozomem X. Ony oba jsou původem homologní autozomy, jež se oddělily od ostatních autozomů (Miller 1914, Ohno 1967, Bull 1983) přibližně před 240 - 350 miliony let (Filatov 2005). Z autozomů vznikly gonozomy postupnými translokacemi autozomálních fragmentů a expanzí nerekombinantních částí na proto-gonozomy, až nakonec došlo k zastavení rekombinace mezi autozomy a gonozomy (Filatov 2005). Motorem pro oddělení chromozomu X a Y byla zřejmě „fenotypově výhodná“ mutace.

1.1.2. Savčí gonozomy X a Y

Přestože mají gonozomy společný původ a i některé geny, dnes jsou značně odlišné. Chromozom X je nositelem až 1000 genů s obecnými i specializovanými funkcemi (Ross et al. 2005). Chromozom Y je daleko menší, má mezi 58 – 60 Mb a obsahuje už jen přibližně 45 genů (Graves 2006). Sekvenováním euchromatinových oblastí bylo identifikováno 178 transkripčních jednotek (Skaletsky et al. 2003), ale bylo odhaleno, že řada z nich jsou jen pseudogeny nebo amplifikované kopie (Graves 2006). A na rozdíl od genů na chromozomu X, jsou zde geny velmi specializované a to na hlavně na definici pohlaví, spermatogenetické funkce či plodnost.

Typickým znakem chromozomu Y je také přítomnost mnoha repetice a amplikonů (Skaletsky et al. 2003).

1.1.3. Diferenciace X a Y chromozomu

Došlo k funkční a strukturní divergenci kdysi homologního genu SOX 3 (Sry-related HMG Box 3) na chromozomu X a genu SRY na chromozomu Y. Po ustanovení genu SRY jako determinanty pro mužské pohlaví, se chromozom Y osamostatnil (Graves 1998). Zřejmě kvůli stále menší rekombinaci s X chromozomem a také kumulaci a udržení pro muže výhodných sekvencí začalo docházet k degeneraci chromozomu Y. Indukcí degenerace byly mutace a delece v nerekombinantní části (Graves 2006). Prvním, kdo tento proces odstartoval, byl právě gen SRY (Bachtrog a Charlesworth 2001).

1.1.4. Struktura Y chromozomu

Chromozom Y obsahuje asi 60 Mb.

Heterochromatin se vyskytuje celkem ve třech částech. Největší část je kondenzována v distální oblasti dlouhého raménka (Yq12). Tento úsek je vysoce polymorfni a dlouhý asi 30 Mb (Tilford et al 2001). Jeho délka není konstantní, tvoří polovinu až dvě třetiny dlouhého raménka (Huynh et al. 2002). Úsek je tvořen především vysoce repetitivními genovými rodinami DYZ1 a DYZ2 (Amplified DNA fragment on Y chromosome). Druhá oblast heterochromatinu se nachází v oblasti centromery a jeden malý heterochromatinový ostrůvek ve střední části dlouhého raménka.

Transkripční aktivita byla zjištěna pouze u euchromatinových sekvencí. Bylo identifikováno 156 transkripčních jednotek, přičemž je kódováno minimálně 27 proteinů. Řada z nich je produktem genových často multikopiových rodin, kterých je celkem 24 (Skaletsky et al. 2003).

Z hlediska rekombinovatelnosti a podobnosti jednotlivých sekvencí a původnosti jej lze rozdělit na dvě základní části:

1/ Pseudoautozomální oblast se vyskytuje ve skutečnosti na dvou místech chromozomu, a to na koncích krátkého a dlouhého raménka. Označují se jako PAR 1 a PAR 2 (PseudoAutosomal Region). Představují přibližně 5 % chromozomu. Hlavním znakem, jímž se liší od celého zbytku chromozomu, je rekombinace s chromozomem X.

PAR 1 je lokalizována na konci krátkého raménka, má 2,6 Mbp a obsahuje uvnitř 24 genů, z toho u 16 z nich je známa funkce (Mangs et al. 2007):

- ASMTL
- CD99
- CRLF2
- CSF2RA
- SFRS17A
- DHRSXY
- GTPBP6
- IL3RA
- P2RY8
- PLCXD1
- PPP2R3B
- SHOX
- SLC25A6
- XG
- ZBED1

Kódují například antigeny monoklonálních protilátek, oxidoreduktázy, katalyzátory syntézy melatoninu a další (Mangs et al. 2007, Marschall Graves 2000, Gelin et al. 1989, Gianfrancesco et al. 2001, Slim et al. 1993, Yi et al. 1993).

PAR 2 obsahuje čtyři geny, které mají své kopie na chromozomu X. Tyto geny jsou přenášeny do dalších generací jako autozomální geny. Většina z nich jsou neaktivní pseudogeny (Mangs et al. 2007, Ciccodicola et al. 2001, Marschall Graves 2000).

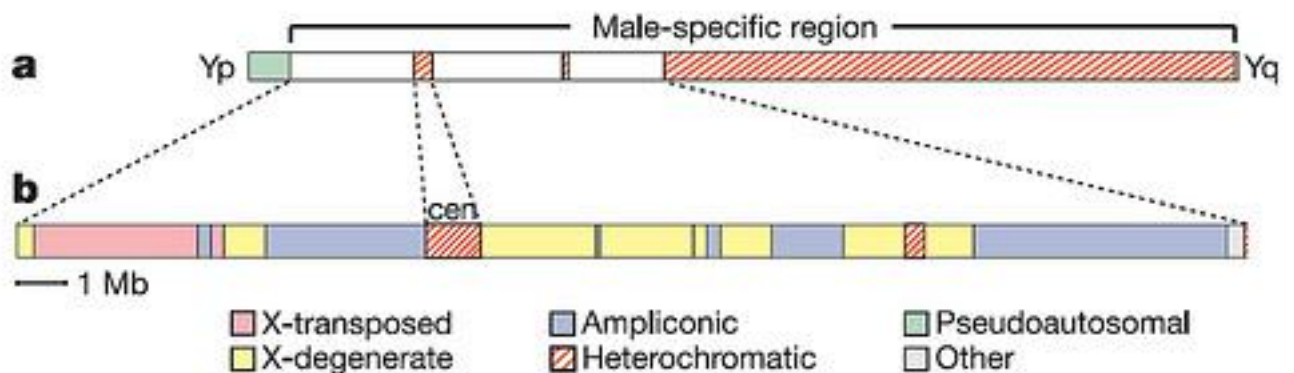
-
- SPRY3
- SYBL1
- IL9R
- CXYorf1 (resp. WASH6P)

Párování chromozómů X a Y a jejich rekombinace mezi jejich pseudoautozomálními regiony se zdají být pro normální vývoj mužské meiózy nezbytné. U buněk, kde nedochází k XY rekombinaci, se nepodaří dokončit meiózu. Strukturální a genetické odchylky mezi pseudoautozomálními regiony chromozómů X a Y mohou narušit párování a rekombinaci a mohou tak způsobit mužskou neplodnost (Mangs et al. 2007).

Gen SHOX (Short stature homeobox gene) v PAR1 je často spojován s některými poruchami u lidí (Blaschke et al. 2006).

2/ MSY oblast (Male Specific region on Y) vešla dříve ve známost jako „nerekombinantní“ oblast NRY (non-recombinant region in Y) (Skaletsky et al. 2003). Ale právě studie Skaletsky (2003) ukazuje, že dochází k rekombinaci i v této oblasti. Proto byla přejmenována na „male-specific region“ (MSY) (obrázek č. 1).

Obrázek č. 1 – Oblast MSY (male specific region on Y), převzato od Skaletsky et al. 2003



Geny v euchromatinové MSY oblasti lze rozdělit podle několika kritérií. Nejdříve se geny v MSY rozdělovaly podle místa exprese na ty, jež se exprimují ve všech tkáních a ty, jež jsou exprimovány pouze v testech (Lahn et al. 1997).

Rozdělení dle H. Skaletsky (2003) je založeno spíše na podobnosti sekvencí, která je navíc mezi sekvencemi na chromozomu Y opravdu výjimečně vysoká. Geny jsou rozděleny do tří tříd:

1/ X-transponované – jsou zde pouze dva geny s vysokou podobností (99 %) se svými homology na chromozomu X (Yq21). Původně byla tato oblast přenesena z chromozomu X a byla rozdělena inverzí na dvě.

2/ X-degenerované - obsahují pouze jednokopiové geny nebo pseudogeny, homologní s některými geny na chromozomu X, s nimiž vykazují 60% až 96% podobnost. Patří sem 12 genů. S výjimkou SRY se všechny exprimují v různých tkáních, SRY pouze v testes.

3/ Amplikonové – představují 30 % euchromatinu v MSY oblasti a jsou rozděleny do 7 oblastí, které jsou lokalizovány na krátkém i dlouhém raménku s celkovou délkou 10,2 Mb. Amplikonové sekvence vykazují ze všech 3 tříd nejvyšší hustotu genů, ať kódujících či nikoliv. Jedná se o multikopiové geny, které tvoří genové rodiny. Počet kopií je různý (Skaletsky et al. 2003).

Například gen ZFY má jednu kopii, geny VCY, XKRY, HSFY nebo PRY mají dvě kopie, BPY2 tři, CDY a DAZ čtyři kopie a gen TSPY 35 – 40 kopií.

Rodiny uvnitř vykazují nejvyšší stupeň podobnosti ze všech třech tříd MSY oblasti, až 99 %. Bylo identifikováno devět MSY specifických genových rodin, které zahrnují přibližně 60 transkripčních jednotek. Tyto genové rodiny jsou téměř výhradně exprimovány ve varlatech. Kromě vysoké sekvenční podobnosti v genových rodinách jsou i typickým znakem amplikonových rodin palindromy. Jsou dlouhé 9 kb až 1,45 Mb a mívají uprostřed tzv. mezerník. Díky vysoké podobnosti mezi nimi, dochází ke genové konverzi (Skaletsky et al. 2003, Rozen et al. 2003).

Jedním z dalších možných rozdělení genů v MSY oblasti je podle Lahna a Page (1999), kteří rozdělují geny homologní s X chromozomem do čtyř skupin v závislosti na X/Y divergenci. K té docházelo ve čtyřech evolučních vrstvách, kde každá měla jinou míru divergence (Filatov 2005).

1.1.5. Degenerace chromozomu Y

Před 300 miliony lety nesl chromozom Y přes 1400 genů a za tuto dobu drtivou většinu z nich ztratil. Nyní je jich aktivních jen 45 (Marshall Graves 2000). Kvůli tak malé odolnosti vůči degeneračnímu evolučnímu tlaku už jej někteří autoři, zabývající se chromozomem Y, ve svých člancích označují dokonce nelichotivě jako „wimpy“¹ (Marshall Graves 2000, Halley 2003).

¹ Český slaboch, chcípáček.

Porovnáním pohlavních chromozomů u různých taxonů se ukázalo, že gen SRY se vyskytoval už na předkovi chromozomu Y, tzv. proto-Y. Nerekombinantní část zřejmě začala mutovat, deletovat a rozšiřovat se díky „napadení“ repetitivními elementy. Tato část už není dále schopna rekombinace s bývalým partnerem. Geny poté dál mutovaly a byly inaktivní (Marshall Graves 2000).

U savců navíc existuje celá řada faktorů, jež působí proti heterogametickým gonozomům. Například vysoký poměr mutací a nepřiměřená selekce nerekombinantních chromozomů. Buňky spermatogonií prodělávají daleko více dělení než oogonií, tudíž je zde i větší pravděpodobnost chyby (Aitken a Graves 2002, Graves 2006).

1.1.6. Mechanismy zachování Y chromozomu

Prvním mechanismem je již zmiňovaný crossing-over mezi chromozomem X a rekombinantními (pseudoautozomálními) oblastmi PAR 1 a PAR2 chromozomu Y.

Druhým je Y-Y genová konverze. Jedná se o nerekombinantní transfer genetické informace z jednoho DNA duplexu na druhý a představuje pro chromozom Y jakési evoluční „eso v rukávu“. Palindromové sekvence jsou součástí funkčních genů se specifickou expresí, zatímco jiné nefunkční kopie na chromozomu jsou umístěny náhodně (Rozen et al. 2003).

Genová konverze je u chromozomu Y častá asi tak, jako crossing-over u autozomů.

Tento jev byl zřejmě nejvíce prostudován u hub (Skaletsky et al. 2003, Rozen et al. 2003).

1.2. NEPLODNOST

1.2.1. Neploдность, definice

Neploдность je definována jako neschopnost dosáhnout otěhotnění při nechráněném pohlavním styku a to po dobu jednoho roku (WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, Cambridge 2000).

Neploдность je dělena do dvou kategorií:

Primární neploдность - nedochází k početí při nechráněném pohlavním styku po dobu jednoho roku.

Sekundární neploдность - po dobu jednoho roku nechráněného pohlavního styku nedošlo k otěhotnění, přestože v minulosti k oplodnění došlo.

Epidemiologie

Neploдность je celosvětový problém, který postihuje poměrně velkou část populace; je to 13-18 % (Greenhall a Vessey 1990, Iammarrone et al. 2003). Přibližně 25 % párů nedosáhne otěhotnění během jednoho roku, ale jen 15 % z nich vyhledá lékařskou pomoc (Kubiček 2008).

1.2.2. Příčiny

Dříve se předpokládalo, že neploдность je ženský problém, obzvláště pokud u muže probíhala ejakulace standardním způsobem. Dnes už víme, že infertilita postihuje téměř stejným dílem muže i ženy.

Podle WHO (World Health Organization) je až u 33 % párů příčinou neploдности samotný mužský faktor, v 25 % ženský faktor a oba faktory současně u 20 % párů. To znamená, že mužská neploдность může za neploдность až u 53 % párů (WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, Cambridge 2000).

V případě, že se jedná pouze o sníženou plodnost, hledají se řešení snadněji. Snížená plodnost u mužů bývá následkem několika faktorů: vrozené či získané kongenitální či urogenitální abnormality, genetické abnormality, úrazy, infekce, poruchy endokrinního systému či imunologická nekompatibilita (WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, Cambridge 2000).

Příčiny mužské neplodnosti lze rozdělit na vrozené a získané.

Mezi vrozené patří například vrozená porucha tvorby gonadoliberinů (př. Kallmanův syndrom), genetické poruchy diferenciac gonád, mutace receptoru pro androgeny, poruchy enzymů při tvorbě testosteronu, cystická fibróza a další.

Získanými příčinami neplodnosti bývají často nesestouplá testes, varikokéla, úrazy šourku, infekce a poškození zárodečného epitelu, pohlavní nemoci, nádorová onemocnění, radiace, cirhóza jater.

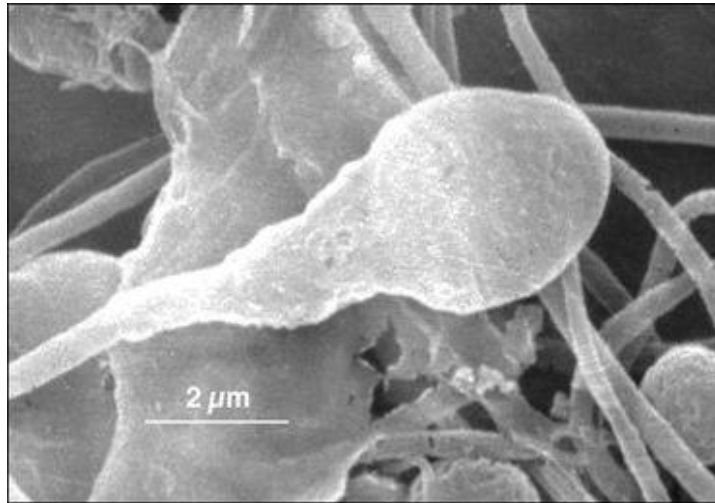
1.2.3. Diagnostika mužské neplodnosti

Pro diagnostiku mužské neplodnosti je jedním z nezbytných vyšetření **analýza spermioqramu** – standardizované vyšetření ejakulátu. Je posuzován dle manuálu WHO (WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, Cambridge 2000).

Tabulka č. 1 – Přehled standardních hodnot analýzy ejakulátu podle kritérií WHO z roku 1999:

Objem	≥ 2,0 ml
pH	7,0-8,0
Koncentrace spermií	≥ 20 milionů/ml
Celkový počet spermatozoí	≥ 40 milionů/ejakulát
Motilita	≥ 50 % s progresivní motilitou nebo 25 % s rychlou motilitou do 60 minut po ejakulaci
Morfologie	≥ 14 % normálního tvaru a formy*
Viabilita	> 50 % spermatozoí
Leukocyty	< 1 milion/ml
IBT	< 50 % spermatozoí s adherujícími partikulami
MAR test**	< 50 % spermatozoí s adherujícími partikulami
* hodnocení podle Krugerových a Menkfeldových kritérií	
** smíšená antiglobulinová reakce	

Obrázek č. 2 - Spermie



Na základě těchto parametrů se nejčastěji rozlišuje:

Oligospermie – méně než 20 milionů spermií/1 ml ejakulátu

Astenoospermie - méně než 50 milionů motilních spermií/1 ml ejakulátu

Teratoospermie – méně než 14 % normálního typu spermií

Azoospermie - méně než 1 milion spermií/1 ml ejakulátu (WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, Cambridge 2000).

Provádí se též vyšetření hormonů či genetické vyšetření (urologickelisty.cz/pdf/ul.07/05/01), a to buď cytogenetické (chromozomové aberace) nebo molekulárně genetické (cystická fibróza, delece v oblasti AZF – azoospermický faktor).

1.2.4. Mužská neplodnost a její genetické příčiny

1.2.4.1. Genetika neplodnosti

Dle Diemera a Desjardina (1999) je až 30 % mužské neplodnosti označeno jako idiopatická infertilita; tedy bez známé příčiny. Na základě rekombinantních DNA technik bylo zjištěno, že velká část z nich souvisí s geny na pohlavních chromozomech. Předpokládá se, že spermatogenezi reguluje až 150 genů, z nichž je většina na autozomech, asi 30 na chromozomu Y (Wang et al. 2004).

Úkolem autozomálních genů pro spermatogenezi je spíše regulace metabolických procesů v somatických i spermatických buňkách. Geny na chromozomu Y do obecných funkcí lidského těla prakticky nezasahují, význam mají ale právě pro reprodukční procesy jako je spermatogeneze (Diemer a Desjardins 1999).

Poruchy mohou být na chromozomální či molekulární úrovni.

1.2.4.2. Chromozomální aberace

Aberace na cytogenetické úrovni jsou buď numerické (monozomie, trizomie) či strukturní (ring chromozom, translokace, inverze) a dochází k nim na základě meiotické nondisjunkce zárodečných buněk.

Na rozdíl od numerických aberací gonozomů, kde nebývá zřejmý patologický nálezn (kromě monozomie X), u autozomů znamenají často těžké defekty (malformace srdce a plic, mentální retardace, mikrocefalie a další) se špatnou prognózou (Diemer a Desjardins 1999).

U strukturních aberací je vždy zásadní otázkou, zda je translokace balancovaná. Jsou známy nebalancované strukturní aberace, zapříčiňující chyby v promotorech či supresorech a následné poruchy spermatogeneze (Nieschlag et al. 1997).

1.2.4.3. Autozomální aberace

Infertilní muži mají 4 až 10krát častěji autozomální translokace než fertilní jedinci. Nejčastěji jsou to různé pericentrické (obsahující centromeru) inverze u chromozomů 1, 3, 5, 6, 9, 10 a 21 (Chandley et al. 1975, Elliott a Cooke 1997).

Bylo popsáno přibližně 20 balancovaných či nebalancovaných translokací na autozomech, jež jsou spojené s poruchami spermatogeneze (Diemer a Desjardins 1999).

Zastavení spermatogeneze bylo zatím prokázáno jen u inverzí na chromozomu 1 (Meschede et al. 1994). Infertilita je zde způsobena poruchami při vytváření synaptonemálního komplexu v časném pachytene ve spermatogenezi (de Perdigó et al. 1991, Guichaoua et al. 1992).

Syndrom Noonanové

Jedná se o kongenitální poruchu postihující obě pohlaví s incidencí 1 případ na 1000 až 2500 narozených. Jde o autozomálně dominantní onemocnění s variabilní expresí (<http://emedicine.medscape.com/article/947504-overview>).

U většiny případů byla popsána jako příčina onemocnění mutace v genech PTPN11 (50 %), SOS1 (10 %), RAF1 (3-17 %) a KRAS (1 %), jež patří do skupiny RAS/RAF/MEK/ERK – signálních drah, které jsou důležitým regulátorem buněčného růstu (<http://emedicine.medscape.com/article/947504-overview>).

Hlavními znaky tohoto onemocnění jsou krátká postava, úzký hrudník, hypoplastické plíce a kongenitální abnormality srdce, poruchy srážlivosti krve, hypogonadismus, kryptorchidismus. Prognóza u postižených dětí není příznivá, umírají často v prvních měsících života (Diemer a Desjardins 1999).

Kartagenerův syndrom

Jde o autozomálně recesivní onemocnění. Patří mezi tzv. primární ciliární dyskineze. Konkrétní příčina tohoto syndromu zatím není zcela objasněna, ačkoliv už bylo potvrzeno, že odpovědný gen se nachází na chromozomu 15 (oblast 15q24–25) (Geremek et al. 2006).

Pacientům chybí protein Dynein, jež spojuje triplety mikrotubulů v axonemě. Bez něj se nemohou cíle správně pohybovat. Postižen je především respirační trakt a bičik spermii (nepohyblivost spermii). Pacienti často trpí chronickou bronchitidou a recidivující bronchopneumonií, chronickými sinusitidami a situs viscerum inversus (vnitřní orgány jsou v těle zrcadlově převráceny), defekty ledvin a srdce, poruchami spermiogeneze či anosmií (Eliasson et al. 1977, Carson a Collier 1988, Geremek et al. 2006).

1.2.4.4. Gonozomální aberace

Postihují chromozomy X a Y.

U chromozomu X je mužská neplodnost způsobena malými delecemi či nebalancovanými translokacemi. U žen jsou tyto aberace kompenzovány na druhém chromozomu X. (Diemer a Desjardins 1999).

Bylo zjištěno, že na dlouhém raménku chromozomu Y je minimálně 15 genů (Lahn a Page 1997) a řada z nich je důležitá pro správný průběh spermatogeneze (Ma et. al. 2000).

Klinefelterův syndrom

Jde o jednu z nejběžnějších chromozomálních aberací, způsobující hypogonadismus a neplodnost u mužů. Důsledkem meiotické nondisjunkce se do gamety k chromozomu Y přidruží i chromozom X. Dvě třetiny postižených jedinců mají nadpočetný chromozom X od matky, jedna třetina od otce (Diemer a Desjardins 1999).

Klinickými znaky je vyšší postava, oblé boky, gynekomastie, malá varlata, neplodnost. (Diemer a Desjardins 1999).

Kallmannův syndrom

Jedná se o „de novo“ mutaci v genu KAL-1 na Xp22.3, jenž kóduje anosmin-1. Je exprimován v mozku, faciálním mezenchymu, meta a mesonefronech. Je důležitý pro promotorovou migraci gonadoliberinů v neuronech z čichových nervů do hypotalamu.

Znaky onemocnění jsou malá postava, anosmie a mentální retardace, hypogonadotropní hypogonadismus (Diemer a Desjardins 1999).

Supermale syndrom

Jde o podobný funkční problém jako u Klinefelterova syndromu. Při mužské meióze se v důsledku nondisjunkce do pohlavní buňky dostanou dva chromozomy Y. Po oplození je tedy jeden chromozom Y nadpočetný. Důsledky nondisjunkce ale nejsou nijak vážné. Tělesný vývoj probíhá zcela standardním způsobem, hladina testosteronu je rovněž fyziologická. Plodnost těchto mužů buď není postižena vůbec nebo je jen mírně snížena (Diemer a Desjardins 1999).

V jejich psychickém a především kognitivním a behaviorálním vývoji však byly popsány jisté odchylky. Chlapci mají různé poruchy učení, horší slovní zásobu a vyjadřování. Rovněž po určitou dobu přetrvával názor, že mají tito muži sklon k agresivnímu chování a probíhal dokonce výzkum na mužích ve výkonu trestu. Tato hypotéza byla ovšem vyvrácena. (Milunsky a Maher 2004, Nussbaum et al. 2004).

Aberace na chromozomu Y

Nejčastěji dochází k translokacím mezi chromozomem Y a autozomy 1, 3 a 11 a tyto translokace postihují spermatogenezi (Diemer a Desjardins 1999).

Reverzní (obrácené) pohlaví (Sex Revers)

Tento jev postihuje přibližně 2 % neplodných mužů (Nieschlag et al. 1997). Příčinou je translokace genu SRY. Tento gen rozhoduje o tom, jakého pohlaví bude dítě. Je specifický pro muže.

Pokud dojde k translokaci genu z chromozomu Y na chromozom X, vyvíjí se většinou fenotypově muž, ačkoliv je jeho karyotyp 46,XX.

Gen SRY je exprimován v podpůrných buňkách nediferencovaných testes. Díky němu se diferencují v Sertoliho buňky (<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/pohlavi.htm>).

SRY působí rovněž na gen Sox9 (SRY-related high-mobility group [HMG] box 9). Mutace tohoto genu vyvolávají *kampomelickou dysplazii* - karyotyp 46,XY je spojen s ženským pohlavím a s dysplázií skeletu (Sox9 je také nezbytný pro vývoj chrupavky) (<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/pohlavi.htm>).

Gen SRY není exprimován jen ve varlatech, ale i v mozku. Konkrétně byl nalezen v substantia nigra, kde zvyšuje expresi tyrosin hydroxylázy, enzymu potřebného pro tvorbu dopaminu. Pokud se u myši exprese Sry v substantia nigra "vypne", dojde u zvířat k rozvoji příznaků Parkinsonovy choroby. Závislost syntézy dopaminu na SRY u mužů by mohlo vysvětlit jejich větší náklonnost ke vzniku Parkinsonovy choroby. U žen je substantia nigra patrně menší (potvrzeno u myši - rozdíl 20 %), ale syntéza dopaminu je řízena jinak a je patrně stabilnější (<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/pohlavi.htm>).

1.2.4.5. Delece v AZF oblasti

Přestože se už dříve vědělo, že delece na chromozomu Y mohou poškozovat spermatogenezi (Chandley a Edmond 1971, Tiepolo a Zuffardi 1976, Maeda et al. 1976), trvalo dlouho, než byly ony oblasti či geny na chromozomu Y popsány (Ma et al. 2000).

U azoospermických mužů byly na v heterochromatinové části velkého raménka chromozomu Y nalezeny rozsáhlé delece. Předpokládalo se tedy, že právě zde leží gen nebo geny, nezbytné pro mužskou plodnost (Vogt et al. 1996, Vogt 2004). Mikrodelece v euchromatinu na chromozomu Y byly popsány u infertilních i fertálních mužů. U infertálních se vyskytují častěji. Vznikají zřejmě jako de novo mutace (delece) v rámci jednoho chromozomu (Chandley 1998, Repping et al. 2002).

Euchromatin v těchto oblastech obsahuje geny důležité pro správný průběh spermatogeneze a defekty mohou způsobovat poškození či zastavení spermatogeneze (Ma et al. 2000). Nejznámější taková oblast bývá označována jako azoospermický faktor AZF (obrázek č. 3) (Bühler 1985). Byly popsány 3 deleční oblasti AZFa, AZFb a AZFc a u každé z nich i s tím

související konkrétní postižení spermatogeneze (Chandley 1998). Bylo rovněž zjištěno, že oblasti AZFb a AZFc se částečně překrývají (Repping et al. 2002, Ali a Hasnain 2002).

Nejčastěji se vyskytují mikrodelače v oblasti **AZFc** (dříve KLARD) (Yq11.23) (Vogt et al. 1996).

Jeho velikost se odhaduje na 3,5 Mb (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001, Repping et al. 2002). AZFc obsahuje geny, regulující spermatogenezi. Delece této oblasti má za následek nedostatek zárodečných buněk a „syndrom pouze Sertoliho buněk“, protože geny z tohoto regionu se podílí na celém procesu zrání postmeiotických zárodečných buněk (Vogt et al. 1996). Oblast je tvořena již zmíněnými palindromovými sekvencemi s extrémně vysokou sekvenční podobností (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001).

V AZFc jsou jen multikopiové geny. Patří sem DAZ (Deleted in Azoospermia) – obsahuje geny, jež regulují vstup spermatocytu do meiózy, SPGY (SpermatoGenesis on Y), dále CDY, PRY, RBM, TTY1, TTY a další (Ma et. al. 2000, Ferlin et al. 2003).

DAZ - Zpočátku se předpokládalo, že se jedná o jednokopiový gen (Reijo et al. 1995), ale další studie odhalily, že se jedná o multikopiovou genovou rodinu s nejméně 7 kopiemi uspořádanými v distálním intervalu 6 (Saxena et al. 1996). Autozomální gen homologní s DAZ leží na chromozomu 3p25 a byl pojmenován DAZL1 (Deleted in azoospermia-like), u myši je na chromozomu 17 a nazývá se Dazl1 (Kent-First et al. 1999, Bryan 1977, Johnson a Hunt 1971). Původ z rodiny DAZ se odvozoval od jeho autozomálního předka, jež vznikl transpozicí a amplifikací (Saxena et al. 1996). Stejně jako DAZ, i DAZL1 a Dazl1 je cytoplazmatický protein exprimovaný výlučně v testes a ovariích. Proteiny lidského DAZ byly nalezeny ve zralých spermatidách a bičících spermii (Reijo et al. 2000, Habermann et al. 1998).

U myši bylo prokázáno, že ztráta tohoto genu vede ke sníženému počtu zárodečných buněk a k zastavení produkce gamet, jak u mužů, tak u žen. Bylo tedy nasnadě pokládat ho za gen nezbytný pro správný průběh spermatogeneze (Ruggiu et al. 1997).

O samotném genu DAZ byly publikovány studie, kde narušení DAZ - homologního genu u *Drosophily*, zvaného Boule, vedou u samců k zástavě meiózy (Eberhart et al. 1996) a u značného počtu oligo i azoospermiků byly nalezeny delece DAZ. To vedlo nakonec k závěrům, že se zřejmě jedná o nejlepší kandidátní gen pro AZF (Reijo et al. 1995, Saxena et al. 1996). A to přesto, že klinický obraz jedinců s delecí DAZ kolísá od azoospermie až po fertilitu (Vogt et al. 1996, Pryor et al. 1997).

AZFc delece jsou nejběžnější známou molekulárně genetickou příčinou mužské neplodnosti, a to napříč populacemi (Vogt 1998). Přesto ještě není jasné, zda tyto v testes výlučně

exprimované geny (Lahn a Page 1997, Vogt 1998), jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze (Fernandes et al. 2002).

Dříve se předpokládalo, že testikulární patologie AZFc je způsobena ztrátou celé AZFc oblasti (Vogt 1998). Fernandes et al. 2002 ve svých studiích ale dokazuje, že delece DAZ1/DAZ2 bývá příčinou oligospermie podobně jako delece celé AZFc oblasti. Ferlin et al. 2005 uvádí, že úplná absence AZFc vede k azoospermii a naopak delece DAZ3/DAZ4 byla pozorována u fertilních mužů s normálním spermiogramem.

Vzhledem k tomu, že stejný typ delecí má v konečném důsledku odlišný klinický projev, lze předpokládat, že se jedná o multifaktoriální onemocnění, kde dalšími faktory mohou být typ populace, věk, imunogenetika a další (Ma et al. 2000, Ferlin et al. 2005).

Našly se také jisté shody s genovou rodinou RBM (Retinoblastoma tumor suppressor), exprimovaného pouze v zárodečných buňkách (Vogt et al. 1996).

SPGY – byl popsán Vogtem a jeho kolegy (Maiwald et al. 1996).

RBM – genový produkt se pravděpodobně účastní sestřihu (Cooke 1999), delece většiny jeho kopií vede k abnormálnímu vývoji spermií (Mahadevaiah et al. 1998). V japonské populaci se například vůbec nevyskytuje. V ostatních populacích je velmi polymorfni (Nakahori et al. 1994).

AZFb – obsahuje SMCY, EIF 1AY – u všech pacientů, kde došlo k zastavení spermatogeneze ve stádiu spermatocyty, byla nalezena delece AZFb lokusu (Vogt 2004). Stejně jako u AZFc, i v lokusu AZFb jsou hlavní příčinou delecí rekombinace mezi velkými homologními bloky, které jsou složeny z různě repetivních sekvenčních rodin. Velikost AZFb se odhaduje na 6,2 Mb (Repping et al. 2002, Kuroda-Kawaguchi et al. 2001). Deleční interval AZFb ještě obsahuje velký blok s normálním euchromatinem.

AZFa – dříve označovaný jako JOLAR - obsahuje USP9Y, DBY, UTY a další (Ferlin et al. 2003, Vogt et al. 1996). Jeho velikost je 782 kb (Repping et al. 2002, Kuroda-Kawaguchi et al. 2001). Jako hlavní příčina delecí tohoto lokusu bývá uváděna intrachromozomální rekombinace mezi specifickými repetivními bloky HERV (Human Endogenous RetroViral) (Blanco et al. 2000, Sun et al. 2000, Kamp et al. 2000).

Kent-First et al. v roce 1999 ještě dokonce popisují další AZF oblast mezi AZFb a AZFc, a to AZFd.

Celkem byly tedy popsány 4 kandidátní genové rodiny pro AZF. Jsou to:

RNA-Binding Motif (RBM) - (Ma et al. 1993)

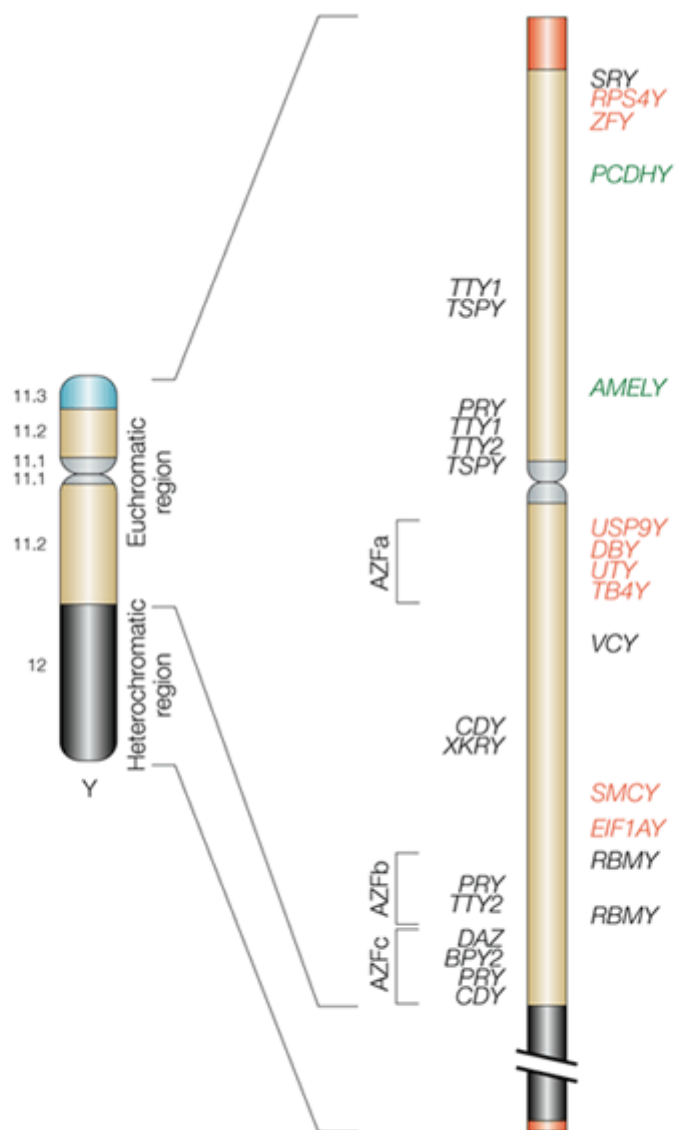
Deleted in AZoospermia (DAZ) (Reijo R. et al. 1995)

Drosophila Fat Facets Related Y (DFFRY) (Brown et al. 1998)

Chromodomain Y (CDY) (Lahn a Page 1999)

Vzhledem k tomu, že až u 40 % neplodných mužů je diagnostikována idiopatická infertilita (nebyla zjištěna žádná již popsaná příčina onemocnění) (Kretser 1997, <http://www.cochrane.org/reviews/en/ab005071.html> 2006), je poměrně významná část výzkumu zaměřena na ještě jiné molekulárně genetické faktory, jež by mohly vnést světlo do této problematiky. Jedná se především o geny ovlivňující spermatogenezi. Wang a kolektiv (2004) zjistili, že až 149 genů může ovlivňovat spermatogenezi a tudíž mutace v nich mohou do značné míry s mužskou infertilitou souviset. Jedním z nich je gen TSPY, ležící na chromozomu Y.

Obrázek č. 3 – AZF oblasti na chromozomu Y. Převzato od Lahn, Pearson a Jegalian (2001)



Nature Reviews | **Genetics**

1.3. TSPY

1.3.1. Gen TSPY

TSPY je na Y chromozom vázaný testis specifický gen, jeden z prvních identifikovaných testis specifických genů vůbec (Skawran et al. 2005). Je přítomen u většiny savců, hmyzu (s výjimkou motýlů), plazů a dvoudomých rostlin. Skot má například 50-200 kopií (Vogel et al. 1997), myši mají jen jednu kopii a ta je díky nonsense mutacím nefunkční. O svou funkci ale přišel myši TSPY zřejmě teprve nedávno a to díky evoluci, protože u většiny příbuzných druhů stále ještě funguje (Vogel et al. 1997).

Lidský TSPY je jedním z hlavních představitelů proteinové rodiny TSPY/SET/NAP1 (SET-suppressor of variegation enhancer of zeste and Trithorax, NAP-nucleosome assembling protein) (von Lindern et al. 1992, Vogel et al., 1998, Ozbun et al. 2001). Charakteristickým znakem této rodiny je přítomnost SET/NAP1 konzervované domény o velikosti asi 160 aminokyselin (Ishimi a Kikuchi 1991, Kido et al. 2008). Zajímavým faktem se ukázala skutečnost, že je tato doména zainteresována v regulaci buněčného cyklu a buněčné diferenciaci (Chai et al. 2001, Canela et al. 2003), což byla jedna z indicií v hledání souvislosti mezi genem TSPY, regulací spermatogeneze a nasměrováním spermatogonií do meiózy (Schnieders et al. 1996, Lau, 1999).

V rámci ontogeneze byl produkt TSPY detekován už ve 22. týdnu ve fetálním varleti (Zhang et al. 1992).

1.3.2. Organizace genu TSPY

TSPY je multikopiový repetitivní gen o velikosti 2,8 kb, kde je každá kopie vložena do 20 kb tandemově repetitivního klastru DYZ5, kde jedno vlákno kóduje protein TSPY a to druhé představuje transkripční jednotku CYorf16 (Manz et al. 1993, Skaletsky et al. 2003). Ačkoliv patří TSPY do třetí skupiny amplifikovaných genů s expresí ve varletech, on sám je mimo palindromové sekvence (Skaletsky et al. 2003). Množství kopií je individuální a pohybuje se většinou v rozmezí 20 až 40 kopií. Pokud počítáme i pseudogeny, může to být až 60 kopií (Arnemann et al. 1987). Většina kopií je lokalizovaná v oblasti Yp11.2 (obrázek č. 3). Další kopie jsou umístěny na Yq11.23 (Schempp et al. 1995).

Podle charakteru a podobnosti sekvencí na Y chromozomu řadí Skaletsky et al. (2003) gen TSPY do „třídy amplikonů“. Jejich hlavními znaky je vysoký počet repetic, multikopiový

charakter a vysoká podobnost mezi kopiemi, která dosahuje až 99 %. Gen TSPY je typickým představitelem této třídy (Skaletsky et al. 2003).

Divergence mezi funkčními kopiemi se pohybuje od 1 % (Skawran et al. 2005) do 3 % (Manz et al. 1993) a mezi funkčními kopiemi a jejich pseudogeny je asi 10% (Manz et al. 1993, Vogel a Schmidte 1998).

1.3.3. TSPY promotor

TSPY promotoru dříve nebylo věnováno příliš pozornosti. Charakterizovat se jej pokusili Tascou S. et al (2000) a Skawran B. et al (2005). Dle jejich výsledků má promotor 1,35 kb a obsahuje dva 5'ACAAT 3' shodné motivy na pozicích -218 a -632 před začátkem transkripce.

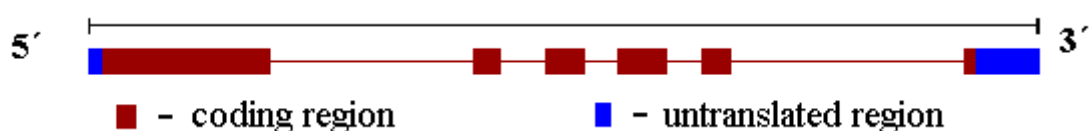
Jádro promotoru bylo zjištěno v pozicích -159 až -1, oblast zesilovače -673 až -364 a oblast zeslabení -1262 až -669. Bylo odhaleno, že promotor neobsahuje TATA box, ale NF-Y box (Nuclear Factor) v opačné orientaci, jež by mohl sloužit místo TATA boxu. Je situován 42 nukleotidů před začátkem transkripce.

Rovněž byly identifikovány dva na guanosin a cytosin bohaté WT-1 (Wilm's Tumor gene) responsivní elementy a to na pozicích -115 až -102 a -66 až -51, označované také jako AP2 motivy (Activating Protein), jež mohou sloužit jako transkripční faktory (Skawran et al. 2005, Vernimmen et al. 2003)

Jedny z nich jsou CpG ostrůvky, které jsou přítomny jak v promotoru, tak v prvním exonu TSPY genu. Tyto ostrůvky jsou v savčích genech poměrně častým jevem (Kido a Lau 2005). Používají se jako orientační body v genech v kosmidových knihovnách (Zhang et al. 1992).

Bylo rovněž prokázáno, že exprese lidského TSPY je řízena Sox specifickými shodnými motivy, jež leží uvnitř promotorové oblasti (Skawran et al. 2005).

Obrázek č. 4 - Převzato z NCBI: *TSPY1 testis specific protein, Y-linked 1 (Homo sapiens)* – human TSPY gene structure



1.3.4. Transkripce a exprese

Většina transkriptů je 1,3 kb velká a pochází z 2,8 kB transkripční jednotky (6 exonů, 5 intronů) (Dechend et al. 2000, Zhang et al. 1992, Schnieders et al. 1996) (obrázek č. 4).

Délka transkriptu se liší v závislosti na typu transkriptu. Nejčastějším typem je varianta dlouhá 1169 nukleotidů, kódující polypeptidový produkt o 308 aminokyselinách, který je např. Schniedersem et al. (1996) nazýván jako TSPY-1 a Krickem et al. (2003) jako TSPY-S. Velikost produktu závisí na míře fosforylace, což je jeden z aktivačních procesů. "Nahý" produkt má hmotnost 33 kDa, plně fosforylovaný produkt 38 kDa (Schnieders et al. 1996).

Až do nedávna byl TSPY považován za testes specifický gen. Tedy za gen, jehož exprese je omezená pouze na tkáň varlete, respektive spermatogonie a primární spermatocyty, kde je hladina TSPY nejvyšší (Schnieders et al. 1996).

Současné studie exkluzivitu exprese ve varleti popírají. Byla zjištěna exprese v patologických tkáních, zárodečných testikulárních tumorech, v epiteliálních buňkách rakoviny prostaty, plicních a jiných somatických nádorech (Schnieders et al. 1996, Lau et al. 2000, Lau et al. 2003, Lau a Zhang 2000, Kido a Lau 2005, Kido a Lau 2008).

Expresní studie demonstrovaly, že velikost transkriptu lidského TSPY je různě velká, ale přesto se vyskytuje několik nejčastějších variant.

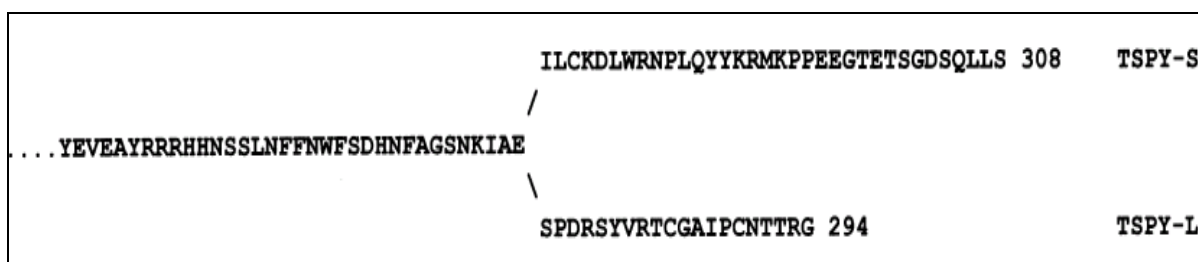
Dle Kricka et al. (2003) byly pojmenovány dvě velmi časté varianty: TSPY-S (short) a TSPY-L (long) (obrázek č. 4). Varianty se liší svým C koncem a sestřihovým místem uvnitř čtvrtého intronu. Variantu TSPY-S již popsal Schnieders (1996) a TSPY-L Zhang et al. (1992). U většiny kopií genu mají obě varianty část 3' konce shodnou. Následně dochází k alternativnímu sestřihu a vzniku různých transkriptů (Krick et al. 2003).

Byly identifikovány 2 transkripty lišící se díky sestřihu o 11 nukleotidů. TSPY-L kóduje 294 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 33,3 kDa a je o něco delší než TSPY-S. K rozdílnému sestřihu dochází 11 nukleotidů před sestřihovým místem varianty TSPY-S.

Varianta TSPY-S je kratší než TSPY-L, ale má delší c-konec tvořený 34 aminokyselinami a celkovou délkou 308 aa, zatímco varianta TSPY-L má c-konec tvořen 20 aminokyselinami s celkovou délkou 294 aa (Krick et al. 2003).

Krick et al. (2003) pomocí dozimetrie zjistil, že poměr mezi těmito variantami je 25:9. Tedy že kratší varianta TSPY-S je přibližně 3krát častěji exprimována.

Obrázek č. 5 – Rozdílné 3' konce S a L formy genu TSPY. Převzato Krick et al. 2003



Lau a jeho kolegové popsali v roce 2003 další hlavní transkript a poté jiné, spíše vzácnější.

Třetí transkript vzniká „in frame“ inzercí 18 bp v 1. exonu (221-238). Do ORF (open reading frame) je vneseno 6 aminokyselin navíc a vzniká tak protein o 314 aminokyselinách a váze 35,8 kDa (Dechend et al. 2000).

Nazývá se TSPY3 a je velmi vzácný; méně než 4 % transkriptů. (Lau et al. 2003).

Byly ale identifikovány ještě další méně časté transkripty, které lze rozdělit do dvou kategorií.

1/ V první kategorii jsou transkripty, jež obsahují skryté donorové sestřihové místo uprostřed prvního exonu, hned za kodonem pro aminokyselinu 29, které je potom užito pro sestřih hned tří transkriptů společně s třemi různými akceptorovými sestřihovými místy buď v exonu 1 nebo už exonu 2 (Lau et al. 2003).

Vznikají tedy transkripty mezi sestřihovými místy:

#29 #117

#29 #134

#29 #169 (už 2. exon)

Skryté RNA sestřihy vznikly z „in frame“ delecí 87, 104 a 139 aminokyselin. Tyto tři varianty byly popsány jako **Exon 1A, 1B a 1C**.

Lau et al. je označil jako H71 Exon 1A

H104..... Exon 1B

H109 a H106 Exon 1C

Nejčastější z této kategorie je exon 1A.

Skryté introny byly označeny jako donorová místa díky shodě dinukleotidu GT z valinového kodonu (GTG) na zbytku 30. aminokyseliny, zatímco všechna akceptorová místa nesou AG z kodonu (CAG) s příslušným spojením. Biologická funkce jednotlivých transkriptů není

popsána, ale rozdíly na úrovni proteinu ukazují, že budou vykazovat rozdílné a specifické vlastnosti (Lau et al. 2003).

2/ Druhá kategorie transkriptů se vyskytuje ještě vzácněji. Představuje méně než 5 % všech TSPY sekvencí. V intronech 3 a 4 byly popsány přeskoky, změněný ORF za sekvencí v intronu a lehce pozměněné proteiny, resp. jejich karboxylový konec, jako je tomu u transkriptů H80 a H30. Navzdory možným změnám vlastností Lau et al. (2003) předpokládá, že všechny kódující TSPY transkripty pořád nesou buď celou nebo skoro celou SET/NAP doménu v příslušném ORF. Lauovy výsledky ukazují, že všechny transkripční varianty byly pozorovány v prostatických i testikulárních tkáních. Distribuce ale byla různá.

Testikulární tkáň měla 52 % cDNA s normálním ORF, jež odpovídalo transkriptu TSPY-1, 19 % představovaly transkripty Exon 1A, 1B a 1C a zbytek byly transkripty 420 bp krátké, nekódující a transkripty přeskakující introny s pozměněným ORF.

Byly identifikovány rovněž pozměněné transkripty, většinou se jednalo o substituce. Např. kodon 45 (GTG/GTA), polymorfismus pro Valin. (Dechend et al. 2000)

Kodon 92 (CCC/CGA), Pro/Arg (Lau et al. 2003)

Kodon 93 (CGC/GCA), Arg/Ala (Lau et al. 2003)

Kodon 195 (CCT/CGT), Pro/Arg (Dechend et al. 2000)

1.3.5. Funkce

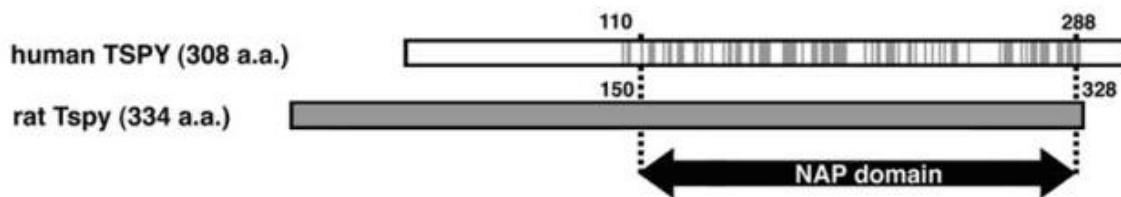
Funkce genu TSPY ještě nejsou zcela objasněné. Dle Wang et al. (2004) je TSPY jedním z přibližně 150 genů, jež hrají roli ve spermatogenezi. Schnieders et al. (1996) dokázal prostřednictvím imunohistochemických metod specifickou funkci TSPY v proliferaci spermatogonií, v jejichž cytoplazmě se vyskytuje. Nejvyšší hladina TSPY, nejčastěji se vyskytující varianty TSPY-S, byla zjištěna právě ve spermatogoniích, o něco menší koncentrace byla nalezena v primárních spermatocytech. Jeho exprese TSPY může být znakem přechodu mitotického (spermatogonie) a meiotického dělení (primární spermatocyt) (Schnieders et al. 1996).

SET/NAP1 doména

TSPY je členem proteinové rodiny SET/NAP1. Ta se skládá z proto-onkogenu SET a NAP. Členové této rodiny mají doménu, vázající cyklin typu B, jež hraje jednu z nejdůležitějších rolí v regulaci buněčného cyklu. Je totiž substrátem pro CDK (cyklin dependentní kináza), s

níž posouvá buňku v buněčném cyklu z fáze G2 do fáze M (mitotické). Na základě strukturní podobnosti genu TSPY se členy SET/NAP1 rodiny lze tedy soudit, že i on hraje roli v regulaci spermatogeneze a nasměrování spermatogonií do meiózy (Schnieders et al. 1996, Lau 1999).

Obrázek č. 6 - Lokalizace SET/NAP domény a její srovnání, převzato od Kido a Lau 2006



SET byl poprvé identifikován u pacientů s akutní nediferencovanou leukémií a byly zde zjištěny vazby na B cykliny (von Lindern et al. 1992, Kellogg et al. 1995). Je schopen regulovat přechod z fáze G2 do M fáze modulací aktivity CDK1 (Canela et al. 2003) a inhibovat tumor-supresorový gen NM-23H1 (Fan et al. 2003). Nadměrná exprese SET může mít inhibiční efekt na buněčnou proliferaci v přechodu G2/M fáze (Canela et al. 2003), což poukazuje na to, že proteiny, nesoucí SET/NAP doménu mohou ovlivňovat buněčný cyklus (Oram et al. 2006).

Dle Orama et al. (2006) je TSPY schopen zprostředkovat buňkám přechod z G2 do M fáze rychlejším tempem než je tomu u buněk, kterým TSPY chybí. Tyto poznatky podpořily hypotézu, že TSPY je gen stimulující růst, tedy že zvyšuje buněčnou proliferaci in vitro a tumorogenezi in vivo. Role TSPY tak nabrala výrazný patologický význam.

1.3.6. Patologický význam TSPY

Forma TSPY (TSPY-L) je umístěna v kritické oblasti GBY (gonadoblastoma Y-linked), jediném onkogenním lokusu na chromozomu Y. Proto je považován za významného kandidáta pro tumory pohlavních buněk (Arnemann et al. 1987 a 1991, Zhang et al. 1992, Vogt et al. 1997, Oram et al. 2006). Patří sem i další možné tumor supresorové geny a onkogeny, jako např. RBM, PRKY, genová rodina PTP-BL (PRY) a repetitivní genová rodina TSPY.

Geny RBM(Y) a PRKY jsou považovány za možné protoonkogeny, PRY plní pravděpodobně funkci tumor supresorového genu.

AMELY – kóduje formu amelogeninu, nachází se na chromozomu Y. Amelogenin je členem rodiny proteinů extracelulární matrix. Jsou zapojeny do biomineralizace během vývoje zubní skloviny (Lau et al. 1989).

PRKY - kóduje členy cAMP-dependentní serin/threonin protein kinázové rodiny. Abnormální rekombinace mezi tímto genem a souvisejícím genem na chromozomu X je častou příčinou mužů XX a žen XY (Skaletsky et al. 2003).

GBY leží v oblasti Yp11.1 a jeho velikost je 1-2 Mb (Ali a Hasnain 2002).

Byla zjištěna zvýšená koncentrace TSPY v gonadoblastomech, nádorech prostaty, seminomech, intrakraniálních tumorech zárodečných buněk, melanomech či hepatocelulárním karcinomu (Lau 1999, Oram et al. 2006, Høe-Hansen et al. 2006). TSPY také urychluje regulaci růstových genů a onkogenů a snižuje regulaci inhibitorů buněčného cyklu a apoptotických faktorů, ačkoliv ani přímý, ani nepřímý efekt není znám (Oram et al. 2006).

Lze tedy soudit, že TSPY je jedním z onkogenních faktorů, které přispívají k tumorogenezi v nefunkčních pohlavních buňkách a citlivých somatických tkáních (Oram et al. 2006).

1.4. TSPY-LIKE GENY

TSPY-like geny, tedy geny podobné TSPY genu, byly zmíněny už například v roce 1997 Delbridgem nebo v roce 1998 Vogelem a jeho kolegy, kteří se zabývali už několik let výzkumem samotného TSPY genu. Všechny doposud známé autozomální TSPY like geny jsou jednokopiové (Delbridge et al. 2004, Lau et al. 2007).

Svůj název dostaly podle nápadné sekvenční podobnosti s Y vázaným genem TSPY a bylo jich identifikováno celkem šest. Byly rovněž přiřazeny do genové rodiny TSPY-SET-NAP1L1, stejně jako je třeba TSPY členem své genové rodiny TSPY-SET-NAP (Puffenberger et al. 2004)

Číslice byly k TSPY-like genům přiřazeny až později, protože se nepředpokládalo, že jich bude víc.

1.4.1. TSPY-like 1

Gen TSPYL1 je lokalizován na dlouhém raménku šestého chromozomu 6q22-q23 a je exprimován v mozkovém kmeni a testes.

V roce 2006 bylo publikováno hned několik článků ukazujících blízkou souvislost mezi SIDDT (Sudden Infant Death with Dysgenesis of Testes - náhlé úmrtí kojenců spojené s dysgenezí testes) a mutacemi v tomto genu (Puffenberger et al. 2004, Hering et al. 2006).

SIDDT byl poprvé popsán v odborném periodiku Proceedings of the National Academy of Sciences u ortodoxní skupiny Židů (Amishů) v Pensylvánii. Jedná se o recesivní typ dědičnosti, kdy postižený dostane od každého rodiče jednu zmutovanou alelu.

Postižení jedinci zemřeli před prvním rokem života na kardiální nebo pulmonální selhání. Byla u nich popsána rovněž dysgeneze gonád. Zajímavým faktem byla skutečnost, že dysgeneze gonád postihovala pouze chlapce, ačkoliv smrt postihovala obě pohlaví stejně a ve stejném věku. Smrt navíc nejde žádným způsobem odvrátit, ať už je jedinec hospitalizován na resuscitačních přístrojích nebo je v domácí péči (Pazdera 2004, citace č. 104). Postižení chlapci mají díky absenci Leydigových buněk nevyvinuté sekundární pohlavní znaky a zevní genitál tedy vypadá buď oboupohlavně, nebo je přítomen penis. Šourek je ale prázdný, protože varlata zůstala zakrnělá v břišní dutině. Pro děti je navíc, stejně jako třeba u syndromu Cri du Chat, typický charakteristický vysoký pláč, v jakoby staccato modu (Pazdera 2004, citace č. 104).

Jako původce SIDDT byly označeny mutace v genech TSPYL1 a TSPYL4 na šestém chromozomu. Sekvenční analýza odhalila u pacientů se SIDDT posunovou mutaci (inzerci

guaninu) v pozici 457_458 v kodonu 153, což znamená zkrácení translace v kodonu 169 a následnou ztrátu peptidové domény (Puffenberger et al. 2004).

TSPYL1 může hrát roli ve vývoji tím, že mění regulaci specifických vývojových genů a podílí se na přestavbě chromatinu. Gene Expression Omnibus (GEO) doložila, že je TSPYL1 také ve vysokých dávkách exprimován v mozku plodu (GEO no. GSM14799, Puffenberger et al. 2004). Na produktech fúzní exprese GFP (Green Fluorescein Protein) byly znázorněny důsledky zkrácené formy TSPYL a ztráty domény a objasnila se tak patogeneze poruchy pohlavního vývoje a náhlého úmrtí z mozkového kmene (Puffenberger et al. 2004).

1.4.2. TSPY-like 2

Gen TSPYL2 je lokalizován na chromozomu Xp11.2, a protože se jedná téměř o sekvenčního homologa genu TSPY, bývá označován rovnou TSPX. Lau et al. (2009) předpokládá, že TSPY a TSPX mají stejný původ, tedy že vznikly ze stejného předka. Zatímco TSPX si svou původní strukturu zachoval, TSPY pozbyl kyselou karboxylovou doménu a na prolin bohatou doménu na N konci. SET/NAP doménu ale mají oba geny (Delbridge et al. 2004, Li a Lau 2008). TSPYL2 je 6,3 kb velký, obsahuje 7 exonů a na rozdíl od TSPY je jednokopiový. Tento gen kóduje proteiny o dvou velikostech, 667 a 693 kb (Delbridge et al. 2004).

Je přítomen u všech savců (Delbridge et al. 2004, Li a Lau 2008), ovlivňuje buněčný cyklus a regulaci transkripce (Lau et al. 2009). TSPYL2 je součástí transkripčního komplexu CASK/TRB1/TSPYL2, jež dokáže měnit genovou expresi v závislosti na synaptické aktivitě neuronu a touto cestou může i přes p53 dependentní CDKN1A zastavit buněčné dělení (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSPYL2>).

1.4.3. TSPY-like 3

TSPY-like 3 je lokalizován na 20. chromozomu (20q11.21), je velký 3,88 kb a kóduje 355 aminokyselin. Patří stejně jako TSPY do NAP rodiny a předpokládá se, že se podílí na sestavování nukleozomu (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H489>).

1.4.4. TSPY-like 4

TSPY-like 4 leží na 6. chromozomu (6q.22.1), 25 kb vedle svého „kolegy“ TSPYL1, je velký 4,18 kb. TSPYL4 je stejně jako TSPYL1 spojován s SIDDT. V TSPYL4 ale u postižených pacientů nebyly zjištěny žádné kódující varianty (Puffenberger, E. G. et al. 2004).

1.4.5. TSPY-like 5

TSPY-like 5 leží na 8. chromozomu (8q22.1), obsahuje 4,4 kb a kóduje protein o velikosti 417 aminokyselin. Podle Vachaniho et al. (2007) patří TSPYL5 mezi několik genů, jež dokážou rozlišit 2 typy epiteliálního karcinomu buněk hlavy a krku a karcinomu plic. Byla porovnána genová exprese u tumorů HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) a LSCC (lung squamous cell carcinoma) s předpokladem, že právě rozdílná exprese u jednotlivých typů tumorů může přesně rozlišit primární rakovinu plic od HNSCC metastází. Pomocí analýzy PDA (penalized discriminant analysis) se podařilo určit právě 10 genů, které dokážou pacienty s diagnózou odlišit. TSPYL5 patří mezi ně (Vachani et al. 2007).

Jung et al. (2008) u TSPYL5 prokázal velké zeslabení exprese DNA methylací u buněčných linií gliomů a primárních gliových tumorů. Výsledky ukazují, že u exprese mRNA TSPYL5 byla často snížena regulace a inverzně korelovala s DNA methylací u sedmi z devíti buněčných linií rakoviny žaludku. Po ošetření inhibitorem DNA methyltransferázy byla exprese mRNA TSPYL5 znovu obnovena. Zdá se tedy, že methylace TSPYL5 hraje dost významnou roli v rozvoji rakoviny žaludku a TSPYL5 lze považovat za kandidátní tumor supresorový gen. (Jung et al. 2008).

1.4.6. TSPY-like 6

TSPY-like 6 leží na 2. chromozomu (2p16.2), obsahuje 3 kb a kóduje protein o velikosti 410 aminokyselin. Lze jej nalézt v cytoplazmě i jádře. Gen obsahuje NAP doménu. Lze předpokládat, že se gen podílí na skládání nukleozomu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&l=TSPYL6>).

2. Cíle disertační práce

1/ Popis polymorfismů a porovnání sekvence genu TSPY u jednotlivých skupin.

2/ Porovnání zastoupení jednotlivých sekvenčních polymorfismů v genu TSPY u sledovaných skupin (infertilní jedinci, Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem, pacienti se seminomem a kontrolní vzorky).

3/ Kvantifikace repetice genu TSPY u infertilních mužů a vzorku normální populace pomocí molekulárně-cytogenetických technik (PRINS, imunofluorescence).

4/ Posouzení exprese TSPY genu s využitím imunofluorescence v tumorózních a fyziologických tkáních.

3. Materiál a metodika

3.1. SEKVENAČNÍ ANALÝZA

Celý soubor jedinců, jež byli podrobena sekvenační analýze, byl rozdělen do 4 skupin. Největší a nejvýznamnější skupinu tvořili infertilní muži, dále pacienti se seminomem, Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem a kontrolní (fertilní) jedinci. (tabulka č. 2)

V letech 2002 až 2004 bylo na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci vyšetřeno 75 infertilních mužů dle směrnic WHO

(<http://www.cambridge.org/uk/catalogue/catalogue.asp?isbn=0521645999>). Jednalo se většinou o jedince z Centra asistované reprodukce při Porodnicko-gynekologické klinice FN Olomouc a FERTIMEDu rovněž v Olomouci.

Průměrný věk neplodných mužů byl 32,08 a průměrný věk kontrol 33,27. V ejakulátu infertilních mužů byl hodnocen objem, koncentrace, motilita, pH, morfologie, vitalita semene, počet spermií a leukocytů, Immunobead test a MAR (mixed antiglobulin reaction) test (tabulka č. 1). Tito muži byli klinicky detailně popsáni již Vodičkou et al. (2007), včetně konfirmace fertility, paternitní analýzy u kontrol, nepříbuzenského (non-consanguinity) testu mezi infertilními muži a kontrolami pomocí Y haplotypové analýzy.

Pacienti se seminomem byly testovány ve spolupráci s MUDr. V. Hořínkovou. Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem byly získány od doc. J. Zapletalové (Dětská klinika FN Olomouc) a prof. J. Lebla (Klinika dětí a dorostu FN UK Praha) a fertilní jedinci byli vyšetřeni na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny FN v Olomouci.

Všichni námi analyzovaní jedinci měli normální karyotyp a všichni byli informováni o projektu a podepsali informovaný souhlas (příloha č. 1).

Celý projekt byl schválen Etickou komisí při Fakultní nemocnici v Olomouci.

Tabulka č. 2 – Počet analyzovaných jedinců v jednotlivých skupinách

	Infertilní muži	Seminomy	Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem	Kontroly
Celkem	75	6	2	31

3.1.1. Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena z 10 ml periferní krve Müllerovou vysolovací metodou v EDTA (Miller et al. 1988). Koncentrace byla měřena spektrofotometrem Beckman Coulter, vzorky byly před PCR naředěny na koncentraci 100 ng/μl.

3.1.2. PCR, primery

Primery byly navrženy tak, aby byl amplifikován téměř celý gen. Pro optimalizaci bylo vybráno sedm párů primerů. Později byla u prvního páru primerů (1f, 1r) navržena jiná sekvence pro amplifikační PCR a jiná pro sekvenační PCR.

Tabulka č. 3 - Sekvence primerů pro gen TSPY

Primer	Sekvence	T _m
1f 1r	5'CGGCACAAGTTCCAAG 3' 5' TCCCAAAGAGTCACATC 3'	58°C
3f 3r	5'GAGGTGCTCTCGGGGAAGTGTAAGTG 3' 5'GAGGGTGTATGATTCTGAGGCTGACTG 3'	61°C
5f 5r	5'CATACACCCTCTGTCAACAC 3' 5'CTCTTCTTCCACCTGTCAG 3'	61°C
6f 6r	5'CGAAGTTGTGGTCAGAGAAC 3' 5'GACAGGTGGAAGAAGAGAAG 3'	61°C
7f 7r	5'GTTCTCTGACCACAACCTTCG 3' 5'CCTGGATTCTGTCACTCTCTG 3'	58°C
8f 8r	5'CTGGCTGCTCATTTTCAG 3' 5'CAGTCCTTTGTGGTTTGG 3'	58°C
9f 9r	5'GTCCTGGTCATCCTTGC 3' 5'ACATTACCCCTCTTCC3'	58°C

Podmínky amplifikační PCR

Reakční směs pro PCR o objemu 20 μl obsahovala:

Mix 1 reakce	(20 μl)
DNA (100 ng/μl.)	1,0 μl
PCR voda	8,4 μl
PPP mix	10,0 μl
primery mix (10 μM)	0,6 μl

Amplifikační profil:

- 94°C/3 min
- 92°C/1 min
- 52°C (58°C, 61°C/1 min)

- 72°C/1 min
- opakovat 35x
- 72°C/7 min
- inkubace při 10°C hold

Tato reakce byla prováděna při 35 cyklech.

3.1.3. Verifikace PCR produktů

Pro kontrolu PCR produktů připravíme 1,5% agarózový gel v TBE pufru s 5 μ g EtBr/100ml gelu. Combi PPP mix obsahuje nanášecí barvu, proto není třeba míchat PCR produkt s nanášecím pufrem. Pipetujeme 10 μ l vzorku na jamku. Pouštíme 15-20 minut při 100V.

Přítomnost produktů pozorujeme na UV transiluminátoru.

3.1.4. Post PCR purifikace

Přečištění PCR produktů bylo provedeno podle protokolu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagene).

3.1.5. Sekvenační PCR

První pár primerů byl stejný jako pro amplifikační PCR, ale pro “vnitřní” část sekvence byl navržen ještě druhý pár primerů (Tabulka č. 4).

Složení sekvenační PCR: 10 μ l reakční směsi obsahuje 3 μ l sekvenčního pufru (ABI PRISM – Applied Biosystems), 1 μ l sekvenčního směsi (ABI PRISM Big Dye, verze 3), 2 μ l forward (reverse) primeru a 4 μ l templátové DNA. Amplifikace probíhá v termocykleru (MJ Research 200).

Amplifikační profil:

- 94°C 2 minuty
- 96°C 10 sekund
- každou sekundu se sníží teplota o 1°C až na teplotu 50°C.
- 50°C 5 sekund
- 60°C 4 minuty
- inkubace při 10°C

Tato reakce byla prováděna v 34 cyklech.

Tabulka č. 4 - Sekvence pro první pár primerů pro sekvenační reakci

Primer	Sekvence	T _m
1f – sekvenační	5' ACGGGAGGAAGTCGGC 3'	50°C
1r – sekvenační	5' TTCACTGGCTACCCGT 3'	
1f vnitřní-sekvenační	5' GATGGAGGCTGTGCAG 3'	
1r vnitřní-sekvenační	5' CCACCTCCGCCATTATG 3'	

3.1.6. Post-sekvenační purifikace

- 1) K 10 µl sekvenačního produktu přidat 2 µl roztoku octanu sodného v EDTA (1ml 1,5 M octanu sodného se 1,3 ml 0,25 M EDTA) a centrifugovat 30 s při 1000 rpm.
- 2) Přidat 25 µl absolutního ethanolu.
- 3) Centrifugovat 30 min. při 14 000 rpm.
- 4) Opatrně odsát supernatant, přidat 50 µl 80% ethanolu.
- 5) Centrifugovat 10 min. při 14 000 rpm.
- 6) Opatrně odpipetovat supernatant a dát otevřené mikrozkušavky vysušit do trouby na 15 minut při 60 °C.
- 7) Přidat 15 µl formamidu, nechat difundovat 2 minuty, potom protřepat a přenést do zkumavek určených do kapiláry.

3.1.7. Separace v kapilární elektroforéze

Pro separaci v kapiláře byl využit genetický analyzátor ABI PRISM 310 (obrázek č. 7). Jako separační gel byl použit polymer POP4 TM (Applied Biosystems). Separace probíhala ve 47 cm dlouhé kapiláře o průměru 50 µm.

Obrázek č. 7 - Genetický analyzátor ABI PRISM 310



Podmínky elektroforézy:

Modul: P4Std(1mL)E 150s.

Nasátí vzorku: 1 kV po dobu 30 s.

Vlastní elektroforéza: 26 minut při teplotě 50 °C při napětí 11,3 kV.

Směs přečištěného sekvenačního produktu s 15 μ l Hi Di formamidu byla 2 - 3 minuty denaturována při 95°C, ihned zchlazena na ledu a aplikována do sekvenátoru. Data byla shromažďována pomocí ABI PRISM 310 Data Collection software a vyhodnocena pomocí Sequencing Analysis (oboje Applied Biosystems). Výsledky byly srovnány s referenční genomickou sekvencí

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7258&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum) za pomoci programu BLAST (Basic local alignment search tool).

3.2. Statistika sekvenční analýzy

Porovnání výskytu jednotlivých změn v 1. exonu genu TSPY bylo provedeno pomocí Fisherova přesného testu. Vzhledem k vysokému počtu opakování (test byl opakován celkem 63krát) byla provedena korekce pro adjustaci p-hodnot na problém mnohonásobného testování, zajišťující maximálně 5 % falešně pozitivních výsledků mezi všemi pozitivními výsledky (Benjamini a Hochberg 1995).

Srovnání poměru mužů s počtem kopií nad a pod hranicí 0,58 mezi první a druhou podskupinou infertilních mužů bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu.

Srovnání výsledků spermioqramu mezi uvažovanými podskupinami infertilních mužů bylo provedeno pomocí Pearsonova Chí-kvadrát testu.

Zvolená hladina významnosti testů α je rovna 0,05.

Všechny výše popsané metody byly provedeny ve statistickém programu *R.2.8.1*

3.3. MOLEKULÁRNĚ-CYTOGENETICKÁ KVANTIFIKACE GENU TSPY

Tabulka č. 5 - Soubor vyšetřovaných pacientů a vzorků z tkání

Diagnóza	Typ vzorku	Typ vyšetření	Celkem vyšetření včetně kontrol
Seminom Gonadoblastom Y sekvence u Turnerova syndromu	tkáň v parafinovém bločku/nativní tkáň	Imunofluorescence	19
		In situ PCR	15

Vzorky pacientů s tumorem a vzorky z tumorů byly shromážděny ve spolupráci s následujícími institucemi:

Ústavem patologie při LF UP Olomouci (MUDr. Marie Geierová)
Dětskou klinikou při FN Olomouc (Doc. MUDr. Jiřina Zapletalová, Ph.D.)
MOU Brno (MUDr. Věra Hořínová)

Izolace z tkání uložených v parafinových bločcích

Deparafinizace: pět 10 μ m řezů z každého vzorku bylo ponořeno do 1 ml xylenu (2 x 10 min při RT), poté byly vzorky centrifugovány při 15 000 x g a supernatant odstraněn. Peleta byla 2krát promyta v roztoku xylen – ethanol (1:1) a 2krát v absolutním ethanolu.

Vlastní DNA extrakce byla provedena kitem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

3.3.1. In situ PCR (PRINS)

Použité reagensy: xylen (směs izomerů), 0,02M HCl, PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄), ethanol, 0,01% Triton X 100 v PBS, 0,1M Tris-HCl, 5mM EDTA, 20% kys. octová, deionizovaná voda, 0,5 X SSC.

a/ Příprava preparátů pro PRINS - ve spolupráci s Laboratoří experimentální medicíny při Dětské klinice v Olomouci byly z bločku upnutého do mikrotomu nakrájeny histologické řezy o tloušťce 4-5 μ m.

Řezy byly přeneseny na teplou vodní hladinu a poté štětečkem opatrně umístěny na podložní sklíčko, potažené 3-aminopropylethoxysilanem a nechaly se dále rozpínat na temperované podložce. Poté skla s řezy zasychala v termostatu při 50-60°C po dobu 36 až 48 hodin.

b/ Odstranění parafínu - následovalo odstranění zalévacího média pomocí xylenové lázně. Řezy byly ponořeny postupně do 3 třech Coplinových nádob s xylenem, vždy po 10 minutách.

c/ Zavodnění tkáně - vzorky byly promyty v sestupné alkoholové řadě (např. 100 %, 75 %, 50 % a 25 %), potom na 10 minut vloženy do 0,02 M HCl a dále na 2 minuty do PBS pufru.

Následně byly řezy vloženy na 1,5 minuty do 0,01% Tritonu X 100 v PBS a dále na 2 minuty už jen v PBS.

d/ Zpřístupnění DNA - vzorky byly přeneseny do další Coplinovy nádoby, obsahující 2,5 µg/ml proteinázy K v 0,1 M roztoku Tris-HCl, 0,005M EDTA o pH=7,5. Nádoba se skly byla umístěna do termostatu, který byl předehřátý na 37°C. Zde byla ponechána 30 minut.

Následovala inhibice proteinázy tak, že Coplinovu nádobu se skly byla umístěna do termostatu na 40-45°C po dobu 10 minut. Poté byla nádobka vyjmuta a po 2 minutách při pokojové teplotě opět vložena do termostatu na 10 minut při teplotě 40-45°C.

Vzorky byly vyjmuty, přeneseny do jiné nádoby a bylo přilito 20% kys. octová, která má cca 4°C po dobu 15 sekund.

Vzorky byly vloženy na 2 minuty do PBS a potom na 2 minuty do deionizované vody.

e/ Odvodnění tkáně - vzorky prošly vzestupnou ethanolovou řadou. Řezy byly před samotnou PCR uchovávány v absolutním alkoholu.

f/ PCR - skla vzorků byla vyjmuta z ethanolu, vysušena v sušičce či na vzduchu tak, aby nebyl přítomen žádný ethanol.

Skla byla umístěna na předehřáté plato a na vzorek abylo plikováno 50 µl reakční směsi dle tabulky č. 6. Krycí sklo bylo opatrně přiklopeno a po obvodu pokryto lepidlem Fixogum, abychom se roztoku neodpařoval. Lepidlo zasychalo asi 10-15 minut. Skla byla vložena do vlhké komůrky PTC 200 Peltier Thermal cycleru.

Tabulka č. 6 - Reakční směs pro in situ PCR v objemu 50 µl

komponenty	objem
pufr	5 µl
dATP	0,25 µl (200 µM)
dCTP	0,25 µl (200 µM)
dGTP	0,25 µl (200 µM)
dTTP	0,25 µl (200 µM)
Primer r	30 pmol

Primer f	30 pmol
MgCl ₂	5 µl
polymeráza	0,5 µl
Fluorescein 12-dUTP*	0,3 µl
Deionizovaná H ₂ O	29,2 µl
Celkový objem	50 µl

*komerčně dodaný fluorescein měl koncentraci 25 nmol.

PCR Podmínky:

krok 1- denaturace při 94°C po dobu 4,5 minuty

krok 2- denaturace při 94°C po dobu 30 sekund

krok 3 – nasednutí primerů po dobu 1,5 minuty

krok 4 – zpět na krok 2

Reakce se opakuje v 31 cyklech.

g/ Odmytí nenavázaných nukleotidů - po skončení PCR se lepidlo sloupne ze skla, opatrně odklopí. Vzorky byly promyty v tzv. stop pufru (0,5 X SSC) 5 minut při teplotě 65°C a dále v promývacím pufru (PBS) při pokojové teplotě.

h/ Podbarvení - na vzorek bylo přikápnuto 10 µl DAPI kvůli podbarvení. Následovalo hodnocení řezů pod mikroskopem a analýza signálu

Vzorky byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX 600 na dvou jednoduchých filtrech (DAPI a zelený) a dvou dvojitých filtrech (modročervený a červenozeleň).

3.3.2. Imunofluorescenční analýza

Navržení a příprava značené protilátky pro imunofluorescenci

Protilátka byla vytvořena imunizací králíka a slepice pomocí syntetického oligopeptidu, shodného se sekvencí aminokyselin genu TSPY. Tento oligonukleotid byl navržen pomocí programu Max Vector 7.2.2 s ohledem na antigenicitu a hydrofobilitu. Navržená sekvence REEAQPRQQA VPGPGP byla dále optimalizována a mírně posunuta směrem k C-terminálnímu konci. Po připojení Cysteinu k N-terminálnímu a C-terminálnímu konci byla kvůli úspěšné konjugaci k nosiči (KLH - Keyhole limpet hemocyanin nebo BSA – bovinní

sérový albumin) konečná verze oligonukleotidu následující: C-LVERREEAQPRQAV - CONH₂.

Samotnou protilátku včetně přečištění a značení (FITC) vyráběla firma AgriSera AB (Švédsko).

3.3.2.1. Příprava mikroskopických preparátů

Řezy z nativních tkání a parafinových bločků byly provedeny ve spolupráci s Laboratoří experimentální medicíny při FN Olomouc.

a) Preparáty z tkání v parafinových bločcích pro imunofluorescenci:

Tato metodika vyžaduje ve svém postupu určitou zkušenost s tímto typem tkání. Nejprve musí být co nejefektivněji odstraněn parafin a poté je nutné zpřístupnit tkáň, aby se protilátka mohla specificky navázat. Způsob a kvalita deparafinizace a ošetření blokačním mlékem patří mezi nejdůležitější kroky v protokolu:

Deparafinizace:

- 1) Xylen I – 10 min.
- 2) Xylen II – 10 min.
- 3) Xylen III – 10 min.
- 4) 100% EtOH – 10 min.
- 5) 100% EtOH – 10 min.
- 6) 95% EtOH – 10 min.
- 7) opláchnutí v dest. H₂O
- 8) promytí ve studené tekoucí vodě (preparáty nechat v tekoucí vodě do doby než bude připraven roztok na odmaskování epitopů v mikrovlnce).

Postup:

- 1) 5 min. promývání v Coplinově nádobě s 1 x PBS.

Příprava roztoku 1 x PBS: 100 ml 10 x PBS do 1 litru destilované vody

- 2) Blokace 1 hod. v Coplinově nádobě s blokačním mlékem.

Příprava blokačního mléka:

3 % LFM (Low-fat milk)	3 g
2 % ALB (albumine-bovine, Sigma)	2 g
0.1 % NaN ₃	1 ml (ze zásobního 10% roztoku NaN ₃)
1 x PBS	100 ml

Příprava roztoku 1 x PBS: 10 ml 10 x PBS do 100 ml destilované vody

3) 2 x rychlé opláchnutí v 1 x PBS v koplince.

4) Primární protilátka – ve vlhké komůrce

IgY antibodies against antigen: CLV 16

Ředění protilátky IgY antibodies against antigen CLV 16:

1 µg/ml.....Ř 640....640 µg

1,56 µl do 1000 µl ředícího roztoku

IgG antibodies against antigen: CLV 16

Ředění protilátky IgG antibodies against antigen: CLV 16:

1 µg/ml.....Ř 1360....1360 µg

1,4 µl do 1000 µl ředícího roztoku

Ředící roztok pro primární protilátku:

900 µl	1 x PBS
100 µl	FCS (Fetální sérum)
10 µl	0.1% NaN ₃ (ze zásobního 10% roztoku NaN ₃)

Sklíčka byla před nanesením primární protilátky osušena (ale řez nesmí vyschnout!) a vložena do vlhké komůrky. Dále bylo naneseno 200 µl primární protilátky a vloženo do vlhké komůrky. Řez byl inkubován s primární protilátkou přes noc.

5) 2 x rychlé opláchnutí v 1 x PBS – koplinka

3 x 5 min. opláchnutí 1 x PBS – koplinka

6) Montování do DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol).

b) Příprava mikroskopických preparátů z nativních tkání pro imunofluorescenci:

5 µm tlusté řezy ze zamražených gonád byly zhotoveny na mikrotomu Cryostat Leica CM1850. Další postup:

1) ponoření do xylenu 15 min

2) 100% EtOH – 10 min.

3) 100% EtOH – 10 min.

4) 95% EtOH – 10 min.

5) promytí v destilované vodě (preparáty nechat v tekoucí vodě do doby než bude připraven roztok na odmaskování epitopů v mikrovlnce).

6) 5 min. promývání v Coplinově nádobě s 1 x PBS.

Příprava roztoku 1 x PBS: 100 ml 10 x PBS do 1 litru destilované vody

7) Blokace 1 hodinu v Coplinově nádobě s blokačním mlékem.

Příprava blokačního mléka:

3 % LFM (Low-fat milk)	3 g
2 % ALB (albumine-bovine, Sigma)	2 g
0.1 % NaN ₃	1 ml (ze zásobního 10% roztoku NaN ₃)
1 x PBS	100 ml

Příprava roztoku 1 x PBS: 10 ml 10 x PBS do 100 ml destilované vody

8) 2 x rychlé opláchnutí v 1 x PBS v Coplinově nádobě .

9) Primární protilátka (ve vlhké komůrce)

IgY antibodies against antigen: CLV 16

Ředění protilátky IgY antibodies against antigen: CLV 16:

1 µg/ml.....Ř 640....640 µg

1,56 µl do 1000 µl ředícího roztoku

IgG antibodies against antigen: CLV 16

Ředění protilátky IgG antibodies against antigen: CLV 16:

1 µg/ml.....Ř 1360....1360µg

1,4 µl do 1000 µl ředícího roztoku

Ředící roztok pro primární protilátku:

900 µl	1 x PBS
100 µl	FCS (Fetální sérum)
10 µl	0,1% NaN ₃ (Ze zásobního 10% roztoku NaN ₃)

Sklička byla před nanesením primární protilátky osušena (ale řez nesmí vyschnout!) a vložena do vlhké komůrky. Dále bylo naneseno 200 μ l primární protilátky a vloženo do vlhké komůrky. Řez byl inkubován s primární protilátkou přes noc.

- 10) 2 x rychlé opláchnutí v 1 x PBS – koplínka
3 x 5 min. opláchnutí 1 x PBS – koplínka

- 11) Montování do DAPI.

Všechny preparáty byly vyhodnoceny fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 60, při použití filtrů DAPI, Red/Green dual, DAPI/Orange dual, Green firmy Vysis.

4. Výsledky

4.1. SEKVENAČNÍ ANALÝZA GENU TSPY

Gen TSPY byl podroben sekvenční analýze. U nalezených změn v sekvenci genu byl popsán typ mutace, její lokalizace, frekvence výskytu a případný vliv na protein na primární úrovni. Byly nalezeny 3 typy mutací: substituce, delece a inserce. Jejich frekvence se u jednotlivých vyšetřovaných skupin lišila.

Signifikantní změny byly nalezeny pouze v 5'UTR (UnTranslated Region) oblasti a prvním exonu.

4.1.1. 5'UTR

Promotorová oblast byla hodnocena u dvou největších vyšetřovaných skupin: infertilních mužů a kontrolní skupiny fertálních jedinců. Bylo nalezeno a popsáno pět nejčastějších polymorfismů, vyskytujících se v pozicích -80, -51, -50, -39 a -8 od začátku iniciačního kodónu ATG. Jednalo se vždy o substituce a vyskytovaly se u obou skupin a s podobnou frekvencí.

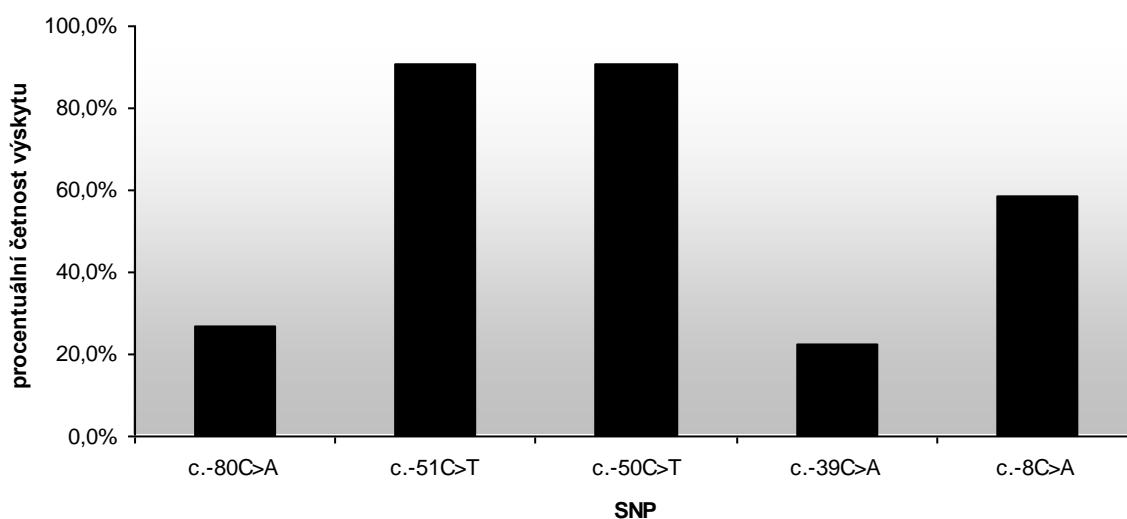
Ve skupině infertilních jedinců byly nejčastější polymorfismy v pozicích -51 a -50 (proti směru začátku transkripce); vyskytovaly se i stejně často. V obou polohách se jednalo o substituci cytosinu za thymin a to tak, že buď došlo k úplné substituci, byly přítomny oba nukleotidy (podobně jako u heterozygota, ale toto srovnání je kvůli multikopiovému charakteru nevhodné) nebo původní nukleotid zůstal. U přibližně 2/3 infertilních mužů byl přítomen buď původní thymin nebo oba nukleotidy současně, ale u 1/3 mužů byl původní nukleotid zcela nahrazen cytosinem.

Tabulka č. 7 – Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – infertilní muži

c.-80C>A	c.-51C>T	c.-50C>T	c.-39C>A	c.-8C>A
26,7 %	90,5 %	90,5 %	22,7 %	58,7 %
20	43/24T*	43/24T*	17	44

*... 43 mužů má přítomno oba nukleotidy současně, u 24 mužů thymin zcela nahradil cytosin

Obrázek č. 8 – Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – infertilní muži



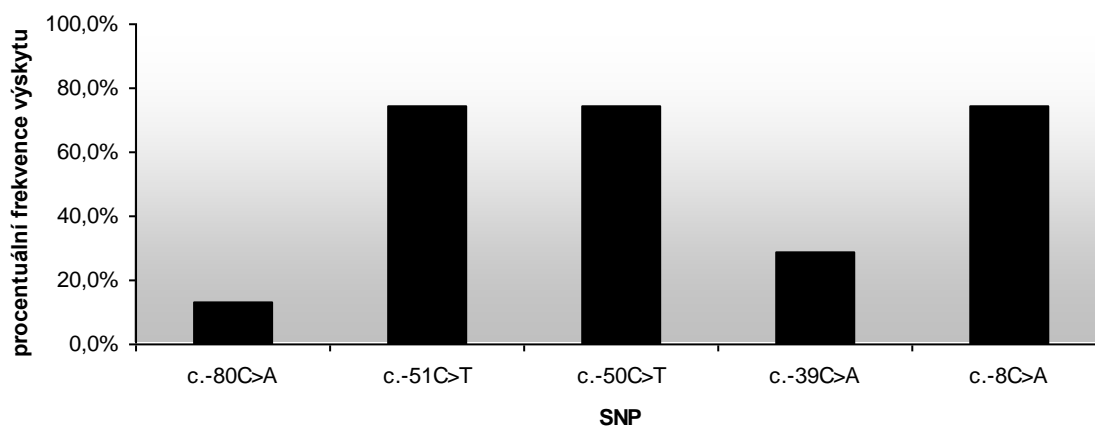
Osa X – pět nejčetnějších jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v oblasti 5'UTR genu TSPY ve skupině infertilních mužů. Nejčetnější polymorfismy jsou v polohách -51 a -50. Na ose Y je procentuálně vyjádřena frekvence výskytu jednotlivých polymorfismů.

V kontrolní skupině bylo pozorováno stejných pět nejčastějších polymorfismů. Nejvíce se vyskytovaly substituce v polohách, -51 a -50 (proti směru začátku transkripce) stejně jako tomu bylo u infertilních jedinců. V této skupině byl vždy přítomen buď jen původní nukleotid nebo oba současně.

Tabulka č. 8 – Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – kontroly

c.-80C>A	c.-51C>T	c.-50C>T	c.-39C>A	c.-8C>A
12,9 %	74,2 %	74,2 %	29,0 %	74,2 %
4	23	23	9	23

Obrázek č. 9 – Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – kontroly

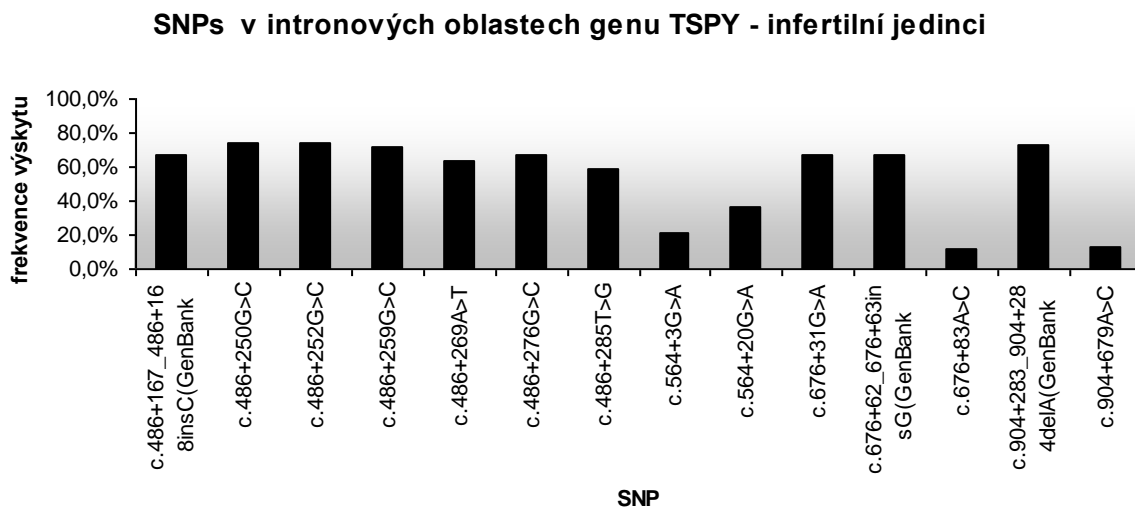


Osa X – pět nejčtenějších jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v oblasti 5'UTR genu TSPY ve skupině kontrolních jedinců. Nejčtenější polymorfismy jsou v polohách -51 a -50. Na ose Y je procentuálně vyjádřena frekvence výskytu jednotlivých polymorfismů.

4.1.2 Intronové oblasti

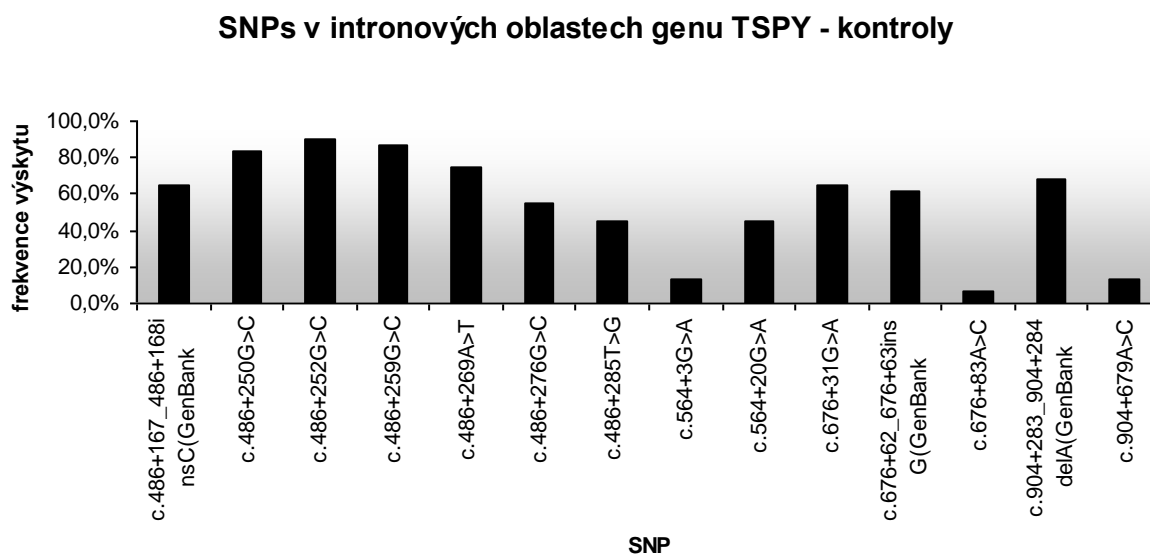
Polymorfismy byly nalezeny ve čtyřech z pěti intronů. Nejčastěji se jednalo o substituce, ale byly nalezeny i dvě inserce a jedna delece (srovnáno se sekvencí GenBank AF106331). Nejvíce SNP bylo nalezeno v prvním intronu. U infertilních mužů byly nejčastější substituce v pozicích c.486+250G>C a c.486+252G>C, u kontrol c.486+252G>C, u mužů se seminomem delece c.904+283_904+284delA a u Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem se většina změn vyskytovala u obou pacientek. Naopak substituce c.564+3G>A a c.676+83A>C nebyly u těchto pacientek pozorovány vůbec.

Obrázek. č. 10 - Frekvence výskytu polymorfismů v intronových oblastech TSPY genu – infertilní muži



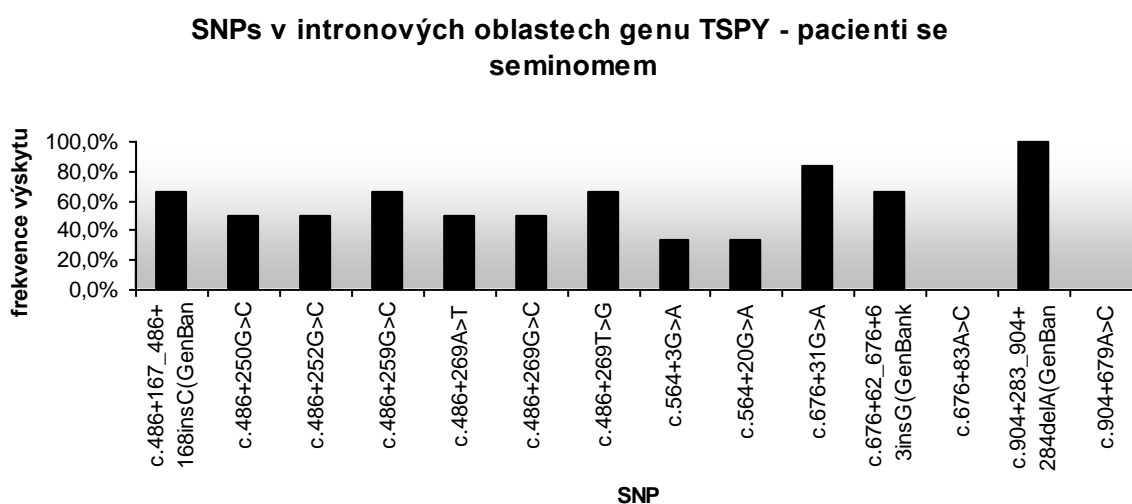
Osa X – 14 nejčastějších jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v intronových oblastech genu TSPY u infertilních mužů. Na ose Y je procentuálně vyjádřena frekvence výskytu jednotlivých polymorfismů.

Obrázek č. 11 - Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – kontroly



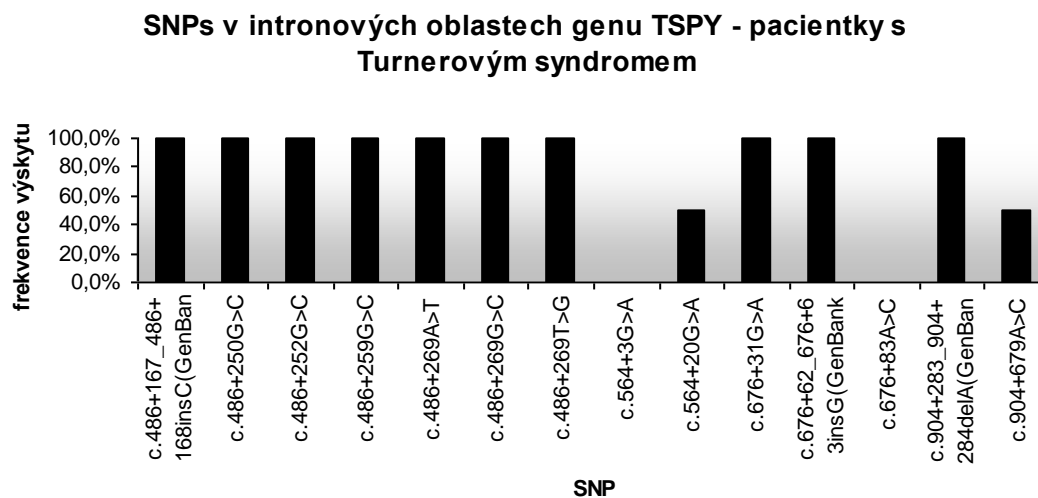
Osa X – 14 nejčastějších jednonukleotidových polymorfismů v intronových oblastech genu TSPY u kontrolního souboru. Na ose Y je procentuálně vyjádřena frekvence výskytu jednotlivých polymorfismů.

Obrázek č. 12 - Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – pacienti se seminomem



Osa X – 14 nejčastějších jednonukleotidových polymorfismů v intronových oblastech genu TSPY u pacientů se seminomem. Na ose Y je procentuálně vyjádřena frekvence výskytu jednotlivých polymorfismů.

Obrázek č. 13 - Frekvence výskytu polymorfismů v 5' UTR oblasti TSPY genu – Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem



Osa X – 14 nejčastějších jednonukleotidových polymorfismů v intronových oblastech genu TSPY u Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem. Na ose Y je procentuálně vyjádřena frekvence výskytu jednotlivých polymorfismů.

Tabulka č. 9 – Frekvence substitucí, delecí a inzercí v intronových oblastech genu TSPY v jednotlivých vyšetřovaných skupinách

substituce	inzerce	delece
------------	---------	--------

Intron	Polymorfismus, poloha v genu	Infertilní muži		Kontroly		Pacienti se seminomem		Pacientky s TS	
		75	celkem	31	celkem	6	celkem	2	celkem
intron 1	c.486+167_486+168insC(GenBank AF106331)	66,7%	50	64,5%	20	66,7%	4	100,0%	2
intron 1	c.486+250G>C	74,7%	56	83,9%	26	50,0%	3	100,0%	2
intron 1	c.486+252G>C	74,7%	56	90,3%	28	50,0%	3	100,0%	2
intron 1	c.486+259G>C	72,0%	54	87,1%	27	66,7%	4	100,0%	2
intron 1	c.486+269A>T	64,0%	48	74,2%	23	50,0%	3	100,0%	2
intron 1	c.486+276G>C	66,7%	50	54,8%	17	50,0%	3	100,0%	2
intron 1	c.486+285T>G	58,7%	44	45,2%	14	66,7%	4	100,0%	2
intron 2	c.564+3G>A	21,3%	16	12,9%	4	33,3%	2	0,0%	0
intron 2	c.564+20G>A	36,0%	27	45,2%	14	33,3%	2	50,0%	1
intron 3	c.676+31G>A	66,7%	50	64,5%	20	83,3%	5	100,0%	2
intron 3	c.676+62_676+63insG(GenBank AF106331)	66,7%	50	61,3%	19	66,7%	4	100,0%	2
intron 3	c.676+83A>C	12,0%	9	6,5%	2	0,0%	0	0,0%	0
intron 5	c.904+283_904+284delA(GenBank AF106331)	73,3%	55	67,7%	21	100,0%	6	100,0%	2
intron 5	c.904+679A>C	13,3%	10	12,9%	4	0,0%	0	50,0%	1

Polymorfismy se vyskytovaly ve čtyřech z pěti intronů, tabulka popisuje jejich polohu a povahu změny. Podle typu změny je tabulka barevně rozlišena. Bílá barva představuje substituce, světle šedá inserce a tmavě šedé jsou delece.

4.1.3 **Kódující oblasti – Exon 1**

V prvním exonu bylo zjištěno celkem 63 změn, což je více než ve všech zbylých pěti exonech dohromady. Byly rozmístěny po jeho celé délce. Navíc zde byly zjištěny zásadní změny v sekvenci, kvůli kterým byl exon 1 hodnocen zvlášť. Kvůli přílišné délce, byly pro exon 1 navrženy dva páry primerů. Bohužel se některé části exonu opakovaně nepodařilo sekvenovat, proto je počet jedinců pro první a druhou část exonu 1 různý.

Nejčastějším typem změny byla substituce s následnou změnou aminokyseliny. Vyskytovaly se zde ale i delece a inserce. Všechny změny v sekvenci exonu 1 jsou uvedeny v tabulce č. 10. Nejdůležitějším objevem byla 4bp delece a 2bp substituce v pozici 36 – 42

(c.36_42 AGAGAGG>CAT), kde byla sekvence AGAGAGG nahrazena CAT (obrázek č. 15). Tento typ změny byl nalezen u přibližně poloviny infertilních mužů, všech pacientů se seminomem a obou Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem. U jedinců, kteří měli tuto delecii, se dále vyskytovaly i další charakteristické změny v sekvenci. Na základě této významné odlišnosti byly infertilní muži rozděleni do dvou podskupin.

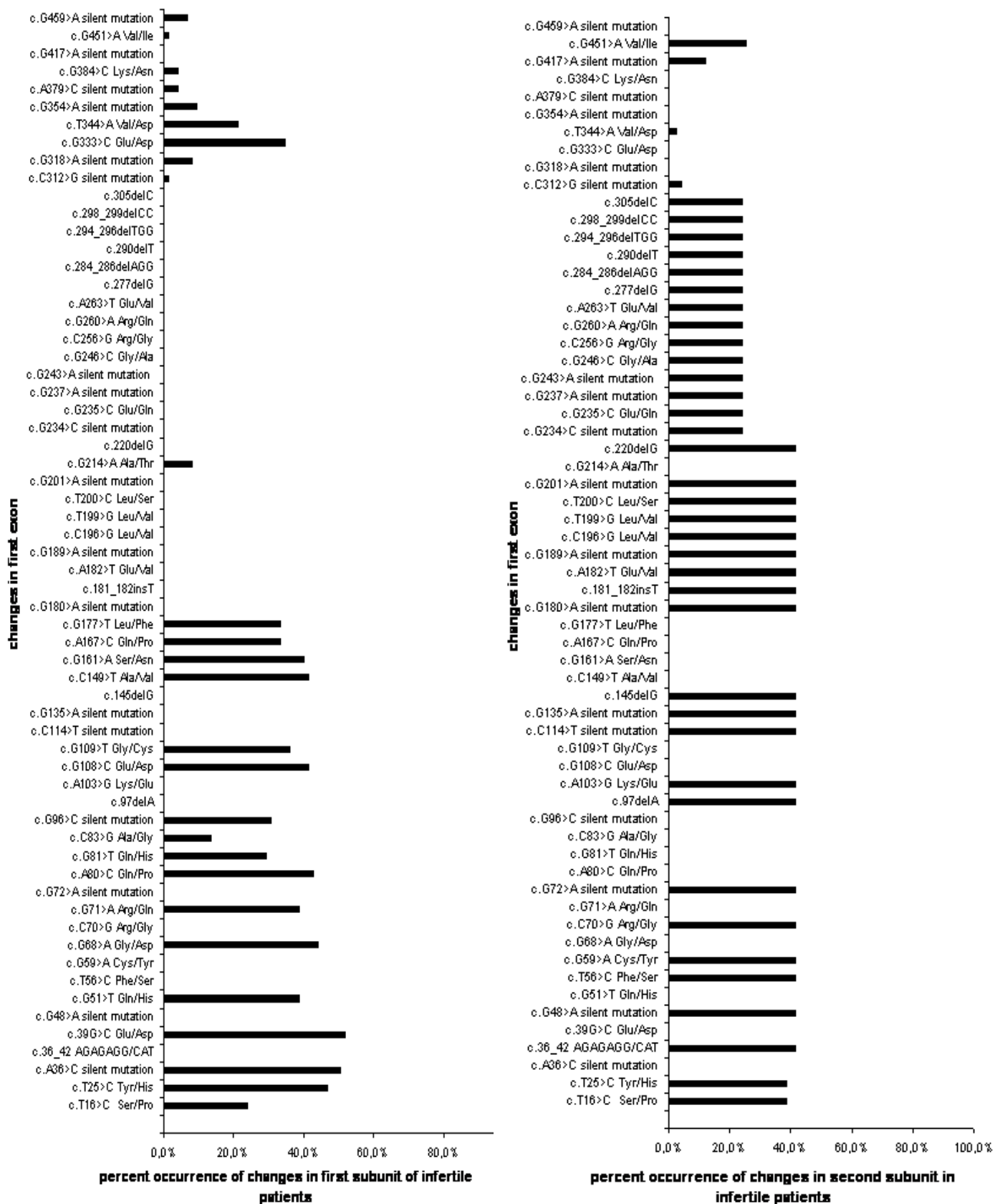
4.1.3.1 **Infertilní muži**

4.1.3.1.1 *První podskupina*

Zde byly sledovány nejčastější změny v sekvenci. Bylo jich 26 a vždy se jednalo o substituce. Devatenáct těchto substitucí (73 %) znamenalo změnu aminokyseliny (obrázek č. 14). Dále zde byla pozorována u jednoho muže substituce c.G451>A (Val/Ile), jež se vyskytovala jen u druhé skupiny infertilních mužů. SNP c.G214>A (Ala/Thr) byl jediným polymorfismem, jenž se vyskytoval pouze u infertilních mužů a žádného jiného vyšetřovaného jedince. Delece ani inserce u této skupiny infertilních mužů pozorovány nebyly (obrázek č. 14 a 15).

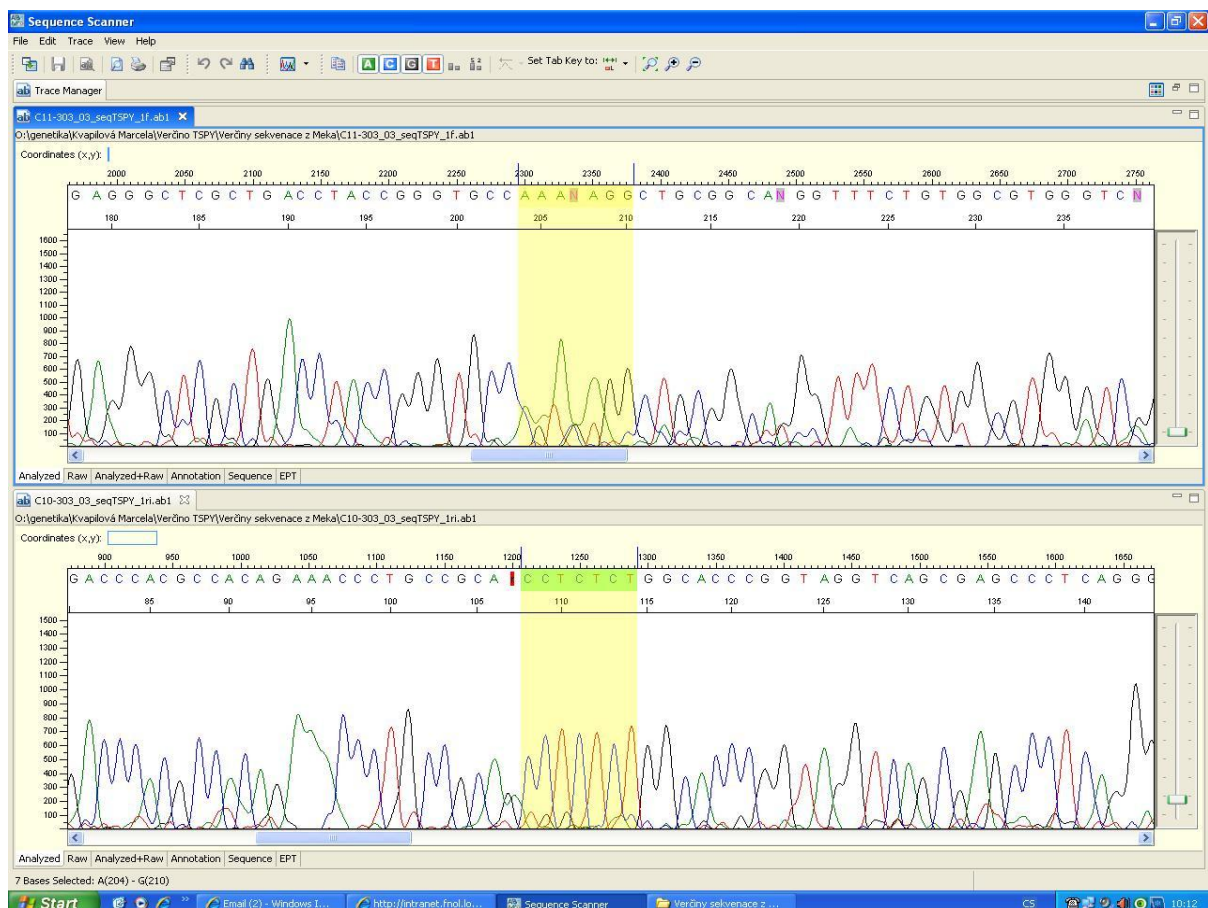
Obrázek.č. 14 – Srovnání SNPs v 1. exonu genu TSPY mezi 1. a 2. podskupinou infertilních mužů

mužů



Graf v levé části ukazuje četnost výskytu jednotlivých změn v exonu 1 genu TSPY, a to u první podskupiny infertilních mužů. Osa X – Procentuálně vyjádřená četnost nejfrekventovanějších změn. Většina polymorfismů nepřesáhne polovinu. Osa Y – výčet všech změn, jež byly nalezeny u infertilních mužů: substituce, delece a inserce. Zde jsou zastoupeny pouze substituce. Graf v pravé části obrázku znázorňuje četnost výskytu všech změn prvního exonu genu TSPY ve druhé podskupině infertilních jedinců. Osa X – Procentuálně vyjádřená četnost nejfrekventovanějších změn. Osa Y – výčet všech změn, jež byly nalezeny u infertilních mužů: substituce, delece a inserce. U této skupiny se vyskytovaly jiné substituce než na grafu v levé části.

Obrázek č. 15 – Sekvence prvního exonu u infertilních mužů z 1. podskupiny (sekvence srovnaná v programu BLAST; zde se delece v pozici 36-42 nevyskytovala)



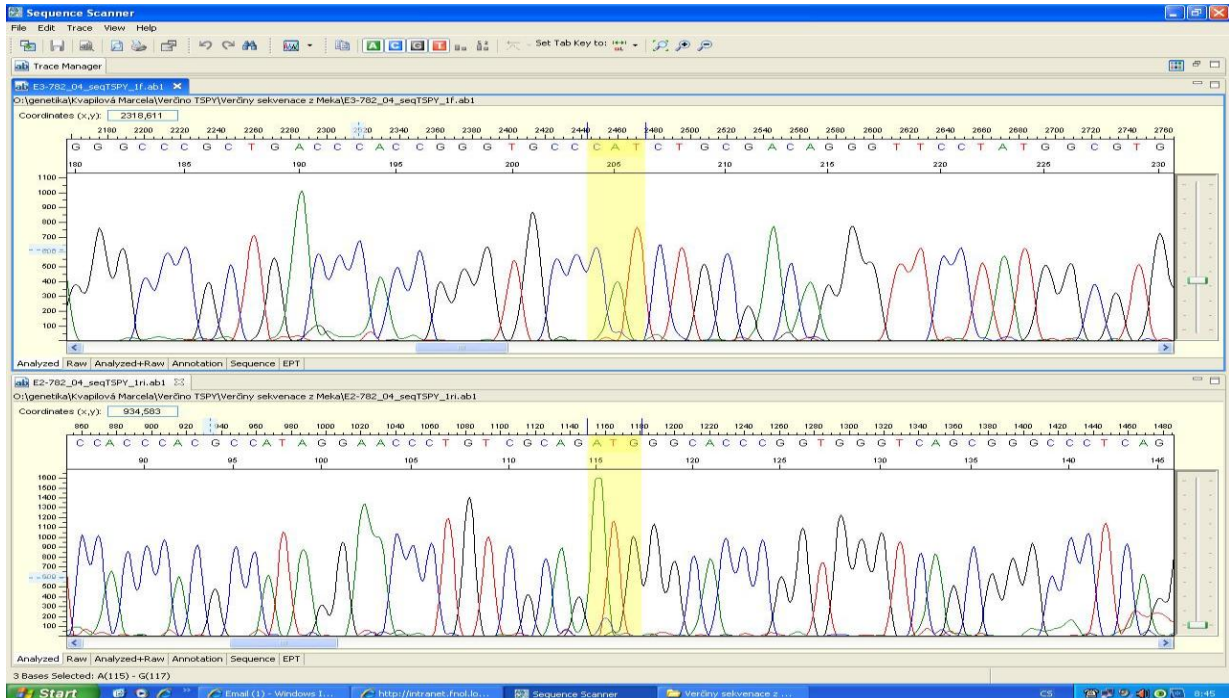
4.1.3.1.2 *Druhá podskupina*

Sekvence prvního exonu této skupiny infertilních mužů se od ostatních infertilních mužů lišila v několika zásadních bodech. Byly zde přítomné delece (obrázek č. 14 a 16), inserce a za delecí v pozici 36 – 42 byly nalezeny substituce na zcela jiných pozicích než u ostatních infertilních jedinců a kontrol. Navíc v pozicích c.T16>C a c.T25>C byly oba původní nukleotidy zcela nahrazeny. Obě změny byly potvrzeny v protilehlém řetězci.

Následující změny v sekvenci se již lišily od ostatních infertilních mužů. Bylo pozorováno celkem 54 substitucí, delece v pozicích 36 – 42 (zde zřejmě jeden původní adenin zůstal), 97, 145, 220, 284 – 286, 290, 294 – 296, 298 – 299 a 305. V pozici c.181_182insT byla pozorována i jedna inserce thyminu (obrázek č. 14).

Při součtu všech těchto změn je původní délka prvního exonu (486 nukleotidů) zkrácena o 17 nukleotidů a dojde k posunutí čtecího rámce. Žádná z těchto změn nebyla pozorována v kontrolním souboru fertálních jedinců.

Obrázek č. 16 – Elektroforetogram prvního exonu u mužů z 2. infertilních mužů (delece v pozici 36-42 a sekvence srovnaná v programu BLAST)

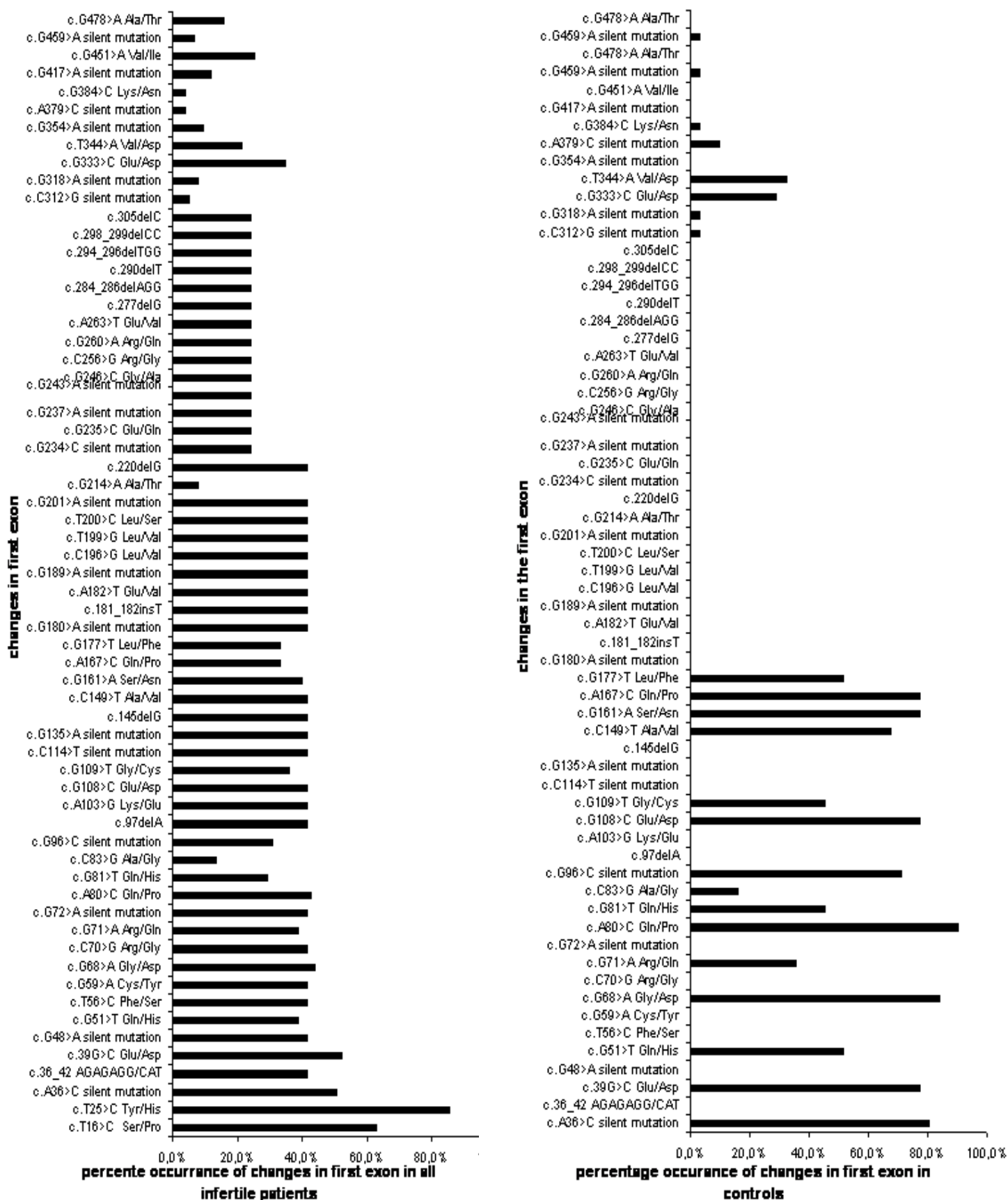


Features in this part of subject sequence:
testis specific protein, Y-linked 1

Score = 634 bits (343), Expect = 2e-179
Identities = 509/587 (87%), Gaps = 32/587 (5%)
Strand=Plus/Plus

Query	13	GGGCTGGAAAATGCAGGCGCGCCCGTNNCTTTGCAGCCCAGGGAANACGCCCGCCGCCCT	72
Sbjct	13135	GGGCTGG-AGATGCAGGCCCGCCAGTGGCTGTGCCCGCCAGGG-AGACGCCACCGCCCT	13192
Query	73	CCCATTGATTGNCCATGAAGGGAAGGAAGTTCGGCCTGGGTGCGGCCCTTGGCCCTTAGC	132
Sbjct	13193	CCCATTGATTGGCCACGACGGG-AGGAAGTTCGGCCTGGGTGCGGCCCGCCCGCCCTTCGC	13251
Query	133	GCGCAGTCCCTTAGGGGTCTCCTGGAACCCGCGGCATGCGCCCTGAGGGCCCGCTGACC	192
Sbjct	13252	GCGCAGTCCCTTAGGGGGCGCCTGGAAGCCCGCGGCATGCGCCCTGAGGGCTCGCTGACC	13311
Query	193	CACCGGGTGCC---CA-TCTGCGACAGGTTTCTATGGCGTGGGT-GGAGCAGCACAGGC	247
Sbjct	13312	TACCGGGTGCCAGAGAGGCTGCGGCAGGTTTTCTGTGGCGTGGGTGCG-GCAGCACAGGC	13370
Query	248	CTTGGTGTGTGCG-GTGCCGAGGAGGGCACTGCCTTCAGGATGGAGGCTGTACAGGA-GG	305
Sbjct	13371	CTTGGTGTGTGCGAGTGCCAAAGGAGGGCACCGCCTTCAGGATGGAGGCTGTGCAGGAGGG	13430
Query	306	GGCGGCCGGGGTGGAGAGTGAGCAGGCGGCTTTGGGAGTTGGAGGCAGTGCTGGTGGCAG	365
Sbjct	13431	GGCGGCCGGGGTGGAGAGTGAGCAGGCGGCTTTGGGGGA-GGAGGCGGTGCTGCTGTTGG	13489
Query	366	ATGACATAATGGCGGAGGTGGAGGTGGTGGCCCAAGANGAGGCCCTCGTGGAGGGGCAGG	425
Sbjct	13490	ATGACATAATGGCGGAGGTGGAGGTGGTGGCGGAGGAGGAGGCCCTCGTGGAGCGGCGGG	13549
Query	426	TGGAGGCCAGCGGGCACAGC---CTG-GCC---C--TGGGCC-ATGACCC-AGAGTCTG	474
Sbjct	13550	AGGAGGCCAGCGGGCACAGCAGGCTGTGCCTGGCCCTGGGCCATGACCCAGAGTCTG	13609
Query	475	CACTGGAGGAGCTGCTGGCCGTTTCAGGTGGAGCTGGAGCCGGTTA-TGCCCA-GCCAGGA	532
Sbjct	13610	CACCGGAGGAGCTGCTGGCCGTTTCAGGTGGAGCTGGAGCCGGTTAATGCCCAAGCCAGGA	13669
Query	533	AGGC-TTT-CTCGGCAGCGG-AAAN-ATG-AGCGAAG-CGCA-GCCC	572
Sbjct	13670	AGGCCTTTTCTCGGCAGCGGGAAAAGATGGAGCGGAGGCGCAAGCCC	13716

Obrázek č. 17 – Srovnání SNPs v 1. exonu genu TSPY mezi infertilními jedinci a kontrolami



Na grafu v levé části je znázorněna frekvence všech nalezených změn v exonu 1 genu TSPY u všech infertilních mužů dohromady. Osa X – Procentuálně vyjádřená četnost nejčastějších změn. Osa Y – výčet všech změn, jež byly nalezeny u infertilních mužů: substituce, delece a inserce. Graf v pravé části znázorňuje četnost nalezených změn v exonu 1 genu TSPY u kontrolního souboru. Osa X – Procentuálně vyjádřená četnost nejčastějších změn. Osa Y – výčet všech změn, jež byly nalezeny u infertilních mužů. Vyskytují se zde pouze substituce.

Tabulka č. 10 – Frekvence substitucí, delecí a insercí v prvním exonu genu TSPY v jednotlivých vyšetřovaných skupinách

substituce	substituce (posunutý RF)	delece	inzerce
------------	--------------------------	--------	---------

Vzorek	Infertilní muži		Kontroly		Seminomy		Turnerův syndrom	
	72	počet	31	počet	6	počet	2	počet
polymorfismus, změna aminokyseliny								
c.T16>C Ser/Pro	65,3%	47	16,1%	5	0,0%	0	0,0%	0
c.T25>C Tyr/His	88,9%	64	58,1%	18	0,0%	0	0,0%	0
c.A36>C tichá mutace	52,8%	38	80,6%	25	0,0%	0	0,0%	0
c.36_42 AGAGAGG/CAT	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.39G>C Glu/Asp	54,2%	39	77,4%	24	0,0%	0	0,0%	0
c.G48>A tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G51>T Gln/His	40,3%	29	51,6%	16	0,0%	0	0,0%	0
c.T56>C Phe/Ser	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G59>A Cys/Tyr	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G68>A Gly/Asp	45,8%	33	83,9%	26	0,0%	0	0,0%	0
c.C70>G Arg/Gly	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G71>A Arg/Gln	40,3%	29	35,5%	11	0,0%	0	0,0%	0
c.G72>A tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.A80>C Gln/Pro	44,4%	32	90,3%	28	0,0%	0	0,0%	0
c.G81>T Gln/His	30,6%	22	45,2%	14	0,0%	0	0,0%	0
c.C83>G Ala/Gly	13,9%	10	16,1%	5	0,0%	0	0,0%	0
c.G96>C tichá mutace	31,9%	23	71,0%	22	0,0%	0	0,0%	0
c.97delA	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.A103>G Lys/Glu	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G108>C Glu/Asp	43,1%	31	77,4%	24	0,0%	0	0,0%	0
c.G109>T Gly/Cys	37,5%	27	45,2%	14	0,0%	0	0,0%	0
c.C114>T tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G135>A tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.145delG	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.C149>T Ala/Val	43,1%	31	67,7%	21	0,0%	0	100,0%	2
c.G161>A Ser/Asn	41,7%	30	77,4%	24	0,0%	0	100,0%	2
c.A167>C Gln/Pro	34,7%	25	77,4%	24	0,0%	0	100,0%	2
c.G177>T Leu/Phe	34,7%	25	51,6%	16	0,0%	0	100,0%	2
c.G180>A tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.181_182insT	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.A182>T Glu/Val	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G189>A tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2

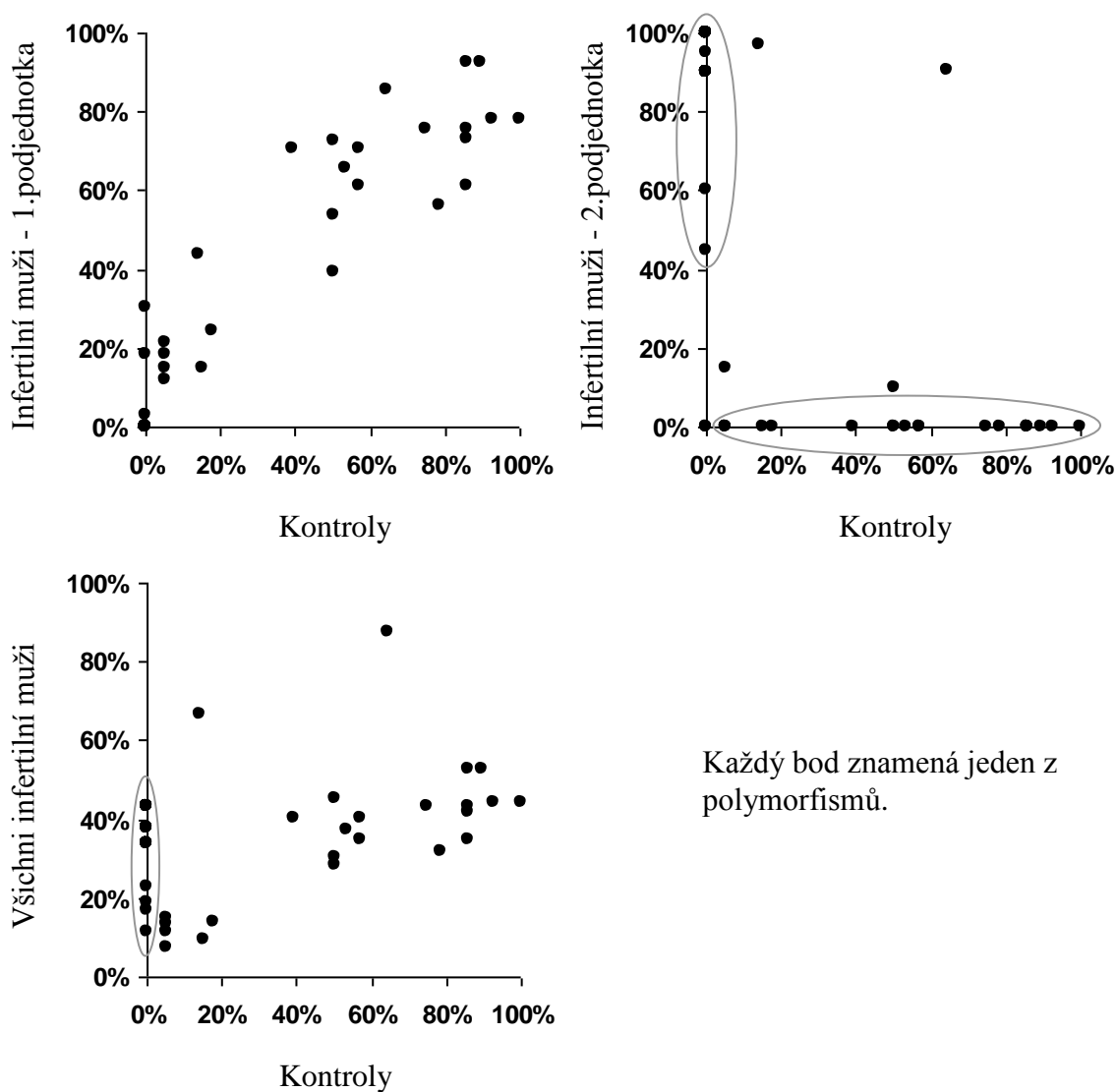
c.C196>G Leu/Val	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.T199>G Leu/Val	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.T200>C Leu/Ser	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G201>A tichá mutace	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G214>A Ala/Thr	8,3%	6	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0
c.220delG	43,1%	31	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G234>C tichá mutace	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G235>C Glu/Gln	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G237>A tichá mutace	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G243>A tichá mutace	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G246>C Gly/Ala	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.C256>G Arg/Gly	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G260>A Arg/Gln	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.A263>T Glu/Val	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.277delG	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.284_286delAGG	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.290delT	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.294_296delTGG	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.298_299delCC	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.305delC	25,0%	18	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.C312>G tichá mutace	5,6%	4	3,2%	1	0,0%	0	0,0%	0
c.G318>A tichá mutace	8,3%	6	3,2%	1	0,0%	0	0,0%	0
c.G333>C Glu/Asp	36,1%	26	29,0%	9	0,0%	0	0,0%	0
c.T344>A Val/Asp	22,2%	16	32,3%	10	0,0%	0	0,0%	0
c.G354>A tichá mutace	9,7%	7	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0
c.A379>C tichá mutace	4,2%	3	9,7%	3	16,7%	1	0,0%	0
c.G384>C Lys/Asn	4,2%	3	3,2%	1	0,0%	0	0,0%	0
c.G417>A tichá mutace	12,5%	9	0,0%	0	16,7%	1	50,0%	1
c.G451>A Val/Ile	26,4%	19	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2
c.G459>A tichá mutace	6,9%	5	3,2%	1	0,0%	0	0,0%	0
c.G478>A Ala/Thr	16,7%	12	0,0%	0	100,0%	6	100,0%	2

V tabulce je popsán typ mutace, jeho pozice v genu a případná změna aminokyseliny. Jednotlivé změny jsou dle významu barevně odlišeny. „Substituce“ jsou zobrazeny na bílém pozadí a vyskytují se především v první skupině infertilních jedinců a u kontrol. Zřejmě se tedy jedná o běžné jednonukleotidové polymorfismy (SNP). „Substituce v posunutém čtecím rámci (RF – reading frame)“ jsou ve světle šedém poli a vyskytují se od pozice 36-42, kde právě došlo k posunutí čtecího rámce. „Delece“ jsou zobrazeny v tmavě šedém poli a vyskytovaly se u druhé podjednotky infertilních mužů, pacientů se seminomem a Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem. „Inzerce“ je v černém poli. Vyskytovala se pouze v jediné pozici.

Tabulka č. 11 - Srovnání významnosti všech 63 změn mezi první a druhou podskupinou u infertilních mužů a kontrolami

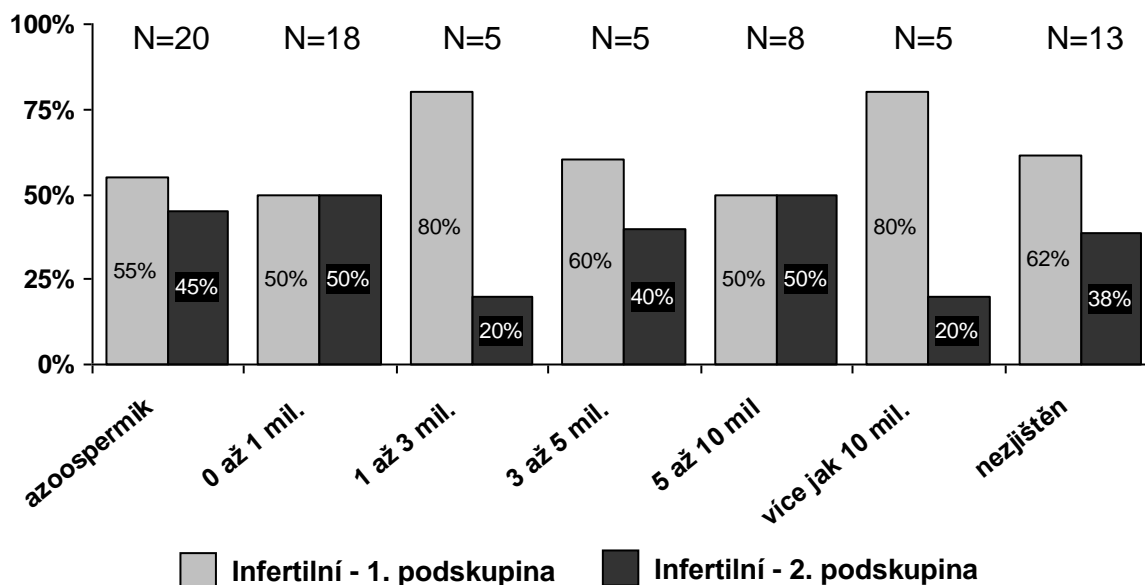
Srovnávané skupiny	Výsledky Fischerova přesného testu	
	Počet změn se statisticky významným rozdílem	Počet změn bez statisticky významného rozdílu
Kontroly x Infertilní muži	47 (74,6%)	16 (25,4%)
Kontroly x 1. podjednotka infertilních mužů	0 (0,0%)	63 (100,0%)
Kontroly x 2. podjednotka infertilních mužů	56 (88,9%)	7 (11,1%)

Obrázek č. 18 – Procentuální zastoupení změn 1. exonu v porovnávaných skupinách



4.1.3.1.3 Výsledky spermogramu u infertilních mužů

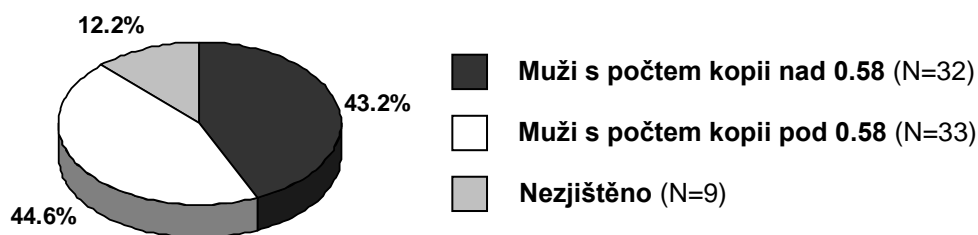
Obrázek č. 19 - Výsledky spermogramu u infertilních jedinců



Graf zobrazuje výsledky spermogramu vzhledem ke dvěma uvažovaným podskupinám infertilních mužů. Mezi první a druhou podskupinou infertilních mužů nebyl na hladině významnosti $\alpha=0,05$ prokázán statisticky významný rozdíl. Ve výsledku spermogramu je p-hodnota Pearsonova Chí-kvadrát testu rovna 0,755. Při výpočtu Pearsonova Chí-kvadrát testu byly vzhledem k nízkým četnostem sloučeny kategorie 1 až 3 miliony a 3 až 5 milionů, stejně tak 5 až 10 milionů a více jak 10 milionů.

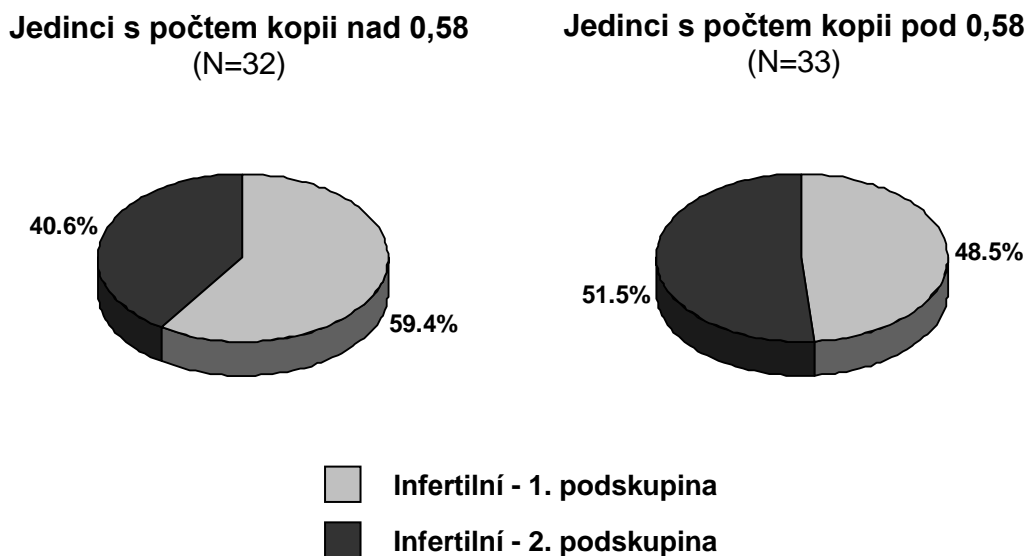
4.1.3.1.4 Srovnání počtu kopií genu TSPY vzhledem k uvažovaným skupinám

Obrázek č. 20 - Poměr infertilních mužů vzhledem k počtu kopií genu TSPY



Je zde zobrazen poměr infertilních mužů a počtu kopií genu TSPY vzhledem k mediánu výskytu (0,58). Z obrázku je patrné, že mezi infertilními muži jsou jedinci s počtem kopií genu nad i pod mediánem zastoupeni ve srovnatelné míře.

Obrázek č. 21 - Poměr podskupin infertilních mužů vzhledem k počtu kopií genu TSPY



Zobrazuje poměr dvou uvažovaných podskupin infertilních mužů vzhledem k počtu kopií genu TSPY.

Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ nebyl odhalen statisticky významný rozdíl v poměru infertilních mužů z první a druhé podskupiny mezi oběma uvažovanými kategoriemi.

p-hodnota Fisherova přesného testu je rovna 0,459.

4.1.3.2 Kontroly

Ve skupině infertilních jedinců bylo pozorováno stejných 26 nejčastějších SNP, jako v první podskupině infertilních jedinců (obrázek č. 17 a 18, tabulka č. 10). Nejvíce se vyskytovaly polymorfismy v polohách c.A80>C, c.G68>A, c.A36>C. V této skupině nebyly pozorovány žádné delece ani inserce.

4.1.3.3 Pacienti se seminomem

V této skupině byly pozorovány stejné typy polymorfismů jako v druhé podskupině infertilních jedinců, tedy substituce, delece a inserce vedoucí k posunutí čtecího rámce.

4.1.3.4 Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem

V této skupině dvou pacientek byly pozorovány stejné změny v sekvenci prvního exonu jako u druhé podskupiny infertilních jedinců a u pacientů se seminomem.

Stejně jako u skupiny pacientů se seminomem i v souboru Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem je třeba přihlídnout k faktu, že se jedná o velmi malé soubory a výsledky tedy nejsou zcela parametrické.

4.1.4 Kódující oblasti – Exony 2, 3, 4, 5, 6

Ve zbylých pěti exonech bylo zjištěno celkem 12 polymorfismů. Vždy se jednalo o substituce, 83 % z nich vedlo ke změně aminokyseliny. Všechny změny v exonech 2, 3, 4, 5 a 6 jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12 – Polymorfismy v exonech 2, 3, 4, 5 a 6 genu TSPY

Poloha a typ substituce Změna AK	infertil. muži		kontroly		seminomy		TS	
	75	počet	31	počet	6	počet	2	počet
c.493A>C Asn/His	66,7%	50	58,1%	18	83,3%	5	0,0%	0
c.526G>C Glu/Gln	36,0%	27	38,7%	12	66,7%	4	0,0%	0
c.553G>A, Val/Ile	46,7%	35	54,8%	17	50,0%	3	50,0%	1
c.556A>C Ser/Arg	56,0%	42	48,4%	15	50,0%	3	50,0%	1
c.557G>A Ser/Asn/His	29,3%	22	45,2%	14	33,3%	2	50,0%	1
c.702A>C Pro/Pro	17,3%	13	3,2%	1	33,3%	2	100,0%	2

c.741C>T tichá mutace	18,7%	14	16,1%	5	16,7%	1	50,0%	1
c.844C>T Arg/Cys	17,3%	13	16,1%	5	33,3%	2	0,0%	0
c.869G>C Arg/Thr	26,7%	20	6,5%	2	0,0%	0	50,0%	1
c.899C>T Thr/Met	65,3%	49	74,2%	23	50,0%	3	100,0%	2
c.900G>T tichá mutace	82,7%	62	83,9%	26	83,3%	5	100,0%	2
c.914A>C Gln/Pro	24,0%	18	58,1%	18	0,0%	0	50,0%	1

U všech skupin byla nejčastěji se vyskytujícími polymorfismy tichá mutace c.900G>T v pátém exonu. U infertilních mužů se vyskytovala v 82,7 % a patřila mezi nejčastější i u ostatních vyšetřovaných skupin. Dále se ještě poměrně často vyskytovaly polymorfismy v pozicích c.493A>C a c.526G>C.

4.2 PCR in situ

In situ PCR bylo provedeno na 18 vzorcích zalitých v parafinových bločcích a dále na 4 vzorcích nativní tkáně.

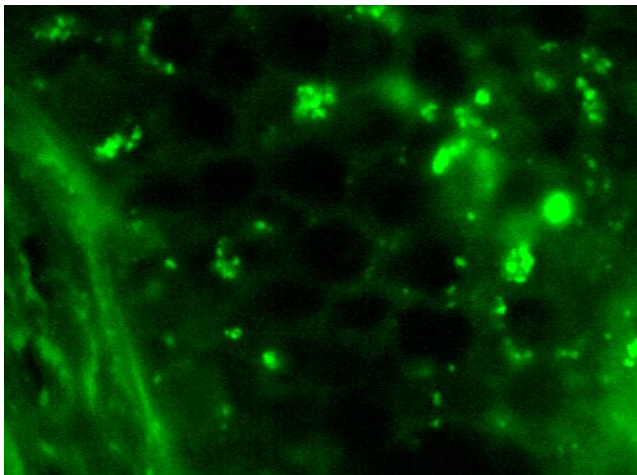
V rámci jednoho vzorku byla hodnocena vždy 3 skla a na každém skle bylo hodnoceno 200 nepřekrývajících se buněk. V rámci jedné buňky (jádra) byly odhadovány počty signálů. Dále byla hodnocena pozitivní a negativní kontrola. V rámci odečítání dat byl také posuzován počet signálu v rámci jednoho interfázního jádra a odhadován tak počet seskupení TSPY kopií. Tento odhad je shrnutý v tabulce č. 13. Z tabulky je zřejmé, že ve srovnání s referenčními vzorky nebylo pozorováno větší množství signálů v tumorózních tkáních. Většina signálů byla pozorována na okrajích jader.

Tabulka č. 13 – Počet signálů TSPY a jejich lokalizace v tumorózních tkáních

Vzorek	typ tkáně	Průměrný počet signálů	Odhad lokalizace okraj : střed
11755/05B	seminom/parafin	5,6	3:1
21452/05A	varle/parafin	3,8	3:2
21253/05 A	varle + nadvarle/parafin	7,5	3:2
6108	seminom/parafin	5,4	10:1
Z1053/01	ovarium/parafin	0,2	-
A13540/98	teratom/parafin	0,3	-
15616/06E	seminom/parafin	4,8	5:2
15616/06D	seminom/parafin	6,7	6:1
6892	gonadoblastom/parafin	4,9	2:1

77/03	seminom/parafin	9,8	1:1
78/03	seminom/parafin	7,3	4:3
132/03	seminom/parafin	3,3	1:2
69/05	seminom/parafin	6,9	3:2
148/05	seminom/parafin	7,1	1:3
355/04	seminom/parafin	nevyšlo	-
7758/04	seminom/parafin	2,5	1:3
95/06	seminom/parafin	5,3	1:1
4080/6	seminom/parafin	nevyšlo	-
4412/04	seminom/nativní tkáň	3,8	3:1
0778/05	seminom/nativní tkáň	4,5	2:1
32/04	varle/nativní tkáň	5,1	4:1
32/04	referenční nativní tkáň	4,4	2:1

Obrázek č. 22 - *In situ* PCR na vzorku seminomální tkáně zalité v parafinu (148/05). Zvětšení 1000x



4.3 Imunofluorescence - posouzení exprese TSPY genu v tumorózních a fyziologických tkáních

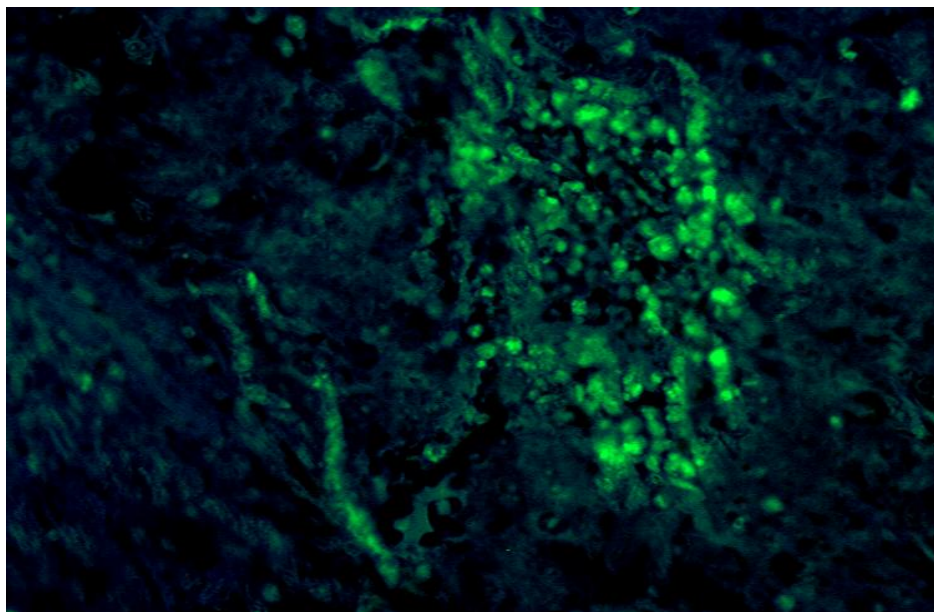
Srovnání exprese v tumorózních a fyziologických tkáních bylo provedeno pomocí imunofluorescenční detekce značené protilátky na 18 vzorcích tumorózní tkáně zalité v parafinu a na 4 vzorcích nativní tumorózní tkáně (tabulka č. 14).

Byla pozorována intenzita exprese ve 4 stupních a lokalizace navázané protilátky.

Tabulka č. 14 - Výsledky imunofluorescenční detekce

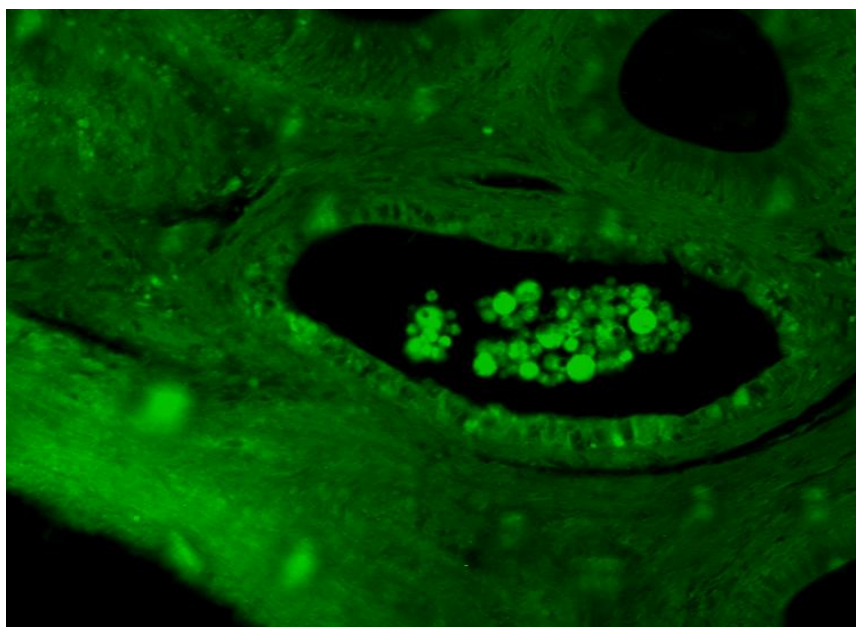
Vzorek	typ tkáně	intenzita fluorescence	lokalizace signálu	specifická exprese
11755/05B	seminom/parafin	+++	okraj jádra	+
21452/05A	varle/parafin	+++	rozptýlený	+
21253/05 A	varle nadvarle/parafin	++++	rozptýlený	+
6108	seminom/parafin	++++	okraj jádra	+
Z1053/01	ovarium/parafin	+	nespecifický	-
A13540/98	teratom/parafin	++	nespecifický	-
15616/06E	seminom/parafin	++++	rozptýlený/okraj jádra 1:1	+
15616/06D	seminom/parafin	++	nespecifický	-
6892	gonadoblastom/parafin	++	nespecifický	-
77/03	seminom/parafin	+++	okraj jádra	+
78/03	seminom/parafin	++++	okraj jádra	+
132/03	seminom/parafin	+++	nespecifický	-
69/05	seminom/parafin	++	rozptýlený	+
148/05	seminom/parafin	++++	nespecifický	-
355/04	seminom/parafin	+++	rozptýlený/okraj jádra 1:2	+
7758/04	seminom/parafin	++	nespecifický	-
95/06	seminom/parafin	+++	okraj jádra	+
4080/6	seminom/parafin	++	nespecifický	-
4412/04	seminom/nativní tkáň	+	nespecifický	-
0778/05	seminom/nativní tkáň	+++	rozptýlený/okraj jádra 2:1	+
32/04	varle/nativní tkáň	++++	rozptýlený	+
32/04	referenční nativní tkáň	++	nespecifický	-

Obrázek č. 23 - Přímá imunofluorescence (FITC) na řezu ze seminomální tkáně pomocí Ig-G a IG-Y anti-TSPY. Zvětšeno 100x.



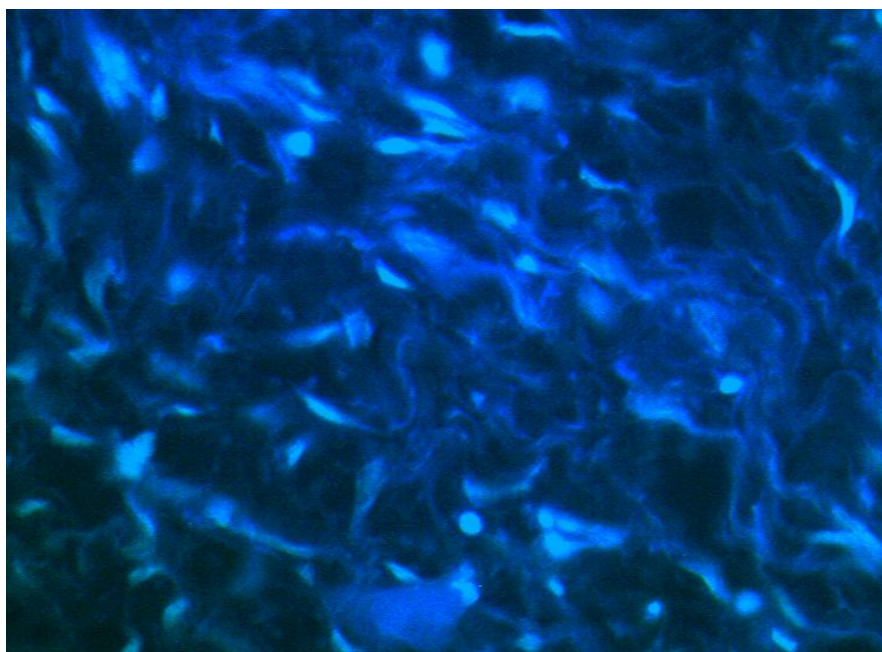
DAPI bylo použito pro podbarvení jader. Zelené označují navázanou protilátku.

Obrázek č. 24 - Přímá imunofluorescence (FITC) na řezu z varlete pomocí Ig-G a IG-Y anti-TSPY. Zvětšeno 200x.



DAPI bylo použito pro podbarvení jader. Zelené označují navázanou protilátku. Na řezu jsou vidět struktury typické pro testikulární tkáň. Zralé spermie v obrázku vykazují falešně pozitivní fluorescenci.

Obrázek č. 25 - Ovariální tkáň jako negativní kontrola. Zvětšeno 200x.



Na základě imunofluorescenční analýzy byla detekována pozitivní specifická fluorescence u řezů z tkání zalitých v parafinu u 8 seminomů, u teratomu a gonadoblastomu.

U negativní kontroly nebyla prokázána specifická vazba protilátky. Ze dvou zkoumaných preparátů seminomů nativních tkání byl jeden pozitivní, rovněž pozitivní kontrola vykazovala specifické navázání protilátky.

Lokalizace signálu byla v případě seminomů pozorována většinou na okrajích jader, zatímco v případě řezů z varlat byl pozorován rozptýlený signál.

Vyšší pozadí bylo způsobeno nespecifickou fluorescencí, která byla pozorována i na řezech bez aplikované protilátky.

Expese byla dále posouzena analýzou genu TSPY na úrovni cDNA na 2 vzorcích seminomů z nativní tkáně a 2 kontrolních vzorcích (negativní referenční tkáň, pozitivní testes) nativní tkáně. Detekce byly provedeny jednak pomocí duplexu páru primerů specifických pro mRNA genu TSPY a jednak pro každý primer zvlášť. Pozitivní PCR produkty byly zjištěny u pozitivního kontrolního vzorku stejně tak u 1 vzorku ze seminomu (nebyl shledán rozdíl v úrovni exprese). Tento vzorek seminomu byl také specificky pozitivní při imunofluorescenčním vyšetření.

5. Diskuze a závěry

Hledání nových kandidátů v oblasti molekulárně genetických příčin mužské neplodnosti je velmi aktuální problém. Díky podílu na regulaci spermatogeneze se na seznam kandidátních genů dostal i TSPY. Byl podroben sekvenční analýze s cílem nalézt polymorfismy, jež by bylo možné asociovat s poruchou plodnosti u infertilních mužů.

Exprese a lokalizace genu TSPY byla dále posuzována ve fyziologických a tumorózních tkáních.

Lau a jeho kolegové popsali v roce 2003 nejdříve 3 hlavní transkripty a poté další, vzácnější. Jako hlavní a nejhojnější byl popsán transkript označený TSPY1. Má 308 aminokyselin (Schnieders et al. 1996) a 35,1 kDa.

Druhý nejčastější transkript byl popsán jako TSPY2. Pochází z jiného RNA sestřihu, který má akceptorové sestřihové místo 11 nukleotidů před pátým exonem (Zhang et al. 1992).

Třetí transkript, TSPY3, vzniká „in frame“ inzercí 18 bp v 1. exonu. Všechny tři typy transkriptů mají stejný ORF (Lau et al. 2003).

Existují další, méně časté transkripty, popsané v úvodu práce, jako např. sestřihy mezi 29. kodonem a dalšími dvěma sestřihovými místy:

#29 #117

#29..... #134

#29..... #169 (už 2. exon)

či přeskoky v intronech (Lau et al. 2003).

Další pozměněné transkripty (většinou se jednalo o substituce v prvním exonu):

Např. kodon 45 (GTG/GTA), polymorfismus pro Valin (Dechend et al. 2000):

Kodon 92 (CCC/CGA), Pro/Arg (Lau et al. 2003)

Kodon 93 (CGC/GCA), Arg/Ala (Lau et al. 2003)

Kodon 195 (CCT/CGT), Pro/Arg (Dechend et al. 2000)

Studie Kido a Lau (2005) ukazují více typů úprav RNA, včetně skrytých intronových míst nebo donor či akceptorových míst. Transkripty potom vykazují různé velikosti i vlastnosti.

Zkrácené formy TSPY proteinu mohou být přednostně exprimovány v kulatých spermatidách, zatímco ve spermatogoniích jsou exprimovány obě formy, zkrácené i nezkrácené. To ukazuje, že TSPY exprese může být v různých fázích spermatických buněk daleko komplikovanější než se předpokládalo (Kido a Lau 2005).

5.1 Promotorová oblast (5'UTR)

1,3 kb velkou promotorovou oblast TSPY genu popsala Skawranová s kolegy (2005). Nalezeny zde byly lokusy pro transkripční faktory AP-2 a SP-1 (proti směru začátku transkripce) a dva CCCAAT motivy na pozicích -218 a -632 (proti směru začátku transkripce), na které se vážou členové proteinové rodiny SRY/Sox. TATA box v promotoru TSPY genu totiž chybí (Skawran et al. 2005).

Ve skupině námi vyšetřovaných infertilních mužů, seminomů, Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem a kontrol byly nalezeny polymorfismy v 5'UTR oblasti v pozicích - 80, - 51, - 50, - 39 a - 8. Polymorfismy v pozicích - 51, - 50 (proti směru začátku transkripce) jsou právě v jednom z AP-2 motivů. V obou pozicích jde o substituci thyminem za původní cytosin. Tyto dvě substituce byly zastoupeny u 91,9 % infertilních mužů a u 74,2 % kontrol. Vzhledem k tomu, že se tento jev vyskytoval poměrně často, jak u vyšetřovaných jedinců, tak u kontrol, bude se zřejmě jednat o častý polymorfismus vyskytující se v populaci.

5.2 První exon TSPY genu

V prvním exonu genu TSPY bylo popsáno již několik změn, vedoucích díky rozmanitým sestřihovým místům k různě dlouhým transkriptům. Dříve popsané změny, vyskytující se v prvním exonu, byly srovnány s našimi výsledky:

1/ Substituce v kodonu 45 (pozice v c.DNA 135 GTG/GTA popsáno Dechendem et al. 2000) byla nalezena u přibližně poloviny infertilních jedinců (31/74), všech pacientů se seminomem (6/6) a obou Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem (2/2). Nevyskytovala se ani jednou u kontrol. Jedná se o tichou mutaci.

2/ Delece kodonu 87 EXON 1A (popsáno Lauem et al. 2003). V této pozici nebyla u našich vzorků pozorována delece, ale substituce a to v pozici c.DNA 260 C~~GG~~/C~~AG~~. Byla nalezena u 24 % (18/74) infertilních jedinců, všech pacientů se seminomem (6/6) a obou Y pozitivních

pacientek s Turnerovým syndromem (2/2). Nevyskytovala se ani jednou u kontrol. Na úrovni aminokyselin je původní arginin nahrazen glutaminem.

3/ Substituce v kodonu 92 (pozice v c.DNA 275, 276 CGG/CCC popsáno Lauem et al. 2003) nebyly pozorovány u žádného z vyšetřovaných vzorků.

4/ Substituce v kodonu 93 (pozice v c.DNA 277, 278) CGC/GCA popsáno Lauem et al. 2003). V pozici 277 byla u našich vzorků pozorována delece, ne substituce, a to u 24 % infertilních mužů (18/74), všech pacientů se seminomem (6/6) a obou Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem (2/2). Delece jednoho nukleotidu může vést k posunutí čtecího rámce. Změna v pozici 288 nebyla pozorována u žádného z našich vyšetřovaných vzorků. V souboru kontrol nebyla v tomto kodonu pozorována žádná změna.

5/ Delece 104. kodonu (ACC) EXON 2A (popsáno Lauem et al. 2003) nebyla pozorována u žádného z našich vyšetřovaných vzorků.

6/ Delece kodonu 139 (EXON 3A CGG/CGA, popsáno Lauem et al. 2003). V tomto kodonu nebyla nalezena delece, ale substituce v pozici v c.DNA 417, a to u 12% (9/75) infertilních jedinců, jednoho pacienta se seminomem (1/6) a jedné Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem (1/2). U kontrol se nevyskytovala. Jednalo se o tichou mutaci.

Krom výše uvedených změn v sekvenci genu TSPY byly v námi vyšetřované skupině infertilních jedinců pozorovány ještě jiné substituce, delece i inserce. Právě spektrum a četnost těchto polymorfismů rozdělily skupinu infertilních mužů přibližně na poloviny. Bylo hodnoceno, o jaký typ mutace se jedná, u kolika jedinců se vyskytuje a jestli dochází ke změně v primární struktuře.

První dvě substituce v pozicích c.T16>C a c.T25>C byly přítomny u větší části infertilních mužů i kontrol. Zásadní změna v pozici 36 však rozdělila infertilní jedince na dvě skupiny. U jedné části infertilních mužů je zde substituce c.A36>C, u druhé části došlo k deleci a substituci v poloze 36 - 42. U skupiny, kde se vyskytovala tato delece, se již dále vyskytovalo zcela jiné spektrum mutací než u skupiny infertilních mužů bez delece v pozici 36 – 42. Zatímco v první části infertilních mužů se vyskytovaly jen substituce, u druhé části se vyskytovaly substituce, delece i inserce.

Exon 1 – První skupina infertilních jedinců

V této skupině se vyskytovaly pouze substituce. Bylo sledováno nejčastějších 26 SNP. Většina z nich (74 %) vedla ke změně aminokyseliny, zbytek byly tiché mutace. S výjimkou tří SNP (c.G214>A Ala/Thr, c.G354>A /tichá mutace/ a c.G451>A Val/Ile) se všechny ostatní substituce vyskytovaly jak u této skupiny infertilních mužů, tak u kontrol, takže se zřejmě jedná o běžně rozšířené polymorfismy. Vzhledem k tomu, že je spektrum polymorfismů u první skupiny mužů do velké míry podobné jako u kontrol, lze předpokládat, že žádný z uvedených SNP (Obrázek č. 14 a 17) nevede k závažným změnám či poškození funkce a struktury prvního exonu genu.

Exon 1 - Druhá skupina infertilních jedinců

V této skupině infertilních mužů byly pozorovány významné změny, z nichž některé mohly značně ovlivnit vlastnosti transkriptu.

V pozici 36 – 42 došlo k delecí a substitucí. V původní sekvenci AGAGAGG dochází k čtyřnukleotidové delecí a dvounukleotidové substitucí.

AGAGAGG je nahrazena sekvencí CAT. Předpokládáme, že jeden adenin je původní, ale nedokážeme určit který. Stejně tak nedokážeme určit, které nukleotidy jsou deletované a které nahrazené.

Za delecemi v pozici 36 - 42 byly nalezeny zcela jiné typy mutací než u první skupiny a kontrol. Celkem 31 substitucí, 18 bodových delecí a 1 inzerce.

Při součtu všech těchto zásahů do sekvence prvního exonu vychází, že z původní délky 486 nukleotidů by byl výsledkem transkript o délce 469 nukleotidů. Došlo ke zkrácení transkriptu o 17 bp a především k posunutí čtecího rámce!

Gen TSPY kóduje 308 aminokyselin (Schnieders et al. 1996). V této zkrácené sekvenci byl nalezen stop kodon TGA (opal) v kodonu 67. V případě, že dojde k ukončení transkripce v kodonu 67, má transkript jen 198 bází, tedy 66 aminokyselin. První exon za standardních podmínek kóduje 162 aminokyselin. Díky předčasnému stop kodonu dojde ke zkrácení o téměř celé dvě třetiny transkribovaného prvního exonu.

Pro TSPY gen je charakteristická přítomnost SET/NAP1 specifické domény v oblasti 111. až 288. kodonu. První exon se na ni podílí od 111. do 162. kodonu, tedy prvními 50 aminokyselinami. Díky předčasně ukončenému transkriptu, dlouhému jen 66 aminokyselin, by doména chyběla.

Exon 1 – Pacienti se seminomem

U pacientů se seminomem se vyskytoval podobný charakter změn jako ve druhé skupině infertilních jedinců, tedy substituce, delece i inserce, vedoucí k možnému vzniku stop kodonu (tabulka č. 10).

Exon 1 – Y pozitivní pacientky s Turnerovým syndromem

U Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem se vyskytovalo rovněž stejné spektrum změn jako ve druhé skupině infertilních jedinců a u pacientů se seminomem; substituce, delece i inserce (tabulka č. 10).

5.3 Exony 2, 3, 4, 5 a 6

V ostatních exonech genu TSPY bylo nalezeno celkem 12 polymorfismů, vždy substituce. Většina z nich vedla ke změně aminokyseliny. Všechny z nich se vyskytovaly ve všech vyšetřovaných skupinách, tedy i u kontrol. Jedná se zřejmě o běžné SNP bez zjevného vlivu na vlastnosti transkriptu.

5.4 Intronové oblasti

Změny v intronových oblastech se v rámci porovnávaných skupin trochu lišily. Společné bylo například to, že zde nebyly nalezeny žádné změny v intronu 4 a nejčastěji se vyskytovaly substituce. I vzhledem k velikosti intronů je nasnadě, že bylo nejvíc změn pozorováno v 1. intronu.

Mezi souborem vyšetřovaných infertilních mužů a kontrolami nebyl nalezen žádný významný rozdíl. Lze předpokládat, že tyto změny nemají žádný zásadní vliv na sestřih genového produktu.

Soubory pacientů se seminomem a Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem jsou bohužel oba velmi malé, nesplňují podmínky parametrického testování a dochází zde tudíž při statistickém hodnocení k chybě malých čísel.

5.5 Hodnocení korelace sekvenčních změn a spermiogramu

V posledních letech bylo publikováno několik prací, které se snažili odhalit, zda existuje vztah mezi počtem kopií genu TSPY a mužskou neplodností.

Dle Vodičky et al. (2007) korelace mezi poruchou plodnosti u mužů a počtem kopií TSPY genu existuje. Relativní počet kopií je u infertilních mužů vyšší, s výjimkou mužů, u nichž byla nalezena delece v oblasti AZFa (Vodička et al. 2007).

Giachini et al. (2009) publikoval výsledky, kde je naopak nízký počet kopií TSPY jedním z hlavních faktorů, jež přispívají k mužské neplodnosti. A podle Nickkholgh et al. (2009) korelace mezi poškozením spermatogeneze a počtem kopií genu TSPY neexistuje.

Na základě těchto tří rozdílných studií je nutno vzít v úvahu, že studie probíhaly na různých populacích a byla použita jiná metodika.

Přesný počet exprimovaných kopií u námi analyzovaných vzorků nelze určit. Expresce může být ovlivněna délkou promotoru nebo jeho methyloací. Ta může spolu se sekvencí genu ovlivnit transkripční aktivitu a sekundární strukturu genového produktu.

Při hodnocení elektroforetogramu bylo přítomno v sekvenci asi 20% pozadí, u kterého nešla hodnotit sekvence. Je tedy možné, že jsme nehodnotili až 20 % kopií genu. Všechny ostatní čitelné sekvence byly hodnoceny.

Při hodnocení genového produktu a jeho funkce, respektive selhání funkce, je třeba brát v úvahu i jeho multikopiový charakter. Při PCR je amplifikována a následně detekována majoritní sekvence. Pomocí PCR nelze detekovat a hodnotit sekvenci všech kopií. Při hodnocení tedy popisujeme většinovou sekvenci; menšinová je nám skryta. Pokud je přítomna, mohla by např. kompenzovat nefunkční transkripty sekvence majoritních kopií.

5.6 Srovnání počtu kopií TSPY a genového polymorfismu v podskupinách infertilních jedinců

Poměr neplodných mužů v první a druhé podjednotce byl pomocí Fischerova přesného testu srovnán s mediánem počtu kopií (0,58). Obrázek č. 21 ukazuje, že změny v jednotlivých

podskupinách a počet mužů s počtem kopií genu nad a pod mediánem, jsou srovnatelné. V podílu neplodných mužů z první a druhé podjednotky nebyl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nalezen statisticky významný rozdíl.

U neplodných mužů byl též srovnán počet kopií genu a změny v sekvenci, které vedly ke změně čtecího rámce. U přibližně poloviny infertilních mužů byl počet kopií nad mediánem 0,58. U 40,6 % neplodných mužů s vyšším počtem kopií byly v 1. exonu nalezeny substituce, delece a inserce., které vedly k posunu čtecího rámce a zkrácení transkriptu prvního exonu. U zbylých 59,4 % mužů s vyšším počtem kopií byly nalezeny jen substituce vyskytující se rovněž u kontrol. Žádná vzájemná korelace mezi skupinou mužů s delecemi a insercemi a vyšším počtem kopií nebyla potvrzena.

5.7 Srovnání spermiogramu a zásadních změn vedoucích k posunu čtecího rámce u infertilních mužů

Spermiogram byl hodnocen pouze u neplodných mužů. U kontrol hodnocen nebyl kvůli pozitivním výsledkům paternitní analýzy. Jejich spermiogram byl tedy v pořádku. Porovnáním spermiogramu neplodných mužů a změn vedoucích k posunu čtecího rámce se ukázalo, že je tato distribuce náhodná a není zde žádný signifikantní rozdíl.

Počet mužů ve skupinách rozdělených dle spermiogramu (obrázek č. 19) je malý, takže výsledky mohou být zkresleny.

5.8 Posouzení exprese TSPY genu imunofluorescenční detekcí a PCR in situ

Expresní studie jednoznačně potvrdily přítomnost TSPY proteinu v tkáních seminomu, což koresponduje s některými již publikovanými studiemi. Ukázal se zajímavý rozdíl v lokalizaci pozitivního signálu v buňkách zdravých testikulárních tkáních a v seminomech. Zatímco v buňkách seminomu byl signál pozorován při okrajích jader, ve zdravých buňkách byly signály rozptýlené a rozmístěny spíše náhodně. Pro hodnocení počtu repetice u nádorových tkáních se ukázaly molekulárně-cytogenetické metody jako nepříliš vhodné. Jsou málo citlivé a časově náročné. Nádorové tkáně mají oproti těm fyziologickým poměrně odlišnou strukturu. Jsou více či méně vazivovité, čímž znesnadňují například dokonalé prostoupení rozpouštědly, digestivním činidly (enzymy) či barvivům. Pro kvantifikaci TSPY klastrů by byla tato metoda vhodná, ale zde je třeba mít metafázní chromozomy, což je v případě buněk, které nelze kultivovat, nemožné.

6. Souhrn

Příčiny mužské neplodnosti mohou být vrozené nebo získané. Nejčastěji se jedná o kombinaci obojího. Geneticky podmíněné selhání nebo zhoršení spermatogeneze může být ovlivněno až 150 geny. Většina prací této problematiky je zaměřena na kandidátní geny z oblasti AZF.

Jedním z dalších kandidátních genů je TSPY. Gen TSPY je gen kódující testes specifický protein. Jedná se o multikopiový gen. Počet kopií se pohybuje od 30 do 60. Gen má přibližně 2,8 kb a obsahuje 6 exonů a 5 intronů. Předpokládanými funkcemi je úloha proliferačního faktoru ve spermatogenezi a regulace genové exprese. TSPY je fyziologicky exprimován v tkáni varlete. Dále byla zjištěna exprese v patologických tkáních (prekurzory tumorů, karcinomy in situ, seminomy a dalších).

Cílem práce bylo porovnání sekvenčních polymorfismů v genu TSPY, kvantifikace relativního počtu repetice a posouzení exprese genu ve fyziologických a patologických tkáních u neplodných mužů, pacientů se seminomem, Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem a kontrolního souboru.

Jednotlivé vzorky byly vyšetřeny pomocí PCR, sekvenační analýzy, PCR in situ a imunofluorescence a statisticky vyhodnoceny.

Významné změny byly nalezeny v prvním exonu. U poloviny neplodných mužů a kontrol bylo sledováno 26 nejčastějších polymorfismů s podobným patternem. U druhé poloviny neplodných mužů byly nalezeny velmi důležité změny generující stop kodon v první třetině exonu 1. Předčasné ukončení transkripce by zkrátilo protein o 78 %. Tento typ změny nebyl nalezen v kontrolním souboru.

Korelace mezi spermioqramem a změnami, jež vedou ke změně čtecího rámce nebyla nalezena, stejně jako rozdělení mužů u nichž se vyskytovaly delece a inserce bylo náhodné.

Změny nalezené v prvním exonu genu TSPY by mohly značně poškodit proces spermatogeneze. Tyto poznatky mohou značně rozšířit naše znalosti o molekulárně genetických příčinách mužské neplodnosti.

Klíčová slova: gen TSPY, mužská neplodnost, Y chromozom, doména SET/NAP

Summary

The causes of male infertility can be congenital or acquired. Most often it is a combination of both. Genetically determined failure or deterioration of spermatogenesis may be affected up to 150 genes. Most of these studies are focused on AZF candidate genes.

Another candidate gene is TSPY, which encodes the testis-specific protein. It is a multi-copy gene. Number of copies varies from 30 to 60. The gene has approximately 2.8 kb and contains 6 exons and 5 introns.

There are expected functions: the role of proliferative factor in spermatogenesis and the gene expression regulation.

TSPY is expressed in testes tissue. There was described expression in pathological tissue too (tumors, carcinoma in situ, seminoma etc).

The aim of this study was to compare sequence polymorphisms in the gene TSPY, quantify the copy number and gene expression assessment in physiological and pathological tissue in infertile men, patients with seminoma, Y-positive patients with Turner syndrome and controls.

There were analyzed 75 infertile men and 31 fertile controls using PCR, conventional sequencing analysis, PCR in situ a immunofluorescence.

The most remarkable changes were found in the 1st exon only. In one half of the both infertile men and fertile controls, the most frequent finding was 26 SNPs with a similar pattern. In the other half we found highly relevant changes, generating a stop codon in the first third of exon 1. Early termination cut down the protein by 78 %. This kind of change was not found in the fertile controls. No correlation was found between the spermiogram and the changes leading to the stop codon. The distribution of men with deletions, insertion and higher gene copy number was not statistically different.

The changes found in exon 1 in infertile men could fundamentally affect the process of spermatogenesis. These findings could significantly enhance our understanding of the molecular-genetic causes of male infertility.

Keywords: TSPY gene, male infertility, Y chromosome, SET/NAP domain

7.

Literatura

1. Aitken RJ, Marshall Graves JA. The future of sex. *Nature*. 2002 Feb 28;415(6875):963.
2. Ali S, Hasnain SE. Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene*. 2002 Jan 23;283(1-2):1-10.
3. Arnemann J, Epplen JT, Cooke HJ, Sauermann U, Engel W, Schmidte J. A human DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleid Acid Res*. 1987 Nov 11;15(21):8713-24.
4. Bachtrog D, Charlesworth B. Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biol*. 2001;2(5): Reviews 1016. Epub 2001 Apr 26.
5. Beamer WG, Cunliffe-Beamer TL, Shultz KL, Langley SH, Roderick TH. Juvenile spermatogonial depletion (jsd): a genetic defect of germ cell proliferation of male mice. *Biol Reprod*. 1988 May;38(4):899-908.
6. Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurles ME. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet*. 2000 Oct;37(10):752-8.
7. Blaschke RJ, Rappold G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Jun;16(3):233-9. Epub 2006 May 2.
8. Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Human Molecular Genetics*. 1998 Jan;7(1):97-107.
9. Bryan JH. Spermatogenesis revisited. III. The course of spermatogenesis in a male-sterile pink-eyed mutant type in the mouse. *Cell Tissue Res*. 1977 May 16;180(2):173-86.
10. Bühler EM. A synopsis of the human Y chromosome. *Hum Genet*. 1980;55(2):145-75.
11. Bull JJ. Evolution of sex determining mechanisms. 1983. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
12. Canela N, Rodriguez-Vilarrupla A, Estanyol JM, Diaz C, Pujol MJ, Agell N, Bachs O. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10;278(2):1158-64. Epub 2002 Oct 28.
13. Carson JL, Collier AM. Ciliary defects: cell biology and clinical perspectives. *Adv Pediatr*. 1988;35:139-65.
14. Chai Z, Sarcevic B, Mawson A, Toh BH. SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):33665-74. Epub 2001 Jun 6.
15. Chandley AC, Edmond P. Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics*. 1971;10(4):295-304.
16. Chandley AC, Fletcher J, Rossdale PD, Peace CK, Ricketts SW, McEnery RJ, Thorne JP, Short RV, Allen WR. Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares. *J Reprod Fertil Suppl*. 1975 Oct;(23):377-83.
17. Chandley AC. Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod*. 1998 Apr;13 Suppl 1:45-50.
18. Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, Matarazzo MR, Vacca M, Franzè A, Cuccurese M, Cocchia M, Curci A,

- Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D, D'Urso M. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet.* 2000 Feb 12;9(3):395-401.
19. Cooke HJ 1999. Y chromosome and male fertility. *Rev Reprod.* 1999 Jan;4(1):5-10.
 20. Dechend F, Williams G, Skawran B, Schubert S, Krawczak M, Tyler – Smith, Schmidtke J. TSPY variants in six loci on the human Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;91(1-4):67-71.
 21. Delbridge ML, Longepied G, Depetris D, Mattei MG, Disteché CM, Marshall Graves JA, Mitchell MJ. TSPY, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X - implications for Y chromosome evolution. *Chromosome Res.* 2004;12(4):345-56.
 22. Diemer T, Desjardins C. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod Update.* 1999 Mar-Apr;5(2):120-40.
 23. Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature.* 1996 Jun 27;381(6585):783-5.
 24. Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *N Engl J Med.* 1977 Jul 7;297(1):1-6.
 25. Elliott DJ, Cooke HJ. The molecular genetics of male infertility. *Bioessays.* 1997 Sep;19(9):801-9.
 26. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell.* 2003 Mar 7;112(5):659-72.
 27. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet.* 2003 Jan;40(1):18-24.
 28. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Engl B, Foresta C. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005 Mar;42(3):209-13.
 29. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002 Mar;8(3):286-98.
 30. Filatov DA. Evolutionary history of *Silene latifolia* sex chromosomes revealed by genetic mapping of four genes. *Genetics.* 2005 Jun;170(2): 975-9. Epub 2005 Apr 16.
 31. Flória-Santos M, Ramos ES. Genomic-based nursing care for women with Turner Syndrome: genomic-based nursing care. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2006 Sep-Oct;14(5):645-50.
 32. Ford CE, Jones KW, Miller OJ, Mittwoch U, Penrose LS, Ridler M, Shapiro A. The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet.* 1959 Apr 4;1(7075):709-10.
 33. Ford CE., Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 1959 Apr 4;1(7075):711-3.
 34. Gelin C, Aubrit F, Phalipon A, Raynal B, Cole S, Kaczorek M, Bernard A. The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product. *EMBO J.* 1989 Nov;8(11):3253-9.

35. Geremek M, Zietkiewicz E, Diehl SR, Alizadeh BZ, Wijmenga C, Witt M. Linkage analysis localises a Kartagener syndrome gene to a 3.5 cM region on chromosome 15q24-25. *J Med Genet.* 2006 Jan;43(1):e1.
36. Giachini C, Nuti F, Turner DJ, Laface I, Xue Y, Daguin F, Forti G, Tyler-Smith C, Krausz C. TSPY1 copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Oct;94(10):4016-22. Epub 2009 Sep 22.
37. Gianfrancesco F, Sanges R, Esposito T, Tempesta S, Rao E, Rappold G, Archidiacono N, Graves JA, Forabosco A, D'Urso M. Differential divergence of three human pseudoautosomal genes and their mouse homologs: implications for sex chromosome evolution. *Genome Res.* 2001 Dec;11(12):2095-100.
38. Graves JA. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool.* 1998 Aug 1;281(5):472-81.
39. Graves JA. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell.* 2006 Mar 10;124(5):901-14.
40. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril.* 1990 Dec;54(6):978-83.
41. Guichaoua MR, Delafontaine D, Taurelle R, Taillemite JL, Morazzani MR, Luciani JM. Loop formation and synaptic adjustment in a human male heterozygous for two pericentric inversions. *Chromosoma.* 1985;93(4):313-20.
42. Guichaoua MR, Speed RM, Luciani JM, Delafontaine D, Chandley AC. Infertility in human males with autosomal translocations. II. Meiotic studies in three reciprocal rearrangements, one showing tertiary monosomy in a 45-chromosome individual and his father. *Cytogenet Cell Genet.* 1992;60(2):96-101.
43. Habermann B, Mi HF, Edelmann A, Bohring C, Backert IT, Kiesewetter F, Aumuller G, Vogt PH. DAZ (Deleted in AZoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails. *Hum Repr.* 1998 Feb;13(2):363-9.
44. Harrison PM, Hegyi H, Balasubramanian S, Luscombe NM, Bertone P, Echols N, Johnson T, Gerstein M. Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22. *Genome Res.* 2002 Feb;12(2):272-80.
45. Hawley RS. The human Y chromosome: rumors of its death have been greatly exaggerated. *Cell.* 2003 Jun 27;113(7):825-8.
46. Hering R, Frade-Martinez R, Bajanowski T, Poets CF, Tschentscher F, Riess O. Genetic investigation of the TSPYL1 gene in sudden infant death syndrome. *Genet Med.* 2006 Jan;8(1):55-8.
47. Hoei-Hansen CE, Sehested A, Juhler M, Lau YF, Skakkebaek NE, Laursen H, Rajpert-de Meyts E. New evidence for the origin of intracranial germ cell tumours from primordial germ cells: expression of pluripotency and cell differentiation markers. *J Pathol.* 2006 May;209(1):25-33.
48. <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/pohlavi.htm>
49. <http://emedicine.medscape.com/article/947504-overview>
50. <http://www.forumzdravi.cz/kategorie-157-sexuologie>
51. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TSPYL2>
52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acemby/av.cgi?db=human&l=TSPYL6>
53. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H489>
54. Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update.* 2002 Mar-Apr;8(2):183-98.
55. Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG. Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003 Apr;17(2):211-29.

56. Ishimi Y, Kikuchi A. Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro. *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):7025-9.
57. Jacobs PA, Baikie AG, Brown WM, Macgregor TN, Maclean N, Harnden DG. Evidence for the existence of the human "super female". *Lancet.* 1959 Sep 26;2(7100):423-5.
58. Johnson DR, Hunt DM. Hop-sterile, a mutant gene affecting sperm tail development in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1971 Apr;25(2):223-36.
59. Jung Y, Park J, Bang YJ, Kim TY. Gene silencing of TSPYL5 mediated by aberrant promoter methylation in gastric cancers. *Lab Invest.* 2008 Feb;88(2):153-60. Epub 2007 Dec 3.
60. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet.* 2000 Oct 12;9:2563-2572.
61. Kellogg DR, Kikuchi A, Fujii-Nakata T, Turck CW, Murray AW. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J Cell Biol.* 1995 Aug;130(3):661-73.
62. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havighurst T, Grosch J. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev.* 1999 May;53(1):27-41.
63. Kido T, Lau YF. The rat Tspy is preferentially expressed in elongated spermatid and interacts with core histones. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Nov 10;350(1):56-67. Epub 2006 Sep 14.
64. Kido T, Lau YF. A Cre gene directed by a human TSPY promoter is specific for germ cells and neurons. *Genesis.* 2005 Aug;42(4):263-75.
65. Kido T, Lau YF. The human Y- encoded testis-specific protein interacts functionally with eukaryotic translation elongation factor eEF1A, a putative oncoprotein. *Int J Cancer.* 2008 Oct 1;123(7):1573-85.
66. de Kretser DM. Male infertility. *Lancet.* 1997 Mar 15;349(9054):787-90.
67. Krick R, Jakubiczka S, Arnemann J. Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (TSPY) genes. *Gene.* 2003 Jan 2;302(1-2):11-9.
68. Kubiček Vladimír. Sexuální strategie a promiskuita 19. 11. 2008
69. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletzsky H, Brown LG, Minx PJ, Fordum H, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):279-86.
70. Lahn BT, Page DC. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science.* 1999 Oct 29;286(5441):964-7.
71. Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science.* 1997 Oct 24;278(5338):675-80.
72. Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet.* 2001 Mar;2(3):207-16.
73. Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics.* 1989 Feb;4(2):162-8.

74. Lau Y, Chou P, Iezzoni J, Alonzo J, Kömüves L. Expression of a candidate gene for the gonadoblastoma locus in gonadoblastoma and testicular seminoma. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;91(1-4):160-4.
75. Lau YF, Zhang J. Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2000 Apr; 27(4):308-21.
76. Lau YF, Li Y, Kido T. Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2009 Mar;87(1):114-22.
77. Lau YF. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am J Hum Genet.* 1999 April;64(4):921– 927.
78. Lau YF, Lau HW, Kömüves LG. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res.* 2003;101(3-4):250-260.
79. Li Y, Lau YF. TSPY and its X-encoded homologue interact with cyclin B but exert contrasting functions on cyclin-dependent kinase 1 activities TSPY interacts and modulates cyclin B–CDK1 activities. *Oncogene.* 2008 Oct 16;27(47):6141-50. Epub 2008 Jun 30.
80. Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology; candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell.* 1993;75:1287–1295.
81. Ma K, Mallidis C, Bhasin S. The role of Y chromosome deletions in male infertility. *European Journal of Endocrinology. Eur J Endocrinol.* 2000 May;142(5):418-30.
82. Maeda T, Ohno M, Ishibashi A, Samejima M, Sasaki K. Ring Y chromosome: 45,X/46,Xr(Y) chromosome mosaicism in a phenotypically normal male with azoospermia. *Hum Genet.* 1976 Sep 10;34(1):99-102.
83. Mahadevaiah SK, Odorisio T, Elliott DJ, Rattigan A, Szot M, Laval SH, Washburn LL, McCarrey JR, Cattanch BM, Lovell-Badge R, Burgoyne PS. Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet.* 1998 Apr;7(4):715-27.
84. Maiwald R, Seebacher T, Edelmann A, Hirschmann P, Köhler MR, Kirsch S, Vogt PH. A human Y-chromosomal gene mapping to distal Yq11 is expressed in spermatogenesis. In *Report of the Second International Workshop on Y Chromosome Mapping. Asilomar, 1995.* Eds Affara et al. *Cytogenetics and Cell Genetics.* 1996;73:33–76.
85. Mangs HA, Morris BJ. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics.* 2007 Apr;8(2):129-36.
86. Manz E, Schnieders F, Müller Brechlin A, Schmidtke J. TSPY-related sequences represent a microheterogenous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics.* 1993 Sep;17(3):726–31.
87. Marshall Graves JA. Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view. *Biol Reprod.* 2000 Sep;63(3):667-76.
88. Meschede D, Froster UG, Bergmann M, Nieschlag E. Familial pericentric inversion of chromosome 1 (p34q23) and male infertility with stage specific spermatogenic arrest. *J Med Genet.* 1994 Jul;31(7):573-5.
89. Miller AM. Evolution by selection of mutations. *Science.* 1914 Oct 30;40(1035):636-7.
90. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.

91. Milunsky JM, Maher TA. Fragile X carrier screening and spinocerebellar ataxia in older males. *Am J Med Genet A*. 2004 Mar 15;125A(3):320.
92. Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, Clément A, Geremek M, Delaisi B, Bridoux AM, Coste A, Witt M, Duriez B, Amsalem S. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet*. 2006 Apr;43(4):326-33. Epub 2005 Jul 31.
93. Nakahori Y, Kobayashi K, Komaki R, Matsushita I & Nakagome Y. A locus of the candidate gene family for azoospermia factor (YRRM2) is polymorphic with a null allele in Japanese males. *Hum Mol Genet*. 1994 Sep;3(9):1709.
94. Nickkholgh B, Noordam MJ, Hovingh SE, van Pelt AM, van der Veen F, Repping S. Y chromosome TSPY copy numbers and semen quality. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1744-7. Epub 2009 Nov 14.
95. Nieschlag E. Andrology at the end of the twentieth century: from spermatology to male reproductive health. Inaugural Address at the VIth International Congress of Andrology, Salzburg, 25 May 1997. *Int J Androl*. 1997 Jun;20(3):129-31.
96. Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FW. *Klinická genetika*. nakl.: Triton, 6. vyd., 2004.
97. Ohno S. *Sex Chromosomes and sex-linked genes*. Berlin: Springer-Verlag. 1967.
98. Oram SW, Liu XX, Lee TL, Chan WY, Lau YF. TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells. *BMC Cancer*. 2006 Jun 9;6:154.
99. Ozbun LL, You L, Kiang S, Angdisen J, Martinez A, Jakowlew SB. Identification of differentially expressed nucleolar TGF-beta1 target (DENTT) in human lung cancer cells that is a new member of the TSPY/SET/NAP-1 superfamily. *Genomics*. 2001 Apr 15;73(2):179-93.
100. Pazdera J. Komunita Amishů odhalila genetický základ náhlého úmrtí kojenců. 13. 08. 2004. <http://www.osel.cz/index.php?clanek=862>
101. de Perdigo A, Gabriel-Robez O, Rumpler Y. Analysis of synaptonemal complexes in a heterozygous human male carrier of a reciprocal translocation involving an acrocentric chromosome: heterosynapsis without previous homosynapsis. *Hum Genet*. 1991 Sep;87(5):602-6.
102. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med*. 1997 Feb 20;336(8):534-9.
103. Puffenberger EG, Hu-Lince D, Parod JM, Craig DW, Dobrin SE, Conway AR, Donarum EA, Strauss KA, Dunckley T, Cardenas JF, Melmed KR, Wright CA, Liang W, Stafford P, Flynn CR, Morton DH, Stephan DA. Mapping of sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) by a SNP genome scan and identification of TSPYL loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11689-94. Epub 2004 Jul 23.
104. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*. 1995 Aug;10(4):383-93.
105. Reijo RA, Dorfman DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke H, Page DC. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod*. 2000 Nov;63(5):1490-6.

106. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002 Oct;71(4):906-22. Epub 2002 Sep 20.
107. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Frankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS, Sudbrak R, Wen G, Jones MC, Hurler ME, Andrews TD, Scott CE, Searle S, Ramser J, Whittaker A, Deadman R, Carter NP, Hunt SE, Chen R, Cree A, Gunaratne P, Havlak P, Hodgson A, Metzker ML, Richards S, Scott G, Steffen D, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Ainscough R, Ambrose KD, Ansari-Lari MA, Aradhya S, Ashwell RI, Babbage AK, Bagguley CL, Ballabio A, Banerjee R, Barker GE, Barlow KF, Barrett IP, Bates KN, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Beck A, Bethel G, Blechschmidt K, Brady N, Bray-Allen S, Bridgeman AM, Brown AJ, Brown MJ, Bonnin D, Bruford EA, Buhay C, Burch P, Burford D, Burgess J, Burrill W, Burton J, Bye JM, Carder C, Carrel L, Chako J, Chapman JC, Chavez D, Chen E, Chen G, Chen Y, Chen Z, Chinault C, Ciccodicola A, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg S, Clerc-Blankenburg K, Clifford K, Cobley V, Cole CG, Conquer JS, Corby N, Connor RE, David R, Davies J, Davis C, Davis J, Delgado O, Deshazo D, Dhami P, Ding Y, Dinh H, Dodsworth S, Draper H, Dugan-Rocha S, Dunham A, Dunn M, Durbin KJ, Dutta I, Eades T, Ellwood M, Emery-Cohen A, Errington H, Evans KL, Faulkner L, Francis F, Frankland J, Fraser AE, Galgoczy P, Gilbert J, Gill R, Glöckner G, Gregory SG, Gribble S, Griffiths C, Grocock R, Gu Y, Gwilliam R, Hamilton C, Hart EA, Hawes A, Heath PD, Heitmann K, Hennig S, Hernandez J, Hinzmann B, Ho S, Hoffs M, Howden PJ, Huckle EJ, Hume J, Hunt PJ, Hunt AR, Isherwood J, Jacob L, Johnson D, Jones S, de Jong PJ, Joseph SS, Keenan S, Kelly S, Kershaw JK, Khan Z, Kioschis P, Klages S, Knights AJ, Kosiura A, Kovar-Smith C, Laird GK, Langford C, Lawlor S, Leversha M, Lewis L, Liu W, Lloyd C, Lloyd DM, Loulseged H, Loveland JE, Lovell JD, Lozado R, Lu J, Lyne R, Ma J, Maheshwari M, Matthews LH, McDowall J, McLaren S, McMurray A, Meidl P, Meitinger T, Milne S, Miner G, Mistry SL, Morgan M, Morris S, Müller I, Mullikin JC, Nguyen N, Nordsiek G, Nyakatura G, O'Dell CN, Okwuonu G, Palmer S, Pandian R, Parker D, Parrish J, Pasternak S, Patel D, Pearce AV, Pearson DM, Pelan SE, Perez L, Porter KM, Ramsey Y, Reichwald K, Rhodes S, Ridler KA, Schlessinger D, Schueler MG, Sehra HK, Shaw-Smith C, Shen H, Sheridan EM, Shownkeen R, Skuce CD, Smith ML, Sotheran EC, Steingruber HE, Steward CA, Storey R, Swann RM, Swarbreck D, Tabor PE, Taudien S, Taylor T, Teague B, Thomas K, Thorpe A, Timms K, Tracey A, Trevanion S, Tromans AC, d'Urso M, Verduzco D, Villasana D, Waldron L, Wall M, Wang Q, Warren J, Warry GL, Wei X, West A, Whitehead SL, Whiteley MN, Wilkinson JE, Willey DL, Williams G, Williams L, Williamson A, Williamson H, Wilming L, Woodmansey RL, Wray PW, Yen J, Zhang J, Zhou J, Zoghbi H, Zorilla S, Buck D, Reinhardt R, Poustka A, Rosenthal A, Lehrach H, Meindl A, Minx PJ, Hillier LW, Willard HF, Wilson RK, Waterston RH, Rice CM, Vaudin M, Coulson A, Nelson DL, Weinstock G, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Gibbs RA, Beck S, Rogers J, Bentley DR. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature.* 2005 Mar 17;434(7031):325-37.
108. Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature.* 2003 Jun 19;423(6942):873-6.

109. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature*. 1997 Sep 4;389(6646):73-7.
110. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):292-9.
111. Schempp W, Binkele A, Arnemann J, Gläser B, Ma K, Taylor K, Toder R, Wolfe J, Zeitler S, Chandley AC. Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes. *Chromosome Res*. 1995 Jun;3(4):227-34.
112. Schnieders F, Dörk T, Arnemann J, Vogel T, Werner M and Schmidtke J. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum Mol Genet*. 1996 Nov;5(11):1801-7.
113. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003 Jun 19;423(6942):825-37.
114. Skawran B, Schubert S, Dechend F, Vervoorts J, Nayernia K, Lüscher B, Schmidtke J. Characterization of a human TSPY promoter. *Mol Cell Biochem*. 2005 Aug;276(1-2):159-67.
115. Slim R, Levilliers J, Ludecke HJ, Claussen U, Nguyen VC, Gough NM, Horsthemke B, Petit C. A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. *Genomics*. 1993 Apr;16(1):26-33.
116. Smith JM. A short-term advantage for sex and recombination through sib-competition. *J Theor Biol*. 1976 Dec;63(2):245-58.
117. Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC. Deletion of azoospermia factor a. (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 22;9(15):2291-6.
118. Tascou S, Nayernia K, Samani A, Schmidtke J, Vogel T, Engel W, Burfeind P. immortalization of murine male germ cells at a discrete stage of differentiation by a novel directed promoter-based selection strategy. *Biol Reprod*. 2000 Nov;63(5):1555-61.
119. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976 Oct 28;34(2):119-24.
120. Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M, McPherson JD, Wylie K, Sekhon M, Kucaba TA, Waterston RH, Page DC. A physical map of the human Y chromosome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):943-5.
121. Vachani A, Nebozhyn M, Singhal S, Alila L, Wakeam E, Muschel R, Powell CA, Gaffney P, Singh B, Brose MS, Litzky LA, Kucharczuk J, Kaiser LR, Marron JS, Showe MK, Albelda SM, Showe LC. A 10-gene classifier for distinguishing head and neck squamous cell carcinoma and lung squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2905-15.

122. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet.* 1986 Feb;38(2):109-24.
123. Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grooteclaes M, Winkler R. Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem J.* 2003 Feb 15;370(Pt 1):323-9.
124. Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, Singh AR, Krizova K, Svacinova V, Horinova V, Dostal J, Oborna I, Brezinova J, Sobek A, Santavy J. TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2007 May;14(5):579-87.
125. Vogel T, Schmidtke J. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet.* 1998;80(1-4):209-13.
126. Vogel T, Dechend F, Manz E, Jung C, Jakubiczka S, Fehr S, Schmidtke J, Schnieders F. Organization and expression of bovine TSPY. *Mamm Genome.* 1997 Jul;8(7):491-6.
127. Vogel T, Dittrich O, Mehraein Y, Dechend F, Schnieders F, Schmidte J. Murine and human TSPYL genes: novel members of the TSPY-SET-NAP1L1 family. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;81(3-4):265-70.
128. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod.* 1998 Aug;4(8):739-44.
129. Vogt PH. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Sep 30;224(1-2):1-9.
130. Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lau YF, Mitchell M, Schempp W, Tyler-Smith C, Williams G, Yen P, Rappold GA. Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. Heidelberg, Germany, April 13-16, 1997. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;79(1-2):1-20.
131. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996 Jul;5(7):933-43.
132. von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeyer A, Grosveld G. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol.* 1992 Aug;12(8):3346-55.
133. Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu ZY, Sha J. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med.* 2004 May;82(5):317-24. Epub 2004 Feb 24.
134. Yi H, Donohue SJ, Klein DC, McBride OW. Localization of the hydroxyindole-O-methyltransferase gene to the pseudoautosomal region: implications for mapping of psychiatric disorders. *Hum Mol Genet.* 1993 Feb;2(2):127-31.
135. Zhang JS, Yang-Feng TL, Müller U, Mohandas TK, de Jong PJ, Lau YF. Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. *Hum Mol Genet.* 1992 Dec;1(9):717-26.

8. Seznam použitých zkratek

AMELY	Amelogenin vázaný na Y chromozom
AP2	Aktivační protein 2
ASMTL	Acetyl serotonin N-methyltransferáza
AZF	Azoospermický faktor
BLAST	Basic local alignment search tool
BPY2	Testis specifický basic protein Y 2
BSA	Bovinní sérový albumin
CD99	Diferenční faktor (Cluster of Differentiation 99)
CDY	Testis specifický chromodoménový protein Y
CRLF2	Cytokinový receptor (Cytokine receptor-like factor 2)
CSF2RA	Stimulační faktor receptoru alfa (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor alpha)
DAZ	Deletováno v azoospermii (Deleted in azoospermia)
DAZL	Příbuzné deletováno v azoospermii (Deleted in azoospermia-like)
CDK	Cyklin dependentní kináza
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DHRSXY	Dehydrogenáza/reduktáza (SDR rodina) vázaná na X chromozom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
DYZ5	Amplifikovaný DNA úsek na Y chromozomu
EDTA	Ethylen diamin tetra-octová kyselina (Ethylen diamin tetra-acetic acid)
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FSH	Folikul stimulační hormon
GEO	Gene Expression Omnibus
GFP	Zelený fluorescenční protein (Green Fluorescein Protein)
GTPBP6	GTP vázaný protein 6 (GTP binding protein 6)
HNSCC	Gen pro pinocelulární karcinom hlavy a krku (Head and neck squamous cell carcinoma)
HSFY	Transkripční faktor tepelného šoku (Heat shock transcriptional factor on Y)
IBT	Test na přítomnost protilátek ve spermatu (Immunobead test)
IL3RA	Gen pro receptor interleukinu alfa (Interleukin 3 receptor alpha)
IL9R	Receptor pro interleukin 9
ISH	In situ hybridizace

KLH	Nosný protein (kuproprotein) vázající kyslík (Keyhole limpet hemocyanin)
LH	Luteinizační hormon
LSCC	Spinoecelulární karcinom plic (Lung squamous cell carcinoma)
MAR	Imunologický test na mužskou neplodnost (Mixed antiglobulin reaction test)
MSY	Pro muže specifická oblast na Y chromozomu (Male-specific region)
NF-Y	Nukleární faktor (Nuclear factor)
NRV	Nerekombinantní oblast na chromozomu Y (Non-recombinant region Y)
ORF	Otevřený čtecí rámec (Open reading frame)
P2RY8	Purinoreceptor P2Y 8 (Purinergic receptor P2Y 8)
PAR	Pseudoautozomální oblast na chromozomu Y (Pseudoautosomal region)
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PDA	Diskriminační analýza (Penalized discriminant analysis)
PLCXD1	Fosfatidylinositol specifická fosfolipáza (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1)
PPP2R3B	Serin/threonine-proteinová fosfatáza (Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B" subunit beta)
PRINS	In situ PCR
PRKY	Serin/threonine-protein kináza
PRY	Y vázaný tyrosin fosfatázový N13 příbuzný protein
RBM	Retinoblastomový tumor supresorový gen
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
SET/NAP	Protoonkofakgen SET (Suppressor of variegation, enhancer of zeste and trithorax) a tor kompletující nukleozom (Nucleosome assembling protein)
SFRS17A	Sestřihový, na arginin a serin bohatý, 17A faktor
SHOX	Gen asociovaný s malým vzrůstem (Short stature homeobox gene)
SIDDT	Syndrom náhlého úmrtí kojenců, spojený s dysgenezí testes (Sudden infant death with dysgenesis of testes)
SLC25A6	Nosič rodiny 25, člen 6 (Solute carrier family 25 member 6)
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism)
SOX9	SRY-related high-mobility group [HMG] box 9
SPGY	Gen pro spermatogenezi (Spermatogenesis gene on Y)
SPRY3	Protein sprouty homolog 3

SRY	Oblast na chromozomu Y určující pohlaví (Sex determining region)
SYBL1	Synaptobrevin-like 1
TE	Pufr obsahující TRIS a EDTA
TSPX	Testis specifický protein na X chromozomu
TSPY	Testis specifický protein na Y chromozomu
TSPYL	Podobný testis specifický protein na Y chromozomu (Testis Specific Protein on Y chromosome – like)
UTR	Nepřekládaná oblast (UnTranslated Region)
VCY	Různě nabitý protein (Variably charged protein on Y)
WASH6P	Homolog 6 proteinové rodiny WAS (WAS protein family homolog 6)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organization)
WT-1	Gen pro Wilmsův tumor (Wilm's tumor gene)
XKRY	Prekurzor krevní skupiny dle Kella (X Kell blood group precursor-related Y-linked)
ZBED1	BED doména se zinkovým prstem, obsahující protein 1 (Zinc finger BED domain-containing protein 1)

9. Přílohy

Příloha č. 1 – Informovaný souhlas

Souhlas klienta s genetickým laboratorním vyšetřením

Jméno vyšetřované/ho:.....

Rodné číslo:.....

Účel genetického laboratorního vyšetření:

Vážená paní, vážený pane, pracovníci Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny, Porodnicko-gynekologické kliniky, Urologické kliniky a Ústavu patologie LF UP Olomouc a FN Olomouc se na Vás obrazejí s žádostí o poskytnutí vzorku Vaší tkáně a/nebo periferní krve ke genetické analýze. Důvodem provedení genetické analýzy je výzkumná práce, která by mohla odhalit dosud neobjasněné příčiny tumorogeneze, infertility a patogeneze gonád. Nabízíme Vám možnost začlenění do našeho výzkumu, ze kterého můžete kdykoliv v jeho průběhu vystoupit a nebude to mít pro Vás žádný dopad na další léčebný postup.

Předpokládaný prospěch tohoto vyšetření: Přesnější a rychlejší odhalování příčin patologií gonád ve vztahu k tumorogenezi a gametogenezi.

A. Prohlášení lékaře

Prohlašuji, že jsem vyšetřované/mu (zákonnému zástupci vyšetřovaného) jasně a srozumitelně vysvětlil/a účel, povahu, předpokládaný prospěch, následky i možná rizika výše uvedeného genetického laboratorního vyšetření. Rovněž jsem vyšetřovanou osobu seznámil/a s možnými výsledky a s důsledky toho, že by vyšetření nebylo možno za výše uvedeným účelem provést (nezdařilo by se) nebo by nemělo potřebnou vypovídací schopnost pro naplnění sledovaného účelu. Seznámil/a jsem vyšetřovanou osobu (zákonného zástupce) i s možnými riziky a důsledky v případě odmítnutí tohoto vyšetření. Výsledky laboratorního vyšetření budou důvěrné a nebudou bez souhlasu vyšetřované osoby/zákonného zástupce sdělovány třetí straně, pokud platné právní předpisy neurčují jinak.

Jméno lékaře:.....

Podpis:

Dne..... 200.....

B. Prohlášení vyšetřované osoby

Potvrzuji, že mi bylo poskytnuto genetické poradenství ke genetickému laboratornímu vyšetření za účelem jak uvedeno shora. Vše mi bylo sděleno a vysvětleno jasně a srozumitelně. Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékaře zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

B. 1 Za účelem výše uvedeným souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku z mého těla a s provedením těchto vyšetření:

Kultivace buněk z odebraných tkání a Molekulární genetická vyšetření

Vyšetření DNA/RNA/proteinu z postižené a referenční odebrané tkáně a/nebo periferní krve.

Ze vzorku:

žilní krev gonadální tkáň

Jiné.....

B. 2 Dále si přeji následující:

- Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření : byl(a) / nebyl(a) seznámen (a)*
- Aby o výsledku vyšetření byly informovány následující osoby:
.....
- Souhlasím/ nesouhlasím *s případným zapsáním mé osoby do registru nemocných
.....
- s chorobou:.....

* vybranou variantu označte

B. 3 Rozhodl (a) jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

- Pokud to bude možné, bude můj vzorek (vzorky) skladován pro další analýzu provedenou k mému prospěchu a prospěchu mé rodiny, ale vždy budu před dalším vyšetřením poučena a nově navrhovaná genetická laboratorní vyšetření budou provedena až s mým aktuálním informovaným souhlasem.
- Můj vzorek (vzorky) bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.
 - Souhlasím s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu
 - Nesouhlasím s anonymním využitím DNA k lékařskému výzkumu
 - Jiné:

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsánoho genetického laboratorního vyšetření s podmínkami jak uvedeny výše.

Jsem si vědom/a toho, že svůj souhlas mohu kdykoliv odvolat.

Podpis vyšetřované osoby

V

Dne..... 200.....

Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopisech, z nichž jeden obdrží vyšetřovaná osoba (zákonný zástupce) a druhý informující lékař.

Pro potřeby ostatních subjektů, podílejících se na diagnostice, se poskytuje (lékařem potvrzená) kopie tohoto dokumentu.

10. Seznam prezentací

Publikace

Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, Singh AR, Krizova K, Svacinova V, Horinova V, Dostal J, Oborna I, Brezinova J, Sobek A, Santavy J. TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2007 May;14(5):579-87.

Svacinova V, Vodicka R, Vrtel R, Godava M, Kvapilova M, Krejcirikova E, Dusek L, Bortlicek Z, Santavy J. Sequence recombination in exon 1 of the TSPY gene in men with impaired fertility. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011; 155:XX.

Postery

Svačinová V, Vodička R, Vrtěl R, Singh AR, Křížová K, Dušek L, Krejčířiková E, Šantavý J. Gen TSPY jako významný marker při poruchách spermatogeneze a při tumorigenezi. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČSL JEP, 19. – 21. 9. 2007 Praha.

Vrtěl R, Vodička R, Singh AR, Dušek L, Dostál J, Sobek A, Křížová K, Svačinová V, Krejčířiková E. An association of TSPY gene copy number with male infertility. European human genetics conference 2006. 6-9.5. 2006 Amsterdam, Nizozemsko.

Vrtěl R, Vodička R, Singh AR, Dušek L, Křížová K, Svačinová V, Hořínková V, Zatura F. Repetitive and sequence TSPY gene polymorphism in infertile men and immunofluorescent TSPY protein detection in paraffin embedded seminoma tissues. International congress of human genetics 2006 –6. – 10. 8. 2006 Brisbane, Austrálie.

Přednášky

Svačinová V, Vodička R, Vrtěl R, Krejčířiková E. Sekvenční analýza genu TSPY u mužů s poruchou plodnosti. Celostátní pracovní konference; sekce zdravotních laborantů. LF a FN UP v Olomouci. 31.3.2006 Olomouc.

Svačinová V, Vodička R, Vrtěl R. Sekvenční analýza genu TSPY u mužů s poruchou plodnosti. Kaprasův den: Klinická genetik, 21.3.2007 Praha.

Svačinová V, Vodička R, Vrtěl R, Krejčířiková E, Schneiderová E, Šantavý J. Studium polymorfismů repetitivního genu TSPY. Přínos lékařské genetiky pro reprodukční medicínu, 8.11.2006 Olomouc.

Svačinová V, Vodička R, Vrtěl R, Singh AR, Křížová K, Dušek L, Krejčířiková E, Šantavý J. Gen TSPY jako významný marker při poruchách spermatogeneze a při tumorogenezi. Kongresová prezentace vědeckých prací DSP, 10. – 11. 9. 2007 Olomouc.

Svačinová V, Vodička R, Vrtěl R, Jurak L, Krejčířiková E, Šantavý J. Polymorfismus genu TSPY u mužů s poruchou plodnosti, seminomů a Y pozitivních pacientek s Turnerovým syndromem. Celostátní konference DNA diagnostiky, 26 - 27. 11. 2009 Olomouc.

