

Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu

mgr Agnieszka Malcher

**„Identyfikacja genów krytycznych dla procesu
spermatogenezy; próba określenia molekularnych markerów
azoospermii”**

Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Macieja Kurpisza
oraz dr Natalii Rozwadowskiej
w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek
Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka PAN
w Poznaniu

Niniejsza praca doktorska była finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki Nr 2012/05/N/NZ5/00893 oraz z grantu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju Nr NR13 0066 06.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej, autorka była stypendystką w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

STRESZCZENIE

Niepłodność dotyczy ok. 15% par w wieku reprodukcyjnym, a czynnik męski stanowi połowę tych przypadków. Niepłodność męska może być skutkiem wielu nieprawidłowości zachodzących w procesie spermatogenezy. Ponieważ proces ten regulowany jest przez czynniki hormonalne, genetyczne i środowiskowe, zaburzenie jednego z tych regulatorów może prowadzić do braku plemników w ejakulacie, czyli azoospermii. Przyczyny azoospermii mogą być złożone, a obecna diagnostyka, oparta głównie na analizie histopatologicznej, nie jest wystarczająca. Zwłaszcza, przyczyny genetyczne są mało poznane, dlatego głównym celem przedstawionej pracy była identyfikacja nowych biomarkerów diagnostyczno-prognostycznych dla mężczyzn z azoospermią nieobstrukcyjną poprzez identyfikację genów potencjalnie istotnych dla płodności męskiej, genów determinujących stopień upośledzenia spermatogenezy, a także genów określającym szanse na pomyślne leczenie azoospermii za pomocą terapii hCG/rFSH.

Badania obejmowały: (1) porównanie klasyfikacji hierarchicznej profilu ekspresji genów pacjentów z azoospermią z ich obrazem histopatologicznym; (2) porównanie profilu ekspresji genów gonady męskiej z prawidłową i uszkodzoną spermatogenezą; (3) porównanie profilu ekspresji genów pomiędzy grupą pacjentów z upośledzeniem spermatogenezy na wczesnym i późnym etapie różnicowania komórek gametogenicznych; (4) porównanie profilu ekspresji genów pacjentów z azoospermią, którzy odpowiedzieli pozytywnie na terapię hormonalną w stosunku do tych bez poprawy. Analizę profili ekspresji genów wykonano za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych GeneChip Human Gene ST 1,0 firmy Affymetrix. Ponad to została przeprowadzona walidacja wyników na poziomie mRNA za pomocą technik PCR w czasie rzeczywistym oraz na niezależnym zbiorze danych pochodzących z bazy danych ArrayExpress, a także na poziomie białka przy zastosowaniu technik immunoblotowania typu Western oraz immunohistochemii. Dodatkowo wykonano sekwencjonowanie wybranych fragmentów DNA w celu określenia wariantów allelicznych.

Analiza porównawcza profilu ekspresji genów pomiędzy grupą mężczyzn niepłodnych a grupą kontrolną pozwoliła na wyodrębnienie 4946 genów różniących się ekspresją ($p < 0,05$). Wyselekcjonowano 7 genów, tj.: *AKAP4*, *UBQLN3*, *SPACA4*, *SPATA3*, *GGN*, *CAPN11*, *FAM71F1*, które wykazywały minimum 4-krotnie obniżony poziom ekspresji ($p \leq 0,005$) u pacjentów z azoospermią w stosunku do kontroli. Geny te zostały pomyślnie zwalidowane na niezależnym zbiorze danych i/lub w analizie PCR w czasie rzeczywistym. Również analiza produktów białkowych genów *UBQLN3* i *FAM71F1* generalnie potwierdziła wyniki

uzyskane na poziomie mRNA. Ponadto globalna analiza profilu ekspresji genów pozwoliła na wyodrębnienie dwóch podgrup mężczyzn wykazujących blok spermatogenezy na późnym i/lub wczesnym etapie różnicowania. Analiza porównawcza pomiędzy tymi podgrupami pozwoliła na zidentyfikowanie kolejnych 7 genów o minimum 5-krotnie podwyższonej ekspresji ($p < 0,0001$) u pacjentów z blokiem spermatogenezy na późnym etapie, tj. *WBSCR28*, *SPATS1*, *TMEM225*, *FSCN3*, *GTSFIL*, *ADCY10*, *GSG1*. Wszystkie te geny zostały pomyślnie zwalidowane za pomocą PCR w czasie rzeczywistym oraz na niezależnej grupie danych pochodzących z bazy danych ArrayExpress. Analiza immunoblotowania typu Western, immunohistochemia oraz dane z bazy danych *The Human Protein Atlas* wykazała, że produkty białkowe wyselekcjonowanych genów obserwowano głównie na późnym etapie spermatogenezy, co potwierdza wyniki otrzymane na poziomie mRNA.

Z kolei analiza obejmująca mężczyzn poddanych terapii hormonalnej pozwoliła na wyodrębnienie genu *HLA-DQB1*, którego poziom ekspresji był znacznie podwyższony ($p < 0,05$) u mężczyzn z azoospermią, u których nie wykazano poprawy na zastosowane leczenie. Dodatkowo analiza sekwencji tego genu wykazała, że mężczyźni z NOA, którzy nie odpowiedzieli na leczenie byli homozygotami względem *HLA-DQB1*, tj. *060301, *020201, *060201, natomiast ci, którzy odpowiedzieli pozytywnie na terapię hormonalną byli heterozygotami i okazywali następujące warianty: *040201/050201, *040201/030101, *030201/020101.

Ponad to porównano profil ekspresji genów gonad przed i po leczeniu od pacjenta, który pozytywnie odpowiedział na terapię hormonalną. Odnotowano, że poziom ekspresji genów odgrywających istotną rolę podczas spermiogenezy, m.in.: *AKAP1*, *PRM2*, *CLDN1*, *TNPI1*, *ODF1*, *PRM1* był podwyższony (ponad 2-krotnie) w gonadzie po leczeniu.

Podsumowując, zidentyfikowane w pracy biomarkery mogą stanowić podstawę do stworzenia molekularnej platformy diagnostyczno-prognostycznej dla skutecznego określenia przyczyn niepłodności, a także określania stadium upośledzenia spermatogenezy oraz szansy na pomyślne leczenie hormonalne u mężczyzn z azoospermią.