

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY

Katedra genetiky



Magisterská diplomová práce

Screening bodových mutací v genech pro LIF a
IL-11 v populaci neplodných žen.

Vypracoval: Bc. Petr Martínek

Vedoucí práce: MUDr. Milena Králíčková, PhD.

Rok vypracování: 2007

Martínek P., 2007: Screening bodových mutací v genech pro LIF a IL-11 v populaci neplodných žen. [Screening of mutations in LIF and IL-11 genes. Mgr. thesis, in Czech.] 27 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The study analyse presence and distribution of mutation in the LIF and IL-11 genes. The alterations were studied in peripheral blood samples by temperature gradient gel electrophoresis and sequencing.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracoval sám, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce v nezkrácené podobě Biologickou fakultou JU elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Poděkování

Chtěl bych velice poděkovat své školitelce doc MUDr. Mileně Králíčkové, PhD. za možnost podílet se na řešení tohoto projektu. Děkuji také RNDr. Tomáši Vaněčkovi, Ph.D. a RNDr. Radku Šimovi za pomoc při teoretickém i praktickém zvládnutí všech použitých metod.

V Českých Budějovicích, 3. ledna 2008

.....

Obsah

1.	Úvod.....	4
1.1	Implantace embrya.....	4
1.2	Leukemický inhibiční faktor (LIF).....	4
1.3	Gen LIF.....	6
1.4	Interleukin 11 (IL-11).....	7
1.5	Gen IL-11.....	8
2.	Cíl práce.....	8
3.	Materiál a metody.....	9
3.1	Materiál.....	9
3.1.1	Soubor pacientek.....	9
3.2	Metody.....	9
3.2.1	Izolace DNA.....	9
3.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	10
3.2.3	Tvorba heteroduplexů.....	11
3.2.4	Elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE).....	11
3.2.5	Konformačně senzitivní kapilární elektroforéza (CSCE).....	12
3.2.6	Sekvenování.....	13
3.2.7	Přečištění PCR produktů a sekvenčních reakcí.....	13
3.2.8	Počítačové zpracování výsledků v Programu SeqScape® v2.1.1.....	14
4.	Výsledky.....	17
4.1	TGGE.....	17
4.2	CSCE.....	19
4.3	Sekvenování.....	19
4.4	Gen LIF.....	20
4.5	Gen IL-11.....	21
5.	Diskuse.....	21
5.1	Metody používané ke screeningu mutací.....	21
5.2	Shrnutí výsledků.....	22
5.3	Mutace nebo polymorfismus.....	24
6.	Závěr.....	25
7.	Literatura.....	26

1. Úvod

1.1 Implantace embrya

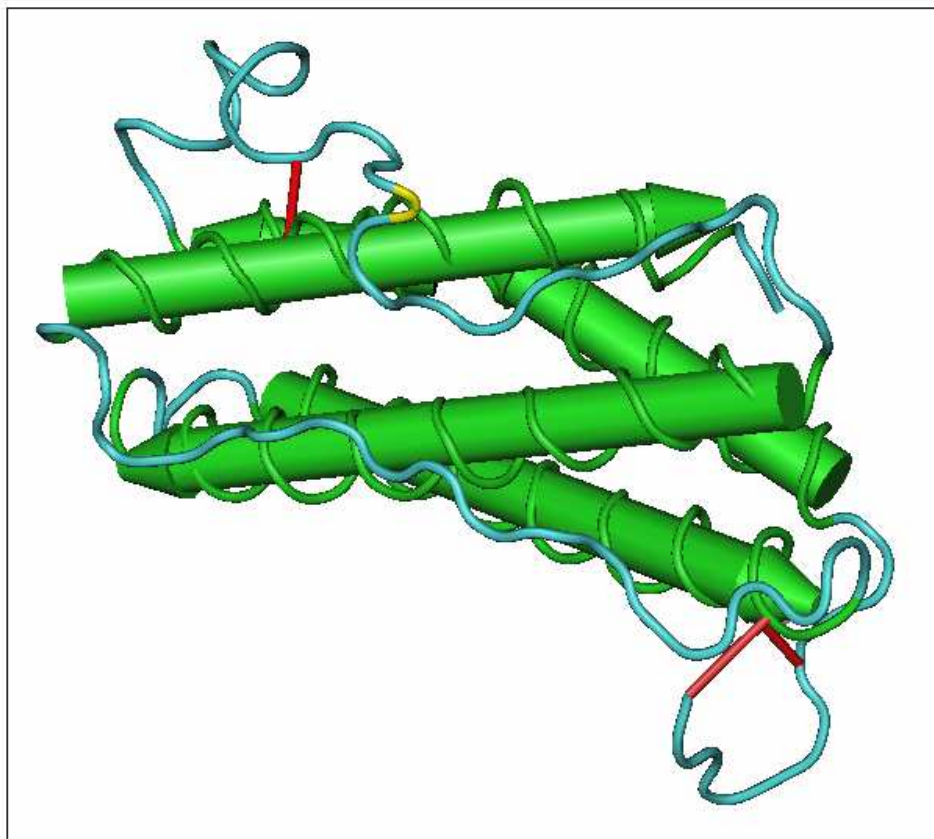
Implantace zárodku do endometria (děložní tkáň) probíhá v několika fázích a je podmíněna hormonálně řízenou morfoloickou a funkční přestavbou endometria, přičemž spolupůsobí řada interakcí mezi adhezivními molekulami mateřské a embryonální tkáň.

V současné době jsou známy desítky růstových faktorů, transformačních růstových faktorů, adhezivních molekul a cytokinů, které zajišťují tuto komunikaci. Jedním z klíčových regulačních faktorů, bez jehož účasti se implantace neuskuteční, je leukemický inhibiční faktor (Lass et al. 2001). Další faktor silně ovlivňující přestavbu stromálních buněk endometria, proces nazývaný decidualizace, je interleukin 11 (Bilinski et al. 1998).

Selhání implantace je častou příčinou idiopatické, tj. standardními metodami nevysvětlitelné infertility, která je diagnostikována u 10-15% neplodných párů. V klinické praxi se rutinně používají optimalizované techniky asistované reprodukce, kterými lze zajistit jak dostatečné množství životaschopných embryí, tak adekvátní hormonální přípravu děložní sliznice pro implantaci, avšak procento započatých těhotenství zůstává stále velmi nízké. Pouze 11-17 % embryí vypěstovaných in vitro a aplikovaných pacientkám úspěšně implantuje. (Van der Elst et al 1996)

1.2 Leukemický inhibiční faktor (LIF)

Leukemický inhibiční faktor je pleotropický cytokin z rodiny interleukinu 6. (Drews 1995) Mezi různé typy buněk na které působí, patří neurony, megakaryocyty, makrofágy, adipocyty a další linie buněk. LIF je vysoce glykosylovaný protein (38-67 kDa) složený z 202 aminokyselin obsahující tři disulfidické můstky, který se váže na nízkoafinní receptorový řetězec LIF-R. (Cullinan et al. 1996). Po připojení řetězce gp130 se vytváří vysokoafinní receptorový komplex a dochází k aktivaci receptoru. Na **obr. 1** je znázorněna prostorová struktura proteinu LIF, červěně jsou vyznačeny disulfidické můstky a žlutou barvou je označeno místo nalezené mutace V64M .



Obr. 1

Blastocysty a endometrium exprimují mRNA pro LIF-R a gp130, a to zvlášt' aktivně v době předpokládané implantace (Charnock-Jones et al. 1994).

Mechanismy působení LIF nejsou zatím zcela zřetelně objasněny. Je známo, že LIF zvyšuje expresi podskupiny progesteronem regulovaných genů (IGF-binding protein 3, amfiregulin a immune response gene-1) na luminálním jednovrstevném cylindrickém epitelu (Sherwin et al. 2004). LIF také napomáhá při uskutečňování invaze trofoblastu tím, že ovlivňuje expresi proteináz (Harvey et al. 1995). Též bylo prokázáno, že LIF reguluje populace uterinních leukocytů, zvláště NK buněk a makrofágů (Schofield et al. 2005).

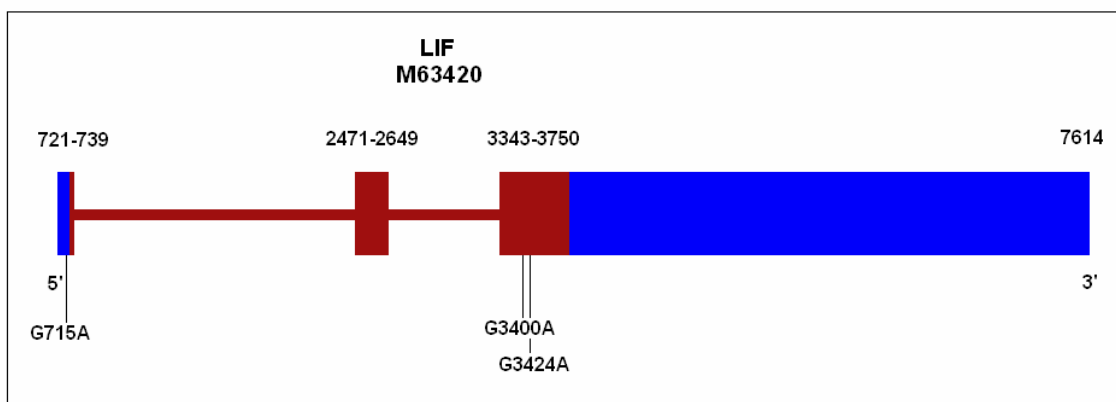
Průkaz nezbytnosti úlohy LIF při implantaci byl podán na experimentálním modelu. Myši, kterým byla knockoutována část genu kódujícího LIF (LIF^{-/-}), nevykazují žádné fenotypové změny, po oplození se u nich vytvářejí blastocysty, ale nedojde k jejich implantaci ani dalšímu vývoji. Nenidují ani implantovaná zdravá embrya. Naopak implantace takto postižených embryí do zdravých samic vedla k úspěšné implantaci. Stejně tak k úspěšné implantaci v postižených samicích vedlo podávání exogenního LIFu (Stewart et al. 1992).

V endometriu je LIF sekretován v souhře s menstruačním cyklem, přičemž nejvyšší hladiny dosahuje během doby implantace. Jeho přítomnost u člověka je zjišťována z uterinních

výplachů a bylo prokázáno, že jeho hladina je výrazně dysregulována (snížena nebo zvýšena) u žen s idiopatickou infertilitou (Laure et al. 1997). Tyto výsledky vedou k hypotézám, že abnormální hladiny LIF mohou mít příčinnou souvislost s idiopatickou infertilitou. K objasnění těchto vztahů by mělo přispět studium genetického pozadí produkce LIF u těchto pacientek.

1.3 Gen LIF

Gen kódující primární strukturu LIF se nachází v oblasti 22q12 na 22. chromozómu. Jeho nukleotidová sekvence je v kódujících částech i v určitých segmentech nekódujících oblastí vysoce konzervativní. Promotorová oblast genu obsahuje čtyři konzervované TATA boxy a dvě oblasti startující transkripci. Kódující oblast je rozčleněna do tří exonů. Giess a kol. (1999) identifikoval dvě mutace v exonech a jednu intronovou, všechny v heterozygotním stavu. Rozložení exonů a známých mutací je znázorněno na **obr 2**. Referenční sekvence byla získána z webových stránek <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> pod číslem M63420. Soudí se, že tyto mutace, ačkoliv pouze v heterozygotním stavu, mohou vést ke snížení dostupnosti či aktivity LIF proteinu a tím pádem mohou být součástí genetické predispozice k snížené plodnosti. Dvě ze tří dosud popsanych bodových mutací genu pro LIF, které leží v exonu 3, způsobují záměnu vždy jedné aminokyseliny v oblasti AB smyčky proteinové části molekuly, jejíž funkčnost podmiňuje interakci s receptorem LIF. Třetí mutace, tranzice C za A v pozici 715, byla nalezena v 5' regulační oblasti, 6 párů bazí před start-kodónem exonu 1 a předpokládá se, že vede k poruchám transkripce, které se projeví poklesem produkce LIF glykoproteinu. Všechny tyto tři mutace byly popsány u infertilních žen a v kontrolní populaci nebyly zatím nikdy detekovány. Dopusud se vyhledáváním mutací v genu pro LIF u neplodných žen věnovaly tři publikace (Giess et al. 1999, Králíčková 2006, Steck 2004) všechny s identickým závěrem, že tyto mutace, ačkoliv pouze v heterozygotním stavu, mohou vést ke snížení dostupnosti či aktivity LIF proteinu a tím pádem mohou být součástí genetické predispozice k snížené plodnosti.



Obr. 2

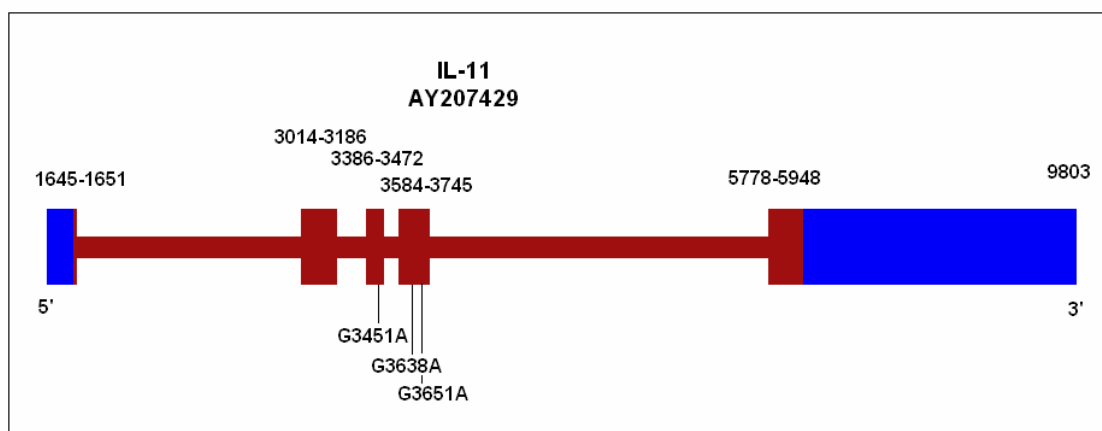
1.3 Interleukin 11 (IL-11)

Interleukin 11 je dalším členem rodiny interleukinu 6 spolu s LIF, ciliárním neurotrofickým faktorem (CNTF), kardiostrofinem (CT-1) a onkostatinem-M (OSM) a společně s nimi sdílí afinitu k receptorovému řetězci gp130. Hotový protein je monomer složený ze 179 aminokyselin o molekulové váze 150 kDa. Sám se váže na vysokoafinní receptor IL-11R α a po spojení s gp130 dochází k homodimerizaci IL-11 a přenosu signálu. Je známo mnoho biologických vlivů IL-11 na různé linie buněk, je důležitým regulátorem hematopoézy, indukuje proliferaci B buněk, stimuluje vývoj osteoblastů, buněk gastrointestinálního a nervového systému (Du et al. 1994). Pozdější studie ukázaly ochrannou úlohu IL-11 na různých modelech, při infekci, zánětu a poranění (Keith 2000). V roce 1997 byl schválen rekombinantní IL-11 (pod názvem Oprelvekin) jako lék pro prevenci závažné trombocytopenie u pacientů po chemoterapii. Studie na myším modelu ukazují, že defekty v genu pro IL-11R α nevedly k žádným abnormalitám v hemopoetickém procesu, ale samice s tímto defektem byly sterilní (Robb et al. 1998). Jako příčina této neplodnosti byla určena nedostatečná decidualizace endometria a jeho postupná degradace. U člověka byla pomocí imunohistochemického barvení prokázána produkce IL-11 v endometriu během celého menstruačního cyklu. V epiteliálních buňkách byla pozorována silnější intenzita produkce IL-11 než u stromálních buněk endometria. Na kultivovaných tkáních in vitro bylo zjištěno zvýšení produkce IL-11 po stimulaci IL-1 α , TNF α , a TNF β (Cork et al. 2000). V jiné studii bylo prokázáno, že produkce IL-11 epiteliálními buňkami endometria je silně snižena u žen s opakovanými potraty v anamnéze ve srovnání se zdravou skupinou. Produkce receptoru IL-

IL-11 byla stejná u obou skupin (Linjawi et al. 2004). Obě práce se shodují na tom, že IL-11 může hrát významnou roli ve funkci lidského endometria při implantaci zárodku.

1.4 Gen IL-11

Gen IL-11 se nachází na chromozomu 19 v oblasti q13.3-q13.4, kóduje pět exonů a čtyři introny. Dosud nebyla v literatuře popsána žádná mutace genu. Je popsáno celkem 27 variant genu, z toho tři se nacházejí v exonech. Jako referenční sekvence byl použit záznam genové banky číslo AY207429 z webových stránek <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. odpovídající referenční sekvenci číslo NM_000641, ze které byly získány varianty genu. Na **Obr 3.** je znázorněn ideogram genu s vyznačením variant v exonech.



Obr. 3

2. Cíl práce

Jak již bylo naznačeno v úvodu, existuje důvod domnívat se, že snížená hladina LIF a IL-11 může být příčinou ženské neplodnosti. Mým úkolem bylo identifikovat a charakterizovat mutace v genech LIF a IL-11 ve skupině neplodných žen, porovnat tyto výsledky s kontrolní skupinou zdravých žen a pokusit se tyto genetické změny fenotypicky charakterizovat. Screening exonů a exon-intronových spojů byl proveden pomocí TGGE a poté byly pozitivní vzorky osekvenovány k přesnému určení druhu a polohy mutace.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Soubor pacientek

Vzorky periferní krve (v roztoku EDTA nebo heparinu) byly získány z několika gynekologicko-porodnických klinik a IVF center (Plzeň, Hradec Králové). Celkový soubor žen čítal 399 pacientek, které byly rozděleny do skupin podle příčin sterility. Kritéria tvořící skupiny byla tato: ovariální faktor (n=55), tubární faktor (n=46), endometrióza (n=34), andrologický faktor (n=115), idiopatická infertilita (n=105), kombinace faktorů (n=44) a kontrolní skupina zdravých žen (n=202). Jako idiopaticky infertilní byly označeny pouze pacientky u kterých byla provedena všechna standardní vyšetření indikovaná neplodností s negativním výsledkem.

Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a všechny zúčastněné pacientky podepsaly informovaný souhlas.

3.2 Metody

3.2.1 Izolace DNA

DNA byla izolována z leukocytů periferní krve pomocí DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) podle firemního předpisu. Vzorky byly skladovány při teplotě -20°C.

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci fragmentů genu LIF byly použity primery převzaté z literatury a některé primery vlastní. V **tabulce 1** jsou hvězdičkami (*) odlišeny převzaté primery (Giess et al.1999). Primery pro TGGE byly modifikovány programem Poland (Steger, 1994) přidáním GC bohatých sekvencí, tzv. GC „clampů“. Ty vytvářejí u PCR produktu termostabilní domény, které umožňují skríníng mutací pomocí TGGE. GC svorka je zapsána kurzívou. Pro

sekvenování byly použity stejné primery bez GC clampů a pro CSCE byly použity také stejné primery fluorescenčně značné na 5' konci.

Exon	Název	Sekvence 5' → 3'
E1	E1F-GC	<i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCC G CTATGATGCACCTCAAACAA</i>
	E1R	<i>GGGGCGGGTGTATTTA</i>
E2	E2F	<i>GCCACCCTTTCCTGCCTTTCTAC*</i>
	E2R-GC	<i>CGGGCGGGGGCGGGCGGGCCGGGCGCGGGGCGGGCGGG CG TCCCTGCCATCTCCTGTCAGTATC*</i>
E3.1	E3.1F-GC	<i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCC G ACAATTCCAGATGCTTACAGGG *</i>
	E3.1R-C	<i>GCGGG GCCAAGGTACACGACTATGC*</i>
E3.2	E3.2F	<i>CCCAACAACCTGGACAAGCTATG*</i>
	E3.2R-GC	<i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCC C CCGTAGGTCACGTCCACATG*</i>
E3.3	E3.3F-GC	<i>CCCGC CCTCCTTAGCAACGTGCTGT</i>
	E3.3R-GC	<i>CGGGCGGGGGCGGGCGGGCCGGGCGCGGGGCGGGCGGG CG ACATCTGGACCCAACTCCTG</i>

Tabulka 1

Primery pro amplifikaci genu IL-11 jsou znázorněny v **tabulce 2**.

Exon	Název	Sekvence 5' → 3'	velikost produktu (bp)	Teplota annealingu
E1	e1F	gcgtccacactcctcac	289	60°C
	e1R	ctgtctccgggtccctct		
E5	e5F	acctctctcctctcccaca	235	60°C
	e5R	aagatctggcctttggaagga		
E2-4	e2F	agcctgagctctctgcctta	798	60°C
	e4F	gtctggggtgtcaggtcttg		

Tabulka 2

Amplifikační reakce obsahovala 12,5 µl mastermixu HotStart Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Hilden, Německo), 10 pmol každého primeru (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, ČR) a 100 ng templátové DNA. Zbývající objem do 25 µl byl doplněn sterilní deionizovanou vodou. Reakce probíhala v termocykleru GeneAmp 9700 (PE/AB Foster City, CA, USA). Amplifikační program pro všechny exony se sestával z následujících kroků : úvodní denaturace 95°C/15 minut, dále 35 cyklů (denaturace 95°C/1 minuta, annealing podle příslušných hodnot v tabulce po dobu 1 minuty, extenze 72°C/1,5 minuty) a finální extenze 72°C/7 minut. Výsledek reakce byl zkontrolován pomocí gelové elektroforézy v 2% TAE agarózovém gelu (SERVA, Heidelberg, Německo). Vzorky byly buď přímo použity nebo skladovány při -20°C.

3.2.3 Tvorba heteroduplexů

Pro analýzu metodou TGGE a CSCE bylo třeba vytvořit směs heteroduplexů, které pak byly rozděleny elektrolyzou. Byla provedena denaturace v termocykleru GeneAmp 9700 (PE/AB Foster City, CA, USA) při 95°C po dobu 5 minut s následnou postupnou renaturací

(1°C/sekundu) na výslednou teplotu 55°C, která byla udržována po dobu 15 minut. Poté byly vzorky zchlazeny na 4°C.

3.2.4 Elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE)

Definování teplotní domény a skríníng mutací byl proveden heteroduplexovou analýzou na elektroforéze TGGE Maxi (Biometra, Goettingen, Německo). Byly vytvořeny heteroduplexy podle bodu 3.1.4. a poté bylo 8 µl PCR produktu smícháno s 0,8 µl vkladacího pufru (200 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0,1% bromfenolové modři, 20% glycerol, pH 8,0) a vzorky byly nanесeny na 8% denaturační polyakrylamidový gel (akrylamid : bis-akrylamid, 7M močovina, 1x MOPS, 2% glycerol) v MOPS pufru (20 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 8,0), byl nastaven takzvaný „prerun“ (20°C/15 minut/300V), tj. fáze, kdy se vzorky zapouštějí do gelu. Poté byly nastaveny podmínky pro kolmou TGGE, kde byly hledány exon-specifické teplotní domény. Získané hodnoty se pak použily pro definování paralelní TGGE pro jednotlivé vzorky (**tabulka 3**).

Vzorky byly barveny stříbrem, gel byl postupně promýván v následujících roztocích : 10% EtOH/5 minut, 1% HNO₃/3 minuty, deionizovaná H₂O/5 sekund, 0,012 M AgNO₃/20 minut, deionizovaná H₂O/5 sekund, chlazený 0,28 M Na₂CO₃ + 0,019% formaldehyd/ čas podle potřeby až do dobré viditelnosti bandů, chlazená 10% kyselina octová/5 minut, 2x H₂O/5 minut (Budowle et al. 1991).

Exon	Teplotní gradient
E1	55°C - 63°C
E2	53°C - 65°C
E3.1	58°C - 66°C
E3.2	60°C - 65°C
E3.3	58°C - 62°C

Tabulka 3

3.2.5 Konformačně senzitivní kapilární elektroforéza (CSCE)

Metodou CSCE lze zjistit jakoukoli změnu nukleotidové sekvence za předpokladu, že se primery nachází alespoň 50bp od okraje zkoumané oblasti. S tímto ohledem byly navrhovány primery, které bylo možné (neznačené) použít i pro sekvenování. Pro CSCE byly použity fluorescenčně značené primery, které jsou vypsány v **tabulce 2**. Exony 2, 3 a 4 byly díky své vzájemné blízkosti zahrnuty do jednoho fragmentu. Všechny primery použité při CSCE a sekvenování byly navrženy v programu Primer3 v.0.4.0, přístupném přes webové rozhraní na stránkách <http://frodo.wi.mit.edu>. Produkty pro CSCE byly zředěny destilovanou deionizovanou vodou podle výtěžku PCR do výsledné ho objemu 20 μ l a smíchány s 0,13 μ l velikostního standartu LIZ 500 (PE/AB Foster City, CA, USA).

Po vytvoření heteroduplexů následovala elektroforéza v CAP polymeru v genetickém analyzátoru ABI 3130 (PE/AB Foster City, CA, USA)

Positivním výsledkem byl posun velikosti píku nebo dvojpík v elektroferogramu . Výsledky byly odečítány v programu Gene Mapper® (PE/AB Foster City, CA, USA)

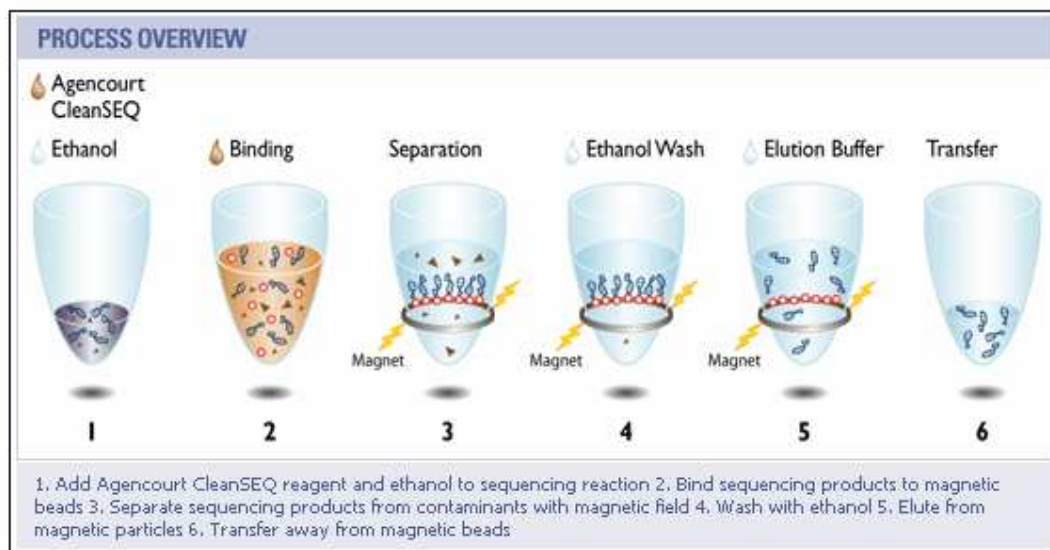
3.2.6. Sekvenování

Pro amplifikaci byly použity stejné sekvence primerů jako pro CSCE, zapsané v **tabulce2**, ale bez fluorescenčního značení. Po přečištění PCR produktů (viz bod **1.3.7.1**) následovala sekvenační reakce. Pro přípravu sekvenačních reakcí byl použit Big Dye Terminator Sequencing kit verze 1.1, pouze pro exon 2-4 byla použita verze 3.1 (PE/AB, Foster City, CA, USA). Na jednu sekvenační reakci bylo použito přibližně 100 ng templátové DNA, 3,2 pmol sekvenačního primeru, 2 μ l Big Dye Terminator Sequencing kit v1.1 (v3.1), 2 μ l 5x Sequencing buffer, vše bylo doplněno sterilní deionizovanou vodou do objemu 10 μ l. Reakce probíhala v termocykleru GeneAmp 9700 (PE/AB Foster City, CA, USA) v následujících krocích : denaturace 96°C/1 minuta, 25 cyklů (96°C/15 sekund, teplota annealingu viz **tabulka 2** /5 sekund, 60°C/4 minuty).

3.2.7 Přečištění PCR produktů a sekvenčních reakcí

Pro přečišťování PCR produktů i sekvenční reakce jsem přešel od tradičních kolonek (SigmaSpin Post-reaction Clean-Up, SIGMA, Heidelberg, Německo) na přečišťování pomocí magnetických kuliček (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA, USA). Metoda SPRI® (Solid Phase Reversible Immobilization) je založena na selektivní imobilizaci nukleových kyselin na magnetické mikročástice (Hawkins, et. al., Nucleic Acids Res.) Tyto kuličky (Sera-Mag™) jsou vytvořeny z polystyrenového jádra potaženého magnetickou vrstvou a na povrchu kryté carboxylátem modifikovanou vrstvou polymeru umožňující eluci pomocí vody. Postup je stručně znázorněn na **obr. 5**. Hlavním rozdílem je absence centrifugačních kroků, což umožňuje s výhodou využít 96ti jamkového formátu mikrokumavek a multikanálových pipet. To značně urychluje práci a umožňuje zpracovávat větší množství vzorků najednou.

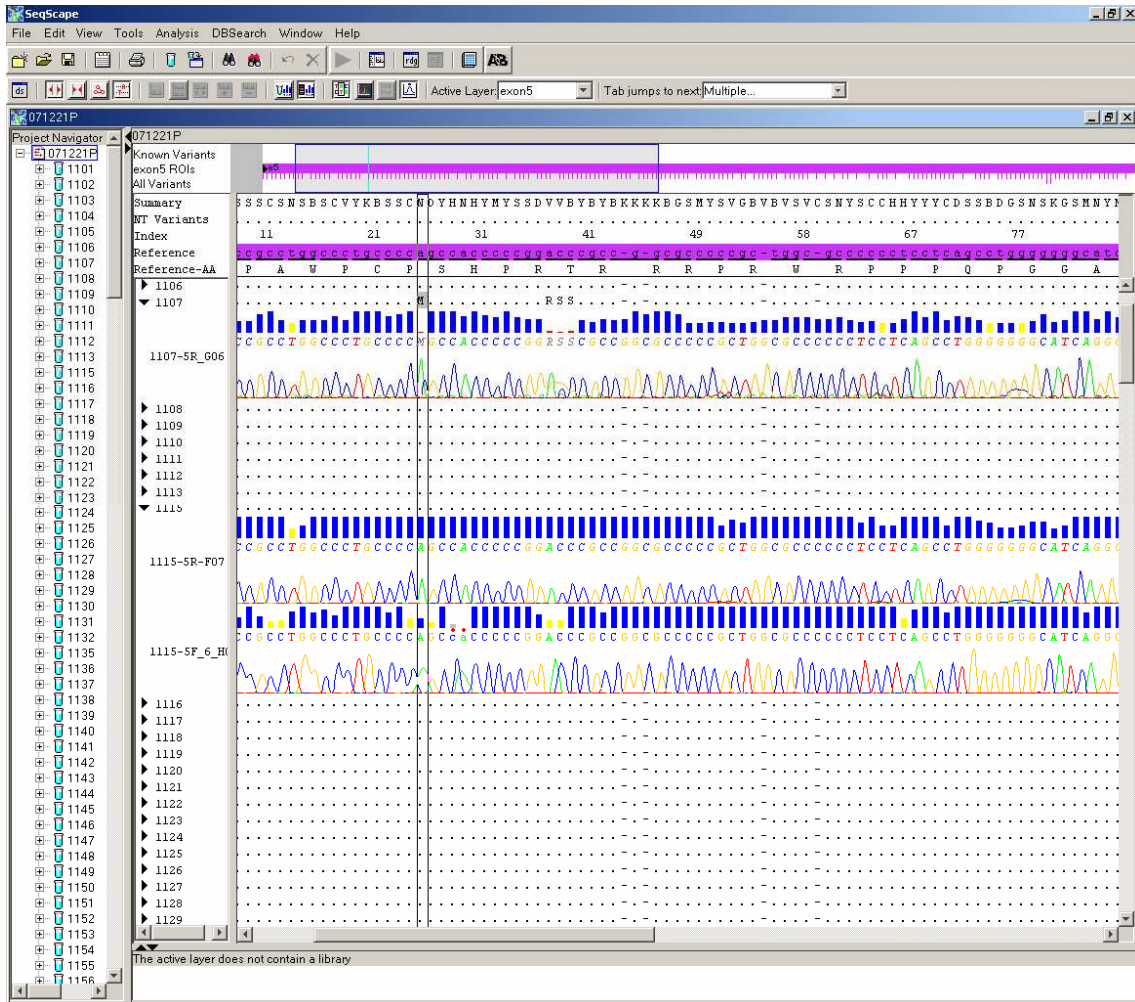
Pro přečištění PCR produktů po amplifikaci jsem používal kit Agencourt AmPure a pro přečištění sekvenční reakce jsem používal kit Agencourt CleanSeq (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA, USA) podle návodu výrobce.



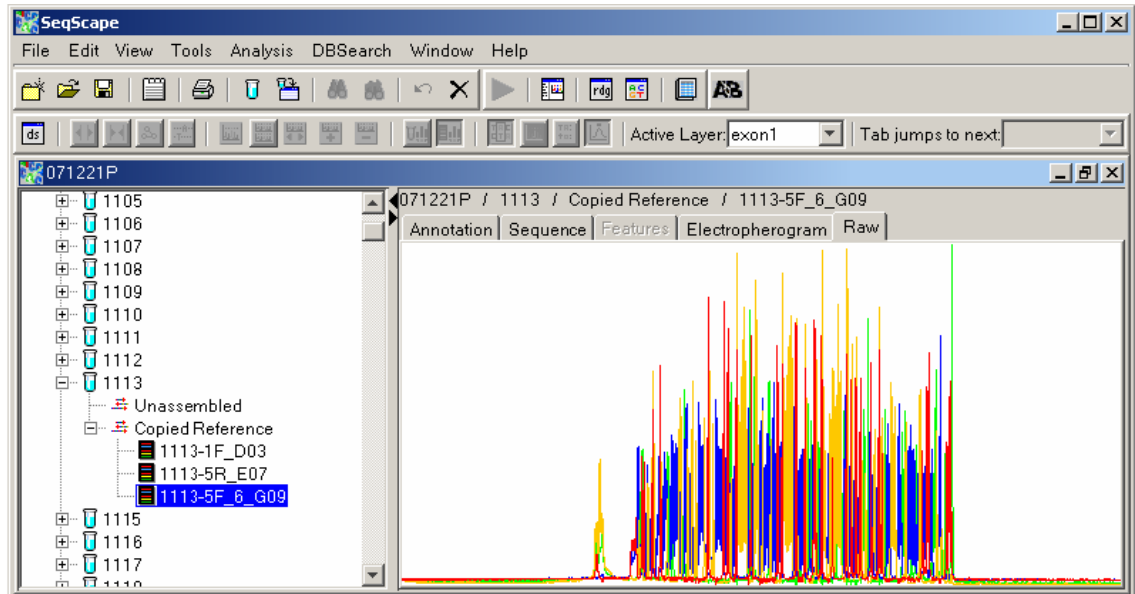
Obr. 5

3.2.8. Počítačové zpracování výsledků v Programu SeqScape® v2.1.1

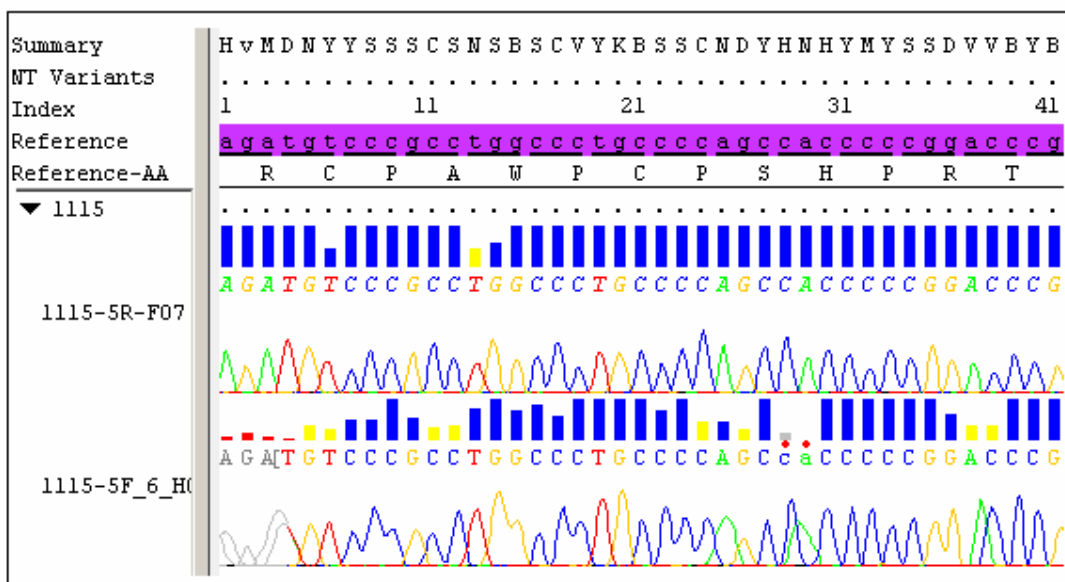
Seq Scape® je program od společnosti Applied Biosystems určený pro takzvanou resekvenaci. To znamená detekci mutací nebo SNP genotypování na základě známé referenční sekvence. Po vytvoření templátu projektu, což je několikastupňový proces zahrnující vložení referenční sekvence, vyznačení zkoumaných oblastí, nastavení parametrů analýzy a vlastností zobrazení výsledků, lze již přímo vkládat výsledky sekvenování ve formátu *.ab1. Není tedy třeba vzorky nijak předem analyzovat a nebo upravovat, program provede basecalling i zhodnocení kvality vzorků, na které jsme zvyklí u programů sekvenční analýzy. Další funkce programu SeqScape je takzvaný ConsensusCaller, který upravuje hodnoty kvality vzorku na základě konsensu několika překrývajících se sekvencí stejného vzorku. Zásah ConsensusCallera je vidět na **obr. 8** a je vyznačen červenou tečkou nad určenou bází. To umožňuje snadno číst i okraje sekvencí v případě, že sekvenujeme vzorek z obou stran. Pro kontrolu kvality reakce lze využít okno prohlížení hrubých dat (**obr. 7**). V módu zobrazení celého projektu (**Obr. 6**) lze přehledně sledovat výsledky mnoha vzorků najednou v textovém formátu, tečka zde představuje bázi shodnou s referenční sekvencí a písmenem jsou označeny rozdílné báze, které lze ručně upravovat. Pro manuální úpravu jednotlivých multibází lze rozbalovat elektroferogramy u vybraných vzorků. V referenční sekvenci jsou podtržením vyznačeny triplety a příslušné aminokyseliny na řádku referenčních aminokyselin. Tento komplexní přístup k hodnocení dat je výhodný u rozsáhlých projektů, zároveň je ale třeba počítat se zvýšenými nároky na hardwarové vybavení.



Obr. 6



Obr.7



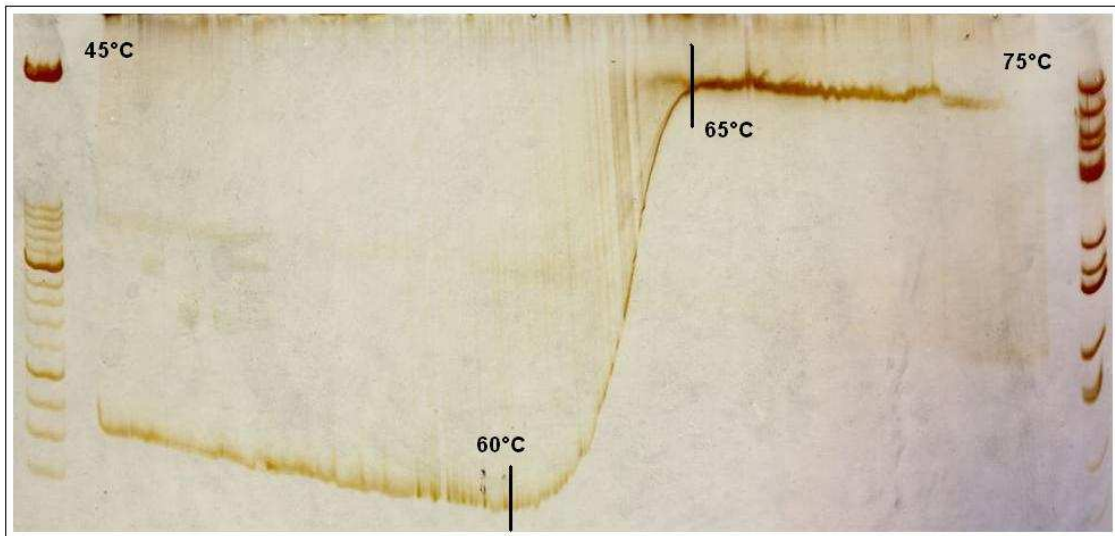
Obr .8

4. Výsledky

Gen LIF byl analyzován pomocí TGGE, část byla analyzována pomocí CSCE a přímého sekvenování. Gen IL-11 byl byl sekvenován.

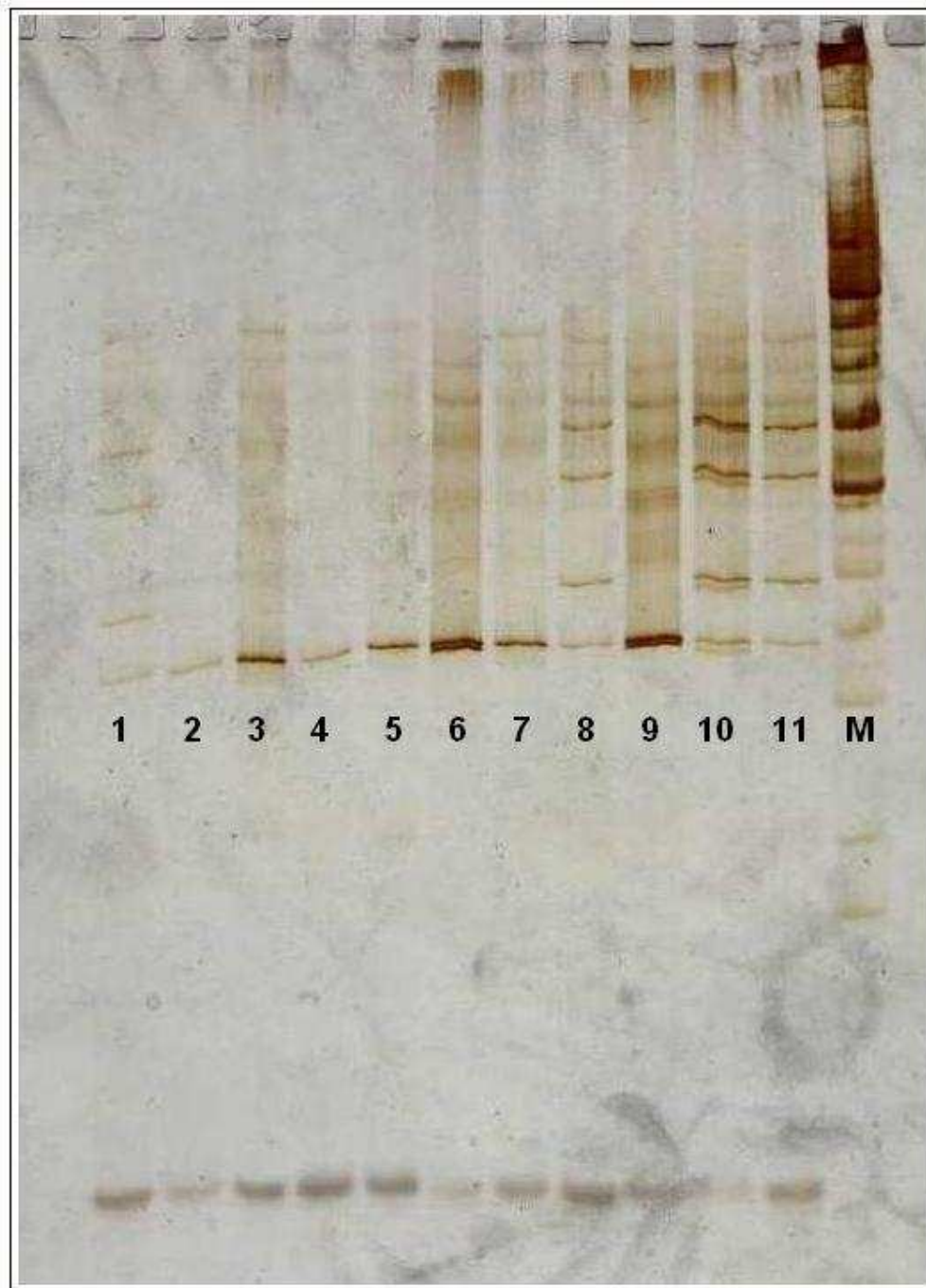
4.1 TGGE

Pro nalezení jednotlivých exon-specifických teplotních domén byly provedeny PCR za použití kontrolní (negativní) DNA (extrahované z periferní krve za skupiny zdravých žen) jež byly postupně analyzovány na TGGE s kolmým teplotním gradientem. Z těchto analýz byly determinovány teplotní domény specifické pro každý ze studovaných exonů (**Tabulka 2**). Na **Obr. 9** je zobrazen exon 3.2 a zjištěná teplotní doména 60-65°C. Ze získaných dat byly za použití negativní kontroly optimalizovány paralelní TGGE pro jednotlivé exony.



Obr. 9

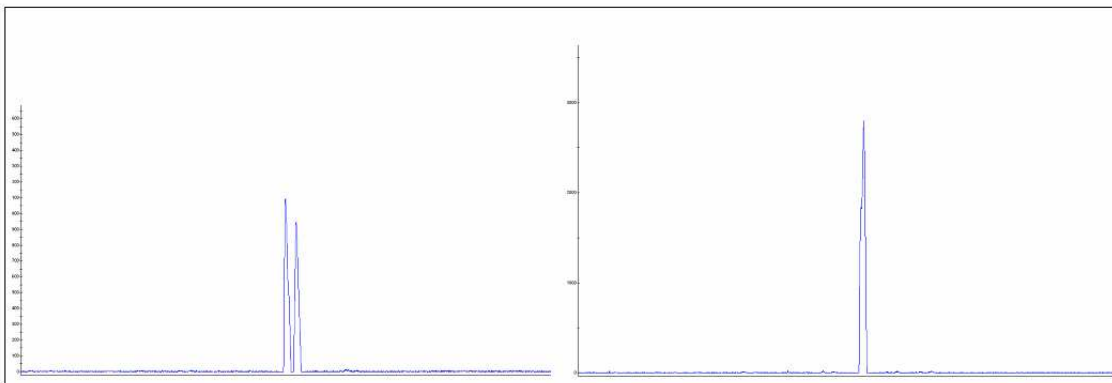
Příklad paralelního gelu je na **obr. 10**. Vzorky 1, 8, 10 a 11 ukazují čtyři proužky, každý z nich představuje jeden homo- nebo heteroduplex a tedy se jedná o mutované vzorky. Ostatní vzorky byly hodnoceny jako negativní (2,4,5,7,9).



Obr. 10

4.2 CSCE

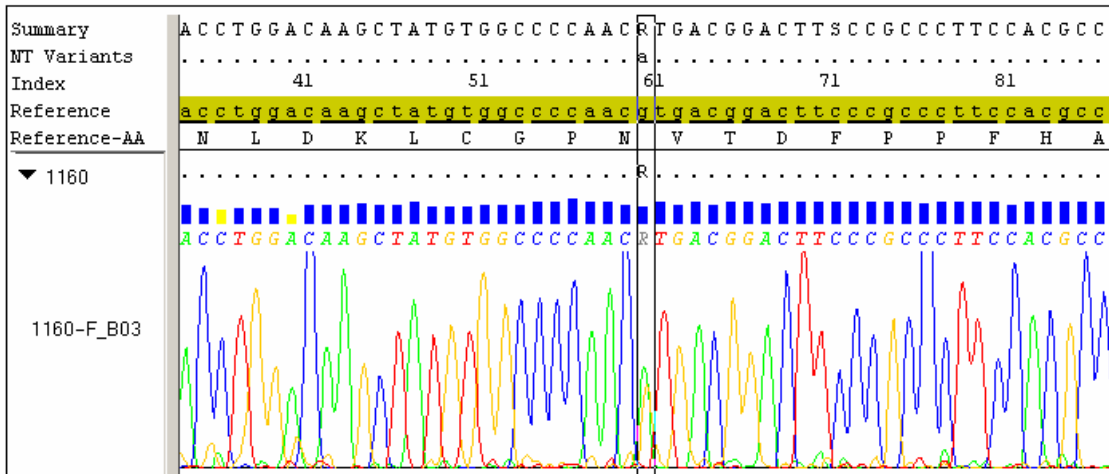
Na **obr. 11** je výřez z elektroferogramu, který ukazuje pozitivní heterozygotní a negativní výsledek analýzy CSCE, jedná se o exon 3.2. Tato mutace byla poté potvrzena sekvenováním a charakterizována jako jednonukleotidová záměna G3400A. Celkem bylo pomocí CSCE analyzováno 50 vzorků.



Obr. 11

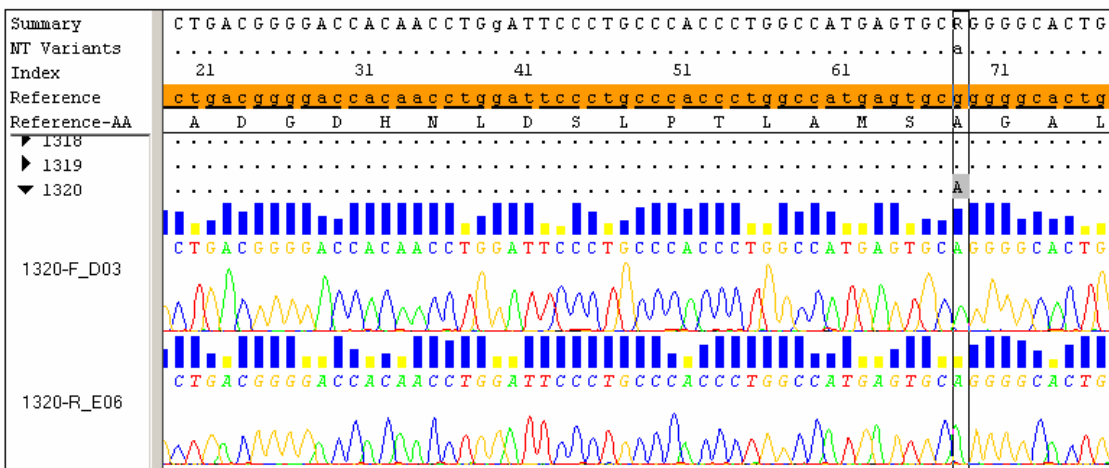
4.3 Sekvenování

Na obr. 12 je vidět tranzice guaninu za adenin v genu LIF na pozici 3400.



Obr. 12

Na Obr. 13 je znázorněna jedna ze zachycených variant genu IL-11, záměna guaninu za adenin na pozici 3451.



Obr. 13

4.4 Gen LIF

V **tabulce 4** jsou shrnuty výsledky analýzy pro gen LIF.

Varianta		Frekvence	
NT	AA	n=399	n=202
C3235T	intron	0	0
G3400A	V64M	0,03	0
G3424A	A72T	0	0
jiná	-	0	0

Tabulka 4

4.5 Gen IL-11

V **tabulce 5** jsou shrnuty výsledky analýzy pro gen IL-11.

Varianta		Frekvence	
NT	AA	n=235	n=20
G3451A	A82A	0,75	0,68
G3638A	V108M	0	0
G3651A	R113H	0,05	0
jiná		0	0

Tabulka 5

5. Diskuse

5.1 Metody používané ke screeningu mutací

Zkoumání genů a vyhledávání změn na úrovni nukleotidové sekvence a následná analýza sekvenčních variant (SNP- single nucleotide polymorphism), je mocný nástroj k vyhledávání původců geneticky určených onemocnění. Ať je to hledání nových mutací v rozsáhlých genech nebo přiřazování známých mutací k jejich projevům, vždy je vyžadována časově a cenově nenáročná metoda umožňující analýzu vzorků v masivním měřítku. V dnešní „postgenomové“ době je poměrně snadné prozkoumat jakýkoli úsek DNA, a takto vytvořená data srovnat s referenční sekvencí a databází známých variant. Porovnáním s klinickým

obrazem lze určit, které odchylky mohou být nemoc-způsobující mutace nebo neutrální polymorfismy

Bylo vyvinuto množství screeningových metod, které slouží k rychlé identifikaci vzorků s pozměněnou DNA, které jsou pak podrobeny konečnému určení nukleotidové sekvence. Aby taková metoda byla užitečná, musí být schopná detekovat jakékoli změny v sekvenci včetně záměny jediného nukleotidu, a zároveň umožňovat větší průtok vzorků než je samotné sekvenování. Příklady těchto technik sahají od PTT (Protein Truncation Test), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), CMC (Chemical Cleavage Method), dHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) až k HA (Heteroduplex Analysis), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) a CSCE (Conformation Sensitive Capillary Electrophoresis). (Review: Nollau et Wagener 1997). Zatímco PTT, DGGE a TGGE se příliš nehodí pro větší množství vzorků (PTT má i omezenou citlivost na mutace vedoucí k vytvoření předčasného stop kodonu), CMC používá velmi toxické látky a dHPLC chromatogram není pro většinu laboratoří dostupný. Zbývající metody používají kapilární elektroforézu, ale odlišné médium. HA, SSCP i CSCE probíhá v nedenedurujícím polymeru (CAP – Conformation Analysis Polymer, PE/AB, Foster City, CA, USA), a pokud těmto metodám není vyhrazen zvláštní přístroj, vyvstává problém s výměnou polymeru mezi CAP a běžně užívaným POP (Performance Optimized Polymer, PE/AB, Foster City, CA, USA). Po každé výměně typu polymeru je třeba provést novou spektrální kalibraci a také kalibraci velikostní ho standardu jelikož za nedenedurujících podmínek se markantně změní pohyblivost fragmentů markeru.

V této práci jsem nejprve používal metodu TGGE, později jsem vyzkoušel CSCE, ale právě kvůli zmíněným komplikacím s výměnou polymeru jsem od ní upustil a přešel na přímé sekvenování. Ovšem z výsledků analýzy CSCE (viz **obr. 11**) plyne, že tato metoda byla dostatečně citlivá aby odhalila změnu na úrovni jednoho nukleotidu

5.2 Shrnutí výsledků

Ve skupině neplodných (n=399) jsme při v genu LIF identifikovali 12 pozitivních vzorků. (**Tabulka 4**) Všechny vzorky byly následně sekvenovány a bylo prokázáno, že se ve všech případech jedná o stejnou mutaci na pozici 3400 (výměna G za A) v heterozygotní formě, jež byla již v minulosti popsána (Giess et al.1999). Tato mutace vede k záměně valinu za methionin v kodónu 64 (V64M), jež je součástí AB klíčky LIF proteinu, klíčové oblasti pro

interakci s receptorem pro LIF. Z toho vyplývá, že tato mutace by mohla vést k snížení biologické aktivity LIF proteinu (Giess et al.1999).

Osm z dvanácti žen pozitivních na LIF mutaci bylo nuligravidních a čtyři byly diagnostikované se sekundární infertilitou. Dvě z těchto čtyř měly v anamnéze spontánní potrat do 12. týdne gravidity a dvě měly v anamnéze ektopické těhotenství.

Mezi pozitivními byly 4 ženy diagnostikované s idiopatickou infertilitou, 3 ženy s endometriózou, 3 se syndromem polycystických ovárií (PCOS), přičemž u jedné byl přítomen i andrologický faktor. Jedna pacientka byla léčena pro neplodnost pouze z důvodu andrologického a jedna byla diagnostikována s hyperprolaktinémií. Tyto výsledky potvrzují výsledky předešlé studie (Králičková et al. 2006), dle níž mutace v genu pro LIF nejsou omezené na nuligravidní ženy a nejsou přítomné jen u žen s idiopatickou infertilitou, což byly původní hypotézy prvních prací na téma mutací v genu pro LIF (Giess 1999, Steck et al. 2004). V kontrolní skupině nebyla zjištěna žádná mutace, což znamená, že frekvence mutací v genu pro LIF je u neplodných žen signifikantně vyšší ve srovnání s plodnými ženami ($P = 0.01$, Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky).

Sedm z dvanácti pozitivních infertilních žen bylo diagnostikováno s idiopatickou neplodností či s endometriózou a je zajímavé, že čtyři z těchto žen ani po opakovaných embryotransferech neotěhotněly. Ženy diagnostikované s jiným příčinami infertility (PCOS, andrologický faktor a hyperprolaktinémie) otěhotněly kromě jedné všechny hned při prvním embryotransferu. Domníváme se, že u žen s idiopatickou neplodností a endometriózou hrají roli další přítomné imunopatologie a jejich interakce s mutacemi v genu pro LIF a vliv na úspěšnost léčby by měly být objasněny. Předešlé studie (Giess et al.1999, Steck 2004), vyslovují hypotézu, že u této heterozygotní mutace může druhá alela genu pro LIF, hormonálně stimulovaná v průběhu přípravy na IVF léčbu, kompenzovat defekt způsobený touto mutací.

V **tabulce 5** jsou shrnuty nalezené varianty genu IL-11 a jejich srovnání se seznamem známých variant nalezených na stránkách NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Tyto varianty byly zjištěny firmou Seattle SNPs (CA, USA) která je částí National Heart Lung and Blood Institute's (NHLBI) a výzkum proběhl v rámci Programs for Genomic Applications (PGA).

Jejich studie čítala 60 vzorků evropského původu, 60 vzorků afrického původu a 90 vzorků asijského původu. U varianty G3451A jsem zaznamenal vyšší celkovou frekvenci (0,74) než je celková frekvence Seattle SNPs (0,3). To je zřejmě dáno tím, že všechny vzorky v mojí skupině byly evropského původu a nikoli smíšené jako u studie Seattle SNPs. Jejich

frekvence pro evropskou populaci byla 0,58 kdežto například pro africkou 0,0. Protože tato varianta nezpůsobuje aminokyselinovou záměnu, lze ji považovat za „silent mutaci“ nebo polymorfismus. Další varianta G3638A již vede k záměně aminokyselin, ale zatím se mi ji nepodařilo zachytit v naší testované skupině. Na stránkách Seattle SNPs je udávána celková frekvence 0,01 což vzhledem k počtu celkem vyšetřených vzorků (n=210) není příliš vypovídající číslo. O frekvencích této mutace v jednotlivých skupinách nejsou podány žádné podrobnější informace. Třetí mutace G3651A byla v naší populaci nalezena u 13 případů což představuje frekvenci 0,05 tedy asi pětikrát vyšší než u předchozí studie. Také byla nalezena jen v populaci neplodných žen, ale to může být způsobeno malou skupinou vyšetřených zdravých žen. Tato mutace má za následek záměnu argininu za histidin na pozici 113 (R113H), takže její vliv na expresi je možný. Celkový počet dosud vyšetřených vzorků je 255, nelze tedy zatím určit přesné frekvence výskytu. Taktéž o klinickém obrazu těchto pacientek nemám dosud žádné informace.

5.3 Mutace nebo polymorfismus

Databáze mutací lidských genů (HGMD-Human Gene Mutation Database) obsahuje ke třetímu lednu 2008 celkem 57047 mutací v 2183 genech. Některé z nich byly identifikovány jako původci nemocí nebo naopak neutrální polymorfismy, ale u velké většiny byl pouze zjištěn výskyt v populaci s určitou frekvencí. Takové varianty se poté rozlišovaly podle toho jestli změna na úrovni nukleotidu má vliv na aminokyselinovou sekvenci, a pokud ne, berou se jako „tiché“ neutrální mutace nebo polymorfismy. Jiný přístup arbitrárně určil, že mutace která se vyskytuje u více jak jednoho procenta populace je „normální“ a označuje se za polymorfismus. Tuto hranici ovšem překračuje mnoho potenciálně škodlivých mutací například přenašečství některých mutací způsobujících cystickou fibrózu a pod. V poslední době se ukazuje, že ani tichá mutace nemusí být neutrální polymorfismus. Vědci z National Cancer Institute v Bethesdě ukázali, že tichá mutace genu MDR-1 (multidrug resistance) mění vlastnosti proteinu P-gp. Tento protein zajišťuje pumpování chemoterapeutik z nádorových buněk a proto míra jeho aktivity je velmi důležitá. Autoři soudí, že podle změněného tripletu se sice do proteinu přidá stejná aminokyselina, mění se ale rychlost přidání této aminokyseliny a tím se mění i podmínky za jakých se syntetizovaná bílkovina smotává do výsledného tvaru. A to má za následek změněné vlastnosti výsledného produktu.

Zdá se, že způsob posuzování mutací se bude muset velmi změnit.

6. Závěr

Z této práce plyne, že mutace v genech LIF a IL-11 nejsou časté a jejich vliv na neplodnost není zcela zásadní, domníváme se, že představují cenný model pro zkoumání podmínek implantace embrya a jeho vliv na plodnost žen. Další výzkumy v této oblasti mohou poskytnout odpovědi na celou řadu klinicky relevantních otázek.

Pochopení imunogenetického pozadí implantace embrya je velmi důležité pro objasnění příčin některých zatím nevysvětlitelných případů neplodnosti a otvírání nových možností léčby.

7. Literatura

Bilinski, P., Roopenian, D., Gossler, A., 1998. Maternal IL-11Ra function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice. *Genes Dev.* 12 (14), 2234–2243.

Cork, B., A., Li, T., C., Warren, M., A., Laird, M., S., Interleukin 11 in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro. *Journal of Reproductive Immunology* 2001, č. 50, s. 3-17.

Cullinan, E.B., Abondanzo, S.J., Anderson, P.S. et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, roč. 93, č. 7, s. 3115-3120.

Drews U.: *Color Atlas of Embryology*. Thieme. 1995.

Du, X.X., Williams, D. A. Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the haemopoietic microenvironment. *Blood* 83, 2020-2030.

Giess R, Tanasescu I, Steck T, Sendtner M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod.* 1999 Jun;5(6):581-6.

Harvey, M.B., Leco, K.J., Arcellana-Panlilio, M.Y. et al. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development.*, 1995, roč. 121, č. 4, s. 1005-1014.

Hawkins et al. *Nucleic Acids Research*, Vol 27, č. 1, s204-208

Charnock-Jones, D.D., Sharkey, A.M., Fenswick, P. et al. Leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J. Reprod. Fertil.*, 1994, roč. 101, č. 2, s. 421-426.

- Keith, J. C. IL-11, cytokine reference. Academic Press, San Diego, CA. 565-584.
- Králíčková, M., Šíma, R., Vaněček, T. et al. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2006, roč. 127, č. 2, s. 231-235.
- Lass A, Weiser W, Munafo A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fert Ster* 2001; 76(6):1091-1096.
- Laure, S.M., Tuckerman, E.M., Dalton, C.F. et al. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum. Reprod.*, 1997, roč. 12, č. 3, s. 569-574.
- Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem.* 1997;43(7):1114-28. Review.
- Sherwin, J.R., Freeman, T.C., Stephens, R.J. et al. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol. Endocrinol.*, 2004, roč. 18, č. 9, s. 2185-2195.
- Schofield, G., Kimber, S.J. Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2005, roč. 72, č. 4, s. 872-878.
- Steck, T., Giess, R., Suetterlin, M.W. et al. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2004, roč. 112, č. 1, s. 69-73.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, roč. 359, č. 6390, s. 76-79.

Robb, L., Li, R., Hartley, L., Nandurkar, H., Koentgen, F., Begley, C.G., Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to defective uterine response to implantation. *Nat. Med.* 4, s 303-308.