



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Ústav experimentální biologie**

---



# **Geneticky podmíněné příčiny neplodnosti u mužů**

**Bakalářská práce**

**Tereza Kramářová**

**Vedoucí práce: Mgr. Jan Smetana Ph.D.**

**Brno 2017**

## Bibliografický záznam

**Autor:** Tereza Kramářová  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Geneticky podmíněné příčiny neplodnosti u mužů

**Studijní program:** Biologie

**Studijní obor:** Lékařská genetika a molekulární diagnostika

**Vedoucí práce:** Mgr. Jan Smetana Ph.D.

**Akademický rok:** 2016/2017

**Počet stran:** 45

**Klíčová slova:** neplodnost mužů; genetické vady; genetické rizikové faktory; polymorfismus; variabilita v počtu kopií; sekvenování nové generace

# Bibliographic Entry

**Author:** Tereza Kramářová  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** Genetic aberrations associated with male infertility

**Degree Programme:** Biology

**Field of Study:** Medical genetics and molecular diagnostics

**Supervisor:** Mgr. Jan Smetana Ph.D.

**Academic Year:** 2016/2017

**Number of Pages:** 45

**Keywords:** male infertility; genetic disorders; genetic risk factors; polymorphism, copy number variant, next-generation sequencing

## **Abstrakt**

Mužská neplodnost stojí za neplodností párů přibližně v polovině případů, nicméně příčiny mužské neplodnosti nejsou zcela objasněny. Cíl bakalářské práce spočívá v uceleném přehledu poznatků o genetických příčinách mužské neplodnosti včetně výsledků studií využívajících technologie sekvenování nové generace.

## **Abstract**

Male infertility is responsible for infertility of couples in about half of the cases, however the causes of male infertility are not fully clarified. The aim of the bachelor thesis is to provide a comprehensive overview of the genetic causes of male infertility, including the results of studies using the next generation sequencing technologies.



MASARYKOVA UNIVERZITA  
Přírodovědecká fakulta

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

**Ústav:** Ústav experimentální biologie  
**Studentka:** Tereza Kramářová  
**Program:** Biologie  
**Obor:** Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Ředitel *Ústavu experimentální biologie* PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

**Název práce:** Geneticky podmíněné příčiny neplodnosti u mužů  
**Název práce anglicky:** Genetic aberrations associated with male infertility

### Oficiální zadání:

Neplodnost u mužů patří mezi typické multifaktoriální komplexní onemocnění s velmi variabilním fenotypovým projevem. Až 15% případů mužské neplodnosti je asociováno s genetickými odchylkami a až 40% případů primárního testikulárního selhání není odhalena známa etiologie onemocnění. Během posledních 10 let byla vyvinuta plejáda testů pro screening delecí na chromozomu Y, nicméně výsledky moderních mikročipových celogenomových technik ukazují, že kromě abnormalit na chromozomu Y lze pozorovat u mužů se sníženou spermatogenezí genetickou zátěž (zejména delece) v rámci celého genomu. V éře sekvenování nové generace (NGS) lze předpokládat další rozšíření poznatků na základě screeningu mutací a odhalování kandidátních jednonukleotidových polymorfismů, které mohou být asociovány s poruchami plodnosti u mužů. Cílem bakalářské práce bude ucelený literární přehled aktuálních poznatků o genetice mužské neplodnosti, se zvláštním zaměřením na nové poznatky a výsledky produkované pomocí NGS u kohort pacientů z bělošské populace.

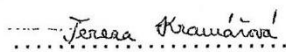
**Jazyk závěrečné práce:** čeština

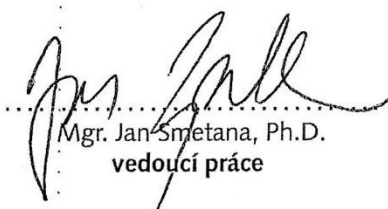
**Vedoucí práce:** Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

**Datum zadání práce:** 21. 10. 2016

**V Brně dne:** 11. 11. 2016

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

  
Tereza Kramářová  
studentka

  
Mgr. Jan Smetana, Ph.D.  
vedoucí práce

  
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel Ústavu experimentální  
biologie

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Janu Smetanovi Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při zpracování bakalářské práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

**Brno 10. května 2017**

.....

**Tereza Kramářová**

# Obsah

1 Úvod.....	8
2 Neplodnost.....	9
3 Mužská neplodnost .....	10
3.1 Spermatogeneze .....	10
3.2 Diagnostika mužské neplodnosti .....	11
3.3 Léčba mužské neplodnosti.....	12
4 Genetické příčiny mužské neplodnosti .....	13
4.1 Početní a strukturní chromozomové aberace .....	13
4.1.1 Klinefelterův syndrom .....	14
4.1.2 Mikrodelece chromozomu Y.....	14
4.2 Genové mutace.....	15
4.2.1 Mutace genu CFTR, cystická fibróza a CBAVD .....	15
5 Genetická vyšetření mužské neplodnosti .....	16
6 Metody sekvenování DNA .....	17
6.1 Klasické metody sekvenování DNA .....	17
6.2 Sekvenování nové generace .....	18
6.2.1 Solexa/Illumina technologie .....	18
6.2.2 Ion Torrent technologie .....	19
6.2.3 Oxford Nanopore technologie.....	21
7 Výzkum mužské neplodnosti a využití NGS.....	22
7.1 Výzkum zaměřený na kandidátní geny .....	22
7.2 Celogenomové studie .....	25
7.2.1 Studie zaměřené na SNPs .....	27
7.2.2 Studie zkoumající vliv CNVs.....	29
7.3 Mitochondriální DNA .....	30
7.4 Epigenetické příčiny.....	30
7.5 Sekvenování s využitím NGS .....	31
8 Závěr .....	34
9 Literatura .....	35
Seznam obrázku.....	45
Seznam tabulek.....	45
Seznam příloh.....	45
Přílohy .....	46

# 1 Úvod

Mužská neplodnost představuje komplexní onemocnění, které přispívá k neplodnosti párů přibližně stejným dílem, jako neplodnost ze strany žen. Významné množství mužů trpících neplodností však zůstává bez objasněné příčiny tohoto onemocnění, ačkoliv se výzkum neustále snaží problematice mužské neplodnosti porozumět.

Předpokládá se, že podstatnou část nediagnostikovaných případů způsobují dosud nestanovené vady na genetické úrovni, a proto se výzkum mužské neplodnosti zaměřuje na identifikaci genetických rizikových faktorů, které by mohly rozšířit současný diagnostický panel vyšetření. Genetická diagnostika neplodných mužů běžně zahrnuje pouze vyšetření karyotypu, mikroleccí chromozomu Y a mutací v *CFTR* genu. Vzhledem k možnostem reprodukční medicíny, která umožňuje početí potomka i mužům s neznámou příčinou neplodnosti, by odhalení genetické podstaty neplodnosti rovněž přispělo k zamezení přenosu genetické zátěže na potomky za použití preimplantační genetické diagnostiky.

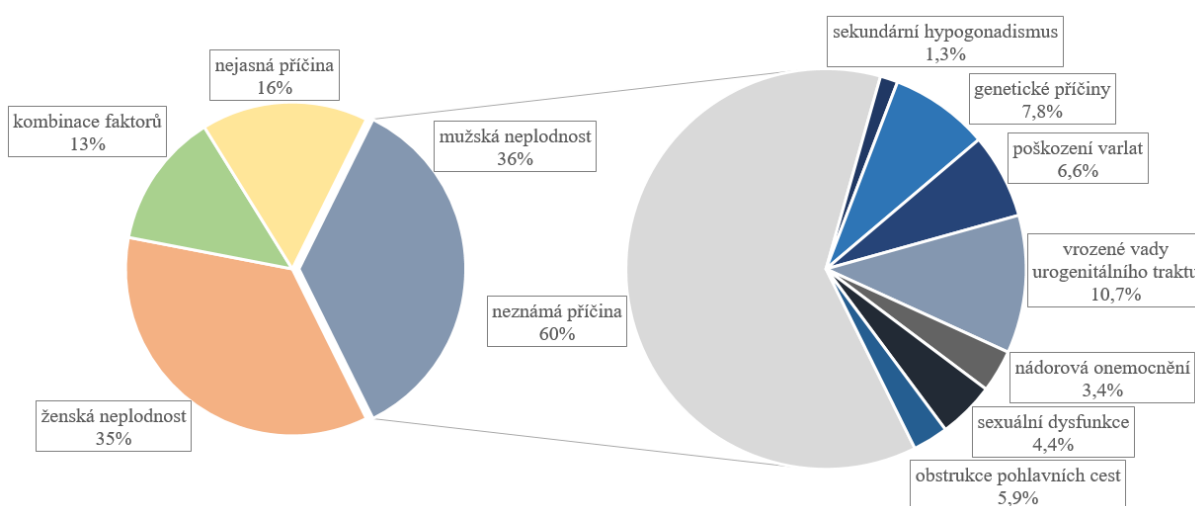
Bakalářská práce pojednává o geneticky podmíněných příčinách mužské neplodnosti s cílem vytvoření jejich uceleného přehledu. Práce zahrnuje výsledky studií prováděných za účelem hledání nových genetických rizikových faktorů, se zaměřením na studie využívající metody sekvenování nové generace, jejichž principy jsou v práci rovněž uvedeny.



## 2 Neplodnost

Světová zdravotnická organizace (WHO) označuje neplodnost za onemocnění rozmnožovacího systému, kdy nedojde k úspěšnému početí při pravidelném nechráněném pohlavním styku do dvanácti měsíců (Zegers-Hochschild *et al.* 2009). Tato formulace od sebe nerozlišuje neplodnost primární a sekundární, tedy nereflektuje, jestli pár úspěšně prodělal předchozí těhotenství (Nieschlag, 2010). Na jejím základě se uvádí, že přibližně 15 % párů v produktivním období můžeme označit za neplodné a vyhledají lékařskou pomoc. Jeden z osmi párů vykazuje potíže s početím prvního potomka a jeden z šesti párů s početím potomka následujícího (Anawalt, 2013, Jungwirth *et al.* 2015).

Neplodnost páru může být způsobena pouze jedním z partnerů nebo oběma partnery současně (Obr. 1). Ženská neplodnost podmiňuje 40-50 % případů neplodných párů, mužský faktor neplodnosti 30-40 % a ve zbývajících 10-30 % se jedná o kombinaci poruch na obou stranách páru nebo nevysvětlitelnou příčinu neplodnosti (Kara a Simoni, 2010). Přestože z některých dat vyplývá, že muž je příčinou neplodnosti párů až v polovině případů, zdravotnická péče se věnuje ve větší míře neplodnosti žen. Tato skutečnost se současně odráží v malém množství případů ženské neplodnosti, u kterých nebyla zjištěna jejich příčina (Nieschlag, 2010).



**Obr. 1:** Příčiny neplodnosti párů. Převzato a upraveno dle Kara a Simoni, 2010. Mužská data získána z Punab *et al.* 2017.

### 3 Mužská neplodnost

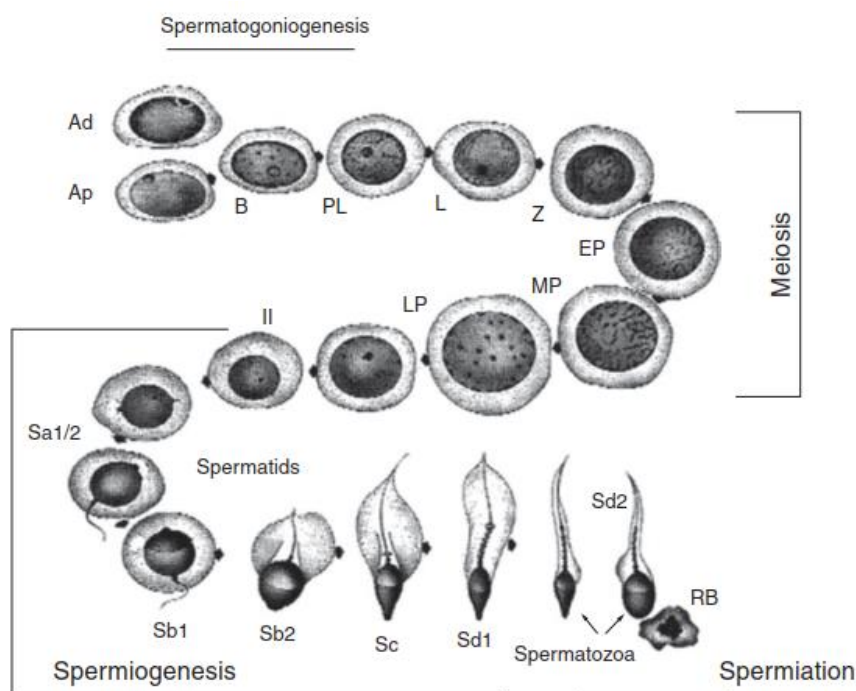
Neplodnost postihuje okolo 7 % světové mužské populace (Krausz, 2011). Jedná se o multifaktoriální onemocnění, které může být vyvoláno celou řadou příčin, ale ve většině případů stále nedokážeme objevit jeho původ (Simon *et al.* 2013, Punab *et al.* 2017).

Pro správné fungování mužského pohlavního systému a následné reprodukce musí docházet k normálnímu procesu spermatogeneze a kompletnímu dozrání spermií v mužských pohlavních orgánech. Pohlavní orgány musí být průchodné a produkovat dostatečné množství spermatu, které je muž schopen umístit do pochvy ženy. Spermie se musí aktivně dostat k vajíčku ve vejcovodu ženy a proniknout dovnitř (Kara a Simoni, 2010).

#### 3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze představuje veškeré procesy vedoucí k produkci mužských pohlavních buněk, ke které dochází ve varlatech, konkrétně v semenotvorných kanálcích složených ze zárodečného epitelu, Sertoliho buněk a peritubulární tkáně (Neto *et al.* 2016).

Proces spermatogeneze (Obr. 2) začíná mitotickým dělením spermatogonia (spermatogoniogeneze), diploidní zárodeční buňky umístěné na bazální membráně semenotvorného kanálku, pokračuje řadou vývojových stádií buněk a končí vytvořením spermie, haploidní pohlavní buňky uvolněné do lumen kanálku (spermiace), (Hess a France, 2008).



**Obr. 2:** Vývojová stádia buněk během spermatogeneze. Převzato z Wienbauer *et al.* 2010.

Spermatogonia se rozlišují na tmavá a světlá spermatogonia typu A a spermatogonia typu B. Tmavá spermatogonia typu A obvykle nevykazují proliferační aktivitu a podstupují mitotické dělení v případě výrazného snížení počtu spermatogonií. Světlá spermatogonia typu A běžně proliferují a mitózou dochází k tvorbě dvou spermatogonií typu A, které nadále zůstávají v nediferenciovaném stavu a slouží k zachování počtů spermatogonií, nebo dvou spermatogonií typu B, které se následně mitoticky dělí za vzniku primárních spermatocytů, ležících nad vrstvou spermatogonií. Primární spermatocyt představuje diploidní buňku, ze které prvním meiotickým dělením vznikají dva haploidní sekundární spermatocyty se zdvojenou genetickou informací vstupující do druhého meiotického dělení, čímž dochází ke vzniku čtyř haploidních spermatid. Vytvořené spermatidy prochází komplikovanou transformací (spermiogeneze), při které dochází k tvarování a kondenzaci buněčného jádra, vytvoření akrozomu a bičíku a snížení množství cytoplazmy. Všechny procesy vedou ke vzniku nezralých spermií, které putují semenotvornými kanálky do nadvarlete, kde dojde k jejich definitivnímu zrání (Hess a France, 2008, Wienbauer *et al.* 2010, Cooper a Yeung, 2010).

Sertoliho buňky představují podpůrné buňky zárodečného epitelu, které jsou umístěné na bazální membráně semenotvorného kanálku a rozpínají se po celé výšce epitelu k lumen. Peritubulární tkáň se skládá především z vrstev peritubulárních buněk, myofibroblastů. Uspořádání myofibroblastů kolem kanálků vyvolává kontrakce jejich stěn, čímž dochází k pohybu spermií ven z kanálků. Prostor mezi semenotvornými kanálky vyplňuje intersticiální vazivo obsahující Leydigovy buňky významné produkci testosteronu, imunitní buňky, krevní a lymfatické cévy a nervy (Neto *et al.* 2016).

### **3.2 Diagnostika mužské neplodnosti**

Na základě zjištěné příčiny neplodnosti rozlišujeme defekty vznikající na úrovni pre-testikulární, testikulární a post-testikulární, které dále můžeme rozdělit na vrozené nebo získané (Krausz, 2011). Mezi hlavní příčiny mužské neplodnosti patří anatomické vady urogenitálního traktu, genetická a nádorová onemocnění, poruchy hormonálního řízení mužské rozmnožovací soustavy, sexuální dysfunkce a poškození varlat v důsledku exogenních vlivů (Punab *et al.* 2017). Rozdělení poruch testikulárních funkcí podle místa vzniku uvádí Příloha 1.

Diagnostika neplodnosti u muže zahrnuje důkladné prozkoumání lékařské dokumentace se zaměřením na rizikové faktory vedoucí k neplodnosti, zjištění informací o předchozích reprodukčních aktivitách, provedení tělesných testů hodnotících primární a sekundární pohlavní znaky a analýzu spermatu (Kuang, 2011).

Analýza spermatu představuje klíčové vyšetření mužské plodnosti, ze kterého se vychází při určování diagnózy a případné léčby (Anawalt, 2013). Laboratorním vyšetřením se zjistí základní vlastnosti spermií v ejakulátu a samotného ejakulátu. Celý proces analýzy podléhá standardizaci dle WHO, publikované ve „WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen“ v aktuálním znění. Zjištěné hodnoty jsou porovnávány s referenčními hodnotami, které byly stanoveny na základě rozsáhlé studie, prováděné za tímto účelem a jsou uvedeny v tabulce 1 (Cooper *et al.* 2010, WHO,2010).

**Tab. 1:** Referenční hodnoty pro zhodnocení výsledků analýzy spermatu. Převzato a upraveno podle Cooper *et al.* 2010.

Základní parametry spermiogramu	Referenční hodnoty
objem ejakulátu (ml)	1,5 (1,4-1,7)
koncentrace spermií (10 <sup>6</sup> /ml)	15 (12-16)
celkový počet spermií (10 <sup>6</sup> /ejakulát)	39 (33-46)
celková pohyblivost (%)	40 (38-42)
progresivní pohyblivost (%)	32 (32-34)
vitalita (živé spermie, %)	58 (55-63)
morfologie spermií (normální formy, %)	4 (3,0-4,0)

Hodnoty zmíněných parametrů spermatu jsou vysoce variabilní. Neplodnost se tedy nemusí u mužů projevit, přestože výsledky analýzy jejich spermatu nedosahují referenční hranice, a naopak může dojít k neplodnosti u mužů s výsledky přesahujícími uvedené hodnoty (WHO, 2010). Názvosloví používané při popisu kvality spermatu na základě výsledků spermiogramu uvádí Příloha 2.

### 3.3 Léčba mužské neplodnosti

Léčba neplodnosti vychází z diagnostického zhodnocení příčiny a závažnosti poruchy, na základě kterého se přistupuje k podávání léčivých přípravků, chirurgickému zákroku nebo využití možností asistované reprodukce (Sabanegh, 2011). V současnosti mohou být prakticky veškeré případy mužské neplodnosti vyřešeny některou z metod asistované reprodukce (ART), především intrauterinní inseminací, *in vitro* fertilizací nebo intracytoplazmatickou injekcí spermií, které se získávají přímo z ejakulátu nebo chirurgicky z nadvarlete – MESA nebo z testikulární tkáně – TESE (De Greyter *et al.* 2010, Chládek, 2013).

## 4 Genetické příčiny mužské neplodnosti

Genetické faktory podmiňují mužskou neplodnost nejméně v 15 % případů, u kterých dojde k objasnění příčiny. Navíc se předpokládá, že podstatnou část nediagnostikovaných případů způsobují dosud neidentifikované genetické vady, jako u mnoha dalších multifaktoriálních onemocnění (Krausz *et al.* 2015). Snahu o rozpoznání genetické podstaty mužské neplodnosti rovněž zvýšil rozvoj ART umožňující početí potomka mužům, kteří by toho přirozeně nedosáhli, a právě u případů mužské neplodnosti z neznámých příčin vznikla potřeba určit míru rizika přenosu případné genetické vady na potomka (Foresta *et al.* 2002). Odhalení genetické vady následně slouží pro účely preimplantační genetické diagnostiky (PGD), která umožňuje výběr geneticky nezatíženého embrya (Wells a Fragouli, 2013).

Fungování lidského pohlavního systému řídí spolupráce tisíců genů. Pochopení rozmnožovacího procesu však nespočívá pouze v objasnění funkce daných genů, vzhledem k tisícům malých nekódujících molekul RNA, které hrají roli při zachování stability mRNA, translaci a modifikaci proteinů a ochraně buněk zárodečné linie. Pokud dojde k chybě v některém z kroků podílejících se na správném vývoji a funkci pohlavního systému, může se stát příčinou neplodnosti (Matzuk a Lamb, 2008). Známé genetické příčiny mužské neplodnosti zahrnují zejména aneuploidie pohlavních chromozomů, chromozomové translokace, mikrolece chromozomu Y nebo mutace v řadě genů ovlivňujících funkci mužského pohlavního systému a spermatogeneze (Tüttelmann a Simoni, 2008, Nato *et al.* 2016). Klinicky významné genetické vady spojené s mužskou neplodností jsou detailně popsány v následujících podkapitolách.

### 4.1 Početní a strukturní chromozomové aberace

Chromozomové aberace se vyskytují u 2–8 % neplodných mužů, což představuje přibližně desetkrát vyšší výskyt oproti normální populaci (Foresta *et al.* 2002, Ravel *et al.* 2006). Jedná se především o početní aberace pohlavních chromozomů, zastoupené ve většině případů Klinefelterovým syndromem, nebo mikrolece úseků obsahujících azospermický faktor (AZF) na chromozomu Y (Foresta *et al.* 2005, Naasse *et al.* 2015). Vzájemnou souvislost mužské neplodnosti a chromozomových aberací demonstruje příkladová studie zaměřená na muže s oligozoospermií a neobstrukční azospermií. V rámci studie byl pozorován rostoucí výskyt chromozomových abnormalit s klesající koncentrací spermií. Chromozomové aberace byly nalezeny u 35 % azospermických a 12,8 % oligozoospermických pacientů, naproti tomu se chromozomové aberace vyskytovaly pouze u 1,1 % mužů s normozoospermií (Pylyp *et al.* 2013).

### 4.1.1 Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom představuje početní aberaci pohlavních chromozomů, charakterizovanou přítomností nejméně jednoho nadbytečného chromozomu X (Obr. 2). Toto onemocnění se vyskytuje přibližně u jednoho z šesti set mužů v normální populaci, avšak bývá diagnostikována u pouhé čtvrtiny postižených mužů (Bojesen *et al.* 2003). V rámci mužské neplodnosti Klinefelterův syndrom nacházíme u 5 % mužů s těžkou oligozoospermii a 10 % mužů s azoospermii (Foresta *et al.* 2005). Snížený počet spermií v ejakulátu při Klinefelterově syndromu způsobuje především porucha spermatogeneze, která spočívá v neobvykle rychlé degeneraci semenotvorných kanálků se spermatogonií (Aksglæde *et al.* 2006).

Muži s Klinefelterovým syndromem mohou k početí potomka využít metod asistované reprodukce, které by měly být doprovázeny PGD z důvodu zvýšeného výskytu chromozomálních vad spermií (Friedler *et al.* 2001, Morel *et al.* 2003). Nicméně léčba, zakončená porodem živého plodu, bývá úspěšná v méně než polovině případů (Bakircioglu *et al.* 2011).

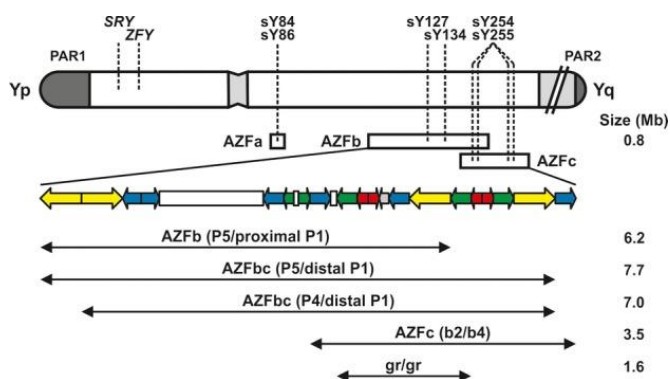


*Obr. 3: Karyotyp muže s Klinefelterovým syndromem, 47,XXY. Převzato z Shamsi et al. 2011.*

### 4.1.2 Mikrodelece chromozomu Y

Chromozom Y nese na dlouhém raménku (Yq) tři úseky, nazývané azoospermické faktory, AZFa, AZFb a AZFc (Obr. 3), které obsahují klíčové geny pro průběh spermatogeneze (Vogt *et al.* 1996). Mikrodelece zmíněných úseků se vyskytuje u 5-10 % mužů s těžkou oligozoospermii a 10-15 % azoospermických mužů (Foresta *et al.* 2005, Mascarenhas *et al.* 2016). Delece úseků AZFa způsobuje syndrom, při kterém se ve varlatech nachází Sertoliho buňky, ale nejsou přítomny buňky zárodečné („Sertoli-cell-only“, SCOS). Delece AZFb vede k zastavení spermatogeneze na úrovni primárních spermatocytů. Částečná nebo kompletní delece regionu AZFc se projevuje velmi variabilně od oligozoospermie k azoospermii (Vogt, 2005).

Vzhledem k tomu, že většina mužů s mikrodelecemi chromozomu Y vykazuje azoospermii, dochází u nich k přirozenému početí pouze ojediněle (Kühnert *et al.* 2004) a mikrodelece vznikají obvykle *de novo* (Edwards a Bishop, 1997). V případě využití metod asistované reprodukce, se mikrodelece přenáší do následující generace mužských potomků (Komori *et al.* 2002, Silber a Repping, 2002), a proto se využívá PGD k určení pohlaví embrya a rozsahu genetické zátěže (Krausz, 2011).



**Obr. 4:** Schématické znázornění mikrodeleci chromozomu Y. Převzato z Krausz *et al.* 2014.

## 4.2 Genové mutace

Mužská plodnost může být ovlivněna mutacemi stovek genů, které se podílí na určení pohlaví, vývoji pohlavních orgánů a spermatogenezi, nicméně klinické významnosti v rámci diagnostiky zatím dosáhla pouze velmi malá část genů (Matzuk a Lamb, 2008).

### 4.2.1 Mutace genu CFTR, cystická fibróza a CBAVD

Cystická fibróza je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi *CFTR* genu umístěném na sedmém chromozomu v lokusu 7q31.2. Tento gen kóduje protein nezbytný pro přenos chloridových iontů skrze buněčnou membránu (Kosařová, 2013). Běžnou mutaci genu *CFTR* představuje delece tří bází kódující fenylalanin na pozici 508, polymorfismus intronu 8 (tzv. 5T alela) nebo mutace R117H (Yu *et al.* 2012).

Muži s cystickou fibrózou trpí poruchami plodnosti v 95 % případů a muži zatížení kombinací dvou mírných mutací nebo kombinací vážné a mírné mutace *CFTR* genu tvoří obvykle 80-90 % pacientů s vrozenou oboustrannou agenezí chámovodu (CBAVD). CBAVD představuje formu obstrukční azoospermie, při které dochází k přerušení spojení mezi nadvarletem a ejakulačním vývodem, což způsobuje přirozenou překážku oplození (Claustres *et al.* 2000). Muži s CBAVD mají zachovaný proces spermatogeneze, takže mohou využít k početí metod asistované reprodukce, při které se vzhledem k autosomálně recesivní dědičnosti onemocnění doporučuje vyšetření partnerky na mutace *CFTR* genu a případně PGD k zabránění přenosu onemocnění na potomka (Georgiou *et al.* 2006, Sosnay *et al.* 2013).

## 5 Genetická vyšetření mužské neplodnosti

Hlavním podnětem pro genetické testování neplodnosti u muže představuje azoospermie a těžká oligozoospermie zjištěná ze spermiogramu. Ačkoliv nejsou stanoveny hraniční parametry, jejichž překročení by vedlo ke genetickému vyšetření, v rámci klinické praxe se k němu přistupuje, pokud koncentrace spermií nedosahuje  $10 \cdot 10^6/\text{ml}$  nebo ejakulát obsahuje méně než  $10\text{-}15 \cdot 10^6$  celkového počtu spermií (Tüttelmann a Simoni, 2008).

Genetické testování zahrnuje cytogenetickou analýzu karyotypu, detekci mikroleceí dlouhého raménka chromozomu Y a molekulárně-genetickou diagnostiku mutací genu *CFTR* u mužů s jednostrannou nebo oboustrannou vrozenou absencí chámovodu. Vyšetření ojedinělých genetických vad může být provedeno ve zvláštních případech, ale není součástí běžné klinické praxe (McLachlan a O'Bryan, 2010, Simoni a Wieacker, 2010). Jedná se například o vyšetření mutací genu *KALI*, způsobujících Kallmannův syndrom, u azoospermických mužů s hypogonadotropním hypogonadismem a ztrátou čichu (Foresta *et al.* 2002). Součástí diagnostiky mohou rovněž tvořit testy na zhodnocení poškození DNA spermií, u kterého bylo prokázáno, že vede ke zhoršení výsledků léčby metodami asistované reprodukce a zapříčiňuje snížený vývoj plodu, potraty nebo vrozené vady potomků (Simon *et al.* 2013).

Pokud by identifikace genetické příčiny přímo nevedla ke změně léčby, genetické testování může být rovněž prováděno z důvodu konečného odhalení příčiny diagnostikované neplodnosti nebo pro zjištění míry genetického zatížení potomka v případě úspěšné léčby. Každé genetické vyšetření by mělo být prováděno na základně odborného posouzení lékařských genetiků (Tüttelmann a Simoni, 2008).

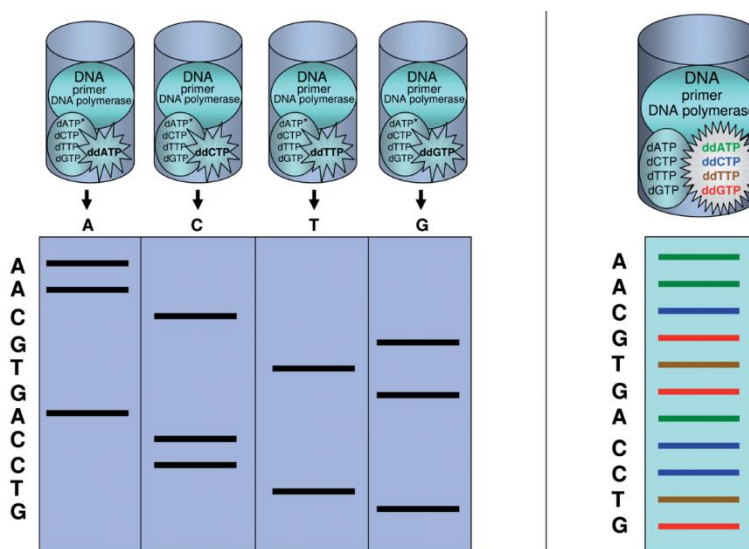


## 6 Metody sekvenování DNA

### 6.1 Klasické metody sekvenování DNA

První přelomové metody sekvenování DNA byly popsány ve dvou studiích roku 1977. Maxam a Gilbert zveřejnili postup metody, ve které terminálně označili konce úseku DNA, jednotlivé báze modifikovali chemickými činidly, a pak úsek DNA vystavili specifickému chemickému štěpení. Získané produkty reakce následně oddělili prostřednictvím gelové elektroforézy (Maxam a Gilbert, 1977). Sanger, Niclen a Coulson publikovali práci o využití dideoxynukleotidů (ddNTPs) během replikace DNA. ddNTPs působí inhibičně a ukončují replikaci syntetizovaného řetězce, což vede k vytvoření směsi odlišně dlouhých sekvencí DNA, které se od sebe oddělují na elektroforetickém gelu (Sanger *et al.* 1977).

Sangerovo sekvenování (Obr. 5) se vyvinulo postupně v automatizovaný proces, při kterém se DNA připravuje prostřednictvím transformace bakteriální kolonie plazmidem s daným fragmentem DNA nebo polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), které slouží k amplifikaci požadovaného úseku DNA – templátu. DNA se následně opakovaně vystavuje reakcím v sekvenačním cyklu, ve kterém dochází k denuraci templátu, vazbě primeru, prodlužování řetězce a ukončení replikace fluorescenčně značeným ddNTP. Získaná směs fragmentů odlišné délky se zpracovává prostřednictvím kapilární elektroforézy. Jednotlivé pozice fluorescenčně odlišně značených ddNTPs jsou lokalizovány na základě emitovaného záření po excitaci vyvolané laserem, které zachycuje detektor. Signál se přenáší do počítačového softwaru, který signál překládá do DNA sekvence (Shendure a Ji, 2008, Men *et al.* 2008).



Obr. 5: Průběh sekvenování Sangerovou metodou. Převzato z Men *et al.* 2008.

## 6.2 Sekvenování nové generace

První přečtení lidského genomu v rámci Human Genome Project, které probíhalo za využití sekvenátorů založených na Sangerově metodě, si vyžádalo velké množství času a zdrojů, což vedlo k myšlence vytvoření nové technologie s vyšší výkonností, a především nižšími náklady (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004, Service, 2006). První metody masivní paralelní sekvenace, rovněž nazývané metody sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS), se začaly využívat pro sekvenaci genomů modelových organismů a člověka od roku 2005. Nové metody se lišily od klasické Sangerovy metody a vedly k navýšení výtěžnosti a přesnosti, současně s poklesem ceny sekvenování (Mardis, 2011). Všechny dostupné NGS technologie mají vlastní charakteristické vlastnosti, ale sdílejí tři základní společné kroky – přípravu DNA templátů vytvořením knihovny amplikonů nebo využití jednotlivých molekul DNA, paralelní sekvenování a přímou detekci bez potřeby provádění elektroforézy (van Dijk *et al.* 2014).

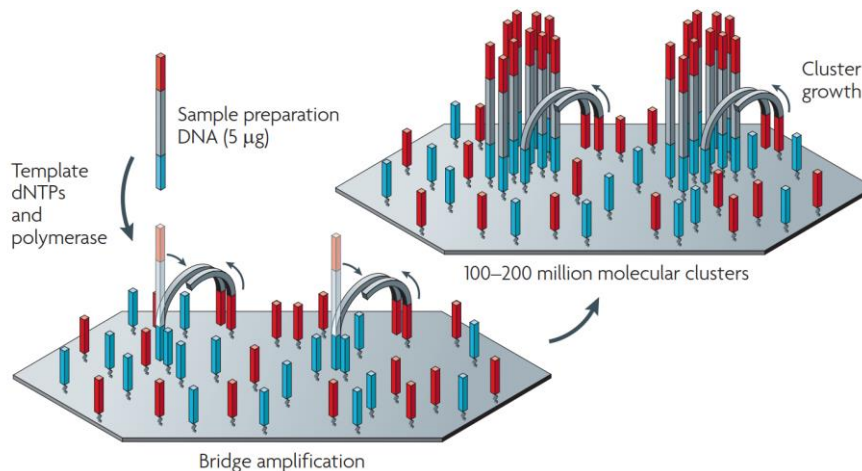
NGS technologie můžeme zařadit do dvou základních skupin. První skupina zahrnuje metody založené na PCR amplifikaci templátu – 454/Roche, Solexa/Illumina, SOLiD a Ion Torrent; druhou skupinu představují technologie nevyžadující amplifikaci templátu – Helicos BioSciences, Pacific Biosciences a Oxford Nanopore (Metzker, 2016). Uvedené příklady představují základní NGS technologie, z nichž jsou blíže stručně popsány v následujících podkapitolách přední technologie současnosti – Solexa/Illumina, Ion Torrent a Oxford Nanopore (Glenn, 2016).

### 6.2.1 Solexa/Illumina technologie

Společnost Solexa představila vlastní technologii NGS roku 2006 a posléze byla za rok získána společností Illumina. Technologie využívá pevný skleněný povrch na zachycení jednotlivých molekul DNA k následné amplifikaci prostřednictvím můstkové PCR. Shluky identických molekul DNA jsou po provedení PCR sekvenovány syntézou za využití fluorescenčně značených terminátorů reakce, deoxynukleotidifosfátů (dNTPs), (Fedurco *et al.* 2006, Turcatti *et al.* 2008).

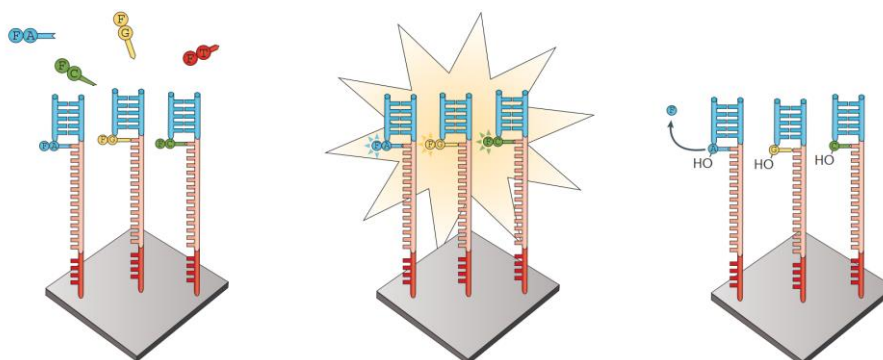
Můstková PCR (Obr. 6) začíná navázáním připravených DNA fragmentů o délce stovek párů bází k povrchu reakční komůrky prostřednictvím komplementárních adaptorů. Adaptory zároveň plní funkci primerů pro amplifikaci templátů, ke které dochází po přidání všech složek reakce a proběhnutí PCR. Vytvořená dvouvláknová DNA denaturuje, původní templát se odstraní a nové vlákno zůstává navázáno na povrchu komůrky. Vlákno se v důsledku vazby volného konce na primer komůrky ohne a vytvoří můstek. Následující PCR opět vede

k vytvoření dvouvláknové DNA prodloužením primeru. Celý postup se provádí opakovaně a končí poslední denaturací dvouvláknové DNA a odštěpením reverzních řetězců, které jsou odstraněny. Výsledek reakce představují shluky přibližně 1000 identických kopií DNA fragmentu k sekvenci (Adessi *et al.* 2000, Ansorge, 2009).



**Obr. 6:** Znárodnění provedení můstkové PCR. Převzato z Metzker, 2010.

Reakční komůrky se shluky jsou doplněny sekvenačními primery, DNA polymerázou a směsí čtyř fluorescenčně značených dNTPs s inaktivovanou 3'-OH skupinou, aby došlo k vazbě pouze jednoho deoxynukleotidu v rámci jednoho cyklu sekvenace. Navázání nového deoxynukleotidu do syntetizovaného řetězce se detekuje na základě fluorescenční značky, po které dojde k aktivaci 3'-OH skupiny a odstranění fluorescenčního barviva a celý proces se opakuje (Obr. 7), (Turcatti *et al.* 2008, Bentley *et al.* 2008).

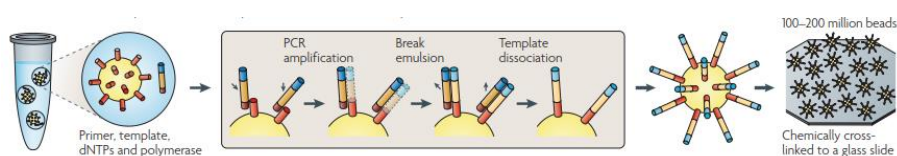


**Obr. 7:** Průběh sekvenování technologie Solexa/Illumina. Převzato z Goodwin *et al.* 2016.

### 6.2.2 Ion Torrent technologie

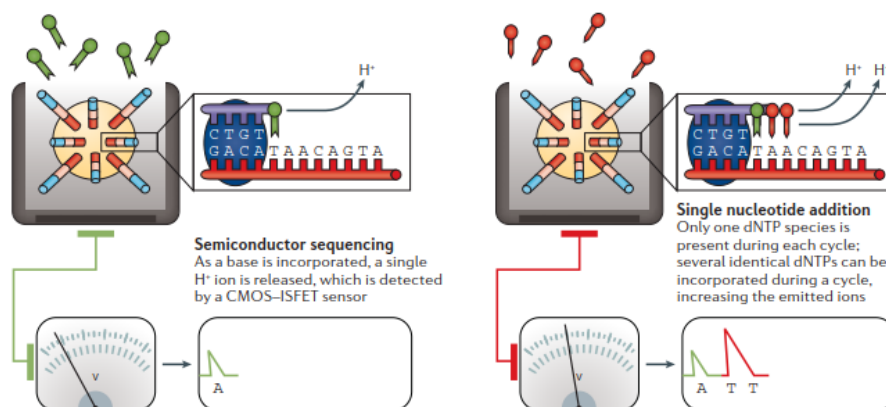
Společnost Life Technologies představila roku 2011 Ion Personal Genome Machine, přístroj schopný přímého přenosu chemického signálu do digitální podoby. Příprava templátů probíhá prostřednictvím emulzní PCR (emPCR) a mikrokuličky jsou jednotlivě umísťovány k sekvenaci do jamek na polovodičovém čipu (Rothberg *et al.* 2011, Quail *et al.* 2012).

Emulzní PCR (Obr. 8) spočívá v převedení všech potřebných komponentů PCR reakce do emulze, kde dojde k vytvoření vodních kapének – mikroreaktorů, které představují místo nezávislé amplifikace daného DNA templátu, který byl do mikroreaktoru uzavřen. Metoda využívá speciální mikrokuličky s navázanými primery pro amplifikaci templátu. Každá mikrokulička, při ideálních hybridizačních podmínkách, nese jeden templát. Emulze se vystaví teplotním cyklům klasické PCR metody a ukončí rozrušením emulze a vyjmutím kuliček. Směs mikrokuliček se přečistí a dojde k selekci mikrokuliček, u kterých proběhla amplifikace a nesou tak na povrchu v průměru 10 milionů kopií DNA templátu (Ghadessy *et al.* 2001, Dressman *et al.* 2003). Mikrokuličky jsou následně pro samotný proces sekvenování umístěny do jamek pikotitrační destičky společně s ostatními složkami reakce (Margulies *et al.* 2005).



**Obr. 8:** Znárodnění provedení emulzní PCR. Převezato z Goodwin *et al.* 2016.

Sekvenování se uskutečňuje během syntézy řetězce komplementárního s templátem, kdy se čip postupně vystavuje jednotlivým dNTPs. Začleněním nukleotidu dojde k uvolnění vodíkového protonu, což vede ke změně hodnoty pH roztoku, která je detekována senzorem. Když se nukleotid nezačlení, senzor zaznamená nulový signál, když se nukleotidů začlení větší počet, signál se znásobí (Obr. 9), (Rothberg *et al.* 2011, Quail *et al.* 2012).

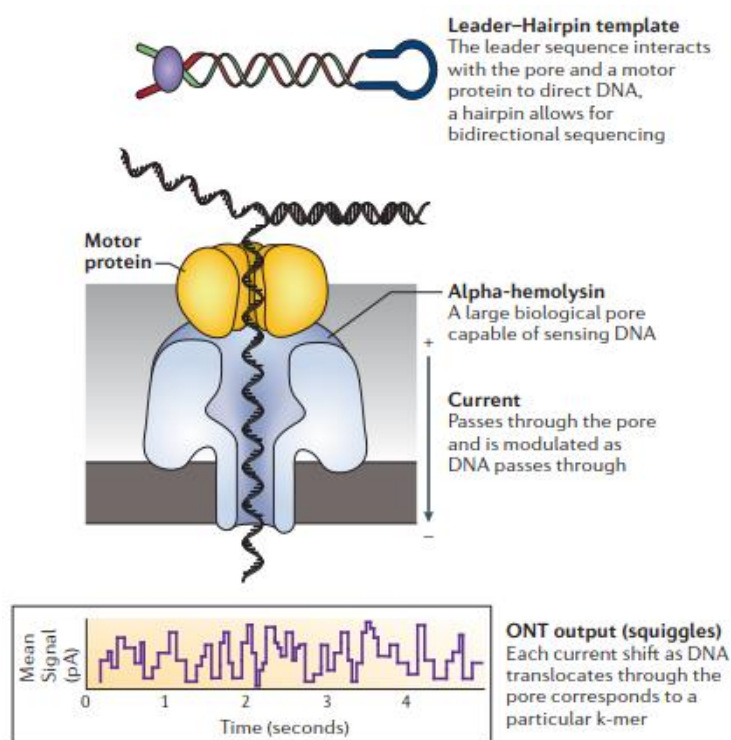


**Obr. 9:** Průběh sekvenování technologie Ion Torrent. Převezato z Goodwin *et al.* 2016.

### 6.2.3 Oxford Nanopore technologie

Společnost Oxford Nanopore Technologies přišla na trh s prvním sekvenátorem využívající biologické vlastnosti nanopórů roku 2014. Jedná se o sekvenování jednotlivých molekul DNA, které nepředchází amplifikace. Tato metoda výrazně zkracuje čas sekvenování, snižuje cenu a chybovost způsobenou amplifikací a umožňuje čtení delších fragmentů, ale rovněž vyžaduje velmi citlivý detektor. Oproti ostatním technologiím nepracuje na principu sekvenace syntézou nebo ligace a nedochází k detekci sekundárního signálu, ale přímé detekci sekvence DNA (Braslavsky *et al.* 2003, Harris *et al.* 2008, Jain *et al.* 2016).

Sekvenace probíhá během průchodu jednořetězcové molekuly DNA proteinovým nanopórem umístěným v elektricky rezistentní membráně. Nanopórem prochází proud iontů, který slouží k nastavení elektrického napětí na membráně. Jednotlivé nukleotidy templátu jsou postupně zaznamenávány na základě změny proudu, kterou vyvolávají při průchodu nanopórem (Obr. 10), (Clarke *et al.* 2009, Jain *et al.* 2015).



**Obr. 10:** Průběh sekvenování technologie Oxford Nanopore. Převzato z Goodwin *et al.* 2016.

## 7 Výzkum mužské neplodnosti a využití NGS

Identifikace genetických příčin mužské neplodnosti probíhala za využití mnoha, stále se zdokonalujících, přístupů. Genetické faktory ovlivňující plodnost byly určovány například prostřednictvím cytogenetických technik (Shi a Martin, 2001), zkoumáním a cíleným poškozováním genů u modelových organismů (Matzuk a Lamb, 2002) nebo analýzou transkriptů v buňkách testikulární tkáně (Schultz *et al.* 2003). Výzkumy vedly k objevení velkého počtu kandidátních genů, jak uvádí Příloha 3, u kterých byl následně zjišťován vliv mutací na mužskou plodnost prostřednictvím genetického mapování. Tento přístup však nevedl k označení jednotlivých genových mutací za hlavní příčinu neplodnosti u mužů (Gianotten *et al.* 2004, Nishimune a Tanaka, 2006).

Na přelomu 20. a 21. století, kdy docházelo k pokroku v hledání neznámých genetických příčin u mnoha komplexních onemocnění, se výzkum mužské neplodnosti rovněž zaměřil na zkoumání rizikových genetických faktorů, především na jednonukleotidové polymorfismy (SNPs), tandemové repetice variabilního množství (VNTRs) a variabilitu v počtu kopií segmentů DNA (CNVs), k čemuž postupně výrazně přispíval rozvoj molekulárně genetických metod. (Krausz a Giachini, 2007, Aston a Carrell, 2009, Tüttelmann *et al.* 2011).

### 7.1 Výzkum zaměřený na kandidátní geny

Výzkum řadu let vycházel z cíleného resekvenování vybraných kandidátních genů. Sekvenování využívající klasickou Sangerovu metodu bylo aplikováno na příslušné amplifikované geny získané ze vzorků DNA od skupiny neplodných mužů a kontrolní skupiny mužů plodných. Analýza obdržených dat zahrnovala identifikaci SNPs a mutací, které se vyskytovaly s větší četností pouze u jedné skupiny, nebo vad genů, které byly specifické u skupiny neplodných mužů (Aston a Carrell, 2011, Aston, 2014).

Jedna z prvních prací shrnující poznatky výzkumu zaměřeného na polymorfismy uvádí, že podstatnou souvislost s mužskou neplodností na prvním místě vykazuje gr/gr delece na AZFc úseku chromozomu Y (Tüttelmann *et al.* 2007), což bylo potvrzeno rovněž některými následujícími metaanalýzami (Visser *et al.* 2009). Přínos zařazení vyšetření gr/gr delecí do souboru diagnostických testů v populacích s prokázaným rizikem výskytu uvedeného polymorfismu je stále aktivně diskutován. (Stahl *et al.* 2011, Bansal *et al.* 2016).

U konkrétních genů souvisejících s mužskou neplodností bylo nalezeno množství SNPs, ale většina z nich byla popsána pouze prostřednictvím jedné studie, jejichž opakované provedení často nevedlo k potvrzení výsledků (Nutti a Krausz, 2008). Nereprodukovatelnost pramenila především z malého množství vyšetřovaných vzorků, fenotypové nesourodosti



a etnické proměnlivosti studovaných skupin nebo z nedostatků při provádění studií. Studie se navíc obvykle zaměřovaly pouze na jeden ze stovek kandidátních genů, což bylo, vzhledem ke komplexnosti části lidského genomu, který se podílí na mužské plodnosti, značně neefektivní (Aston a Carrell, 2009). Genetické vady nalezené u neplodných mužů popsaným přístupem uvádí tabulka 2.

**Tab. 2:** Genetické vady mužů s poruchou spermatogeneze nebo funkce spermií, SNPs zobrazeny červeně. Převzato a upraveno z Matzuk a Lamb, 2008.

<b>abnormální spermatogeneze</b>	ATM; ATMAC; <b>DAZL</b> ; <b>ERCC2</b> ; GTF2A1L; JUN; NLRP14; NRB0B1; <b>POLG</b> ; PRM1; PRM2; <b>SDHA</b> ; SOX8; XRCC1; <b>YBX2</b>
<b>azoospermie</b>	<b>APOB</b> ; ACSBG2; <b>ART3</b> ; ATM; BOULE; <b>BPY2</b> ; <b>BRCA2</b> ; CDY1; CFTR; CREM; DAZ; <b>DDX25</b> ; DDX3Y; DRFFY; ERCC1; ERCC2; <b>FASLG</b> ; FHL5; <b>FKBP6</b> ; <b>HNRNPC</b> ; HSFY1; KLHL10; LAP3; MBOAT1; MEI1; MLH1; MLH3; <b>MTR</b> ; NLRP14; PRDM16; <b>RBMX</b> ; RBMY1A1; RBMY1F; SPATA16; SYCP1; SYCP3; TAF7L; TGIF2LX; TSPY; <b>TSSK4</b> ; UBE2B; <b>USP26</b> ; UTP14C; USP9Y; UTY; <b>XPC</b> ; <b>XPB</b> ; <b>XRCC1</b> ; YBX2; ZNF230
<b>oligozoospermie</b>	MT-ATP6; EGF; <b>FASL</b> ; H19 a MEST; KLHL10; PIGA; PRM1; PRM2; <b>SHBG</b> ; <b>SDHA</b> ; <b>TSSK4</b> ; <b>UBE2B</b> ; VASA
<b>astenozoospermie</b>	AKAP3; AKAP4C; CATSPER2; <b>DNMT3B</b> ; DHAH5; DNAH11; DNALI1; PDYN; GNAI2; DNA mitochondrií; <b>MTHFR</b> ; MT-ND4; PIGA; POLG; PPM1G; PRKARIA; SHBG; SPAG16; TEKT1; TEKT2; TPN1; TPN2; TXNDC3; <b>T mt DNA haplotypes</b>
<b>terazoospermie</b>	AURKC; <b>PRM1</b> ; PVRL2; SPATA16; SPI
<b>oligoastenozoospermie</b>	JUND; mt-ND4; NALP14
<b>oligoastenoteratozoospermie</b>	<b>MTRR</b> ; IL1B; SABP
<b>akrozom nebo oplodnění</b>	POIA3
<b>poškození DNA</b>	<b>GSTM1</b>
<b>neplodnost</b>	AR; <b>GSTM1 KIT</b> ; <b>KITLG</b> ; IL1A; OAZ3; <b>PRM1</b> ; TSPY; <b>TSSK4</b> ; <b>USP26</b> ; <b>YBX2</b>
<b>varikokéla</b>	MT-ATP6; MT-ATP; CACNA1C; MT-CO1; MT-CO2; MT-ND3
<b>chromozomové aberace</b>	početní aberace (Klinefelterův syndrom; XXY–XXXXY), strukturální aberace (translokace, inverze, delece), Y chromosome mikrodelece, XX muž nebo XY žena
<b>systémová onemocnění ovlivňující plodnost</b>	Kartagenerův syndrom, Fanconio anémie, myotonická dystrofie, Noonanův syndrom, srpkovitá anémie, β-talasemie

Celkově bylo v souvislosti s mužskou neplodností k roku 2015 popsáno 314 SNPs v rámci 123 genů, které zajišťují především běžné fungování buněk, specifické procesy spojené se spermatogenezí nebo endokrinní regulaci mužských pohlavních orgánů. Kandidátních genů se SNPs, popsaných větším počtem studií, jejichž výsledky byli vyhodnoceny prostřednictvím metaanalýz, bylo pouze deset – AR, CYP11A1, DAZL, ESR1, ESR2, MTHFR, NOS3, POLG, TP53 a USP26 (Krausz et al. 2015). Zmíněná studie neuvádí významné polymorfismy FSHR a GSTM1 genu, které byly rovněž zkoumány řadou souhrnných studií (Tüttelmann et al. 2007, Lend et al. 2010, Tang et al. 2012, Song et al. 2013).

Navzdory tomu, že SNPs obvykle v části studií vykazují přesvědčivou spojitost s mužskou neplodností, riziko vyplývající z daných SNPs se zatím celkově jeví jako nepatrné (Aston, 2014). Sporné výsledky pramení především ze závislosti fenotypového projevu polymorfismu na etnickém, případně geografickém, původu (*ESR1*, *ESR2*, *MTHFR*, *NOS3*, *DAZL*, *GSTM1*). Účinek polymorfismu současně může být ovlivněn stravou (*MTHFR*) nebo působením vnějších faktorů narušujících endokrinní řízení (*ESR1*, *ESR2*). Některé SNPs si zaslouží provedení dalších studií ke zhodnocení jejich potenciální klinické významnosti a zařazení do souboru diagnostických vyšetření (*NOS3*, *AR*), zatímco u části SNPs nebyla prokázána dostatečná souvislost s mužskou neplodností (*FSHR*, *POLG*, *TP53* a *USP26*), (Lend *et al.* 2010, Song *et al.* 2013, Krausz *et al.* 2015).

Jedním z ojedinělých úspěchů v rámci identifikace mutací stojících za mužskou neplodností bylo objevení mutací v genu *TEX11* na chromozomu X. Gen *TEX11* kóduje protein exprimovaný v samčích pohlavních buňkách, který se podílí na regulaci crossing-overu během meiotické fáze spermatogeneze. Studie vyšetřující daný gen u myších modelových organismů uvádí, že porucha genu *TEX11* vede k azoospermii, která pramení ze zastavení meiózy během spermatogeneze (Yang *et al.* 2008).

Studie vyšetřující zmíněný gen provedla jeho cílenou sekvenaci celkově u 289 azoospermických mužů a kontrolní skupiny 384 mužů. Práce uvádí šest mutací v rámci bělošské populace, které se nevyskytovaly u kontrolní skupiny a prokazatelně souvisely s projevem azoospermie u mužů, obvykle v důsledku zastavení spermatogeneze v meióze (Yatsenko *et al.* 2015). Uvedenou spojitost potvrzuje studie vyšetřující gen *TEX11* prostřednictvím sekvenování realizovaná u skupiny 246 mužů s azoospermii a kontrolní skupiny 175 mužů, která objevila 21 unikátních variant, vyskytujících se především u skupiny mužů s poruchou spermatogeneze. Způsob ovlivnění spermatogeneze byl zcela objasněn u tří z nalezených variant. První mutace způsobující posun čtecího rámce a vedoucí k produkci nefunkčního proteinu byla rovněž nalezena u bratra a matky muže postiženého danou mutací. Histologické vyšetření varlat u daného muže prokázalo zastavení spermatogeneze ve fázi meiózy, což odpovídá výsledkům studie prováděné na modelových organismech. Druhá mutace probíhala v 3'akceptorovém místě sestřihu jednoho z intronů, které běžně podmiňují chyby sestřihu z důvodu nerozpoznání daného místa spliceosomem. Třetí mutace představovala jednu z šesti nalezených mutací vedoucích k zařazení odlišné aminokyseliny do exprimovaného proteinu. Mutace navíc postihovala evolučně vysoce zakonzervovaný úsek, což vedlo k jejímu testování u myších modelových organismů. Výsledek testování potvrdil, že daná mutace narušuje průběh chromozomové synapse.



Z výsledků studie vyplývá, že přibližně u 1 % azospermických mužů neplodnost způsobují mutace *TEX11* genu (Yang *et al.* 2015).

## 7.2 Celogenomové studie

Rozvoj mikročipových technologií, které zahrnují čipy založené na principu komparativní genomové hybridizace (aCGH) a čipy k detekování SNPs, a platform NGS umožnil, kromě výzkumu zaměřeného na konkrétní geny, provádění celogenomových studií, která poskytují celkové zhodnocení genetického podstaty u komplexních onemocnění, ke kterým se rovněž řadí mužské neplodnost (Aston, 2014). Mikročipové technologie se vyznačují určitými omezeními, z nichž některé dokázaly NGS technologie překonat.

Omezení mikročipů například spočívá v tom, že vyžadují předchozí znalost sekvence vyšetřovaného genomu. Rozsah a rozlišení vyšetření se následně odvíjí od návrhu mikročipu a počtu umístěných sond. aCGH vyžadují vyšetření referenčního vzorku DNA, prostřednictvím kterého dochází k relativnímu zhodnocení výsledků, což ztěžuje detekci sekvencí vyskytujících se s malou četností a kvantitativní rozlišení změn v sekvencích s velkou četností výskytu. aCGH běžně poskytují zhodnocení výskytu CNVs ve vyšetřovaném vzorku v porovnání s referenčním vzorkem. Výběr sond aCGH není v rámci genomu limitován a sekvence obvykle dosahují délky okolo 50-70 bp. Naopak SNP mikročipy referenční vzorek nevyžadují, slouží ke genotypizaci SNP vyšetřovaného vzorku a mohou rovněž detekovat CNVs. Sondy SNP čipů jsou vybírány podle výskytu SNPs v genomu, přičemž sekvence sond se mohou lišit jednou nebo větším počtem bází a jejich celková délka se pohybuje mezi 20-60 bp. Rozdíl mezi aCGH a SNP čipy rovněž spočívá v tom, že SNP čipy dokáží detekovat ztrátu heterozygotnosti a příbuzenské vztahy či uniparentální disomii. Nevýhoda obou mikročipů spočívá v obtížné analýze repetitivních a vysoce homologních sekvencí. Prvotní krok mikročipových vyšetření představuje amplifikace DNA, protože hybridizace čipů vyžaduje řádově mikrogramové množství DNA. Amplifikace však může vést k tvorbě chyb v sekvenci DNA vyšetřovaného vzorku (Hurd a Nelson, 2009, Schaaf *et al.* 2011).

Na rozdíl od mikročipových technologií NGS nevyžaduje předchozí znalost genomové sekvence a může být rovněž použito k sekvenování *de novo*. Sekvenování neprobíhá na základě relativního hodnocení, což umožňuje detekovat odchylky v sekvencích exprimovaných ojedinele i frekventovaně v rámci jednoho vzorku. Technologie NGS provádí sekvenaci přímo a nevyžadují hybridizační krok sekvencí definovaných čipem, čímž nedochází ke zkreslení analýzy a mohou být detekovány rovněž repetitivní a homologní sekvence. Sekvenování prostřednictvím NGS poskytuje jednonukleotidové rozlišení, které může sloužit k detekci

CNVs, SNPs a rovněž bodových mutací. Technologie NGS si navíc vystačí s menším množstvím vzorku v řádech nanogramů, což snižuje ovlivnění sekvenování amplifikací (Hurd a Nelson, 2009, Schaaf *et al.* 2011).

Na příkladu studií zaměřených na preimplantační vyšetření embryí prostřednictvím NGS mohou být demonstrovány výhody, kterými NGS částečně překonalo vyšetření aCGH technologiemi v této oblasti. Celochromozomová vyšetření s cílem odhalení aneuploidií u embryí ukázala, že NGS vykazuje 100% citlivost a 100% specifitu u všech typů detekovaných aneuploidií, čímž se vyrovnává výsledkům aCGH. Výsledky studií navíc dokazují, že NGS detekuje částečné aneuploidie a mozaicismy s větší přesností oproti aCGH. (Fiorentino *et al.* 2014, Lai *et al.* 2017). Malé strukturní chromozomové vady nemusí být prostřednictvím aCGH zachyceny především z důvodu nedostačujícího rozlišení a vad vznikajících při celogenomové amplifikaci nutné před provedením vyšetření. Analýza dat u NGS nevyžaduje referenční vzorek a probíhá prostřednictvím specifického postupu, který rovněž slouží k odstranění chyb vzniklých při přípravě vzorků, a tak umožňuje detekci strukturních chromozomových vad o malé velikosti (Zhang *et al.* 2015). Tato skutečnost byla prokázána v případech, kdy vyšetření aCGH nevykazovalo abnormální výsledky, ale prostřednictvím NGS došlo k objevení malých strukturních translokací (Ou *et al.* 2015). Využití označení vzorků specifickými sekvencemi nukleotidů u NGS a paralelní proces sekvenování rovněž umožňuje vyšetření většího počtu vzorků od mnoha pacientů s rozdílnou indikací v jednom procesu sekvenování (Fiorentino *et al.* 2014). Omezení, která se vyskytují u obou srovnávaných technologií spočívají v neschopnosti detekce polyploidii a balancovaných translokací, protože nedochází ke změně v rámci celkové DNA (Zhang *et al.* 2015).

Interpretaci výsledků celogenomových vyšetření prostřednictvím NGS sekvenování značně limituje nedostatek relevantních dat v nepopsaných úsecích genomu, proto došlo k zacílení sekvenování na kódující oblast genomu, což podstatně zjednodušuje analýzu dat a snižuje náklady sekvenování, ale neumožňuje identifikaci odchylek v nekódujících úsecích genomu, které se mohou podílet na regulaci genů. Výhody a nevýhody uvedených metod stručně popisuje tabulka 3 (Ng *et al.* 2009, Carrell *et al.* 2016).

**Tab. 3:** Výhody a nevýhody metod umožňující celogenomová vyšetření. Převzato a upraveno podle Aston, 2014.

metody	výhody	nevýhody
mikročipy CGH	identifikace CNVs	omezené rozlišení, nedetekuje SNPs a bodové mutace, relativně komplexní analýza
mikročipy SNP	identifikace SNPs a CNVs	omezené rozlišení, nedetekuje bodové mutace, relativně komplexní analýza
sekvenování exomu	vysoké rozlišení, identifikace SNPs, CNVs a mutací	omezené na kódující oblast, komplexní analýza
sekvenování genomu	vysoké rozlišení, identifikace SNPs, CNVs a mutací, zahrnující nekódující oblasti	komplexní analýza, vyšší cena oproti sekvenování exomu

Celogenomové studie, využívající mikročipové technologie, mohou být rozděleny podle zaměření na studie hodnotící vliv SNPs nebo CNVs. Celogenomová asociační studie (genome-wide association study, GWAS) hodnotí SNPs v závislosti na jejich výskytu u fenotypově odlišné skupiny a skupiny s normálním fenotypem. Studie zacílené na detekci CNVs pracují na stejném principu.

### 7.2.1 Studie zaměřené na SNPs

První GWAS mužské neplodnosti, provedená u bělošské populace, sledovala přes 370 000 SNPs u 52 mužů s vážnou oligozoospermií a 40 mužů s azoospermií v porovnání s 80 muži s normozoospermií. Studie objevila 20 SNPs spjatých s azoospermií a/nebo oligozoospermií a jeden významný SNPs při hodnocení výsledků v rámci genů ovlivňujících plodnost. SNPs byly přiřazeny k 17 genům, z nichž geny *PDE3A*, *EFCAB4B*, *COBL*, *ATP8A1*, *MASPI* a *PROK2* vedou k produkci proteinů zapojených do procesů potřebných k mužské plodnosti. Vzhledem k malému počtu vyšetřovaných vzorků studie nedosahovala takové významnosti, ale představovala první krok pro zavedení celogenomového přístupu k identifikaci genetických příčin mužské neplodnosti (Aston a Carrell, 2009).

Navazující GWAS byla zacílena na 172 SNPs, které zahrnovaly důležité SNPs z prvotní studie a SNPs se vztahem k mužské neplodnosti, a byla provedena na početně větších skupinách – 141 mužů s vážnou oligozoospermií, 63 mužů s mírnou oligozoospermií, 80 mužů s azoospermií a 158 normozoospermických mužů. Studie zaznamenala podstatnou souvislost se sníženou koncentrací spermí u 14 SNPs v rámci 12 genů, které se neshodovaly s výsledky prvotní studie a žádný SNP nebyl zastoupen u výrazně velkého počtu případů (Aston *et al.* 2010). Jednalo se o geny zapojené do navození buněčné smrti zárodečných buněk (*FASLG*),

formování chromatinu (*JMJD1A*), procesu chromozomální synapse a meiotické rekombinace (*TEX15*, *SMC1B*) a regulace transkripce (*BRDT*, *KIF17*) během spermatogeneze. Gen *USP26* kóduje důležitý enzym pro deubikvitinaci proteinů, čímž zasahuje do signálních drah klíčových pro homeostázu buňky a buněčný cyklus, včetně spermatogeneze. Gen *USP26* se rovněž vyskytuje mezi zmíněnými kandidátními geny v souvislosti s výskytem SNPs. Gen *INSR* kóduje receptor pro inzulin, gen *OR2W3* čichový receptor a gen *TAS2R8* chuťový receptor, odpovídající za rozpoznání hořké chuti. Žádný z uvedených receptorů není přímo zapojený do procesu spermatogeneze, ale receptorové proteiny mnoha tříd se ve varlatech vyskytují. Expze genu *MTHFR* vede k tvorbě methyilentetrahydrofolát reduktázy. Tento enzym katalyzuje konverzi tetrahydrofolátu, čímž představuje nepostradatelnou součást metabolismu kyseliny listové, a rovněž se podílí na přeměně homocysteinu na methionin. Poruchy genu *MTHFR* způsobují perinatální úmrtí, homocysteinurii, homocysteinémií, zpožděný vývoj, těžkou mentální retardaci, psychiatrické poruchy nebo neurodegenerativní onemocnění s pozdním nástupem projevů. Gen *MTHFR* rovněž patří k už zmíněným kandidátním genům, u kterých byl sledován výskyt SNPs. Gen *LOC203413* (*CT83*) odpovídá za tvorbu antigenu běžně exprimovaného v mužských zárodečných buňkách a buňkách nádorů, především u rakoviny plic (databáze GeneBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, databáze UniProt <http://www.uniprot.org/>).

Nezávislé GWAS, týkající se bělošské populace, vyšetřovaly SNPs v souvislosti se syndromem testikulární dysgeneze (STD) a počtem porodů a intervaly mezi nimi. První krok studie zaměřené na STD představoval vyšetření 488 mužů postižených jedním ze čtyř projevů uvedeného syndromu společně s kontrolní skupinou 439 mužů. Druhý krok zahrnoval ověření výsledků pro 39 vybraných SNPs u 436 mužů s STD a 235 mužů kontrolní skupiny. Výsledkem studie byla identifikace SNP v genu *TGFBR3* a genu *BMP7*, které byly spojené s výskytem všech fenotypů STD, a SNP genu *KITLG*, který byl přítomen především u případů rakoviny varlat (Dalgaard *et al.* 2012). Gen *TGFBR3* kóduje receptor pro transformující růstový faktor beta typu III a jeho snížená expze byla zjištěna u různých typu rakoviny. Expzí genu *BMP7* dochází k produkci látky, která se váže na receptor pro transformující růstový faktor beta a vede k regulaci genové expze. Ovlivnění stejné signální dráhy uvedenými dvěma geny poukazuje na její význam u případů STD. Gen *KITLG* kóduje ligand receptoru tyrosin-kinázy, který se podílí na proliferaci, přežívání a migraci buněk, hematopoéze, podpoře kmenových buněk, gametogenezi, vývoji tukových buněk a melanogenezi (databáze GeneBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, databáze UniProt <http://www.uniprot.org/>).

Studie zkoumající mužskou neplodnost z pohledu počtu a frekvence porodů zahrnovala vyšetření 269 mužů z komunity Hutteritů, pocházející z Evropy, která dodržuje zákaz používání antikoncepčních prostředků, a proto představuje ideální skupinu pro studium genetiky přirozené lidské plodnosti. Nalezených 41 kandidátních SNPs bylo následně vyšetřováno pro potvrzení výsledků ve skupině 123 etnicky rozdílných mužů. Práce vedla k objevení 9 SNPs, z nichž každý byl přiřazen k odlišnému genu nebo genům a vykazoval souvislost se sníženou plodností ve skupině Hutteritů současně se snížením některých ze sledovaných hodnot spermatu u etnicky rozdílné skupiny mužů. Tři geny, *EPSTII*, *UBD* a *LRRC32*, mají roli v řízení imunitních reakcí odehrávajících se ve varlatech, které musí být pro přežití zárodečných buněk přesně regulovány. Gen *USP8* plní stejnou funkci, jako dříve zmíněný gen *USP26* (Kosova *et al.* 2012).

Výsledky GWAS dosahují minimální klinické významnosti v důsledku toho, že si vzájemně neodpovídají, což demonstruje Příloha 4, a riziko vyplývající z objevených SNPs není významné.

### 7.2.2 Studie zkoumající vliv CNVs

První celogenomová studie vyšetřující vliv CNVs na mužskou plodnost byla publikována roku 2011. Vyšetření bylo provedeno u 89 mužů s vážnou oligozoospermií, 37 mužů s azoospermií v důsledku SCOS a kontrolní skupiny 100 mužů. Všechny geny, ve kterých se nacházely CNVs s odlišnou četností při porovnání výsledků od zatížené skupiny mužů a kontrolní skupiny, byly analyzovány z pohledu jejich exprese a funkce, což vedlo k výběru 14 genů s CNVs spjatých s předpokládaným vlivem na mužskou plodnost. (Tüttelmann *et al.* 2011). Následující studie vyšetřovala výskyt CNVs u mužů s pozastavenou spermatogenezí na úrovni spermatocytů, v důsledku které nedochází k utváření a dozrávání spermií. Studie se zúčastnilo pouze 9 mužů s uvedeným postižením a 20 normospermických mužů, jejichž DNA vzorky byly vyšetřeny prostřednictvím mikročipů. Všechny vybrané kandidátní úseky CNVs byly následně analyzovány pomocí kvantitativní PCR s větší kontrolní skupinou, 130 mužů s normozoospermií. Výsledkem bylo 10 objevených CNVs ve spojitosti s danou formou mužské neplodnosti (Stouffs *et al.* 2012).

Odlišná studie poskytla informace o míře vlivu CNVs vzhledem k jejich umístění v genomu. Studie vycházela z výsledků tří samostatně prováděných studií případů a kontrol. Souhrnnou analýzou bylo zjištěno, že každá objevená vzácná autozomální delece zvyšuje riziko mužské neplodnosti o 10 %, každá neobvyklá CNVs nacházející na chromozomu X o 29 % a každá vzácná duplikace chromozomu Y o 88 % (Lopes *et al.* 2013).

Celkově se uvedené studie shodují na tom, že prokazatelně vyšší zátěž CNVs se vyskytuje u mužů trpících neplodností. Významné jsou především CNVs pohlavních chromozomů, což bylo rovněž prokázáno studii neprovádějícími celogenomová vyšetření, ale zaměřenými pouze na vyšetření CNVs u chromozomu X a Y (Krausz *et al.* 2012, Krausz *et al.* 2014).

### 7.3 Mitochondriální DNA

Mitochondrie plní u spermií nezastupitelnou funkci vzhledem k nárokům spermií na energii potřebnou k jejich pohybu. Poruchy mitochondriální DNA (mtDNA) z uvedeného důvodu vedou především ke snížení pohyblivosti spermií.

Studie vyšetřující vliv mtDNA poukázaly na řadu bodových mutací a delecí velkého rozsahu působících na mužskou plodnost. Jedna ze studií zkoumající část mitochondriálního genomu od nukleotidu 7126 po nukleotid 14150 objevila například dvě substituční mutace vyskytující se s největší četností u mužů nesplňujících kritéria normozoospermie, především v důsledku snížené pohyblivosti spermií. Jednalo se o substituci nukleotidu 9055 genu *ATPase6*, která se vyskytovala u 10,7 % a substituci nukleotidu 11719 genu *ND4* u 12 % mužů, přičemž mutace genu *ATPase6* byla nalezena u 1,3 % normozoospermických mužů a mutace genu *ND4* u žádného muže s normozoospermií (Holyoake *et al.* 2001). Studie zaměřené na delece mtDNA poukázaly především na deleci zahrnující 4977 bp, která se vyskytovala opět převážně u mužů se sníženou pohyblivostí spermií. Delece vede ke ztrátě genů *ND5*, *ND4*, *ND4L*, *ND3*, *COXIII*, *ATPase6* a *ATPase8*, které jsou nezbytné pro produkci energie mitochondriemi (Kao *et al.* 1998). Uvedená spojitost však nebyla dalšími studii potvrzena (Cummins *et al.* 1998, St John *et al.* 2001).

### 7.4 Epigenetické příčiny

Výzkum mužské neplodnosti se rovněž zaměřuje na epigenetické faktory, zahrnující především metylaci DNA, změny proteinů vázajících se na DNA a vliv krátkých nekódujících sekvencí RNA vyskytujících se u spermií. Uvedené faktory jsou dědičné a mají vliv na expresi genů, ačkoliv nepůsobují přímo změny v DNA sekvenci.

Účinek methylace se zkoumá především v úsecích DNA, kde dochází k rozdílné methylaci v závislosti na rodičovském původu. Neobvyklá methylace DNA byla nalezena v souvislosti s mužskou neplodností například u imprintovaných genů *H19* a *MEST* (Montjean *et al.* 2013, Kräver *et al.* 2013). Gen *H19* se exprimuje z chromozomu obdrženého od matky a jeho expresí vzniká dlouhý nekódující úsek RNA, který plní funkci nádorového supresoru. Mutace genu jsou spojeny s výskytem Beckwithova-Wiedemannova syndromu a Wilmsova

tumoru. Gen *MEST* se exprimuje z chromozomu pocházejícího od otce během vývoje plodu, přičemž v dospělosti může být exprimován rovněž z obou chromozomů v rámci krevních lymfocytů. Gen *MEST* kóduje enzym ze skupiny alfa/beta hydroláz a porucha imprintingu byla prokázána u určitých typů rakovin, například rakoviny prsu (databáze GeneBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, databáze UniProt <http://www.uniprot.org/>, Pederson *et al.* 1999). Studie nevyužívající uvedený přístup vedly k objevení genů ovlivněných DNA methylací v rámci celého genomu, například k nalezení hypermethylace u genu *MTHFR*, jehož funkce už byla v textu popsána (Rotondo *et al.* 2012).

Prokazatelná spojitost epigenetických procesů s mužskou neplodností byla zjištěna studii zaměřenými na protaminy, negativně nabitě nukleoproteiny umožňující dostatečné sbalení genetické informace spermií. Protamin P1 spermií kódovaný genem *PRM1* a protamin P2 kódovaný genem *PRM2* bývají zastoupeny během spermiogeneze obvykle ve stejném množství. Souhrnná studie dokazuje, že výrazné odchylky v jejich poměru negativně ovlivňují počet, pohyblivost a morfologii spermií, způsobují sníženou schopnost oplození a vedou k fragmentaci DNA spermie (Ni *et al.* 2016).

Výzkum se rovněž začíná intenzivně věnovat krátkým nekódujícím sekvencím RNA a jejich způsobu ovlivnění mužské neplodnosti. Studie, která prostřednictvím NGS vyšetřila transkriptom krátkých RNA pocházející z buněk varlat tří plodných mužů, objevila 775 sekvencí microRNA a 20121 RNA sekvencí interagujících s piwi proteiny, což prokazatelně poukazuje na jejich pravděpodobný význam v procesu spermatogeneze (Yang *et al.* 2013).

## 7.5 Sekvenování s využitím NGS

Převážná většina studovaných polymorfismů resekvenačními studii nevykazuje u celogenomových studií spojitost s mužskou neplodností. Resekvenační studie poskytují informace malé vypovídající hodnoty vzhledem k obvykle malému počtu vzorků a nedostatečné fenotypizaci vyšetřovaných jedinců. Získaná data poukazují na význam celogenomových studií zacílených na SNPs a CVNs a epigenetických odchylek. Rozvoj NGS technologií umožnil, dříve cenově nedostupné, celogenomové sekvenování nebo sekvenování velké skupiny kandidátních genů u početných skupin případů a kontrol (Carrell a Aston, 2014, Krausz *et al.* 2015).

Studii využívajícím NGS a zaměřeným přímo na hledání příčin mužské neplodnosti předcházely studie, které se věnovaly odlišným komplexním onemocněním, jejichž vedlejším

projevem byla právě neplodnost. Jednalo se například o studii příčin syndromu nepohyblivých řasinek (Onoufriadis *et al.* 2014).

Jedna z prvních studií vyšetřující neplodnost mužů v rámci bělošské populace prostřednictvím NGS se věnovala výskytu azoospermie či oligozoospermie z neznámé příčiny u dvou rodin vzniklých z příbuzenských sňatků. Kandidátní úseky, vybrané na základě mikročipové analýzy, byly osekvenovány a došlo k nalezení dvou mutací, které se obě u neplodných mužů nacházely v homozygotní recesivní sestavě. Jednalo se o mutaci v genu *TAF4B*, která vede ke vzniku předčasného terminačního kodonu, objevené u první rodiny a mutaci v genu *ZMYND15*, která způsobuje posun čtecího rámce, u druhé rodiny. Objevené mutace se nenacházely u žádného z kontrolní skupiny neplodných mužů. Gen *TAF4B* kóduje transkripční koaktivátor tvořící podjednotku komplexu transkripčních faktorů, které se specificky váží na TATA box sekvenci DNA a ovlivňují odpověď promotoru genu na účinek aktivátorů a represorů. Expresí *ZMYND15* genu se pravděpodobně tvoří transkripční represor ovlivňující deacetylaci histonů a expresi genů u haploidních stádií buněk během spermatogeneze. Mutacemi genů *TAF4B* a *ZMYND15* dochází k narušení spermatogeneze. Studie potvrzuje skutečnost, že plodnost ovlivňuje množství genů a každý gen může být zodpovědný pouze za malou část případů (Ayhan *et al.* 2014, databáze UniProt <http://www.uniprot.org/>, databáze OMIM <https://www.omim.org/>).

Podobná studie objevila celogenomovým sekvenováním nesmyslnou mutaci v genu *TEX15*, jehož funkce už byla v práci uvedena. Nalezená mutace s velkou pravděpodobností vedla k poruše spermatogeneze u homozygotních členů vyšetřované rodiny a vykazovala recesivní dědičnost (Okutman *et al.* 2015).

Následující zveřejněná studie prováděla sekvenaci celého exomu u dvou sourozenců s neobstrukční azoospermií, u kterých zjistila zatížení mutací genu *NPAS2* v homozygotním recesivním stavu. Vzhledem k nenalezení žádného homozygotního jedince dané mutace u kontrolní skupiny, zjištěné genotypové a fenotypové segregace u rodiny sourozenců a nepřítomnosti odlišných CNVs, které by se mohly na neplodnosti podílet, se předpokládá, že se jedná o patogenní mutaci (Ramasamy *et al.* 2015). Gen *NPAS2* kóduje transkripční aktivátor, který přispívá ke správnému fungování cirkadiálního rytmu lidského těla (databáze UniProt <http://www.uniprot.org/>).

Využití NGS u studií zabývajících se rodinným výskytem neplodnosti se ukázalo být značně úspěšné, hlavně kvůli přímé analýze obdržených dat, kterou umožňuje znalost genetických zákonitostí v rámci rodin. Vyšetření zmíněných mutací u ojedinělých případů neplodnosti, které celkově převládají, nedosahuje dostatečné klinické významnosti s ohledem



na to, že heterozygotní jedinci daných mutací nejsou neplodností zatíženi. Z uvedeného důvodu vyplývá, že větší klinické významnosti by dosáhly u jednotlivých případů mutace pohlavních chromozomů, které jsou u mužů v hemizygotní sestavě (Krausz *et al.* 2015, Carrell *et al.* 2016).

Jedny z takových mutací byly objeveny v genech skupiny *RHOX* na chromozomu X, kódující transkripční faktory ovlivňující řadu genů, které jsou exprimované především v pohlavních orgánech. Studie vyšetřující zmíněnou skupinu genů provedla jejich sekvenaci u 250 mužů s vážnou oligozoospermií a objevila dvě mutace v *RHOXF1* genu a čtyři mutace v *RHOXF2/2B* genech, z nichž pouze jedna byla rovněž přítomna u kontrolní skupiny 174 mužů s normozoospermií. Následná funkční analýza prokázala, že dvě mutace genů *RHOXF2/2B* narušují jejich schopnost ovlivnění odlišných genů a vedou k poruše spermatogeneze (Borgmann *et al.* 2016).

Nedávná studie vyšetřující neplodnost příslušníků rodiny vzniklé příbuzenským sňatkem objevila celoexomovým sekvenováním spojitost neplodnosti s novým genem *MAGEB4* na chromozomu X, jehož mutace vedla ke vzniku neobstrukční azoospermie či oligozoospermie. Jednalo se o bodovou mutaci měnící stop kodon za funkční kodon, čímž došlo k prodloužení daného proteinu kódovaného genem *MAGEB4*. Mutace nebyla nalezena u nikoho z početné kontrolní skupiny a předpokládá se, že jde o velmi vzácnou mutaci, jelikož gen kóduje protein patřící do velké skupiny MAGE proteinů, které se pravděpodobně ve funkci doplňují. (Okutman *et al.* 2017). Exprese genu *MAGEB4* probíhá rovněž ve varlatech, na rozdíl od ostatních zástupců *MAGE* genů, které jsou zkoumány především v souvislosti s jejich expresí v nádorových buňkách (databáze GeneBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Identifikace genetických vad zodpovědných za mužskou neplodnost bude vyžadovat další pečlivě navržené celogenomové studie, a především vytvoření prostředků k efektivní analýze a interpretaci získaných dat, které snad povedou k rozšíření diagnostických a léčebných možností (Aston, 2014, Carrell *et al.* 2016).

## 8 Závěr

Genetické příčiny mužské neplodnosti nejsou stále zcela objasněny a aktivně probíhá výzkum k jejich stanovení především z důvodu rozšíření diagnostického panelu vyšetření a zamezení přenosu genetického zatížení do následující generace. Klinické významnosti v rámci diagnostiky prozatím dosáhlo vyšetření karyotypu, mikrodeleci chromozomu Y a mutací genu *CFTR*. Navzdory mnoha přístupům používaným k určení genetické podstaty mužské neplodnosti nebylo doposud objeveno mnoho významných genetických rizikových faktorů.

V současnosti dochází k získávání nových informací o fungování mužského reprodukčního systému a spermatogeneze prostřednictvím studií zaměřených na výskyt neplodnosti u rodin vzniklých příbuzenskými sňatky, které vedou k odhalení vad s autozomálně recesivní nebo gonozomální dědičností. Výzkum rovněž vychází ze sekvenačních studií případů a kontrol, které stále převážně probíhají cílenou sekvenací kandidátních genů, ale výsledky provedených celogenomových studií poukazují na jejich význam v rámci komplexnosti mužské neplodnosti. Na základě studií se dá předpokládat, že mužskou neplodnost z větší části způsobují genetické vady desítek genů vázaných na pohlavní chromozomy nebo vykazujících autozomálně dominantní dědičnost, oproti autozomálně recesivním mutacím v mnohem větší počtu genů.

Využití NGS technologií umožnilo provádění, aktuálně obvykle celoexomových, studií u početných skupin případů a kontrol a přispívá nadále k identifikaci nových genetických rizikových faktorů u různých forem mužské neplodnosti. Celoexomové sekvenování bude pravděpodobně v budoucnu vystřídáno sekvenováním celého genomu, vzhledem k jeho patrným výhodám. Celogenomové sekvenování nevyžaduje počáteční kroky přípravy cílové sekvence, při které dochází k zatížení sekvence kvantitativními chybami, a tak lze přesně detekovat rozsah a pozici genetické vady bez ohledu na její umístění v genomu. Hlavní překážku spojenou s technologiemi NGS představuje adekvátní analýza velkého množství výstupních dat. Tato analýza vyžaduje vytvoření ucelené databáze ze získávaných poznatků, které povede k efektivnímu vyselektování relevantních dat.

## 9 Literatura

**Adessi, C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermod J., Mayer P., Kawashima E.** 2000. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res* 28 (20): e87.

**Anawalt B. D.** 2013. Approach to Male Infertility and Induction of Spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (9): 3532-3542.

**Ansorge W. J.** 2009. Next-generation DNA sequencing techniques 25 (4): 195-203.

**Aksgåede L., Wikström A. M., Meyts E. R., Dunkel L., Skakkebaek N., Juul A.** 2006. Natural history of seminiferous tubule degeneration Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 12 (1): 39-48.

**Aston K. I., Carrell D. T.** 2009. Genome-Wide Study of Single-Nucleotide Polymorphisms Associated With Azoospermia and Severe Oligozoospermia. *Journal of Andrology* 30 (6): 711-725.

**Aston, K.I., Krausz, C., Laface, I., Ruiz-Castane, E., Carrell, D.T.** 2010. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod* 25 (6): 1383-1397.

**Aston K. I.** 2014. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology* 2: 315-321.

**Ayhan Ö, Balkan M., Guven A., Hazan R., Atar M., Tok A., Tolun A.** 2014. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet* 51: 239-244.

**Bakircioglu M. E., Ulug U., Erden H. F., Tosum S., Bayram A., Ciray N., Bahceci M.** 2011. Klinefelter syndrome: does it confer a bad prognosis in treatment of nonobstructive azoospermia? *Fertil Steril* 95 (5): 1696-1699.

**Bansal S. K., Jaiswal D., Gupta N., Singh K., Dada R., Sankhwar S. N., Gupta G., Rajender S.** 2016. Gr/gr deletion on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Sci Rep* 6: 19798.

**Bentley D. R., Balasubramanian S., Swerdlow H. P., Smith G. P., Milton J., Brown C. G., Hall K. P., Evers D. J., Barnes C.L., Bignell H. R., Boutell J. M., Bryant J., Carter R. J., Cheatham R. K., Cox A. J., Ellis D. J., Flatbush M. R., Gormley N. A., Humphray S. J., Irving L. J., Karbelashvili M. S., Kirk S. M., Li H., Liu X., Maisinger K. S., Murray L. J., Obradovic B., Ost T., Parkinson M. L., Pratt M. R., Rasolonjatovo I. M., Reed M. T., Rigatti R., Rodighiero C., Ross M. T., Sabot A., Sankar S. V., Scally A., Schroth G. P., Smith M. E., Smith V. P., Spiridou A., Torrance P. E., Tzonev S. S., Vermaas E. H., Walter K., Wu X., Zhang L., Alam M. D., Anastasi C., Aniebo I. C., Bailey D. M., Bancarz I. R., Banerjee S., Barbour S. G., Baybayan P. A., Benoit V. A., Benson K. F., Bevis C., Black P. J., Boodhun A., Brennan J. S., Bridgham J. A., Brown R. C., Brown A. A., Buermann D. H., Bundu A. A., Burrows J. C., Carter N. P., Castillo N., Chiara E., Catenazzi M., Chang S., Cooley R. N., Crake N. R., Dada O. O., Diakoumakos K. D., Dominguez-Fernandez B., Earnshaw D. J., Egbujor U. C., Elmore D. W., Etchin S. S., Ewan M. R., Fedurco M., Fraser L. J., Fuentes Fajardo K. V., Furey W. S., George D., Gietzen K. J., Goddard C. P., Golda G. S., Granieri P. A., Green D. E., Gustafson D. L., Hansen N. F., Harnish K., Haudenschild C. D., Heyer N. I., Hims M. M., Ho J. T., Horgan A. M., Hoschler K., Hurwitz S., Ivanov D. V., Johnson M. Q., James T., Huw Jones T. A., Kang G. D., Kerelska T. H., Kersey A. D., Khrebtukova I., Kindwall A. P., Kingsbury Z.,**

**Kokko-Gonzales P. I., Kumar A., Laurent M. A., Lawley C. T., Lee S. E., Lee X., Liao A. K., Loch J. A., Lok M., Luo S., Mammen R. M., Martin J. W., McCauley P. G., McNitt P., Mehta P., Moon K. W., Mullens J. W., Newington T., Ning Z., Ng L. B., Novo S. M., O'Neill M. J., Osborne M. A., Osnowski A., Ostadan O., Paraschos L. L., Pickering L., Pike A. C., Pike A. C., Pinkard C. D., Pliskin D. P., Podhasky J., Quijano V. J., Raczy C., Rae V. H., Rawlings S. R., Chiva Rodriguez A., Roe P. M., Rogers J., Bacigalupo M. C. R., Romanov N., Romieu A., Roth R. K., Rourke N. J., Ruediger S. T., Rusman E., Sanches-Kuiper R. M., Schenker M. R., Seoane J. M., Shaw R. J., Shiver M. K., Short S. W., Sizto N. L., Sluis J. P., Smith M. A., Sohna Sohna J. E., Spence E. J., Stevens K., Sutton N., Szajkowski L., Tregidgo C. L., Turcatti G., Vandevondele S., Verhovskiy Y., Virk S. M., Wakelin S., Walcott G. C., Wang J., Worsley G. J., Yan J., Yau L., Zuerlein M., Rogers J., Mullikin J. C., Hurles M. E., McCooke N. J., West J. S., Oaks F. L., Lundberg P. L., Klenerman D., Durbin R., Smith A. J.** 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456 (7218): 53-59.

**Bojesen A., Juul S., Gravholt C. H.** 2003. Prenatal and Postnatal Prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2): 622-626.

**Borgmann J., Tüttelmann F., Dworniczak B., Röpke A., Song H.-W., Kliesch S., Wilkinson M F., Laurentino S., Gromoll J.** 2016. The human RHOX gene cluster: target genes and functional analysis of gene variants in infertile men. *Hum Mol Genet* 25 (22): 4898-4910.

**Braslavsky I., Hebert B., Kartalov E., Quake S. R.** 2003. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (7): 3960-3964.

**Carrell D. T., Aston K. I., Oliva R., Emery B. R. Jonge C. J.** 2016. The “omics“ of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. *Cell Tissue Res* 363: 295-312.

**Chládek D.** 2013. Diagnostika a léčebné možnosti asistované reprodukce při poruše plodnosti muže. In Mardešić T., Chládek D., Kosařová M., Lonský P. Diagnostika a léčba poruch plodnosti. 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 43-51.

**Clarke J., Chen H., Jayasinghe L., Petel A., Reid S., Bayley H.** 2009. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotech* 4: 265-270.

**Claustres M., Guittard C., Bozon D., Chevalier F., Verlingue C., Ferec C., Girodon E., Cazeneuve C., Bienvenu T., Lalau G., Dumur V., Feldmann D., Bieth E., Blayau M., Clavel C., Creveaux I., Malinge M.-C., Monnier N., Malzac P., Mittre H., Chomel J.-C., Bonnefont J.-P., Iron A., Chery M., Georges M. D.** 2000. Spectrum of CFTR Mutations in Cystic Fibrosis and in Congenital Absence of Vas Deferens in France. *Hum Mutat* 16: 143-156.

**Cooper T. G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H. W. G., Behre M., Haugen T. B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M. T., Vogelsong M.** 2010 World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod.* 16 (3): 231-245.

**Cooper T. G., Yeung C.-H.** 2010. Physiology of Sperm Maturation and Fertilization. In: Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (eds.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 60-85.

**Cummins J. M., Jequier A. M., Martin R., Mehmet D., Goldblatt J.** 1998. Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype. *Int J Androl* 21: 47-52.

**Dalgaard M. D., Weinhold N., Edsgard S. D., Silver J. D., Pers T. H., Nielsen J. E., Jørgensen N., Juul A. G., Thomas A., Giwercman A., Giwercman Y. L. Cohn-Cedermark**

- G. Virtanen H. E., Toppari J., Daugaard G., Jensen T. S., Brunak S., Rajpert-De Meyts E., Skakkebaek N. E., Leffers H., Gupta R.** 2012. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J Med Genet* 49: 58–65.
- De Geyter C., De Greyter M., Behre H. M.** 2010. Assisted Reproduction. In: Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (eds.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 469-504.
- Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler K. W., Vogelstein B.** 2003. Transforming single DNA into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (15): 8817-8822.
- Edwards R. G., Bishop C. E.** 1997. On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol Hum Reprod* 3 (7): 549-554.
- Fedurco M., Romieu A., Williams S., Lawrence I., Turcatti G.** 2006. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res* 34 (3): e22.
- Fiorentino F., Biricik A., Bono S., Spizzichino L., Cotroneo E., Cottone G., Kokocinski F., Michel C.-E.** 2014. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 101 (5): 1375-1382.
- Foresta C. Moro E., Ferlin A.** 2001. Y Chromosome Microdeletions and Alteration of Spermatogenesis. *Endocr Rev* 22 (2): 226-239.
- Foresta C., Ferlin A., Gianaroli L., Dallapiccola B.** 2002. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 10: 303-312.
- Foresta C., Garolla A., Bartoloni L., Bettella A., Ferlin A.** 2005. Genetic Abnormalities among Severely Oligospermic Men Who Are Candidates for Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (1): 152-156.
- Friedler S., Raziel A., Strassburger D., Schachter M., Bern O., Ron-El R.** 2001. Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 16 (12): 2616-2620.
- Georgiou I., Syrrou M., Pardalidis N., Karakitsios K., Mantzavinos T., Giotitsas N., Loutradis D., Dimitriadis F., Saito M., Miyagawa I., Tzoumis P., Sylakos A., Kanakas N., Moustakareas T., Baltogiannis D., Touloupides S., Giannakis D., Fatouros M., Sofikitis N.** 2006. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 8: 643-673.
- Ghadessy F. J., Ong J. L., Holliger P.** 2001. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (8): 4552-4557.
- Gilles A., Megléc E. Pech N., Ferreira S., Malausa T., Martin J. F.** 2011. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* 12: 254.
- Gianotten J., Lombardi M. P., Zwinderman A. H., Lilford R. J., van der Veen F.** 2004. Idiopathic impaired spermatogenesis: Genetic epidemiology is unlikely to provide a short-cut to better understanding. *Hum Reprod Update* 10: 533-539.
- Glenn T. C.** 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* 11:759-769. Aktualizace dat k roku 2016 [online] [cit. 6. dubna 2017] <<http://www.molecular-ecologist.com/next-gen-fieldguide-2016/>>

- Goodwin S., McPherson J. D., McCombie W. R.** 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Rev Genet* 17: 333-351.
- Harris T. D., Buzby P. R., Babcock H., Beer E., Bowers J., Braslavsky I., Causey M., Colonell J., DiMeo J., Efcavitch J. W., Giladi E., Gill J., Healy J., Jarosz M., Lapen D., Moulton K., Quake S. R., Steinmann K., Thayer E., Tyurina A., Ward R., Weiss H., Xie Z.** 2008. Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome. *Science* 320 (5872):106-109.
- Hess R. A., de Franca L. R.** 2008. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Adv Exp Med Biol* 636: 1-15.
- Holyoake A. J., McHugh P., Wu M., O'Carroll S., Benny P., Sin I. L., Sin F. Y.** 2001. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int J Androl* 24: 175-182.
- Hurd P. J., Nelson C. J.** 2009. Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8 (3): 174-183.
- International Human Genome Sequencing Consortium.** 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (7011): 931-945.
- Jain M., Fiddes I. T., Miga K. H., Olsen H. E., Paten B., Akeson M.** 2015. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. *Nat Methods* 12 (4): 351-356.
- Jain M., Olsen H. E., Paten B., Akeson M.** 2016. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* 17 (239): 1-11.
- Jungwirth A., Diemer T., Dohle T. D., Giwercman A., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H.** 2015. Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology*.
- Kara E., Simoni M.** 2010. Genetic screening for infertility: When should be done? *Middle East Fertility Society Journal*. 15: 139-145.
- Kao S.-H., Chao H.-T., Wei Y.-H.** 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4 (7): 657-666.
- Komori S., Kato H., Kobayashi S., Koyama K., Isojima S.** 2002. Transmission of Y chromosomal microdeletions from father to son though intracytoplasmic sperm injection. *J Hum Genet* 47: 465-468.
- Kosařová M.** 2013. Monogenně podmíněné poruchy plodnosti. In Mardešić T., Chládek D., Kosařová M., Lonský P. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 62-72.
- Kosova G., Scott N. M., Niederberger C., Prins G. S., Ober C.** 2012. Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans. *Am J Hum Genet* 90: 950-961.
- Krausz C.** 2011. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25: 271-285.
- Krausz C., Giachini C., Giacco D. L., Daguin F., Chianese C., Ars E. Ruiz-Castane E. Forti G., Rossi E.** 2012. High Resolution X Chromosome-Specific Array-CGH Detects New CNVs in Infertile Males. *PLoS ONE* 7 (10), [online] doi:10.1371/journal.pone.0044887.
- Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F.** 2014. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2: 5-19.

- Krausz C., Escamilla A. R., Chianese C.** 2015. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction* 150 (5): R159-R174.
- Kläver R., Tüttelmann F., Bleiziffer A., Haaf T., Kliesch S., Gromoll J.** 2013. DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *Andrology* 1: 731-740.
- Kuang W.** 2011. The Initial Consultation for Male Infertility. In Sabanegh E. S. (ed.) *Male Infertility, Problems and Solutions*. Springer Science+Business Media, Humana Press, 1-14.
- Lai H.-H., Chuang T.-H., Wong L.-K., Lee M.-J., Hsieh C.-L., Wang H.-L., Chen S.-U.** 2017. Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet* 10: 14.
- Lend A. K., Belousova A., Haller-Kikkatalo K., Punab M., Poolamets O., Peters M., Sulamets A.** 2010. Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Haplotypes and Male Infertility in Estonian Population and Meta-Analysis.
- Lopes A. M., Aston K. I., Thompson E., Carvalho F., Goncalves J., Huang N., Matthiesen R., Noordam M. J., Quintela I., Ramu A., Seabra C., Wilfert A. B., Dai J., Downie J. M., Fernandes S., Guo X., Sha J., Amorin A., Barros A., Carracedo A., Hu Z., Hurles M. E., Moskvotsev S., Ober C., Paduch D. A., Schiffman J. D., Schlegel P. N., Sousa M., Carrell D. T., Conrad D. F.** 2013. Human Spermatogenic Failure Purges Deleterious Mutation Load from the Autosomes and Both Sex Chromosomes, including the Gene DMRT1. *PLoS Genet* 9 (3), [online] doi:10.1371/journal.pgen.1003349.
- Mardis E. R.** 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470: 198-203.
- Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y., Chen Z., Dewell S. B., Du L., Fierro J. M., Gomes X. V., Godwin B. C., He W., Helgesen S., Ho C. H., Irzyk G. P., Jando S. C., Alenquer M. L. I., Jarvie T. P., Jirage K. B., Kim J., Knight J. R., Lanza J. R., Leamon J. H., Lefkowitz S. M., Lei M., Li J., Lohman K. L., Lu H., Makhijani V. B., McDade K. E., McKenna M. P., Myers E. W., Nickerson E., Nobile J. R., Plant R., Puc B. P., Ronan M. T., Roth G. T., Sarkis G. J., Simons J. F., Simpson J. W., Srinivasan M., Tartaro K. R., Tomasz A., Vogt K. A., Volkmer G. A., Wang S. H., Wang Y., Weiner M. P., Yu P., Begley R. F., Rothberg J. M.** 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Mascarenhas M., Thomas S., Kamath M. S., Ramalingam R., Kongari A. M., Yuvarani S., Srivastava V. M., George K.** 2016. Prevalence of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletion among men with severe semen abnormalities and its correlation with successful sperm retrieval. *J Hum Reprod Sci* 9 (3): 187-193.
- Matzuk M. M., Lamb D. J.** 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14 (11): 1197-1213.
- Matzuk M. M., Lamb D. J.** 2002. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 4: s41-49.
- Maxam A. M., Gilbert W.** 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (2): 560-564.
- McCarroll S. A., Kuruvilla F. G., Korn J. M., Cawley S., Nemes J., Wysoker A., Shapero M. H., de Bakker P. I. W., Maller J. B., Kirby A., Elliott A. L., Parkin M., Hubbell E., Webster T., Mei R., Veitch J., Collins P. J., Handsaker R., Lincoln S., Nizzari M., Blume J., Jones K. W., Rava R., Daly M. J., Gabriel S. B., Altshuler D.** 2008. Integrated detection

and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet* 40 (10): 1166-1174.

**McLachlan R. I., O'Bryan M. K.** 2010. State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1013–1024.

**Men A. E., Wilson P., Siemering K., Forrest S.** 2008. Sanger DNA Sequencing. In Janitz M. (ed.). *Next-Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. Weinheim, Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, 3-11.

**Metzker M. L.** 2016. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 11: 31-46.

**Montjean D., Ravel C., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie P., Berthaut I., Bashamboo A., McElreavey K.** 2013. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 100: 1241-1247.

**Morel F., Bernicot I., Herry A., Le Bris MJ., Amice V., De Braekeleer M.** 2003. An increased incidence of autosomal aneuploidies in spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 79: 1644-1646.

**Naasse Y., Charoute H., El Houate B., Elbakkay C., Razoki L., Malki A., Barakat A., Rouba H.** 2015. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. *BMC Urol* 15: 95.

**Nato F. T. L., Bach P. V., Najari B. B., Li P. S., Goldstein M.** 2016. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep* 17: 70.

**Neto F. T. L., Bach P. V., Najari B. B., Li P. S., Goldstein M.** 2016. Spermatogenesis in human and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 59: 10-26.

**Ng S. B., Turner E. H., Robertson P. D., Flygare S. D., Bigham A. W., Lee C., Shaffer T., Wong M., Bhattacharjee A., Eichler E. E., Bamshad M., Nickerson D. A., Sheddure J.** 2009. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461 (7261): 272-276.

**Ni K., Spiess A. N., Schuppe H. C., Steger K.** 2016. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 4 (5):789-799.

**Nieschlag E.** 2010. Scope and Goals of Andrology. In: Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (eds.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1-10.

**Nishimune Y., Tanaka H.** 2006. Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes. *Journal of Andrology* 27, 326–334.

**Nuti F., Krausz C.** 2008. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal reproduction. *Reprod Biomed Online* 16 (4): 504-513.

**Okutman O., Muller J., Baert Y., Serdarogullari M., Gultomruk M., Piton A., Rombaut C., Benkhalifa M., Teletin M., Skory V., Bakircioglu E., Goossens E., Bahceci M., Viville S.** 2015. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in *TEX15* causing spermatogenic failure in Turkish family. *Human Molecular Genetics* 24 (19): 5581-5588.

**Okutman O., Muller J., Skory V., Garnier J. M., Gaucherot A., Baert Y., Lamour V., Serdarogullari M., Gultomruk M., Röpke A., Kliesch S., Herbepin V., Aknin I., Benkhalifa M., Teletin M., Bakircioglu E., Goossens E., Charlet-Berguerand N., Bahceci**



**M., Tüttelmann F., Viville S.** A no-stop mutation in MAGEB4 is a possible cause of rare X-linked azoospermia and oligozoospermia in a consanguineous Turkish family. *J Assist Reprod Genet* DOI 10.1007/s10815-017-0900-z.

**Onoufriadis A., Shoemark A., Munye M. M., James C. T., Schmidts M., Patel M., Rosser E. M., Bacchelli C., Beales P. L., Scambler P. J., Hart S. L., Danke-Roelse J. E., Sloper J. J., Hull S., Hogg C., Emes R. D., Pals G., Moore A. T., Chung E. M., UK10K, Mitchison H. M.** 2014. Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in ARMC4 as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *J Med Genet* 51: 61–67.

**Ou J., Wang W., Feng T., Liao L., Meng Q., Zou Q., Ding J., Zheng A., Duan C., Li P., Liu Q., Lin C., Li H.** 2015. Identification of small segmental translocations in patients with repeated implantation failure and recurrent miscarriage using next generation sequencing after in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection. *Mol Cytogenet* 8: 105.

**Pedersen I. S., Dervan P. A., Broderick D., Harrison M., Miller N., Delany E., O’Shea D., Costello P., McGoldrick A., Keating G., Tobin B., Gorey T., McCann A.** 1999. Frequent Loss of Imprinting of PEG1/MEST in Invasive Breast Cancer. *Can Res* 59: 5449-5451.

**Pylyp L. Y., Spinenko L. O., Verhoglyad N. V., Zukin V. D.** 2013. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 30 (5): 729-732.

**Quail M. A., Smith M., Coupland P., Otto T. D., Harris S. R., Connor T. R., Bertoni A., Swerdlow H. P., Gu Y.** 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13: 341.

**Ramasamy R., Bakircioglu M. E., Cengiz C., Karaca E., Scovell J., Jhangiani S. N., Akdemir Z. C., Bainbridge M., Yu Y., Huff C., Gibbs R. A., Lupski J. R., Lamb D. J.** 2015. Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in NPAS2 in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 104 (2): 286-291.

**Ravel C., Berthaut I., Bresson J. L., Siffroi J. P., Genetics Commission of the French Federation of CECOS** 2006. Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large scale survey of over 10 000 sperm donor karyotypes. *Hum. Reprod.* 21 (6): 1484-1489.

**Rothberg J. M., Hinz W., Rearick T. M., Schultz J., Mileski W., Davey M., Leamon J. H., Johnson K., Milgrew M. J., Edwards M., Hoon J., Simons J. F., Marran D., Myers J. W., Davidson J. F., Branting A., Nobile J. R., Puc B. P., Light D., Clark T. A., Huber M., Branciforte J. T., Stoner I. B., Cawley S. E., Lyons M., Fu Y., Homer N., Sedova M., Miao X., Reed B., Sabina J., Feierstein E., Schorn M., Alanjary M., Dimalanta E., Dressman D., Kasinskas R., Sokolsky T., Fidanza J. A., Namsaraev E., McKernan K. J., Williams A., Roth G. T., Bustillo J.** 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475 (7356): 348-52.

**Rotondo J. C., Bosi S., Bazzan E., Di Domenico M., De Mattei M., Selvatici R., Patella A., Marci R., Tognon M., Martini F.** 2012. Methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 27 (12): 3632–3638.

**Sabanegh E. S.** (ed.) 2011. *Male Infertility, Problems and Solutions*. Springer Science+Business Media, Humana Press.

**Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (12): 5463-5467.

- Schaaf C. P., Wiszniewska J., Beaudet A. L.** 2011. Copy Number and SNP Arrays in Clinical Diagnostics. *Annu Rev Genom Human Genet* 12: 25-51.
- Service R. F.** 2006. The race for the \$1000 genome. *Science* 311 (5767): 1544-1546.
- Shamsi M. B., Kumar K., Dada R.** 2011. Genetic and epigenetic factors: Role in male infertility. *Indian J Urol* 27 (1): 110-120.
- Shendure J., Ji H.** 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26 (10): 1135-1145.
- Shi Q., Martin R.** 2001. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities and in infertile men. *Reproduction* 121: 655-666.
- Schultz N., Hamra F. K., Garbers D. L.** 2003. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 100 (21): 12 201-12 206.
- Silber S. J., Repping S.** Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update* 8 (3): 217-229.
- Simon L., Proutski I. Stevenson M., Jennings D., McManus J., Lutton D., Lewis S.** 2013. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 26: 68-78.
- Simoni M., Wieacker P.** 2010. Genetic Investigations. In: Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (eds.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 119-124.
- Song X., Zhao Y., Cai Q., Zhang Y., Niu Y.** 2013. Association of the Glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphism with male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 30: 131-141.
- Sosnay P. R., Siklosi K. R. Goor F. V., Kaniecki K., Yu H., Sharma N., Ramalho A. S., Amaral M. D., Dorfman R., Zielenski J., Masica D. L., Karchin R., Millen L., Thomas P. J., Patrinos G. P., Corey M., Lewis M. H., Rommens J. M., Castellani C., Penland C. M., Cutting G. R.** 2013. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 45: 1160-1167.
- Stahl P. J., Mielnik A., Margreiter M., Marean M. B., Schlegel P. N., Paduch D. A.** 2011. Diagnosis of the gr/gr Y Chromosome Microdeletion Does Not Help in the Treatment of Infertile American Men. *J Urol* 185: 233-237.
- St John J. C., Jokhi R. P., Barratt C. L. R.** 2001. Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod* 7 (1): 103-111.
- Stouffs K., Vandermaelen D., Massart A., Menten B., Vergult S., Tounaye H., Lissens W.** 2012. Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Hum Reprod* 27 (3): 921-929.
- Tang M., Wang S., Wang W., Cao Q., Qin C., Liu B., Li P., Zhang W.** 2012. The glutathione-S-transferase gene polymorphisms (*GSTM1* and *GSTT1*) and idiopathic male infertility risk: A meta-analysis. *Gene* 511: 218-223.
- Turcatti G., Romieu A., Fedurco M., Tairi A.** 2008. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res* 36 (4): e25.

- Tüttelmann F., Rajpert-De Meyts E., Nieschlag E., Simoni M.** 2007. Gene polymorphisms and male infertility – a metanalysis and literature review. *Reprod Biomed Online* 15 (6): 643-658.
- Tüttelmann F., Simoni M.** 2008. Current recommendations for genetic testing in male infertility. *European Urological Review* 3 (2): 88-92.
- Tüttelmann F., Nieschlag E.** 2010. Classification of Andrological Disorders. In: Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (eds.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 87-92.
- Tüttelmann F., Simoni M., Kliesch S., Ledig S., Dworniczak B., Wieacker P., Röpke A.** 2011. Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS ONE* 6 (4), [online] doi:10.1371/journal.pone.0019426.
- van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C.** 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30 (9): 418-426.
- Visser L., Westerveld G. H., Korver C. M., van Daalen S. K. M., Hovingh S. E., Rozen S., van der Veen F., Repping S.** 2009. Y chromosome gr/gr deletions are a risk for low semen quality. *Hum Reprod* 24 (10): 2667-2673.
- Vogt P. H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kiesewetter F., Köhn F. M., Schill W. B., Farah S., Ramos C., Hartmann M., Hartschuh W., Meschede D., Behre H. M., Castel A., Nieschlag E., Weidner W., Gröne HJ., Jung A., Engel W., Haidl G.** 1996. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5 (7): 933-943.
- Vogt P. H.** 2005. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 10 (1): 81-93.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M. S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T. J. Lipshutz R., Chee M. Lander E. S.** 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280 (5366): 1077-1082.
- Wells D., Fragouli E.** 2013. Preimplantation genetic diagnosis. In Coward K., Wells D. (eds.). *Textbook of Clinical Embryology*. Cambridge University Press, 346-356.
- WHO.** 2010. WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed., Geneva: World Health Organization, c2010.
- Weinbauer G. F., Luetjens C. M., Simoni M., Nieschlag E.** 2010. Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (eds.). *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3rd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 11-59.
- Wu W., Cai H., Sun H., Lu J., Zhao D., Qin Y., Han X., Niu X., Lu C., Xia Y., Wang S., Moor B., Marchal K., Wang X.** 2012. Follicle stimulating hormone receptor G-29A, 919A>G, 2039A>G polymorphism and the risk of male infertility: A meta-analysis. *Gene* 505: 388-392.
- Wu W., Lu J., Tang Q., Zhang S., Yuan B., Li J., Wu D., Sun H., Lu C., Xia Y., Chen D., Sha J., Wang X.** 2013. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and male infertility risk: an updated meta-analysis encompassing 6934 subjects. *Sci Rep* 3: 2258.

- Yang F., Gell K., van der Heijden G. W., Eckardt S., Leu N. A., Page D. C., Benavente R., Her C., Hoog C., McLaughlin K. J., Wang P. J.** 2008. Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev* 22: 682–691.
- Yang Q., Hua J., Wang L., Xu B., Zhang H., Ye N., Zhang Z., Yu D., Cooke H. J., Zhang Y. Shi Q.** 2013. MicroRNA and piRNA Profiles in Normal Human Testis Detected by Next Generation Sequencing. *PLoS ONE* 8 (6), [online] doi:10.1371/journal.pone.0066809.
- Yang F., Silber S., Leu N. A., Oates R. D., Marszalek J. D., Skaletsky H., Brown L. G., Rozen S., Page D. C., Wang P. J.** 2015. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med* 7 (9): 1198-1210.
- Yatsenko A. N., Georgiadis A.P., Röpke A., Berman A. J., Jaffe T., Olszewska M., Westernströer B., Sanfilippo J., Kurpisz M., Rajkovic A., Yatsenko S. A., Kliesch S., Schlatt S., Tüttelmann F.** 2015. X-Linked TEX11 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. *N Engl J Med* 372 (22): 2097-2107.
- Yu J., Chen Z., Ni Y., Li Z.** 2012. *CFTR* mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 27 (1): 25-35.
- Zheng H., Jin H., Liu L., Wang W.-H.** 2015. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. *Mol Cytogenet* 8: 38.
- Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Vanderpoel S.** 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Hum Reprod* 24 (11): 2683-2687.

## Seznam obrázku

Obr. 1: Příčiny neplodnosti párů.....	9
Obr. 2: Vývojová stádia buněk během spermatogeneze. ....	10
Obr. 3: Karyotyp muže s Klinefelterovým syndromem, 47,XXY.....	14
Obr. 4: Schématické znázornění mikrodeleci chromozomu Y.....	15
Obr. 5: Průběh sekvenování Sangerovou metodou.....	17
Obr. 6: Znázornění provedení můstkové PCR. ....	19
Obr. 7: Průběh sekvenování technologie Solexa/Illumina. ....	19
Obr. 8: Znázornění provedení emulzní PCR. ....	20
Obr. 9: Průběh sekvenování technologie Ion Torrent.....	20
Obr. 10: Průběh sekvenování technologie Oxford Nanopore. ....	21

## Seznam tabulek

Tab. 1: Referenční hodnoty pro zhodnocení výsledků analýzy spermatu. ....	12
Tab. 2: Genetické vady mužů s poruchou spermatogeneze nebo funkce spermií. ....	23
Tab. 3: Výhody a nevýhody metod umožňující celogenomová vyšetření. ....	27

## Seznam příloh

Příloha 1a: Rozdělení poruch testikulárních funkcí podle místa vzniku.	
Příloha 1b: Rozdělení poruch testikulárních funkcí podle místa vzniku (pokračování).	
Příloha 2: Názvosloví používané při popisu kvality spermatu podle spermogramu.	
Příloha 3: Soubor genů ovlivňujících plodnost u samců myši.	
Příloha 4: Souhrn výsledků uvedených GWAS.	

## **Přílohy**

**Příloha 1a:** Rozdělení poruch testikulárních funkcí podle místa vzniku (Tüttelmann a Nieschlag, 2010).

Lokalizace	Příčina	Onemocnění	Neplodnost
hypotalamus, hypofýza	genetická porucha sekrece hormonu GnRH způsobená mutací genů ( <i>KALI</i> , <i>FGFR1</i> , <i>KAL2</i> , <i>PROK2</i> , <i>PROKR2</i> , <i>GPR54</i> , a další)	Kallmannův syndrom, idiopatický hypogonadotropní hypogonadismus	+
	genetická porucha sekrece GnRH	Prader-Labhart-Willi syndrom	+
	opožděné „biologické hodiny“	opožděné pohlavní dospívání	(+)
	nádor, infiltrace, trauma, ozáření, narušení krevního zásobení a výživy, systémová onemocnění	sekundární porucha sekrece hormonu GnRH	+
	nádor, infiltrace, trauma, ozáření, ischemie, chirurgický zákrok	hypopituitarismus	+
	nedostatek LH (luteinizační hormon)	Pasqualiniho syndrom	(+)
	adenomy, léčebné přípravky, drogy	hyperprolaktinémie	+
varlata	nevyvinutí varlat u plodu	vrozená anorchie	+
	trauma, torze, nádor, infekce, chirurgický zákrok	získaná anorchie	+
	nedostatek testosteronu a AMH (anti-Müllerian hormon), vrozená anatomická překážka	nesestoupení varlat	+
	žilní nedostatečnost	varikokéla	+
	infekce s poškozením zárodečného epitelu	zánět varlat	+
	vrozené nebo získané onemocnění	syndrom „Sertoli cell only“	+
	vrozené nebo získané onemocnění	zástava spermatogeneze	+
	nepřítomnost akrozomu spermií	globozoospermie	+
	nedostatek dyneinových proteinů	syndrom nepohyblivých řasinek (Kartagenerův syndrom)	+
	genetická vada v diferenciaci pohlavních žláz	poruchy sexuálního vývoje	+
	meiotická non-disjunkce	Klinefelterův syndrom, 47,XXY	+
	translokace části chromozomu Y	46,XX syndrom	+
	různorodé genetické poruchy	dysgeneze pohlavních žláz	+
	mutace v receptoru pro AMH	nedochází k zániku Müllerových vývodu	(-)
	mutace v receptoru pro LH	hypoplazie Leydigových buněk	(+)
	enzymatický defekt syntézy testosteronu	poruchy syntézy steroidů	+
	meiotická non-disjunkce	47,XYY syndrom	(+)
mutace genů <i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>SOS1</i> a <i>RAF1</i>	Noonanův syndrom	+	

**Příloha 1b:** Rozdělení poruch testikulárních funkcí podle místa vzniku (pokračování).

Lokalizace	Příčina	Onemocnění	Neplodnost
varlata	delece, translokace, a další	strukturní chromozomové vady	+
	vrozené nebo získané onemocnění	nádory varlat	+
	léčebné přípravky, ozáření, teplo, toxiny, cirhóza jater, selhání ledvin	poruchy vzniklé exogenními faktory nebo systémovými onemocněními	+
	–	idiopatická neplodnost	+
smíšená lokalizace (hypotalamus, hypofýza, varlata)	primární a sekundární hypogonadismus	hypogonadismus s opožděným nástupem	+
semenné vajíčky a přídatné pohlavní žlázy	viry, bakterie	infekce	+
	vrozené vady, infekce, vasektomie, apendektomie, herniotomie, transplantace ledvin	obstrukce	+
	mutace genu cystické fibrózy pro transmembránový regulátor ( <i>CFTR</i> )	cystická fibróza	+
	mutace genu <i>CFTR</i>	vrozené oboustranné nevyvinutí chámovodu	+
	–	porucha zkapalnění ejakulátu	+
	autoimunitní reakce	neplodnost z imunitních příčin	+
porucha vylučování sperma	vrozené onemocnění	ektopie močové trubice	(+)
	vrozené nebo získané onemocnění	deformace penisu	(+)
	multifaktoriální původ	erektilní dysfunkce	(+)
	vrozené nebo získané onemocnění	porucha ejakulace	+
	vrozené onemocnění	fimóza	(+)
cílové orgány pro působení androgenů	porucha receptoru pro androgeny	syndrom úplné androgenní necitlivosti (testikulární feminizace)	+
	lehký defekt receptoru pro androgeny	Reifensteinův syndrom	+
	lehký defekt receptoru pro androgeny	rozštěp šourku a hypospadie	+
	porucha receptoru pro androgeny	bulbospinální svalová atrofie (Kennedyho syndrom)	–
	nedostatek 5 $\alpha$ -reduktázy	perineoskrotální hypospadie s pseudovaginou	+
	porucha receptoru pro estrogény	necitlivost na estrogény	(–)
	nedostatek aromatázy	nedostatek estrogenů	(–)
	–	gynekomastie	(–)
–	androgenní alopecie	–	



**Příloha 2:** Názvosloví používané při popisu kvality spermatu podle spermioqramu. Převzato a upraveno podle WHO, 2010.

<b>normozoospermie</b>	celkový počet spermií $\geq 39 \cdot 10^6$ /ejakulát (nebo koncentrace spermií $\geq 15 \cdot 10^6$ /ml), progresivní pohyblivost $\geq 32$ % a normální morfologie spermií $\geq 4$ %
<b>oligozoospermie</b>	celkový počet spermií $< 39 \cdot 10^6$ /ejakulát (nebo koncentrace spermií $< 15 \cdot 10^6$ /ml)
<b>astenozoospermie</b>	progresivní pohyblivost $< 32$ %
<b>teratozoospermie</b>	normální morfologie spermií $< 4$ %
<b>oligoastenozoospermie</b>	celkový počet spermií $< 39 \cdot 10^6$ /ejakulát (nebo koncentrace spermií $< 15 \cdot 10^6$ /ml) a progresivní pohyblivost $< 32$ %
<b>oligoteratozoospermie</b>	celkový počet spermií $< 39 \cdot 10^6$ /ejakulát (nebo koncentrace spermií $< 15 \cdot 10^6$ /ml) a normální morfologie spermií $< 4$ %
<b>oligoastenoteratozoospermie</b>	celkový počet spermií $< 39 \cdot 10^6$ /ejakulát (nebo koncentrace spermií $< 15 \cdot 10^6$ /ml), progresivní pohyblivost $< 32$ % a normální morfologie spermií $< 4$ %
<b>astenoteratozoospermie</b>	progresivní pohyblivost $< 32$ % a normální morfologie spermií $< 4$ %
<b>azoospermie</b>	nepřítomnost spermií v ejakulátu
<b>kryptozoospermie</b>	přítomnost spermií v ejakulátu po zpracování centrifugací
<b>aspermie</b>	žádná nebo retrográdní ejakulace

**Příloha 3:** Soubor genů ovlivňujících plodnost u samců myši. Převzato z Matzuk a Lamb, 2008.

Genes					Cells	Function		
<i>Acvr2a</i>	<i>Cldn11</i>	<i>Gdl1</i>	<i>Lhcgr</i>	<i>Serpina5</i>	Sertoli, peritubular, Leydig and/or interstitial cells	Growth factors and receptors Gonadotropin receptors Cell-cell adhesion Steroids and receptors Signal transduction Junctional complexes		
<i>Adralb</i>	<i>Cyp17a1</i>	<i>Gdnf</i>	<i>Man2a2</i>	<i>Slc12a2</i>				
<i>Ar</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Map7</i>	<i>Sox8</i>				
<i>B4galnt1</i>	<i>Dhh</i>	<i>Hmga1</i>	<i>Nr0b1</i>					
<i>Bcl2l2</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Hmgb2</i>	<i>Rbp4</i>					
<i>Cdkn2c</i>	<i>Dnaja1</i>	<i>Inha</i>	<i>Sf1</i>					
<i>Cdkn2e</i>	<i>Etv5</i>	<i>Kitl</i>	<i>Sbf1</i>					
<i>Adams2</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Pl3K</i>	<i>Sycp2</i>	Spermatogonia (mitosis and apoptosis)	Proapoptotic, survival and cell cycle Apoptotic stem cells		
<i>Apaf1</i>	<i>Dazl</i>	<i>Kit</i>	<i>Rbp4</i>	<i>Utp14b</i>				
<i>Bax</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Limk2</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Zbtb16</i>				
<i>Bmp8b</i>	<i>Dnmt3l</i>	<i>Nanos2</i>	<i>Slc19a2</i>					
<i>Csf1</i>	<i>Etv5</i>	<i>Pln1</i>	<i>Sohlh2</i>					
<i>Cdkn2d</i>	<i>Gdnf</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Stra8</i>					
<i>Adralb</i>	<i>Cdk2</i>	<i>Ercc1</i>	<i>Ihpk1</i>	<i>Plwil2</i>	Spermatocytes (meiosis)	Chromosome pairing and synapsis Homologous recombination Genomic integrity DNA replication and repair		
<i>Atm</i>	<i>Ccna1</i>	<i>Exo1</i>	<i>Limk2</i>	<i>Plwil4</i>				
<i>Bat3</i>	<i>Cks2</i>	<i>Fanca</i>	<i>Lmna</i>	<i>Pms2</i>				
<i>Bcl2</i>	<i>Cnb1lp1</i>	<i>Fkbp6</i>	<i>Mel1</i>	<i>Psmc3ip</i>				
<i>Bcl6</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Fus</i>	<i>Mlh1</i>	<i>Rad51c</i>				
<i>Bcl2l2</i>	<i>Cpeb1</i>	<i>Gal3st1</i>	<i>Mlh3</i>	<i>Rara</i>				
<i>Bcl2l1</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Gnpat</i>	<i>Morc1</i>	<i>Rarb</i>				
<i>Bmp8a</i>	<i>Csda</i>	<i>H2afx</i>	<i>Msh4</i>	<i>Rec8</i>				
<i>Brca2</i>	<i>Dazap1</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Msh5</i>	<i>Slc25a4</i>				
<i>Btrc</i>	<i>Dmc1</i>	<i>Hsf1</i>	<i>Mybl1</i>	<i>Sgol2</i>				
<i>Bsg</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Hsf2</i>	<i>Ovol1</i>	<i>Siah1a</i>				
<i>Bub1b</i>	<i>Egr4</i>	<i>Hspa2</i>	<i>Pafah1b2</i>	<i>Slc25a4</i>				
				<i>Smc1b</i>	<i>Spo11</i>	<i>Sycp3</i>	<i>Tex14</i>	<i>Ubb</i>
				<i>Sohlh1</i>	<i>Sycp1</i>	<i>Tert</i>	<i>Tex15</i>	<i>Ube2b</i>
				<i>Stx2</i>	<i>Sycp2</i>	<i>Tex11</i>	<i>Trip13</i>	<i>Ubr2</i>
<i>Adams2</i>	<i>Ddx25</i>	<i>Pank2</i>	<i>Ppp1cc</i>	<i>Tdrd1</i>	Spermatids (differentiation)	Cell remodeling Cytoplasmic extrusion Chromatin packaging Nuclear condensation Spermiation		
<i>Bcl2l2</i>	<i>Fndc3a</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Pygo2</i>	<i>Tbpl1</i>				
<i>Cadm1</i>	<i>H1fnt</i>	<i>Pafah1b1</i>	<i>Rpb4</i>	<i>Theg</i>				
<i>Camk4</i>	<i>Hlp1</i>	<i>Parp2</i>	<i>Rnf17</i>	<i>Tjp</i>				
<i>Cib1</i>	<i>Ihpk1</i>	<i>Plwil1</i>	<i>Six5</i>	<i>Tnp1</i>				
<i>Crem</i>	<i>Krt9</i>	<i>Prm1</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Tnp2</i>				
<i>Csnk2a</i>	<i>Lmk2</i>	<i>Prm2</i>	<i>Slc4a2</i>	<i>Ube2b</i>				
<i>Cugbp1</i>	<i>Mtap7</i>	<i>Prnd</i>	<i>Styx</i>	<i>Ybx2</i>				
<i>Ace</i>	<i>Tekt2</i>	<i>Slc12a2</i>	<i>Prnd</i>	<i>Smpd1</i>	Spermatozoa (maturation, motility and fertilization)	Maturation in genital tract Capacitation Fertilization Nuclear decondensation Hyperactivated motility Sperm, zona and egg penetration		
<i>Acr</i>	<i>Tekt3</i>	<i>Spag16</i>	<i>Rhox5</i>	<i>Spem1</i>				
<i>Adad1</i>	<i>Tekt4</i>	<i>Spag9</i>	<i>Spg6</i>	<i>Tssk6</i>				
<i>Adam2</i>	<i>Tnp1</i>	<i>Tsn</i>	<i>Taf7l</i>	<i>Zbbp</i>				
<i>Adam3</i>	<i>Tnp2</i>	<i>Vlpr2</i>		<i>Zbbp2</i>				
<i>Apob</i>	<i>Pcsk4</i>		<b>Morph.</b>					
<i>Bub1</i>	<i>Vdac3</i>	<b>OT</b>	<i>Aff4</i>	<b>Mot.</b>				
<i>Cign</i>		<i>Fhl5</i>	<i>Agtpbp1</i>	<i>Apob</i>				
<i>Csnk2a2</i>	<b>Count</b>	<i>Gmcl1</i>	<i>Bbs2</i>	<i>Adcy3</i>				
<i>Dnahc1</i>	<i>Adams2</i>	<i>Nphp1</i>	<i>Bbs4</i>	<i>Adcy10</i>				
<i>Egr4</i>	<i>Ar14</i>	<i>Prkar1a</i>	<i>Cd59b</i>	<i>Akap4</i>				
<i>Inpp5b</i>	<i>Ahr</i>		<i>Cd81</i>	<i>Agtpbp1</i>				
<i>Jund</i>	<i>Apob</i>	<b>OAT</b>	<i>Csnk2a2</i>	<i>Atp2b4</i>				
<i>Klh10</i>	<i>Cenpb</i>	<i>Apob</i>	<i>Gba2</i>	<i>Bbs1</i>				
<i>Pebp1</i>	<i>Gamt</i>	<i>Brd1</i>	<i>Gopc</i>	<i>Bbs4</i>				
<i>Prm1</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Cadm1</i>	<i>Gml01</i>	<i>CatSper1</i>				
<i>Prm2</i>	<i>Hspa4l</i>	<i>Cnot7</i>	<i>Hrb</i>	<i>CatSper2</i>				
<i>Rbmx12</i>	<i>Pacrg</i>	<i>Cstf2t</i>	<i>Hook1</i>	<i>CatSper3</i>				
<i>Rxrb</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Gmcl1</i>	<i>Il2rn</i>	<i>CatSper4</i>				
<i>Ros1</i>	<i>Rxfp1</i>	<i>Jam3</i>	<i>Sepp1</i>	<i>Cd59b</i>				
<i>Sprn</i>	<i>Sh2b1</i>	<i>Polg</i>	<i>Sept4</i>	<i>Cga</i>				
				<i>Filr</i>	<i>Pold4</i>	<i>Tekt3</i>	<i>B4galnt1</i>	<i>Plwil1</i>
				<i>Gapdhs</i>	<i>Prkaca</i>	<i>Tekt4</i>	<i>Cadm1</i>	<i>Plcb1</i>
				<i>Gm101</i>	<i>Prkar1a</i>	<i>Tekt18</i>	<i>Camk4</i>	<i>Plcd4</i>
				<i>Inpp5b</i>	<i>Ros1</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Cib1</i>	<i>Prnd</i>
				<i>Ldhc</i>	<i>Sirt1</i>	<i>Theg</i>	<i>Cplx1</i>	<i>Pvrl2</i>
				<i>Lrp8</i>	<i>Slc9a10</i>	<i>Vdac3</i>	<i>Crem</i>	<i>Rasip1</i>
				<i>Mthfr</i>	<i>Smcp</i>		<i>Crisp</i>	<i>Rbmx12</i>
				<i>Nsun7</i>	<i>Spag6</i>	<b>Fer.</b>	<i>Fndc3a</i>	<i>Spam1</i>
				<i>Pcsk4</i>	<i>Sult1e1</i>	<i>Acr</i>	<i>HexbB</i>	<i>Tyst2</i>
				<i>Pla2g4c</i>	<i>Taldo1</i>	<i>Ace</i>	<i>Mfge8</i>	<i>Wipf3</i>
				<i>Pgs1</i>	<i>Tcf21</i>	<i>Adam2</i>	<i>Mmel1</i>	<i>Zbbp</i>
				<i>Pitp</i>	<i>Tekt2</i>	<i>Adam3</i>	<i>Pgap1</i>	
<i>Acvr2a</i>	<i>Cpe</i>	<i>Fanc1</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Lhb</i>	Other fertility defects			
<i>Adora1</i>	<i>Crtc1</i>	<i>Fgf9</i>	<i>HexbB</i>	<i>Lhcgr</i>				
<i>Aire</i>	<i>Crybb2</i>	<i>Fkbp4</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Limk2</i>				
<i>Amh</i>	<i>Csf1</i>	<i>Fos</i>	<i>Hoxa11</i>	<i>Lipe</i>				
<i>Amhr2</i>	<i>Csf2</i>	<i>Foxa3</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Lrp8</i>				
<i>Ar</i>	<i>Cux1</i>	<i>Fmr1</i>	<i>Immp2l</i>	<i>Mark2</i>				
<i>Atf4</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Fshb</i>	<i>Inha</i>	<i>Mc4r</i>				
<i>Bcl2l1</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Fshr</i>	<i>Insl3</i>	<i>Mtmr2</i>				
<i>Blimp1</i>	<i>Dhcr24</i>	<i>Gdf7</i>	<i>Igf1</i>	<i>Nanos2</i>				
<i>Bmp4</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gdi1</i>	<i>Insr</i>	<i>Nanos3</i>				
<i>Bmp8a</i>	<i>Ddx4</i>	<i>Ggt1</i>	<i>Kiss1r</i>	<i>Ncoa1</i>				
<i>Bmp8b</i>	<i>Dmrt1</i>	<i>Ghr</i>	<i>Kiss</i>	<i>Ncoa6</i>				
<i>Ccnd2</i>	<i>Egr1</i>	<i>Gja1</i>	<i>Kit</i>	<i>Nhlh2</i>				
<i>Cdkn2d</i>	<i>Emx2</i>	<i>Glp1</i>	<i>Kitll</i>	<i>Nhlh2</i>				
<i>Cdkn1b</i>	<i>Esr2</i>	<i>Gnrh</i>	<i>Lep</i>	<i>Nmp4</i>				
<i>Cdkn1c</i>	<i>Fanca</i>	<i>Gnrh5</i>	<i>Lepr</i>	<i>Nos1</i>				
<i>Cenpb</i>	<i>Fancc</i>	<i>Gnrhr1</i>	<i>Lfng</i>	<i>Npc1</i>				
<i>Cga</i>	<i>Fancg</i>	<i>Gpr64</i>	<i>Lgr4</i>	<i>Nr0b1</i>				
				<i>Nr2c2</i>	<i>Piga</i>	<i>Rxfp2</i>	<i>Sh2b1</i>	<i>Ube3a</i>
				<i>Nr5a1</i>	<i>Pou1f1</i>	<i>Sbf1</i>	<i>Sp4</i>	<i>Utp14b</i>
				<i>Ncoa1</i>	<i>Prop1</i>	<i>Serpine2</i>	<i>Star</i>	<i>Vdr</i>
				<i>Otx1</i>	<i>P2rx1</i>	<i>Smad1</i>	<i>Stat3</i>	<i>Vh1h</i>
				<i>Oxt</i>	<i>Pcyt1b</i>	<i>Smad5</i>	<i>Strpb</i>	<i>Wnt7a</i>
				<i>Oxr</i>	<i>Rad23b</i>	<i>Spr1</i>	<i>Taf4b</i>	<i>Wt1</i>
				<i>Pax8</i>	<i>Rara</i>	<i>Sox3</i>	<i>Sox3</i>	<i>Zfx</i>
				<i>Ppm1d</i>	<i>Rxrb</i>	<i>Stat3</i>	<i>Tia1</i>	<i>Zbtb16</i>
				<i>Prdm1</i>	<i>Rec8</i>	<i>Sc19a2</i>	<i>Top3b</i>	

**Příloha 4:** Souhrn výsledků uvedených GWAS. Převzato a upraveno podle Aston a Carrell, 2009, Aston *et al.* 2010, Dalgaard *et al.* 2012 a Kosova *et al.* 2012.

Aston a Carrell, 2009		Aston <i>et al.</i> 2010		Dalgaard <i>et al.</i> 2012		Kosova <i>et al.</i> 2012	
SNP	související gen	SNP	související gen	SNP	související gen	SNP	související gen
rs1399645	<i>NXPH2</i>	rs763110	<i>FASLG</i>	rs12082710	<i>TGFBR3</i>	rs12870438	<i>EPST11</i>
rs2063802	<i>NXPH2</i>	rs34605051	<i>JMJD1A</i>	rs388286	<i>BMP7</i>	rs7174015	<i>USP8</i>
rs4954657	<i>NXPH2</i>	rs5911500	<i>LOC203413</i>			rs10129954	<i>DPF3</i>
rs11707608	<i>CNTN3</i>	rs10246939	<i>TAS2R8</i>			rs724078	<i>MASIL/UBD</i>
rs2976084	<i>CNTN3</i>	rs3088232	<i>BRDT</i>			rs10966811	<i>TUSC1</i>
rs3105782	<i>MASP1</i>	rs323344	<i>TEX15</i>			rs7867029	<i>PSAT1</i>
rs4484160	<i>PROK2</i>	rs323345	<i>TEX15</i>			rs680730	<i>DSCAML1</i>
rs9814870	<i>ARL6</i>	rs5764698	<i>SMC1B</i>			rs11236909	<i>TSKU/LRRC32</i>
rs9825719	<i>NSUN3</i>	rs1801131	<i>MTHFR</i>			rs10488786	<i>ARHGAP42</i>
rs2290870	<i>ATP8A1</i>	rs631357	<i>KIF17</i>				
rs4343755	<i>GNPDA2</i>	rs35397110	<i>USP26</i>				
rs4695097	<i>GNPDA2</i>	rs2030259	<i>JMJD1A</i>				
rs4541736	<i>LRFN2</i>	rs11204546	<i>OR2W2</i>				
rs1545125	<i>COBL</i>	rs2059807	<i>INSR</i>				
rs215702	<i>LSM5</i>						
rs6476866	<i>SLC1A1</i>						
rs10841496	<i>PDE3A</i>						
rs10848911	<i>EFCAB4B</i>						
rs12920268	<i>MAF</i>						
rs2032278	<i>GALR1</i>						
rs6068020	<i>SALL4</i>						