

ZAKLJUČNO POROČILO

*o rezultatih internega raziskovalnega projekta UKC Maribor
za obdobje od 25. 4. 2022 do 24. 4. 2024*

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta:	IRP-2021/02-02	
Naslov projekta:	ISKANJE VZROČNIH KANDIDATNIH GENOV PRI MOŠKI NEPLODNOSTI Z ANALIZO STRUKTURNIH GENOMSKIH VARIABILNOSTI	
Vodja projekta:	prof. dr. Nadja KOKALJ VOKAČ, spec. lab. med. genetike	
Trajanje projekta (leta, od-do):	2 leti	25. 4. 2022 - 24. 4. 2024
Velikost projekta	☒ mali (do 10.000,00 EUR)	☐ veliki (do 50.000,00 EUR)

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

1. Poročilo o realizaciji predloženega programa raziskovalnega projekta - opis raziskave (izhodišča, predstavitev problema, metode dela), ugotovljeni rezultati in uporaba (največ do 3 strani)

Moška neplodnost je multifaktorsko patološko stanje, ki prizadene približno 7% moške populacije. Težave med spermatogenezo se odražajo v manjši, nepravilni ali odsotni proizvodnji semenčic. Ugotavljamo jih z analizo semenskega izliva in opredelimo z izrazi, kot so azoospermija (odsotnost semenčic v semenskem izlivu), oligozoospermija (nižja koncentracija), teratozoospermija (nižji delež pravilno oblikovanih semenčic ali astenozoospermija (nižji delež progresivno gibljivih semenčic)). Genetska slika moške neplodnosti je izredno kompleksna in vključuje najmanj 2000 genov, ki sodelujejo v spermatogenezi. Genetski faktor kot vzrok za moško neplodnost, je najpogostejše prisoten pri azoospermiji (25%), vendar raste z novimi analizami tudi pri drugih kategorijah moške neplodnosti. Najpogostejši vzrok hudih okvar spermatogeneze so anomalije spolnih kromosomov. Pri 15% primerov neobstruktivne azoospermije je vzrok dodatni kromosom X, ki vodi v sindrom Klinefelter: 47,XXY. Pogosti so tudi primeri XX moških, robertsonovih in recipročnih translokacij. Raziskave kromosoma Y so pokazale delecije v regiji na Yq – AZF a, b, in c regije (azoospermalni faktor) z najpomembnejšo regijo DAZ1-4 (deleted in azoospermia). Te regije vključujejo številne gene BPY2, CDY, DAZ, HSFY, RBMY, PRY, TSPY; VCY and XKRY, ki se izključno izražajo v testisih in so vzrok za oligozoospermijo in azoospermijo pri 2 - 10% neplodnih moških. Poleg genov na Y kromosomu, ima pomembno vlogo tudi AR (gen za androgeni receptor) na X kromosomu ter CFTR gen na kromosomu 7. Mutacije v CFTR genu povzročajo v 60 – 70% primerih odsotnost semenovoda (CAVD), ki pa se sicer redko pojavlja. Z razvojem genomskih študij so se odkrili novi geni, ki so locirani na avtosomnih kromosomih in imajo različno vlogo v spermatogenezi. Mutacije avtosomskih genov so večinoma vključene v hipogonadizem, monomorfnost teratozoospermijo ali astenozoospermijo, prirojeno obstruktivno azoospermijo in družinske primere kvantitativne motnje spermatogeneze. Genomske študije so pokazale, da imajo pogoste različice relativno majhno vzročno vlogo, medtem ko strukturne genomske variabilnosti (CNV – copy number variations) prispevajo predvsem k družinskim primerom moške neplodnosti. Kljub vsem genetskim analizam ostaja 40% moške neplodnosti nepojasnjene, kar je velik izziv v andrologiji.

Načini odkrivanja genetskih vzrokov moške neplodnosti so se s časom spreminjali. Kariotipizacija omogoča odkrivanje večjih sprememb kot so aneuploidije spolnih kromosomov ter uravnosteznih kromosomskih spremembe. Mikrodelecije na kromosomu Y se analizirajo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), za analizo mutacij v drugih genih pa tehnike, kot so elektroforeza z denaturacijskim gradientnim gelom (DGGE) in analiza enoverižnega konformacijskega polimorfizma (SSCP) ter s presejanjem z visoko zmogljivo tekočinsko kromatografijo (DHPLC). Kljub številnim tehnikam, so do odkritja genomske analize, ostali genetski vzroki moške neplodnosti v večini primerov neznani. Primerjalna genomska hibridizacija, ki temelji na mikromrežih (Array CGH in SNP Arrays), je dramatično povečala ločljivost odkrivanja genomske delecije in duplikacije, t.i. strukturnih genomske variabilnosti (CNV). Medtem ko je bilo jasno dokazano, da imajo CNV-ji, prisotni na Y kromosomu, negativen učinek na spermatogenezo, je bilo le nekaj drugih strukturnih genomske variabilnosti na avtosomnih kromosomih povezanih z moško neplodnostjo. Uporaba tehnologije mikromrež se v diagnostiki uporablja približno 10 let. Leta 2011 je razkrila pomemben CNV na kromosomu 19, povezano z moško neplodnostjo, 200 kb homozigotno delecijo, ki prizadene gen DPY19L2 (Harbuz et al. 2011; Koscinski et al. 2011). Leta 2015 so z matriko visoke ločljivosti-CGH Yatsenko in sodelavci identificirali delecijo treh eksonov gena TEX11 na kromosomu X pri dveh bolnikih z azoospermijo (Yatsenko et al. 2015). Druga skupina je poročala tudi o mutacijah v TEX11 pri bolnikih z azoospermijo (Yang et al. 2015). Z uporabo podobnega pristopa mikromrež so bile ugotovljene ponavljajoče se delecije, ki vplivajo na gen DMRT1, ki se nahaja na kromosomih 9, povezane z azoospermijo (Lopes et al. 2013; Lima et al. 2015). Klinični pomen drugih redkih CNV, o katerih so poročali raziskovalci v omejenem številu ali celo pri enem neplodnem moškem, ostaja negotov. Analize na mikromrežah so tako poudarile pomembno vlogo CNV-jev pri moški neplodnosti. Z razširjeno uporabo sekvenciranja nove generacije (NGS) se zdaj ponuja priložnost za kombiniranje odkrivanja CNV-jev in drugih bolj zapletenih strukturnih variabilnosti s hkratnim odkrivanjem SNV (structure number variations) (Zhou et al. 2018; Ho et al. 2019). Zgodovina analize vzrokov moške neplodnosti, nam kaže, da je kombinacija citogenetskih in molekularno genetskih metod ključna pri iskanju vzročnih genov in kromosomskih nepravilnosti. Strukturne genomske variabilnosti v velikosti nekaj kb so še vedno velika neznanka in pomemben razlog spremenjene genske regulacije. S pomočjo novih dizajnov mikromrež in boljše resolucije pomeni uporaba Array-CGH tehnik eno od ključnih metod za analizo delecij in duplikacij genov, ki vplivajo na moško neplodnost. Za izvedbo projekta smo uporabili metodo molekularne kariotipizacije na mikromrežah Agilent GenetiSure Cyto 4 x 180K CGH (Bild GRCh37 : SurePrint Cyto).

REZULTATI:

Analizirali smo 51 pacientov z diagnozo moške neplodnosti, kjer po osnovnih genetskih analizah: kariotipizaciji, mikrodelecijah kromosoma Y in delecijah v CFRT genu, ni bil ugotovljen vzrok stanja azoospermije.

1 od analiz ni uspela

6 analiz je pokazalo odstopanja v CNV: 4 patogene variante CNV

3 variante z neznanim kliničnim pomenom (VOUS).

Torej smo skupno identificirali 12% CNV-jev.

Patogene variabilnosti:

1. dup(5q11.1-q11.2) – 5.790 Kb velika duplikacija
2. del(Yq11.223-q11.3) – 2,775Kb velika delecija
3. del(Yq11.223-q11.23) – 3197 KB velika delecija
4. del(Yq11.23) – 140 KB velika delecija

VOUS variabilnosti:

1. del(15q11.1-q11.2) – 2324Kb velika delecija (2x)
2. dup(8p11.21-p11.1) – 997 Kb velika duplikacija

Analizirali smo tudi variabilnosti v regiji HLA, ki spadajo med normalne variabilnosti. Kljub temu je potrebna še nadaljnja analiza teh sprememb, saj se pojavljajo pogosteje, kot v splošni populaciji.

Rezultate pripravljamo za objavo na Evropskem kongresu humane genetike (ESHG) in na kongresu evropskega združenja za reproduktivno medicino (ESHRE) ter na domačem kongresu slovenskega genetskega društva. Rezultate raziskav nameravamo objaviti v mednarodni reviji z visokim faktorjem vpliva in/ali v strokovni reviji.

Rezultati naše raziskave z uporabo novega dizajna mikromrež sicer kažejo na uporabnost tega dizajna, vendar ne na večjo klinično uporabnost, kot je dizajn, ki ga rutinsko uporabljamo (CytoShure Agilent) za določanje CNV-jev.

Pridobitev je seveda tudi za paciente, kjer prej vzroka za njihovo neplodnost nismo ugotovili. Paciente s patološkimi rezultati bomo povabili na genetski posvet in jim razložili izvide.

2. Ocena stopnje realizacije in zastavljenih raziskovalnih ciljev (obkrožite)

☒ DA ☐ NE

Če je odgovor NE, napišite kratko utemeljitev

3. Pridobitev za UKC Maribor - doktorska disertacija, članek, prispevek na znanstveni konferenci/simpoziju ali kongresu, patent, uvedba novih dejavnosti, smernic in metod ali izboljšanje že obstoječih itd. (največ do 1 stran)

Doktorska disertacija, magistrska naloga, raziskovalna naloga, specialistična naloga:
Objavljeni članki:
Nove metode, smernice, dejavnosti:
Ugotavljamo, da je analiza strukturnih genomskih variabilnosti na mikromrežah dopolnilna metoda za diagnosticiranje moške neplodnosti predvsem, kadar gre za velike delecije na kromosomu Y, ki niso zajete v standardni diagnostiki mikrodelecij Y z metodo PCR. Prav tako je metoda izbora, kadar je moška neplodnost vezana z drugimi fenotipskimi znaki in je povezana z mikrodelecijami in mikroduplicacijami na avtosomnih kromosomih.
Prispevki (konference, srečanja, kongresi, simpoziji): v pripravi

4. Sumaričen prikaz ciljev projekta (obvezno izpolniti!)

	Doktorat, magisterij, raziskovalna ali specialistična naloga	Objavljeni članki	Nove metode, smernice, dejavnosti	Prenos znanja (konference, srečanja, kongresi, simpoziji)
(DA/NE)			DA	v pripravi
Število			1	

Datum: 8.4.2024	Podpis vodje projekta:
-----------------	------------------------

UNIVERZITETNI KLINIČNI CENTER MARIBOR
KLINIČNI INŠTITUT ZA GENETSKO DIAGNOSTIKO

prof. dr. Nadja KOKALJ VOKAČ, univ. dipl. biof.
specialistka laboratorijske medicinske genetike

Izpolni Oddelek za znanstveno-raziskovalno delo	
REALIZACIJA PROJEKTA ☐ CILJI IZPOLNjeni V CELOTI ☐ CILJI DELNO IZPOLNjeni ☐ CILJI NISO IZPOLNjeni Porabljena sredstva (v EUR): _____	Pregledal in ocenil predstojnik OZRD: Podpis: _____ Datum: _____