

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA OBREZA

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA OBREZA

**GENETSKA ANALIZA HIPOGONADOTROPNEGA
HIPOGONADIZMA S SEKVENCIRANJEM
NASLEDNJE GENERACIJE**

**NEXT GENERATION SEQUENCING IN GENETICS
ANALYSIS OF HYPOGONADOTROPIC
HYPOGONADISM**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem, spec. lab. genet..

Izjava o avtorstvu

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. genet..

Tamara Obreza

ZAHVALA

Doc. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. genet., iskrena hvala za mentorstvo, vso nesebično pomoč, nasvete in posredovanje strokovnega znanja.

Mirjana Zupančič, mag. med. biokem., hvala za možnost opravljanja praktičnega dela magistrske naloge v Službi specialne laboratorijske diagnostike Pediatrične klinike.

Doc. dr. Magdalena Avbelj Stefanija, dr. med. iz Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, iz srca hvala za vse posredovane ideje in pomoč pri magistrski nalogi.

Dr. Jernej Kovač, uni. dipl. biokem., hvala za strokovno uvajanje v laboratorijsko delo, vse nasvete, vzpodbudo in podporo med raziskovanjem. Brez tvoje strokovne pomoči in nasvetov bi težka prišla do cilja.

Gašper Klančar univ. dipl. bioteh., iskrena hvala za vse nasvete, pogovore, pomoč in za nasmeh na obrazu.

Zahvaljujem se tudi vsem drugim iz Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, za prijazno pomoč pri delu in dobro voljo tekom mojega raziskovalnega dela.

Iskrena hvala vsem prijateljem, za podporo in pomoč, brez vas bi bilo življenje težko.

Zahvaljujem se tudi sestrama Meliti in Maji za sproščujoče pogovore in spodbujanje med študijem, še posebej hvala mami Mileni in Gorazdu, ki sta mi omogočila študij, razumevajočo podporo in spodbudo.

Emanuel iz srca se zahvaljujem tudi tebi, da me spoštuješ, osrečuješ in stojiš ob meni ob dobrih in slabih trenutkih.

Magistrsko nalogo posvečam pokojnemu atiju

in preostalim družinskim članom.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	III
1 UVOD	1
1.1 HORMONI HIPOTALAMIČNO-HIPOFIZNO-GONADNEGA SISTEMA.....	1
1.1.1 HIPOTALAMIČNO-HIPOFIZNO-GONADNI SISTEM	2
1.2 KLASIFIKACIJA HIPOGONADIZMA	3
1.2.1 PRIROJENI HH	4
1.2.1.1 Klinične značilnosti	4
1.2.1.2 Diagnostika.....	5
1.2.1.3 Molekularna genetika	6
1.2.1.4 Zdravljenje.....	8
1.3 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (ANGL. <i>NEXT GENERATION</i> <i>SEQUENCING</i>)	9
1.3.1 SEKVENATOR NASLEDNJE GENERACIJE MiSeq.....	10
1.3.1.1 Priprava DNA-knjižnice	10
1.3.1.2 Premostitveni PCR (angl. <i>Bridge amplification</i>).....	11
1.3.1.3 Sekvenciranje s sintezo, proizvajalca Illumina.....	11
1.3.1.4 Sekvenciranje z obeh koncev knjižnice DNA	12
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	13
3 PREISKOVANCI IN METODE	15
3.1 PREISKOVANCI	15
3.2 METODE.....	16
3.2.1 OSAMITEV GENOMSKE DNA IZ PERIFERNE KRVI.....	17
3.2.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOČE DNA	17
3.2.3 FLUORIMETRIČNO MERJENJE KONCENTRACIJE DNA.....	18
3.2.4 PRIPRAVA DNA-KNJIŽNICE	19
3.2.4.1 Fragmentacija genomske DNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. <i>tagmentation</i>).....	21

3.2.4.2 Čiščenje produktov fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev, čiščenje PCR produktov in obogatene knjižnice DNA	21
3.2.4.3 Prva reakcija PCR.....	23
3.2.4.4 Določanje količine in dolžine knjižnice DNA na bioanalizatorju Agilent 2100	24
3.2.4.5 Združevanje vzorcev v eno frakcijo	24
3.2.4.6 Prva in druga hibridizacija tarčnih odsekov DNA z biotiniliranimi sondami.....	25
3.2.4.7 Prva in druga izolacija obogatene DNA-knjižnice	26
3.2.4.7.1 Vezava hibridov na streptavidinske magnetne kroglice	26
3.2.4.7.2 Odstranjevanje nečistoč iz streptavidinskih magnetnih kroglic	27
3.2.4.7.3 Izpiranje obogatene DNA-knjižnice iz magnetnih kroglic.....	27
3.2.4.8 Druga reakcija PCR	28
3.2.4.9 Kvantifikacija knjižnice DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).....	29
3.2.5 DOKONČNA PRIPRAVA REAGENTOV IN DNA-KNJIŽNICE ZA NGS ...	30
3.2.6 ANALIZA REZULTATOV, PRIDOBLENIH S SEKVENATORJEM NASLEDNJE GENERACIJE	31
3.2.7 POTRDITVENA METODA – SEKVENCIRANJE PO SANGERJU	32
3.2.7.1 Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov.....	32
3.2.7.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	34
3.2.7.3 Agarozna elektroforeza.....	35
3.2.7.4 Sekvenčna reakcija	35
3.2.7.5 Analiza in interpretacija rezultatov.....	37
4 REZULTATI.....	38
4.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV	38
4.2 PRIPRAVA DNA-KNJIŽNICE	39
4.3 GENETSKA ANALIZA.....	40
5 RAZPRAVA.....	42
5.1 POMEN GENETSKE DIAGNOSTIKE PRIROJENEGA HH.....	42
5.2 GENETSKE SPREMEMBE PRI BOLNIKI S KLINIČNO DIAGNOZO HH.....	43
5.2.1 GEN <i>PROK2</i>	44

5.2.1.1 Genetska sprememba p.Ile57MetfsTer17	44
5.2.2 GEN <i>FGFR1</i>	45
5.2.2.1 Genetska sprememba p.Trp66Arg (p.Trp99Arg)	45
5.2.3 GEN <i>CHD7</i>	46
5.2.3.1 Genetska sprememba p.Tyr1920Cys	46
5.2.4 GEN <i>PROKR2</i>	47
5.2.4.1 Genetska sprememba p.Arg85Leu	47
5.2.5 GEN <i>GNRHR</i>	47
5.2.5.1 Sestavljen heterozigot za genetski spremembi p.Arg139His in p.Ala171Thr.....	48
5.2.5.2 Genetska sprememba p.Gln106Arg.....	48
5.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI TEHNIK NGS V PRIMERJAVI S SEKVENCIJANJEM PO SANGERJU.....	49
6 SKLEP	51
7 LITERATURA	53
8 PRILOGA	62

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I. ZNAČILNOSTI HORMONOV HIPOTALAMIČNO-HIPOFIZNO-GONADNEGA SISTEMA .	1
PREGLEDNICA II. LASTNOSTI GENOV IN PROTEINOV, KI JIH KODIRAJO GENI, POVEZANI Z RAZVOJEM PRIROJENEGA HH Z ALI BREZ ANOZMIJE	7
PREGLEDNICA III. NADALJEVANJE PREGLEDNICE II	8
PREGLEDNICA IV. KOLIČINE IN INKUBACIJSKI ČASI ČIŠČENJA PRODUKTOV FRAGMENTACIJE GDNA Z LIGACIJO OZNAČEVALNIH ADAPTERJEV, PRODUKTA 1. IN 2. REAKCIJE PCR ALI OBOGATENE KNJIŽNICE DNA	22
PREGLEDNICA V. KOMBINACIJE INDEKSNIH OLIGONUKLEOTIDOV S KATERIMI SMO MED 1. REAKCIJO PCR OZNAČILI KNJIŽNICE DNA.....	23
PREGLEDNICA VI. UPORABLJENI OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIKI IN NJIHOVE LASTNOSTI.....	33
PREGLEDNICA VII. ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV	38
PREGLEDNICA VIII. NADALJEVANJE PREGLEDNICE VII.....	39
PREGLEDNICA IX. VZROČNE SPREMEMBE, KI SMO JIH PREPOZNALI PRI PREISKOVANCIH S KLINIČNO DIAGNOZO HH Z NGS IN POTRREDITVENO SANGERJEVO METODO	41

KAZALO SLIK

SLIKA 1: DVOJNO OZNAČENA KNJIŽNICA DNA.....	11
SLIKA 2: SLIKOVNI PRIKAZ DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA, PROIZVAJALCA ILLUMINA.....	12
SLIKA 3: SHEMA POTEKA LABORATORIJSKEGA DELA.	16
SLIKA 4: SHEMA PRIPRAVE KNJIŽNICE DNA.....	20
SLIKA 5: PRIMER DOLOČANJA KONCENTRACIJE IN DOLŽINE ODSEKOV KNJIŽNICE DNA Z BIOANALIZATORJEM AGILENT 2100.....	40

KAZALO ENAČB

ENAČBA 1: IZRAČUN KOLIČINE POSAMEZNIH KNJIŽNIC DNA, KI JIH BOMO V NADALJEVANJU ZDRUŽILI	25
ENAČBA 2: IZRAČUN KOLIČINE RBS PUFRA S KATERIM SMO REDČILI KNJIŽNICO DNA.....	31

POVZETEK

Prirojeni hipogonadotropni hipogonadizem je redka, vendar klinično in genetsko heterogena bolezen. Nastane kot posledica sprememb v različnih genih, ki kodirajo proteine, udeležene v razvoj in migracijo nevronov gonadotropin sproščujočega hormona, v uravnavanje izločanja gonadotropin sproščujočega hormona ali v delovanje gonadotropin sproščujočega hormona na adenohipofizo. To vodi v moteno nastajanje in izločanje gonadotropnih hormonov (luteinizirajočega hormona in folikel spodbujajočega hormona) ter posledično tudi spolnih hormonov. Posledica prirojenega hipogonadotropnega hipogonadizma je odsotna ali kasna puberteta in neplodnost. Kadar je prirojenemu hipogonadotropnemu hipogonadizmu pridružen zmanjšan ali odsoten občutek za vonj, imenujemo to Kallmannov sindrom. Za opredelitev genetskega vzroka hipogonadotropnega hipogonadizma so potrebne molekularne genetske preiskave.

Namen te magistrske naloge je bil pri preiskovancih s klinično diagnozo hipogonadotropnega hipogonadizma s sekvenciranjem naslednje generacije in potrditvenim sekvenciranjem po Sangerju opredeliti vzročne spremembe v kodirajočih regijah in eksonsko-intronskih mejah 24 genov, povezanih z razvojem prirojenega hipogonadotropnega hipogonadizma z ali brez anozmije.

V raziskavo je bilo vključenih 12 preiskovancev s hipogonadotropnim hipogonadizmom (11 moških, ena ženska), starih med 16 in 67 let. S sekvenciranjem naslednje generacije smo pri šestih preiskovancev opredelili 6 različnih sprememb in sicer v genih *PROK2*, *GNRHR*, *PROKR2*, *FGFR1* in *CHD7*. Med njimi tri spremembe do sedaj še niso bile opisane v bazi podatkov o mutacijah v humanih genih (HGMD). S Sangerjevo metodo smo potrdili vse genetske spremembe, opredeljene s sekvenciranjem naslednje generacije, pri tem smo pri enem preiskovancu zaznali še eno dodatno vzročno spremembo v genu *GNRHR*.

Pristop sekvenciranja naslednje generacije v primeru genetske diagnostike prirojenega hipogonadotropnega hipogonadizma omogoča hitro in zanesljivo opredelitev vzročnih genetskih sprememb v številnih genih hkrati, saj je bil delež preiskovancev z opredeljenimi vzročnimi spremembami primerljiv opisanemu deležu v literaturi.

Ključne besede: prirojeni hipogonadotropni hipogonadizem, Kallmannov sindrom, sekvenciranje naslednje generacije, sekvenciranje po Sangerju, vzročna sprememba.

ABSTRACT

Congenital hypogonadotropic hypogonadism is a rare but clinically and genetically heterogeneous disease. This disease is caused by pathogenic mutations in several genes encoding proteins involved in the development and migration of neurons that secrete gonadotropin-releasing hormone, regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion, or in action of gonadotropin-releasing hormone on the anterior pituitary. This leads to impaired production and secretion of gonadotropin hormones (luteinizing hormone and follicle stimulating hormone) and consequently sex hormones. Congenital hypogonadotropic hypogonadism is characterized by an absence or delay of puberty and infertility. The association of congenital hypogonadotropic hypogonadism with hyposmia or anosmia is defined as Kallmann syndrome. Molecular genetic testing is used for identification of genetic cause of the disease.

The aim of our study was to use next generation sequencing in identification of casual mutations in the coding regions and exon-intron regions of 24 genes related to the development of congenital hypogonadotropic hypogonadism with or without anosmia. All identified mutations suspected to be causal were subsequently confirmed by Sanger sequencing.

12 participants aged between 16 and 67 (eleven males and one female) with clinical symptoms of hypogonadotropic hypogonadism were recruited into this study. Six causal mutations in five genes (*PROK2*, *GNRHR*, *PROKR2*, *FGFR1* and *CHD7*) were detected in six patients. Among them, three changes have not yet been described in the human gene mutations database up to now. Sanger sequencing confirmed all casual mutations detected by next generation sequencing, where one additional *GNRHR* gene mutation was detected.

In genetic diagnostics of congenital hypogonadotropic hypogonadism next generation sequencing enables fast and reliable identification of causal mutations in several genes simultaneously, since proportion of the identified causal mutations was comparable with the reported in the literature.

Key words: Congenital hypogonadotropic hypogonadism, Kallmann syndrome, next generation sequencing, Sanger sequencing, casual mutations.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

A	adenin
A₂₆₀	absorbanca pri 260 nanometrih
A₂₈₀	absorbanca pri 280 nanometrih
ABP	androgen vezoči protein (angl. <i>Androgen Binding Protein</i>)
AD	avtosomno dominantno
AR	avtosomno recesivno
bp	bazni par
BR	barvni reagent
C	Citozin
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
Cq	kvantifikacijski cikel
ddNTP	dideoksinukleotid trifosfat
DHH	družinska hipokalcirična hiperkalcemija
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dsDNA	dvojnoverižna deoksinukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FSH	folikel spodbujajoči hormon
G	gvanin
gDNA	genomska deoksinukleinska kislina
GnRH	gonadoliberin ali gonadotropin sproščujoči hormon
hCG	humani horionski gonadotropin
HH	hipogonadotropni hipogonadizem
HHGS	hipotalamično-hipofizno-gonadni sistem
HLA	človeški levkocitni antigen
hMG	humani menopavzalni gonadotropin
HNZ	hormonsko nadomestno zdravljenje
KS	Kallmannov sindrom

LH	luteinizirajoči hormon
M	moški
MAF	frekvenca manj pogostega alela na lokusu (angl. <i>Minor Allele Frequency</i>)
MRI	magnetna resonanca
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>Next Generation Sequencing</i>)
nHH	normozmični prirojeni hipogonadotropni hipogonadizem
nM	nanomolarnost
nm	nanometer
PCR	verižna reakcija s polimerazo
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RBS	pufer za ponovno suspendiranje (angl. <i>Resuspension Buffer</i>)
rFSH	rekombinantni folikel spodbujajoči hormon
RPM	vrtljaji na minuto
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
SLO	Slovenija
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
SPB	magnetne kroglice za čiščenje vzorca (angl. <i>Sample Purification Beads</i>)
T	timin
TBE	Tris-Borat-Etilendiamintetraocetna kislina
TE	Tris-Etilendiamintetraocetna kislina
UV	ultravijolična
Ž	ženska

1 UVOD

1.1 HORMONI HIPOTALAMIČNO-HIPOFIZNO-GONADNEGA SISTEMA

Gonadoliberin ali gonadotropin sproščujoči hormon (GnRH), luteinizirajoči hormon (LH), folikel spodbujajoči hormon (FSH) in spolni hormoni (testosteron, estrogen) imajo ključno vlogo pri normalnem razvoju ter delovanju tako moškega kot tudi ženskega reproduktivnega sistema (1). Podrobnejše značilnosti hormonov hipotalamično-hipofizno-gonadnega sistema (HHGS) (3) so opisane v *Preglednici I.*

Preglednica I. Značilnosti hormonov hipotalamično-hipofizno-gonadnega sistema (1-3)
(*Ž* – ženska, *M* – moški).

Hormon	Vrsta	Delovanje
GnRH	Dekapeptid	Uravnava in spodbuja izločanje LH in FSH iz adenohipofize
LH	Glikoprotein	Ž: Spodbuja ovulacijo in nastanek rumenega telesca M: Spodbuja nastanek in izločanje testosterona
FSH	Glikoprotein	Ž: Vpliva na rast jajčnega folikla; skupaj z LH spodbuja nastanek estrogenov M: Razvoj semenskih cevk; vpliv na spermatogenezo
Testosteron	Steroid	M: Sodeluje pri razvoju moškega spolovila, sekundarnih moških spolnih znakov, spodbuja spermatogenezo, povečuje libido, erektilno funkcijo in doživljanje orgazma, ima anabolni učinek na mišice in kosti, ugodno vpliva na eritropoezo in sintezo eritropoetina, prav tako na kognitivne funkcije, razpoloženje, čustvovanje
Estrogen	Steroid	Ž: Odgovoren za razvoj in vzdrževanje ženskih spolnih organov, sekundarnih spolnih značilnosti; skupaj s progesteronom sodeluje pri uravnavanju menstrualnega cikla, rasti prsi, rasti endometrija, pri vzdrževanju nosečnosti; ugodno deluje na kosti
Inhibin	Polipeptid	Zavira izločanje FSH iz hipofize

1.1.1 HIPOTALAMIČNO-HIPOFIZNO-GONADNI SISTEM

Normalno delovanje HHGS je nujno potrebno za normalen razvoj reprodukcijskega sistema in spolnih značilnosti pri obeh spolih (4). Glavno vlogo pri uravnavanju HHGS ima pulzirajoče sproščujoč hipotalamični hormon GnRH.

V otroštvu so koncentracije gonadotropinov in spolnih hormonov nizke, obstajajo le minimalne razlike v koncentraciji med spoloma. V kasnejšem obdobju se koncentracije zvišajo in vplivajo na razvoj sekundarnih spolnih značilnosti (1, 3).

Dekapeptidni hormon GnRH izločajo GnRH-nevroni v hipotalamusu. Slednji postanejo del HHGS šele v času življenja. Med embriogenezo se GnRH-nevroni nahajajo izven hipotalamusa, v olfaktorni plakodi, od koder njihovi akosoni migrirajo ob olfaktornih nevronih skozi olfaktorni bulbus do hipotalamusa (5-9). GnRH se izloči iz končičev GnRH-nevronov v mediano eminenco in nato v hipofizni portalni obtok, od koder se po krvi skozi kapilarno mrežje prenese v adenohipofizo, kjer spodbuja izločanje gonadotropnih hormonov (LH, FSH). Ti pa spodbujajo tvorbo in izločanje spolnih hormonov iz moških in ženskih spolnih žlez (1).

V moški spolni žlezi (testis ali moda) pod vplivom hormona LH v Leydigovih celicah nastaja testosteron, ki po negativni povratni zvezi zavira izločanje GnRH iz hipotalamusa in LH iz adenohipofize. FSH v semenskih cevkah neposredno vpliva na spermatogenezo, prav tako deluje tudi na Sertolijeve celice. Slednje sodelujejo pri sintezi specifičnih proteinov, kot sta androgen vezoči protein (angl. *Androgen Binding Protein (ABP)*) in inhibin. ABP veže in prenese testosteron v semenske cevke, kjer ta vpliva na spermatogenezo. Sproščeni inhibin pa po negativni povratni zvezi zavira izločanje FSH iz sprednjega dela hipofize (1, 3).

Reprodukativno obdobje pri ženski zaznamuje menstrualni cikel. To je povprečno 28 dni dolg cikel v katerem se ritmično spreminjajo količine hormonov in fiziološko spremenijo jajčniki. Poteka v dveh fazah, folikularni (rast foliklov) in luteinski fazi (rumeno telesce ali corpus luteum). V prvih dneh folikularne faze je koncentracija FSH povišana, vendar do ovulacije upada, saj nizka koncentracija estrogena po negativni povratni zvezi zavira

izločanje FSH iz adenohipofize. FSH spodbuja rast in razvoj primarnega folikla v sekundarnega, iz katerega se postopno sproščajo velike količine estrogena. Pred ovulacijo visoka količina estrogena po pozitivni povratni zvezi stimulira izločanje GnRH in sproži nenadno povišanje LH. Slednje povzroči sprostitve jajčeca iz jajčnega folikla (ovulacija). Po ovulaciji, začne količina estradiola upadati. V luteinski fazi nastane iz preostalega dela jajčnega folikla rumeno telesce (corpus luteum), ki začne sintetizirati in izločati velike količine progesterona, estrogena ter inhibina. Progesteron po negativni povratni zvezi zmanjša izločanje GnRH in gonadotropinov. Inhibin prav tako po negativni povratni zanki zavira izločanje FSH iz adenohipofize. Če ne pride do oploditve jajčeca, rumeno telesce propade, koncentracije progesterona, estrogena in inhibina upadejo. Ob znižanju progesterona, se količina GnRH poveča, zaradi česar se prične nov menstrualni cikel (1, 3).

1.2 KLASIFIKACIJA HIPOGONADIZMA

Hipogonadizem je stanje, ko spolne žleze (testisi, jajčniki) ne izločajo dovolj spolnih hormonov, zaradi česar je moten pubertetni razvoj in nastop sekundarnih spolnih znakov. Glede na izvor motnje ločimo hipergonadotropni in hipogonadotropni hipogonadizem. Hipergonadotropni hipogonadizem se pojavi zaradi primarno okvarjene funkcije spolnih žlez, kar vodi v povišane vrednosti LH in FSH ter znižano količino spolnih hormonov v krvi. Kadar je motnja prisotna v hipotalamično-hipofiznem sistemu (sekundarna, centralna motnja), nastopi hipogonadotropni hipogonadizem (HH). Okvara v hipotalamusu povzroči zmanjšano izločanje ali moteno delovanje hipotalamičnega hormona GnRH, zaradi česar se zmanjša tudi nastajanje in izločanje gonadotropnih hormonov in posledično tudi spolnih hormonov (1, 3).

HH je lahko posledica pridobljenih ali prirojenih motenj hipotalamusa ali hipofize. Zloraba drog in nekaterih zdravilnih učinkovin (opiat, alkohol, anabolni steroidi, analogi hormona GnRH), tumorji ali poškodbe hipofize, hiperprolaktinemija in sistemske bolezni, kot so hemokromatoza, sarkoidoza ter histiocitoza X, so povezani z razvojem pridobljenega HH (1, 10, 11). Prirojeni HH je posledica številnih genetskih nepravilnosti. Glede na zmožnost zaznavanja vonja se loči na prirojeni HH z normalnim občutkom za vonj (normozmični

prirojeni HH (nHH)) in na prirojeni HH z zmanjšanim ali odsotnim zaznavanjem vonja (Kallmannov sindrom (KS)). Prirojeni HH z ali brez anozmije se lahko pojavi tudi kot del drugih redkih prirojenih sindromov, kot so sindrom Prader Willi, sindrom Laurence Moon Biedl, sindrom Bardet-Biedlov in sindrom Mobius (1, 3, 10, 12, 13).

1.2.1 PRIROJENI HH

Prirojeni HH je klinično in genetsko zelo heterogena vendar redka bolezen (4, 14). Pojavnost bolezni je 1 do 10 bolnikov na 100.000 rojstev (15), med katerimi je 60 % bolnikov s KS in 40 % z nHH (16). Moški zbole vajo 4 do 5-krat pogosteje kot ženske (17). Razvoj bolezni je lahko posledica sprememb v genih, ki kodirajo proteine, udeležene v razvoj in migracijo GnRH-nevronov ter olfaktornih nevronov, v uravnavanje izločanja GnRH iz hipotalamusa ali v delovanje GnRH na adenohipofizo (*Preglednici II. in III.*) (4, 18).

1.2.1.1 Klinične značilnosti

Prirojeni HH je klinično raznolika bolezen. Simptomi in resnost HH se lahko razlikujejo med posameznimi bolniki, kot tudi med bolnimi člani posamezne družine. Klinični znaki, ki bodo prisotni pri bolniku, so odvisni od različnih dejavnikov, kot so spol, starostno obdobje, v katerem se nahaja bolnik (pred puberteto, v puberteti, v odraslem obdobju), do obsega pomanjkanja GnRH (popolna odsotnost, delno pomanjkanje) in vrste gena v katerem je prisotna vzročna sprememba (5, 6, 14).

Pomanjkanje GnRH v poznem fetalnem obdobju pri novorojenčku moškega spola lahko vodi v nastanek kriptorhizma (nespuščenost testisov v mošnjo) in/ali nastanek mikropenisa. Pri novorojenih deklicah s prirojenim HH ni videti nobenih kliničnih znakov (19).

Pri mladostnikih, tako pri dečkih kot pri deklicah, se znaki HH kažejo z motnjami sekundarnega spolnega dozorevanja, ko puberteta ne nastopi ali zakasni (3). O zapozneli puberteti govorimo, kadar se pri deklicah prve pubertetne značilnosti (rast prsi) pojavijo po

13. letu, pri dečkih (rast testisov) po 14. letu (20). Za bolnice je značilna primarna amenoreja in delna ali odsotna razvitost prsi (3). Dečki imajo višji glas, zmanjšan volumen testisov, majhen spolni organ in prostato, so neporaščeni po obrazu, pod pazduho in po genitalijah ter lahko imajo večji delež maščobe kot mišične mase (5, 6, 16). Mladostniki s HH imajo lahko zaradi pomanjkanja spolnih hormonov tudi zmanjšano mineralno kostno gostoto, njihove kosti dozori kasneje, zaradi česar imajo dolge okončine, prisotna je rahla anemija (12, 21).

Po puberteti, v odrasli dobi se HH pri moških kaže kot izguba libida, impotenca, slaba sekundarna poraščenost, kopičenje visceralne maščobe, zmanjšanje mišične mase, ginekomastija, neplodnost, plešavost, nihajoče razpoloženje, utrujenost, vročinski oblivi, blaga anemija in zmanjšana mineralna kostna gostota. Ženske so slabo sekundarno poraščene, imajo malo ali ne razvite prsi in odsotno menstruacijo (3, 12, 16, 21).

Poleg motenj v reproduktivnem sistemu se lahko pojavijo tudi druge nepravilnosti, kot so razcepljena ustnica ali nebo, bimanualna sinkinezija (ena roka nehote zrcalno ponavlja hoten gib druge roke), odsotnost zob ali ledvice, okvara sluha, anomalije ušes ali oči (14, 22).

Bolniki s KS imajo poleg navedenih značilnosti HH tudi odsoten ali le delno razvit olfaktorni bulbus, zaradi česar imajo popolno ali le delno okvarjeno zaznavanje vonja (anozmija, hipozmija).

1.2.1.2 Diagnostika

Postavitev diagnoze prirojenega HH temelji na kliničnih značilnostih bolnika in laboratorijskih preiskavah. Pri moškem novorojenčku se ob prisotnosti kriptorhizma, mikropenisa ali drugih ne-reproduktivnih motnjah posumi na prirojeni HH že ob rojstvu (23). Pri deklicah ni jasnih znakov.

Pri sumu na HH se najprej določijo serumske koncentracije testosterona (celotnega in biološko aktivnega) pri dečkih in estradiola pri deklicah. Ob znižanih vrednostih spolnih hormonov se pri obeh spolih izmerita tudi koncentraciji LH in FSH v serumu. Pri HH so

koncentracije spolnih hormonov in gonadotropinov znižane. Referenčne vrednosti so odvisne od starosti mladostnika in obdobja menstrualnega cikla, v katerem se nahaja dekle, če je menstruacija sploh prisotna. Poleg spolnih hormonov in gonadotropinov se vedno določi tudi količina prolaktina in opredelijo se drugi hormoni hipofizno periferne osi (2, 3, 11).

Delovanje sistema GnRH/GNRHR se preveri s spodbujevalnim GnRH-testom. Tik pred intravensko aplikacijo hormona GnRH se izmeri serumska koncentracija testosterona pri moškem, estradiola pri ženski in koncentraciji FSH ter LH pri obeh spolih. Po intravenski aplikaciji GnRH se po 20-, 30- in 60-ih minutah meri serumska koncentracija obeh gonadotropinov. Kadar je sistem GnRH/GNRHR normalno odziven, se gonadotropina gradientno sproščata iz adenohipofize. V nasprotnem primeru je sproščanje LH in FSH iz hipofize moteno (10, 19).

Poleg laboratorijskih merenj se opravijo tudi vohalni testi in slikanje hipotalamus hipofiznega področja z magnetno resonanco (MRI). Na ta način se izključi prisotnost tumorjev in opredeli morebiten KS. Pri KS so odsotni ali le delno razviti olfaktorni bulbosi, zaradi česar bolnik delno ali ne zaznava vonja.

Za podrobnejšo opredelitev prirojenega HH se ob pregledu anamneze vseh družinskih članov opravijo tudi usmerjene genetske preiskave z namenom opredelitve genetskega vzroka bolezni (3, 11, 24).

1.2.1.3 Molekularna genetika

Pomanjkanje GnRH nastane kot posledica sprememb v različnih genih, ki kodirajo proteine, udeležene v razvoj in migracijo GnRH-nevronov, v uravnavanje izločanja GnRH iz hipotalamusa ali v delovanje GnRH na adenohipofizo (*Preglednici II. in III.*).

Prirojeni HH se v 60 % pojavlja sporadično, kar pomeni, da bolniki nimajo pozitivne družinske anamneze. V preostalih 40 % se lahko deduje vezano na X-kromosom, avtosomno recesivno (AR) ali avtosomno dominantno (AD) (25, 26).

Vzročne spremembe v genih, povezanih z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije, so bile opredeljene pri približno polovici bolnikov s HH (27). Med njimi je pri veliki večini (80 %) izvor bolezni monogenetski, kar pomeni, da je za razvoj bolezni dovolj okvara v enem genu. Pri preostalih bolnikih (20 %) so bile opredeljene vzročne spremembe v več genih hkrati, kar se imenuje digensko ali oligogensko dedovanje. Spremembe v dveh ali več različnih genih povzročijo težjo klinično sliko (23, 28-30).

Preglednica II. Lastnosti genov in proteinov, ki jih kodirajo geni, povezani z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije (AD – avtosomno dominantno, AR – avtosomno recesivno, KS – Kallmannov sindrom, nHH – normozmični prirojeni hipogonadotropni hipogonadizem) (27, 31-40).

Gen	Lega	Dedovanje	Fenotip	Protein	Vloga proteina v HHGS
<i>KAL1</i> (<i>ANOS1</i>)	Xp22.3	X-vezano, oligogensko	KS	Anozmin 1	Razvoj in migracija GnRH- nevronov
<i>FGF8</i>	10q24	AD	KS, nHH	Fibroblastni rastni faktor 8	
<i>FGFR1</i>	8p11.2	AD	KS, nHH	Receptor fibroblastnega rastnega faktorja 1	
<i>PROK2</i>	3p13	AD, AR	KS, nHH	Prokineticin 2	
<i>PROKR2</i>	20p12.3	AD, AR	KS, nHH	Receptor za prokineticin 2	
<i>CHD7</i>	8q12	AD	Sindrom CHARGE, KS, nHH	DNA vezni protein helikazne kromodomene 7	
<i>NELF</i> (<i>NSMF</i>)	9q34.3	AD, di/oligogensko	KS, nHH	Nazalni embrionski faktor LHRH	
<i>HS6ST1</i>	2q14.3	AD, di/oligogensko	KS, nHH	Heparan sulfat 6-O-sulfotransferaza 1	
<i>SEMA3A</i>	7p12.11	AD, di/oligogensko	KS	Semaforin 3A	
<i>AXL</i>	19q13.2	AD	nHH, KS	Protein-tirozin-kinazni receptor UFO	
<i>TSHZ1</i>	18q.22.3	AD	KS	Homolog 1 proteina "teashirt"	
<i>WDR11</i>	10q26	AD	KS, nHH	WD ponovitevsebujoči protein 11	
<i>SOX10</i>	22q13.1	AD	Waardenburgov sindrom, KS	Transkripcijski faktor SOX10	

Preglednica III. Nadaljevanje Preglednice II.

Gen	Lega	Dedovanje	Fenotip	Protein	Vloga proteina v HHGS
<i>TAC3</i>	12q13.3	AR	nHH	Nevrokinin B	Uravnavanje GnRH izločanja iz GnRH-nevronov v hipotalamusu
<i>TACR3</i>	4q24	AR	nHH	Receptor za nevrokinin B	
<i>KISS1</i>	1q32	AR	nHH	Kispeptin 1	
<i>KISS1R</i>	19p13.3	AR	nHH	Receptor za kispeptin 1	
<i>LEP</i>	7q32.1	AR	nHH	Leptin	
<i>LEPR</i>	1p31.3	AR	nHH	Receptor za leptin	
<i>GNRHI</i>	8p21.2	AR	nHH	Gonadoliberin	Delovanje GnRH na adenohipofizo
<i>GNRHR</i>	4q13.2	AR	nHH, KS	Receptor gonadoliberina	
<i>Kandidatni geni</i>					
<i>SOX2</i>	3q26.33	AD	Mikroftalmija, hipoplazija vidnega živca in motnje centralnega živčnega sistema, nHH	Transkripcijski faktor SOX-2	Neznano
<i>HESX1</i>	3p14.3	AD	Septooptična displazija, izolirano pomanjkanje rastnega hormona, kombinirano pomanjkanje hipofiznih hormonov, KS	Homeodomena, ki se izraža v ES celicah	
<i>NROB1</i>	X21.2	X – vezano	Prirojena adrenalna hipoplazija s HH, nHH	Podružina 0 jedrnega receptorja, skupina B številka	

1.2.1.4 Zdravljenje

Pri dečkih, ki se rodijo s kriptorhizmom, je priporočen operativni poseg v drugi polovici prvega leta življenja. Z operacijo se postavi testise v možnjo, kjer je optimalna temperatura za nastanek in dozorevanje spermijev (41).

Cilj zdravljenja bolnikov s prirojenim HH je odpraviti hipogonadizem ter neplodnost. Hipogonadizem se zdravi s hormonskim nadomestnim zdravljenjem z androgeni, neplodnost pa z večmesečno terapijo z nadomeščanjem gonadotropinov ali GnRH (3, 42).

Z nadomestnim hormonskim zdravljenjem z androgeni (testosteron za dečke, kombinacija estradiola in progesterona za deklice) se pri mladostniku doseže popoln razvoj pubertete in sistemsko delovanje, predvsem na kosti. S tem se prepreči zmanjševanje kostne gostote. Pri dečkih se testosteron nadomešča intramuskularno, najpogosteje v obliki estrov testosterona (undekanoat, enantat, cipionat) ali transdermalno kot 1 % testosteronski gel. Pri deklicah se za normalen razvoj pubertete in povečanje kostne gostote uporablja estrogen, po zaključku pubertete pa kombinacija estrogena in progesterona v obliki peroralnih pripravkov ali obližev (3, 31, 42-44).

Odraslemu moškemu se za stimulacijo spermatogeneze in rast testisov, odrasli ženski pa za razvoj jajčnih foliklov, intravensko injicirajo gonadotropini. Najpogosteje je to hCG ali kombinacija hCG bodisi z rekombinantnim FSH (rFSH) ali humanim menopavzalnim gonadotropinom (hMG). Poleg gonadotropinov se lahko nadomešča tudi GnRH, kjer se pod kožo namestijo GnRH pulzirajoče črpalke. Pulzirajoče izločen GnRH posnema normalno izločanje GnRH iz hiptalamusa in delovanje HHGS (42-44).

1.3 SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (angl. *Next Generation Sequencing*)

Visokozmogljive sekvenciranja naslednje generacije (NGS) omogočajo masovno in paralelno (vzporedno) določitev nukleotidnega zaporedja odsekov DNA. Vsak delovni postopek je sestavljen iz priprave knjižnice DNA, ki ji sledi namnožitev in nastanek prostorsko ločenih odsekov DNA s premostitvenim ali emulizijskim PCR ter na koncu določanje nukleotidnega zaporedja na sekvenatorju naslednje generacije. Obstajajo številne NGS platforme in inštrumenti različnih proizvajalcev (Roche (454) (Basel, Švica), Life Technologies (San Diego, CA, ZDA), Illumina (San Diego, CA, ZDA)) (45-48), ki temeljijo na uporabi različnih načinov namnožitve klonov in sekvenciranja.

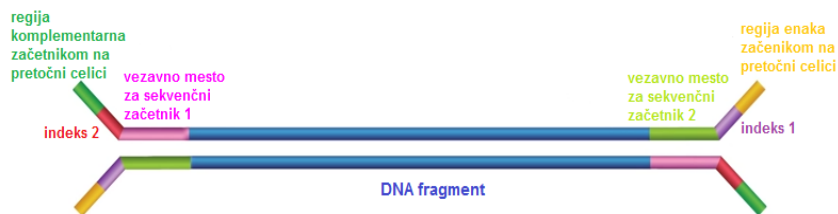
1.3.1 SEKVENATOR NASLEDNJE GENERACIJE MiSeq

Sekvenator naslednje generacije MiSeq proizvajalca Illumina (San Diego, CA, ZDA) omogoča hitro in enostavno določanje nukleotidnega zaporedja tarčnih genov in RNA, krajših zaporedij v genomu, metagenomov (16S rRNA), genoma *de novo*, amplikonov in tipizacijo človeškega levkocitnega antigena (HLA) (49).

Pred sekvenciranjem na aparatu MiSeq se pripravi knjižnica DNA, nato v sekvenatorju na pretočni celici avtomatsko poteče pomnoževanje odsekov DNA s premostitvenim PCR (angl. *Bridge amplification*), sekvenciranje s sintezo (angl. *Sequencing by synthesis*) in analiza pridobljenih podatkov, na koncu sledi še vizualizacija genetskih sprememb in interpretacija rezultatov (49).

1.3.1.1 Priprava DNA-knjižnice

Cilj priprave knjižnice DNA je pridobiti čisto, kvalitetno, z indeksnimi oligonukleotidi označeno knjižnico DNA (Slika 1). Genomska DNA se najprej fragmentira in na vsak konec odseka DNA se ligirata označevalna adapterja (angl. *tagmentation*). Sledi označevanje knjižnice DNA z indeksnimi oligonukleotidi, kateri se med reakcijo PCR vežejo na adapterje odseka DNA. Indeksni oligonukleotidi so sestavljeni iz nukleotidnega zaporedja komplementarnega adapterju in sekvenčnemu oligonukleotidnemu začetniku, indeksa ter regije komplementarne oligonukleotidnim začetnikom na pretočni celici. Indeksi so unikatna zaporedja s pomočjo katerih sekvenator znotraj več združenih knjižnic DNA prepozna in sestavi celotno nukleotidno zaporedje posameznih knjižnic DNA ter identificira, kateremu preiskovancu pripada določeno zaporedje. Reakciji PCR sledi združevanje več knjižnic DNA, hibridizacija z biotiniliranimi sondami in izolacija obogatene knjižnice DNA. Med posameznimi koraki se DNA očisti, na koncu postopka pa se preveri še njena čistost in koncentracija (49).



Slika 1: Dvojno označena knjižnica DNA (prirejeno po 49).

1.3.1.2 Premostitveni PCR (angl. *Bridge amplification*)

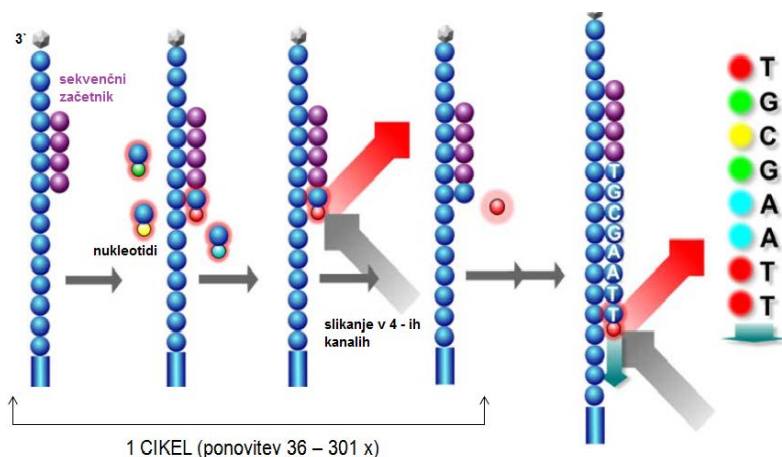
Na celotno površino pretočne celice sta v številnih kopijah s 5' - koncem vezana dva različna oligonukleotidna začetnika, ki sta komplementarna delu indeksnega oligonukleotida, s katerim je označena knjižnica DNA.

Posamezni odseki DNA iz knjižnice se s koncem indeksnega oligonukleotida povežejo s komplementarnim oligonukleotidnim začetnikom na površini pretočne celice. Polimeraza sintetizira novo verigo, dvojnoverižna DNA se nato denaturira in matrica se izpere. Novo nastala veriga DNA se klonsko pomnoži s premostitvenim PCR. V tem procesu se veriga DNA v obliki mostu s prostim indeksnim oligonukleotidom poveže z drugim oligonukleotidnim začetnikom na pretočni celici. Polimeraza tvori most dvojnoverižne DNA, ki se v naslednjem koraku denaturira. Nastaneta kopiji enoverižne DNA (smerna in protismerna veriga DNA), ki sta kovalentno vezani na pretočno celico. Premostitveni PCR in denaturacija dvojnoverižnih DNA mostov se ponavljata dokler, se na površini pretočne celice ne tvorijo milijoni skupkov DNA (angl. *DNA clusters*), ki so sestavljeni iz približno 1000 enakih kopij posameznega odseka DNA iz DNA-knjižnice. Po pomnoževanju se iz pretočne celice izpere vse protismerno pomnožene verige DNA (angl. *Reverse strands*) in blokira 3' - konce verig DNA ter oligonukleotidne začetnike, ki so vezani na pretočno celico (49).

1.3.1.3 Sekvenciranje s sintezo, proizvajalca Illumina

Sekvenciranje s sintezo (Illumina) poteka kontinuirano v ciklih (Slika 2). Sekvenčni oligonukleotidni začetnik se veže na del indeksnega oligonukleotida, ki označuje verigo

DNA. V vsakem ciklu se hkrati uporabi zmes štirih posebno oblikovanih nukleotidov in polimeraza. Nukleotidi imajo na 3' položaju vezano terminirajočo skupino, zaradi katere se prekine podaljševanje polinukleotidne verige in reverzibilno vezano po eno od štirih fluorescentnih barvil. Ko polimeraza vključi komplementarni nukleotid, se sinteza verige ustavi in začne se zajemati slika v štirih kanalih. Vsak cikel se zaključi z odstranitvijo fluorescenčnega barvila in terminirajoče skupine (49, 50).



Slika 2: Slikovni prikaz določanja nukleotidnega zaporedja, proizvajalca Illumina (sekvenciranje s sintezo z uporabo zmesi štirih modificiranih nukleotidov in polimeraze) (prirejeno po 49).

1.3.1.4 Sekvenciranje z obeh koncev knjižnice DNA

Pri določanju nukleotidnega zaporedja iz obeh koncev knjižnice DNA (angl. *paired-end sequencing*) se vedno najprej določi nukleotidno zaporedje verig DNA v smeri 5' proti 3' (smerno), nato se s pomočjo sekvenčnih indeksnih oligonukleotidnih začetnikov določi še nukleotidno zaporedje obeh indeksov in na koncu sledi še določanje nukleotidnega zaporedja verig DNA v obratni smeri 3' proti 5' koncu verige DNA (protismerno). Sekvenciranje poteka po principu določanja nukleotidnega zaporedja s sintezo z uporabo zmesi štirih modificiranih nukleotidov (49).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Kljub temu, da se prirojeni HH pojavlja redko, 1 do 10 bolnikov na 100.000 rojstev, ga ne smemo zapostavljati (15). Preiskava genov, ki so povezani z razvojem prirojenega HH z normalnim občutkom za vonj in KS, ima ključno vlogo pri dokončni postavitvi diagnoze bolezni. Uporaba tehnologije NGS v rutinski genetski diagnostiki omogoča hitrejše, cenejše in enostavnejše pridobivanje genetskih informacij kot do sedaj uporabljeno sekvenciranje po Sangerju. Za bolnike s klinično diagnozo HH je ključnega pomena pravočasno odkritje vzroka bolezni. S tem se bolnikom že v mladosti omogoči normalen razvoj sekundarnih spolnih značilnosti, odraslim pa pravočasno zdravljenje neplodnosti in normalno psihično ter telesno funkcionalnost.

Namen raziskovalnega dela je pri preiskovancih s HH, s sekvenciranjem naslednje generacije in potrditvenim sekvenciranjem po Sangerju, opredeliti vzročne spremembe v genih, povezanih z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije.

Namen dela bomo dosegli po sledečih stopnjah:

- Za preiskovance s klinično diagnozo HH in/ali pozno puberteto bomo pripravili kvalitetno knjižnico DNA ter s tehnologijo NGS opredelili vzročne spremembe v kodirajočih regijah ter eksonsko-intronskih mejah 24-ih genov, povezanih z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije (*KAL1, AXL, CHD7, KISS1, KISS1R, LEPR, PROK2, SOX10, TACR3, FGF8, FGFR1, GNRH1, GNRHR, NSMF, PROKR2, SOX2, TSHZ1, HESX1, HS6ST1, LEP, NROB1, SEMA3A, TAC3, WDR11*).
- Kadar bo horizontalna pokritost (povprečno število odčitkov 4800 genov) posameznega eksperimenta manjša ali enaka 30, bomo NGS še enkrat ponovili, rezultate obeh izvedb bomo združili in podatke ponovno analizirali.
- Kodirajočim predelom genov, kjer bomo z NGS opredelili vzročne spremembe, bomo s sekvenciranjem po Sangerju določili nukleotidno zaporedje in s tem potrdili prisotnost genetske spremembe.

- Pri preiskovancih, ki jim z NGS v izbranih genih ne bomo opredelili vzročne spremembe, bomo s spletnim orodjem Galaxy (51) preverili vertikalno pokritost po posameznih genih (število odčitkov posameznih tarčnih odsekov DNA). Kodirajočim predelom genov, ki bodo pokriti manj kot 10-krat, bomo naknadno s Sangerjevo metodo določili nukleotidno zaporedje.
- Rezultati genetske analize bodo osnova za dokončno potrditev klinične diagnoze HH pri preiskovancih.

Hipoteze

- S sekvenciranjem naslednje generacije in potrditveno Sangerjevo reakcijo je mogoče opredeliti genetsko ozadje prirojenega HH z ali brez anozmije in s tem dokončno potrditi klinično diagnozo HH.
- V populaciji bolnikov s HH v genih, povezanih z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije, pričakujemo prisotnost genetskih sprememb, ki do sedaj v literaturi še niso bile opisane.
- Delež preiskovancev z vzročnimi spremembami v genih, povezanih z razvojem HH z ali brez anozmije in opredeljenimi s tehnologijo NGS, je primerljiv deležu opisanem v literaturi.

3 PREISKOVANCI IN METODE

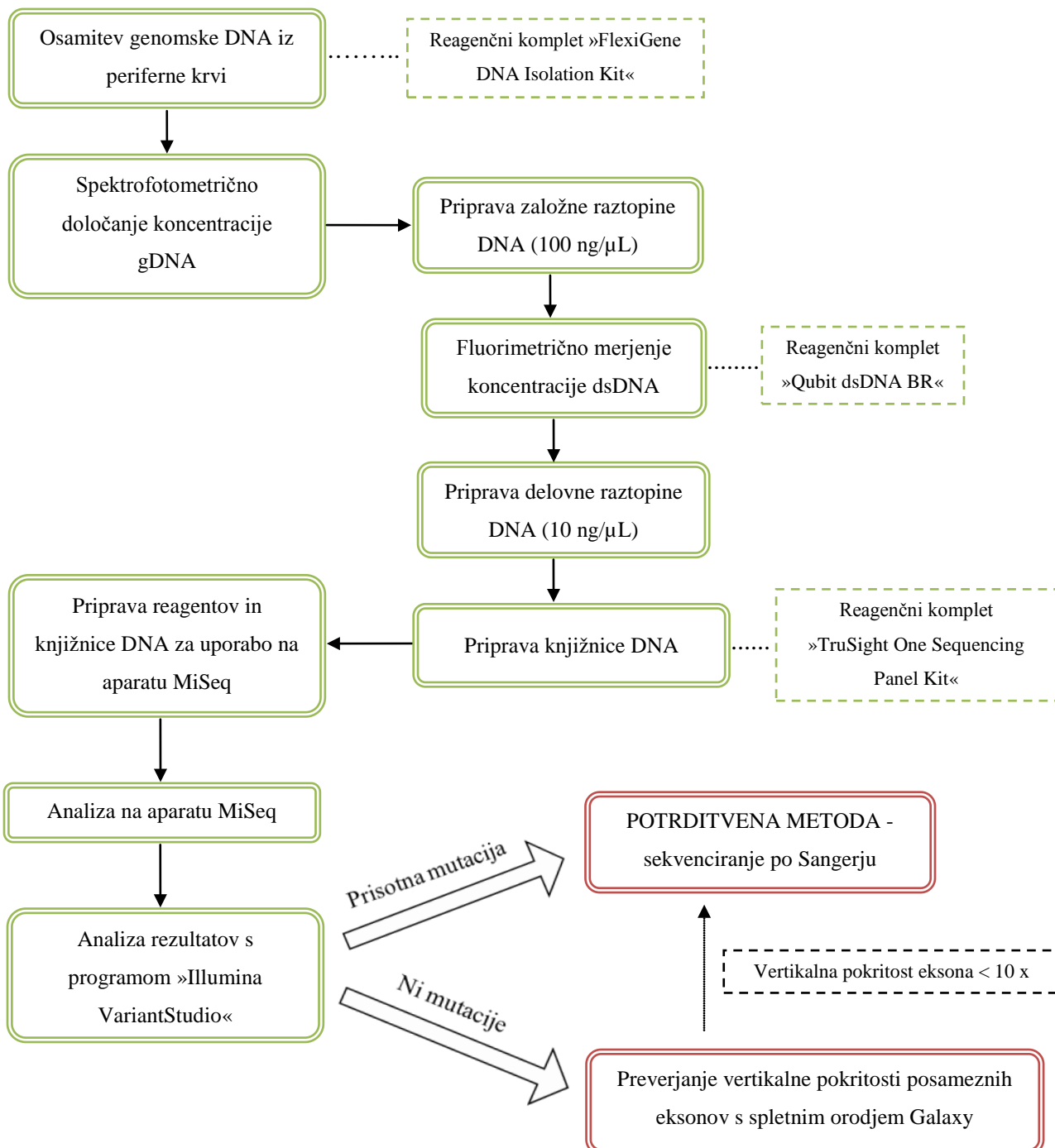
3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 12 preiskovancev s klinično diagnozo HH, enajst moških in eno žensko, ki so prihajali iz 12 družin. Med preiskovanci je bilo enajst Slovencev in en Slovak, starih med 16 in 67 let. Slovenski mladostniki so bili zaradi prisotnih kliničnih simptomov HH ali odsotne pubertete vodeni in zdravljeni na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, medtem ko so bili odrasli vodeni ter zdravljeni na Interni kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Preiskovanci oziroma starši mladoletnih preiskovancev so bili seznanjeni z namenom in potekom raziskave. Vsi so podpisali pisni pristanek.

Raziskava je bila odobrena s strani Komisije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje (številka odobritve: 29/06/14).

3.2 METODE

Za enostavnejše laboratorijsko delo smo oblikovali shemo poteka dela (Slika 3).



Slika 3: Shema poteka laboratorijskega dela (gDNA – genomska DNA, dsDNA – dvojnoverižna DNA).

3.2.1 OSAMITEV GENOMSKE DNA IZ PERIFERNE KRV

Reagenti in raztopine

- Komercialno dostopen reagenčni komplet FlexiGene DNA (Qiagen), 100 % izopropanol in 70 % etanol

Inštrumenti in materiali

- Sterilne mikrocentrifugirne epruvete (1,5 mL), centrifugirke (50 mL), pipete (10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L), sterilni nastavki za pipete
- Centrifuga, vibracijski mešalnik

Delovni postopek

Osamitev gDNA iz periferne krvi smo izvedli z reagenčnim kompletom FlexiGene DNA (Qiagen) po predpisanih navodilih, podanih s strani proizvajalca navedenega kompleta (52).

3.2.2 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOČE DNA

Reagenti in raztopine

- Destilirana voda, vzorec - izolirana DNA

Inštrumenti in materiali

- Sterilne mikrocentrifugirne epruvete (1,5 mL), pipete (10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L), sterilni nastavki za pipete, mikrokvarčna kiveta (10 mm)
- Spektrofotometer (Lambda 25, Perkin Elmer, Massachusetts, ZDA)

Delovni postopek

Koncentracijo in čistost izolirane gDNA smo merili spektrofotometrično z aparatom Lambda 25 (Perkin Elmer, Massachusetts, ZDA) pri dveh valovnih dolžinah, 260 nm in

280 nm. Baze v DNA imajo največjo absorbcijo ultravijolične (UV) svetlobe pri 260 nm (A_{260}), zato velja med izmerjeno absorbanco in količino DNA v raztopini premo sorazmeren odnos. Večina proteinov absorbira največ UV svetlobe pri valovni dolžini 280 nm (A_{280}). Iz razmerja med obema absorbancama A_{260}/A_{280} smo ocenili čistost izolirane DNA oziroma stopnjo kontaminacije DNA vzorca s proteini. Za nadaljnjo molekularno genetsko analizo smo uporabili le vzorce s koncentracijo DNA vsaj 50 $\mu\text{g/mL}$ in razmerjem A_{260}/A_{280} med 1,7 in 2,0.

3.2.3 FLUORIMETRIČNO MERJENJE KONCENTRACIJE DNA

Iz vsakega vzorca smo pripravili založno raztopino s koncentracijo DNA 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, fluorimetrično izmerili njeno koncentracijo in iz založne raztopine pripravili delovno raztopino s koncentracijo DNA 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Reagenti in raztopine

- Komercialno dostopen reagenčni komplet Qubit dsDNA BR (Life Technologies, San Diego, CA, ZDA)
- Vzorec – založna raztopina s koncentracijo DNA 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$

Inštrumenti in materiali

- Sterilne mikrocentrifugirne epruvete (1,5 mL), posebno tanke in čiste PCR-mikrocentrifugirne epruvete (0,5 mL, Invitrogen, Life Technologies, San Diego, CA, ZDA), pipete (10 μL , 200 μL), sterilni nastavki za pipetiranje
- Vibracijski mešalnik, mikrocentrifuga, fluorimeter Qubit 2.0 (Life Technologies, San Diego, CA, ZDA)

Delovni postopek

Z reagenčnim kompletom Qubit dsDNA BR (Life Technologies) smo s fluorimetrom Qubit 2.0 (Life Technologies) izmerili koncentracijo dvojnoverižne DNA (dsDNA) v založni raztopini. Naveden komplet vsebuje fluorescentno barvilo, ki se vrine v dsDNA

(interkalator) in fluorescira. Intenziteta fluorescenčne svetlobe interkalarnega barvila je sorazmerna s koncentracijo dsDNA. Pripravo raztopin in merjenje koncentracije dsDNA smo izvedli z navedenim reagenčnim kompletom po natančnih navodilih, podanih s strani proizvajalca Life Technologies (53).

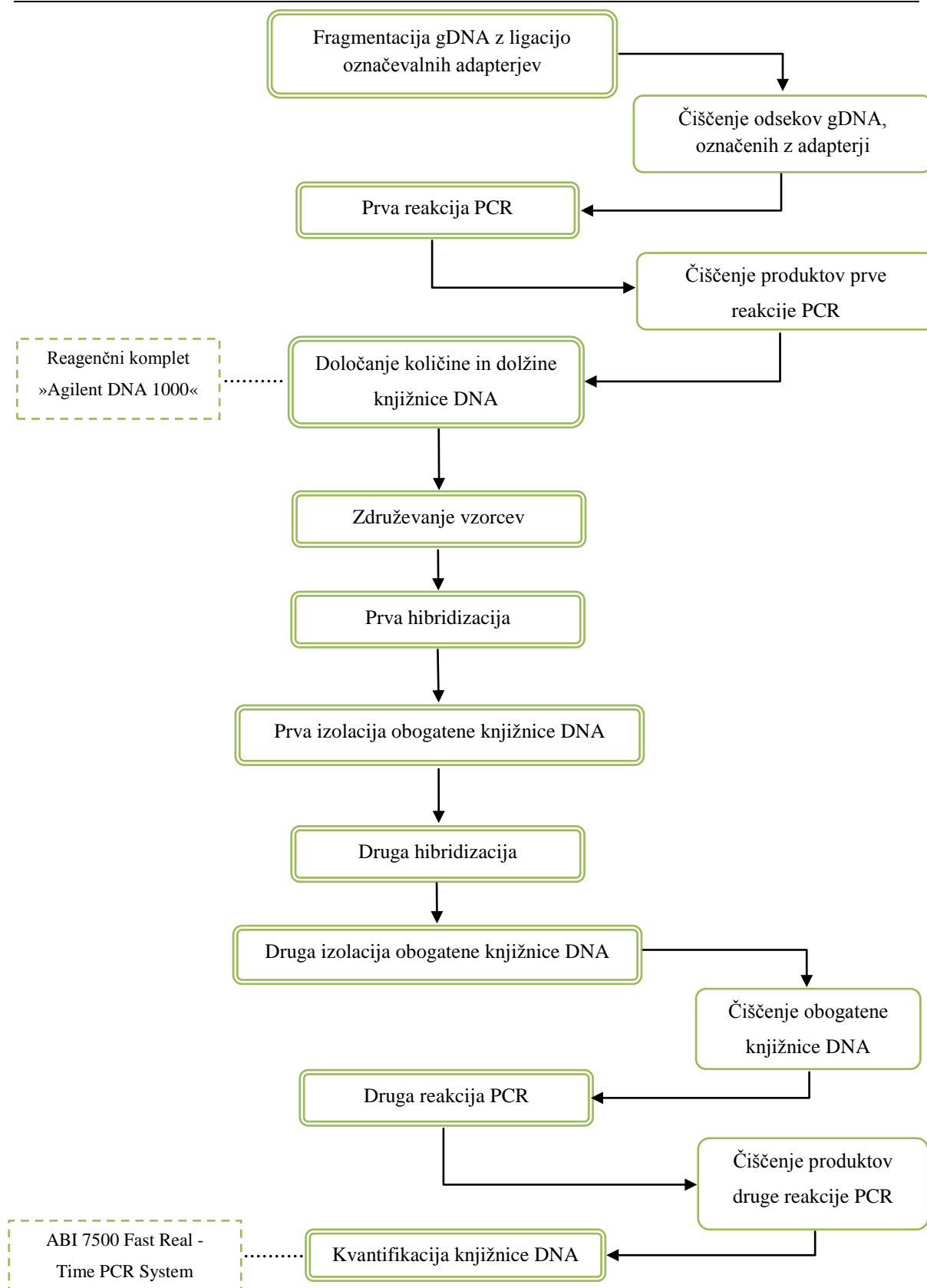
3.2.4 PRIPRAVA DNA-KNJIŽNICE

Knjižnico DNA smo pripravili po navodilih proizvajalca, uporabili smo komercialno dostopen komplet reagentov TruSight One Sequencing Panel Kit (Illumina, San Diego, CA, ZDA) (54). Slednji omogoča pripravo kvalitetne knjižnice DNA in določitev nukleotidnega zaporedja več kot 4800 genov (okvirno 62.000 eksonov), povezanih z razvojem različnih bolezni. Med temi geni je 24 genov, ki so povezani z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije.

Inštrumenti in materiali

- Sterilne mikrocentrifugirne epruvete (1,5 mL), reakcijske epruvete (200 µL) in pripadajoči pokrovčki, nosilci za vzorce in podstavki za nosilce vzorcev, pipete (2 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000µL), sterilni nastavki za pipetiranje, reakcijska ploščica z 96 vdolbinicami, MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- Vibracijski mešalnik, mikrocentrifuga, magnetno stojalo, aparat za PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), evaporator, bioanalizator Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA), ABI 7500 Fast Real - Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)

Celotno pripravo knjižnice DNA smo si poenostavili z oblikovanjem delovne sheme, ki je prikazana na Sliki 4.



Slika 4: Shema priprave knjižnice DNA (54).

3.2.4.1 Fragmentacija genomske DNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. *tagmentation*)

Reagenti in raztopine

- Kroglice za čiščenje vzorca (angl. *Sample Purification Beads*), pufer za ustavitev fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. *Stop Tagment Buffer*), pufer za fragmentacijo gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. *Tagment DNA Buffer*), encim 1 za fragmentacijo gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. *Tagment DNA Enzyme 1*), voda primerna za reakcijo PCR, vzorec – DNA (5 ng/μL)

Delovni postopek

Reakcijsko mešanico za fragmentacijo gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev smo pripravili v 200 μL reakcijski epruveti, v katero smo dodali 15 μL vode primerne za reakcijo PCR, 25 μL pufera za fragmentacijo gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev, 5 μL delovne raztopine z 10 ng/μL DNA in 5 μL encima 1 za fragmentacijo gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev, jo premešali, centrifugirali 1 minuto pri 280 g in inkubirali 10 minut na 58 °C. Po 10-ih minutah smo fragmentacijo gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. *tagmentation*) takoj ustavili z dodatkom 15 μL pufera za ustavitev fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev. Po 4 minutni inkubaciji je sledilo čiščenje odsekov gDNA, označenih z adapterji.

3.2.4.2 Čiščenje produktov fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev, čiščenje PCR produktov in obogatene knjižnice DNA

Reagenti in raztopine

- Pufer za ponovno suspendiranje – RBS (angl. *Resuspension Buffer*), magnetne kroglice za čiščenje vzorca – SPB (angl. *Sample Purification Beads*), 80 % etanol, vzorec – produkt fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev ali produkt prve reakcije PCR ali obogatena knjižnica DNA ali produkt druge reakcije PCR

Delovni postopek

Čiščenje produktov fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev, čiščenje produktov primarne in sekundarne reakcije PCR ter čiščenje obogatene knjižnice DNA poteka po enakem delovnem postopku. Razlikujejo se le po količinah določenega reagenta in inkubacijskem času. Podatki o volumnih reagentov in inkubacijskih časih posamezne stopnje priprave knjižnice DNA so zbrani v *Preglednici IV*.

Čiščenje smo začeli s prenosom celotnega vzorca v 1,5 mL sterilno mikrocentrifugirno epruveto, dodali X_1 μ L dobro premešanih magnetnih kroglic za čiščenje vzorca, premešali, centrifugirali nekaj sekund in inkubirali Y minut pri sobni temperaturi. Nato smo epruveto postavili na magnet in po 2 minutni inkubaciji odstranili supernatant. Kroglice smo spirali z 200 μ L 80 % etanola, ga po 30 sekundah odstranili in postopek spiranja še enkrat ponovili. Ko so se kroglice po desetih minutah posušile, smo mikrocentrifugirno epruveto odstranili iz magneta, kroglice polili z X_2 μ L pufera za ponovno suspendiranje, premešali, centrifugirali nekaj sekund in inkubirali 2 minuti. Nato smo epruveto ponovno postavili na magnet in po 2 minutah prenesli X_3 μ L čistega supernatanta v 200 μ L reakcijsko epruveto.

Po čiščenju produktov fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev (angl. *tagmentation*) smo nadaljevali s prvo reakcijo PCR, po čiščenju produktov prve reakcije PCR s prvo hibridizacijo in po čiščenju obogatene knjižnice DNA z drugo reakcijo PCR. Očiščenim produktom druge reakcije PCR smo s PCR v realnem času (qPCR) izmerili koncentracijo DNA v vzorcu.

Preglednica IV. Količine in inkubacijski časi čiščenja produktov fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev, produkta 1. in 2. reakcije PCR ali obogatene knjižnice DNA (SPB – magnetne kroglice za čiščenje vzorca, RBS – pufer za ponovno suspendiranje) (54).

Vrsta vzorca	Volumni (μ L)			Inkubacijski čas 1 (min) (Y)
	SPB (X ₁)	RBS (X ₂)	Supernatant (X ₃)	
Produkti fragmentacije gDNA z ligacijo označevalnih adapterjev	65	22,5	20	8
Produkti 1. reakcije PCR	90	27,5	25	10
Obogatena knjižnica DNA	45	27,5	25	10
Produkti 2. reakcije PCR	90	32,5	30	10

3.2.4.3 Prva reakcija PCR

Reagenti in raztopine

- Indeksni oligonukleotid 1 – i7 (N701, N705, N709) (angl. *Index 1 primers*), indeksni oligonukleotid 2 – i5 (E503, E504) (angl. *Index 2 primers*), PCR reakcijska zmes Nextera (angl. *Nextera Library Amplification Mix*), vzorec – očiščeni odseki gDNA, ligirani z označevalnimi adapterji

Delovni postopek

V prvi reakciji PCR smo pomnožili odseke gDNA, ki so bili ligirani z označevalnimi adapterji in jih označili z indeksnimi oligonukleotidi. Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo očiščenim odsekom gDNA, ligiranimi z adapterji dodali 5 µL dobro premešanega indeksnega oligonukleotida i7 (N7xx), 5 µL indeksnega oligonukleotida i5 (E5xx) in 20 µL PCR reakcijske zmesi Nextera. V *Preglednici V.* so prikazane kombinacije indeksnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za označevanje 6 različnih knjižnic DNA, katere smo v nadaljevanju združili.

Tako pripravljene vzorce smo pomnožili na aparatu GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

- 72 °C / 3 min
- 98 °C / 30 s
- 10 ciklov: 98 °C / 10 s; 60 °C / 30 s; 72 °C / 30 s
- 72 °C / 5 min
- hlajenje reakcijske mešanice na 10 °C

Preglednica V. Kombinacije indeksnih oligonukleotidov s katerimi smo med 1. reakcijo PCR označili knjižnice DNA.

Pacient	Indeksni oligonukleotidi	
	i7	i5
1.	N701	E503
2.	N705	E503
3.	N709	E503
4.	N701	E504
5.	N705	E504
6.	N709	E504

3.2.4.4 Določanje količine in dolžine knjižnice DNA na bioanalizatorju Agilent 2100

Reagenti in raztopine

- Reagenčni komplet Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA)¹
- Vzorec – knjižnica DNA

Delovni postopek

Na bioanalizatorju Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) smo po natančnih navodilih proizvajalca določili koncentracijo in dolžino knjižnice DNA (55). Za analizo smo uporabili komercialno dostopen reagenčni komplet Agilent 1000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). Na čipu Agilent 1000 bioanalizator elektroforetsko loči odseke DNA na 5 bp natančno, izmeri koncentracijo odsekov DNA v intervalnem območju 0,1 ng/ μ L - 50 ng/ μ L in dolžino odsekov DNA 25 bp - 1000 bp (56).

Aparat je podal rezultate v obliki kromatograma in fotografije agarozne elektroforeze. S programom 2100 Expert (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) smo ročno ovrednotili količino odsekov DNA porazdeljenih v velikostnem razredu 300-1000 bp in vizualno ocenili obliko kromatograma. Za pripravo kvalitetne knjižnice DNA je pomembnejša primerna porazdelitev odsekov DNA, kot pa oblika kromatograma.

3.2.4.5 Združevanje vzorcev v eno frakcijo

Delovni postopek

Združili smo šest knjižnic DNA, ki smo jih predhodno med prvo PCR reakcijo označili z različnimi kombinacijami indeksnih oligonukleotidov. Po *Enačbi 1* smo izračunali posamezne količine knjižnic DNA, katere smo natančno prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto. V izračunu smo upoštevali priporočilo, da je masa posamezne knjižnice v združenem vzorcu 500 ng. Prav tako smo upoštevali tudi proizvajalčevo priporočilo, ki pravi, da mora biti volumen združenega vzorca enaka 40 μ L.

¹Komponente reagenčnega kompleta Agilent 1000 vsebujejo DMSO, zato z njimi ravnamo izredno previdno.

Ob preseženem volumnu smo iz združenega vzorca z evaporatorjem izhlapeli RBS pufer, v nasprotnem primeru smo ga dodali do zapolnjenega volumna 40 µL.

Enačba 1: Izračun količine posameznih knjižnic DNA, ki jih bomo v nadaljevanju združili (54).

$$V (\text{volumen posamezne knjižnice DNA}) = \frac{\text{masa posamezne knjižnice DNA (500 ng)}}{\text{koncentracija knjižnice DNA } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)}$$

3.2.4.6 Prva in druga hibridizacija tarčnih odsekov DNA z biotiniliranimi sondami

Reagenti in raztopine

- Oligonukleotidne sonde označene z biotinom (angl. *TruSight One Oligos*), hibridizacijski pufer za obogatitev knjižnice DNA (angl. *Enrichment Hybridization Buffer*), RBS – uporabljen samo za drugo hibridizacijo, vzorec – združen vzorec šestih DNA knjižnic

Delovni postopek

Med hibridizacijo so se tarčni odseki DNA komplementarno povezali s sondami, označenimi z biotinom. Nastali so hibridi sonda – odsek DNA.

Postopek prve in druge hibridizacije smo združili, saj sta se razlikovala le v zaključni inkubaciji. Reakcijsko mešanico smo pripravili v 200 µL mikrocentrifugirni epruveti, v katero smo dodali 40 µL združenega vzorca, 50 µL hibridizacijskega pufera za obogatitev knjižnice DNA in 10 µL mešanice oligonukleotidnih sond, označenih z biotinom. Vse skupaj smo dobro premešali in izvedli hibridizacijo na aparatu PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), pod sledečimi temperaturnimi pogoji:

- 95 °C / 10 min
- 18 inkubacij po 1 minuto: Začeli smo pri 94 °C, nato smo z vsako naslednjo inkubacijo (vsako minuto) zmanjševali temperaturo za 2 °C do temperature 58 °C.

- Zaključna inkubacija:
 - Med **prvo** hibridizacijo smo vzdrževali temperaturo na 58 °C od 90 minut do največ 24 ur.
 - Med **drugo** hibridizacijo smo vzdrževali temperaturo na 58 °C od 14,5 ur do največ 24 ur.

S hibridizacijo smo v reakcijski mešanici pridobili obogateno knjižnico DNA (mešanico bogato s tarčnimi, specifičnimi odseki DNA). Vendar so poleg specifičnega produkta nastali tudi nespecifični, ki smo jih v naslednjem koraku odstranili.

3.2.4.7 Prva in druga izolacija obogatene DNA-knjižnice

Reagenti in raztopine

- 2 M NaOH, pufer 2 za elucijo tarčne DNA (angl. *Elute Target Buffer 2*), pufer 1 za elucijo tarčnih odsekov DNA (angl. *Enrichment Elution Buffer 1*), raztopina za čiščenje obogatene knjižnice DNA (angl. *Enrichment Wash Solution*), streptavidinske magnetne kroglice (angl. *Streptavidin Magnetic Beads*), vzorec – produkt prve ali druge hibridizacije (specifični in nespecifični)

Delovni postopek

Od obogatene knjižnice DNA smo v treh korakih odstranili nespecifične produkte, ki so nastali med hibridizacijo. V prvem koraku smo na streptavidinske magnetne kroglice preko biotina vezali hibride. Nato smo z inkubacijo pri povišani temperaturi iz kroglic odstranili vse nespecifično vezane produkte. V zadnjem koraku smo iz magnetnih kroglic sprali tarčne odseke DNA. Dobili smo knjižnico DNA obogateno s tarčnimi odseki.

3.2.4.7.1 Vezava hibridov na streptavidinske magnetne kroglice

V 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto smo k 250 µL dobro premešanim streptavidinskim magnetnim kroglicam dodali ves produkt hibridizacije in stresali 5 minut na sobni temperaturi na stresalniku pri 1400 rpm. Sledila je 25 minutna inkubacija na sobni temperaturi. V tem koraku so se na streptavidinske magnetne kroglice preko biotina vezali

tako specifični kot tudi nespecifični produkti hibridizacije. Po inkubaciji smo mešanico predstavili za 2 minuti na magnet, odstranili supernatant in postavili mikrocentrifugirko iz magneta. Temu koraku je sledilo odstranjevanje nečistoč (nespecifičnih produktov) iz streptavidinskih magnetnih kroglic.

3.2.4.7.2 Odstranjevanje nečistoč iz streptavidinskih magnetnih kroglic

Streptavidinske magnetne kroglice na katere so se vezali produkti hibridizacije, smo prelili z 200 μL raztopine za čiščenje obogatene knjižnice DNA. Nato smo resuspendirali vzorec tako, da smo v tips večkrat potegnili raztopino in jo spustili po kroglicah. Sledilo je 30 minutno stresanje na 50 $^{\circ}\text{C}$ pri 300 rpm. Na magnetne kroglice so ostali vezani le specifični produkti hibridizacije (tarčni odseki DNA povezani z biotiniliranimi sondami). Po inkubaciji smo mikrocentrifugirko takoj postavili za 2 minuti na magnet, hitro odstranili supernatant z nespecifičnimi produkti, mikrocentrifugirko postavili iz magneta in postopek čiščenja ponovili.

3.2.4.7.3 Izpiranje obogatene DNA-knjižnice iz magnetnih kroglic

Ko smo iz reakcijske mešanice odstranili vse nespecifične produkte, smo iz magnetnih kroglic izprali tarčne odseke DNA. Na ta način smo dobili knjižnico DNA, obogateno s tarčnimi odseki DNA.

Najprej smo v 1,5 mL mikrocentrifugirni epruveti pripravili mešanico 28,5 μL pufra 1 za elucijo tarčnih odsekov DNA in 1,5 μL NaOH. Magnetnim kroglicam, na katere so bili vezani tarčni odseki DNA, smo dodali 23,5 μL pripravljene mešanice, premešali in inkubirali 2 minuti na sobni temperaturi. Mikrocentrifugirko smo postavili za 2 minuti na magnet. V supernatantu smo dobili knjižnico DNA obogateno s tarčnimi odseki DNA. 21 μL supernatanta smo prenesli v 200 μL reakcijsko epruveto in dodali 4 μL pufra 2 za elucijo tarčne DNA. Postopek hibridizacije in izolacije obogatene knjižnice DNA smo po enakih korakih ponovili še enkrat (druga hibridizacija, druga izolacija obogatene knjižnice DNA). Razlika v postopku je le na koncu izolacije obogatene knjižnice DNA. 21 μL supernatanta z obogateno knjižnico DNA smo prenesli namesto v 200 μL reakcijsko

epruveto v 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto in mu dodali 4 μ L pufru 2 za elucijo tarčne DNA. Sledilo je čiščenje obogatene knjižnice DNA z magnetnimi kroglicami za čiščenje vzorca in 80 % etanolom.

3.2.4.8 Druga reakcija PCR

Reagenti in raztopine

- zmes za pomnoževanje obogatene knjižnice DNA Nextera (angl. *Nextera Enrichment Amplification Mix*), mešanica oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo PCR (angl. *PCR Primer Cocktail*), vzorec – knjižnica DNA obogatena s tarčnimi odseki DNA (po drugi izolaciji obogatene knjižnice DNA)

Delovni postopek

Knjižnico DNA obogateno s tarčnimi odseki DNA smo pomnožili z reakcijo PCR na aparatu GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo k 25 μ L obogateni knjižnici DNA dodali 5 μ L mešanice oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo PCR in 20 μ L zmesi Nextera za pomnoževanje obogatene knjižnice DNA, vsebino premešali in knjižnico DNA pomnožili po naslednjem temperaturnem profilu:

- 98 °C / 30 s
- 10 ciklov: 98 °C / 10 s; 60 °C / 30 s; 72 °C / 30 s
- 72 °C / 5 min
- Hlajenje reakcijske mešanice na 10 °C

Produkte druge reakcije PCR smo očistili z magnetnimi kroglicami za čiščenje vzorca in 80 % etanolom.

3.2.4.9 Kvantifikacija knjižnice DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)

Reagenti in raztopine

- Vsebina reagenčnega kompleta KAPA Library Quantification Kits (Kapa Biosystems, Massachusetts, ZDA): reakcijska zmes KAPA SYBR FAST qPCR – vsebuje fluorescenčno barvilo SYBR Green I, barvilo ROX, osnovna raztopina dveh Illumina oligonukleotidnih začetnikov (angl. *Illumina Primer Premix*), 6 rečenih standardov s koncentracijo dsDNA-odsekov 20 pM - 0.02 fM, voda primerna za reakcijo PCR

Delovni postopek

Na aparatu ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, ZDA) smo izmerili koncentracijo knjižnice DNA. Uporabili smo komercialno dostopen reagenčni set KAPA Library Quantification Kits (Kapa Biosystems, Massachusetts, ZDA). Komplet reagentov je vseboval specifične oligonukleotidne začetnike, ki so se vezali na indeksne oligonukleotide. Na ta način smo izmerili le koncentracijo knjižnice DNA označene z indeksnimi oligonukleotidi.

Za qPCR smo pripravili reakcijsko mešanico tako, da smo k reakcijski zmesi KAPA SYBR FAST qPCR dodali 1 mL osnovne raztopine oligonukleotidnih začetnikov Illumina in dobro premešali. V vdolbinice na reakcijski ploščici smo razporedili 12 µL reakcijske mešanice za qPCR, 3,6 µL vode primerne za PCR, 0,4 µL ROX barvila in 4 µL 1:10.000 rečenega standarda ali knjižnice DNA. Temperaturni profil analize je bil sledeč:

- Aktivacija polimeraze: 95 °C / 5 min
- 35 ciklov 95 °C / 30 s; 60 °C / 45 s

Metoda qPCR temelji na kontinuiranem merjenju fluorescence v vsakem ciklu reakcije. V fazi podaljševanja se je v dsDNA vgradilo fluorescenčno barvilo SYBR Green I in posledično začelo fluorescirati. Aparat ABI 7500 Fast Real - Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) je podal rezultate v obliki amplifikacijske krivulje, iz katere smo razbrali kvantifikacijski cikel (Cq) standardov in vzorcev. Cq vrednost je cikel pri katerem fluorescenca vzorca oziroma standarda preseže prag fluorescence (angl.

threshold). Glede na znano koncentracijo rečenih standardov in njihovo Cq vrednost smo s programom ABI 7500 v2.06 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) izrisali standardno krivuljo odvisnosti Cq od log začetne koncentracije knjižnice DNA. Iz krivulje smo na osnovi Cq vrednosti vzorcev odčitali koncentracijo posameznih knjižnic DNA (1).

3.2.5 DOKONČNA PRIPRAVA REAGENTOV IN DNA-KNJIŽNICE ZA NGS

Reagenti in raztopine

- Vsebina reagenčnega kompleta MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, San Diego, CA, ZDA)²: reagenčna kartuša, hibridizacijski pufer 1 (angl. *Hybridization Buffer*), pufer PR2 (angl. *Incorporation Buffer*), pretočna celica MiSeq, potopljena v pufer za shranjevanje
- RBS, 2 M NaOH, voda primerna za reakcijo PCR, destilirana voda, etanol, kontrola PhiX, knjižnica DNA

Inštrumenti in materiali

- Sterilne mikrocentrifugirne epruvete (1,5 mL), pipete (10 µL, 200 µL, 1000 µL), sterilni nastavki za pipetiranje, steklenica za odpadne reagente
- Vibracijski mešalnik, sekvenator naslednje generacije MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA)

Delovni postopek

Reagenčno kartušo, knjižnico DNA in pretočno celico smo pred uporabo na sekvenatorju MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA) ustrezno pripravili. Reagenčno kartušo smo temeljito odmrznili v vodni kopeli sobne temperature in jo pred uporabo dobro premešali. Ko je bila kartuša pripravljena za uporabo, smo 4 µl knjižnice DNA ($V_{(knj. DNA)}$) redčili z resuspezijskim pufrom (V_{RBS}) do koncentracije 1,25 nM ($C_{(knj. DNA\ končna)}$). Količino RBS smo izračunali po *Enačbi 2* (54).

² Reagenčni komplet MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) vsebuje toksični formamid in alifatske amide, zato z vsemi reagenti ravnamo previdno.

Enačba 2: Izračun količine RBS pufru s katerim smo redčili knjižnico DNA (knj. - knjižnica) (54).

$$V_{(knj. DNA + RBS)} = \frac{c(knj. DNA, qPCR) \times V(knj. DNA)}{c(knj. DNA končna)} \rightarrow V_{(RBS)} = V_{(knj. DNA + RBS)} - V_{(knj. DNA)}$$

10 µL redčene knjižnice DNA smo denaturirali z 10 µL 0,1 M NaOH, katerega smo pripravili iz 10 µL NaOH in 190 µL vode, premešali in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Takoj po inkubaciji smo denaturirani DNA dodali 980 µL hibridizacijskega pufru 1 in 5 µL kontrole Phix. Tako pripravljeno knjižnico DNA smo dobro premešali in jo postavili na led, dokler nismo pripravili pretočne celice. Pretočno celico smo očistili z destilirano vodo in etanolom, osušili s staničevino in vstavili v aparat MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA). V reagenčno kartušo smo na označeno mesto »Load Sample« dodali 650 µL denaturirane in rečene knjižnice DNA. Preden smo vstavili kartušo v sekvenator MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA) smo v aparat postavili še pufer PR2 in steklenico za odpad ter vpisali seznam vzorcev. Na aparatu MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA) je avtomatsko potekla sinteza skupkov DNA, določanje nukleotidnega zaporedja s sintezo in analiza podatkov.

3.2.6 ANALIZA REZULTATOV, PRIDOBLENIH S SEKVENATORJEM NASLEDNJE GENERACIJE

Podatke pridobljene s sekvenatorjem MiSeq (Illumina, San Diego, CA, ZDA) smo analizirali s programskim orodjem Illumina VariantStudio v2.2 (Illumina, San Diego, CA, ZDA). Program omogoča anotacijo genetskih variant in filtriranje NGS podatkov glede na postavljene kriterije. Izluščili smo le gene z več kot 8-kratno pokritostjo, genetske spremembe, ki se pojavljajo pri manj kot 1 % splošne populacije (angl. *Minor Allele Frequency* (MAF)) in spremembe, ki se nahajajo v genih *KALI*, *AXL*, *CHD7*, *KISS1*, *KISS1R*, *LEPR*, *PROK2*, *SOX10*, *TACR3*, *FGF8*, *FGFR1*, *GNRH1*, *GNRHR*, *NSMF*, *PROKR2*, *SOX2*, *TSHZ1*, *HESX1*, *HS6ST1*, *LEP*, *NROB1*, *SEMA3A*, *TAC3* in *WDR11*. Tiste genetske spremembe, ki so bile nesinonimne (povzročajo spremembo aminokislina v proteinu), insercije, delecije ali so se nahajale v ohranjenih mestih za izrezovanje intronov in so bile potencialno vzročne (odgovorne za nastanek bolezni), smo preverili v bazi

podatkov o mutacijah HGMD (57) in bazi polimorfizmov dbSNP (58). Na ta način smo ugotovili ali je sprememba že opisana in pri znanih preverili še njihov MAF ter povezanost z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije. Te genetske spremembe smo naknadno potrdili s sekvenciranjem po Sangerju. Prav tako smo potrdili spremembe, ki so bile potencialno vzročne a še niso bile opisane v bazah podatkov.

Pri preiskovancih, pri katerih s tehnologijo NGS nismo odkrili nobene spremembe v izbranih 24 genih, smo s spletnim orodjem Galaxy (51) preverili vertikalno pokritost posameznih tarčnih odsekov. Predelom, ki so bili izredno slabo pokriti (< 10-krat), smo s Sangerjevo metodo določili nukleotidno zaporedje. Na ta način smo preverili prisotnost vzročnih sprememb v slabo prebranih delih izbranih genov in s tem zapolnili vrzeli, kjer NGS sekvenciranje ni bilo zadovoljivo uspešno.

3.2.7 POTRMITVENA METODA – SEKVENCIRANJE PO SANGERJU

Sekvenciranje po Sangerju temelji na principu verižne reakcije s polimerazo (PCR) z različno fluorescentno označenimi dideoksinukleotidi (ddNTP) in enim samim oligonukleotidnim začetnikom. Z vgraditvijo deoksinukleotidov (dNTP) se sintetizira nova veriga. Ob naključni vključitvi fluorescentno označenega ddNTP, se zaradi odsotne hidroksilne skupine na 3' položaju, sinteza DNA verige ustavi. Produkt je mešanica različno dolgih fluorescentno označenih DNA odsekov. Avtomatski sekvenator s kapilarno elektroforezo odseke DNA loči po velikosti, detektor ob izhodu iz kapilare pa zaznava barvni signal označenega ddNTP-ja. Računalniški program prikaže rezultate nukleotidnega zaporedja v obliki elektroferograma, na katerem vsaka barvna krivulja predstavlja po eno vrsto vgrajenega ddNTP-ja (59, 60).

3.2.7.1 Oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov

V podatkovni bazi genomov ENSEMBL (61) smo poiskali referenčno nukleotidno zaporedje vseh izbranih genov, v katerih smo z NGS analizo opredelili prisotnost

potencialno vzročnih genetskih sprememb. Del zaporedja intronske regije, celoten ekson v katerem se je nahajala sprememba ter del introna za njim smo uporabili za oblikovanje smernih (angl. *forward* (F)) in protismernih (angl. *reverse* (R)) oligonukleotidnih začetnikov v spletnem programu Primer 3 (v.0.4.0). V predlaganih začetnikih smo s SNPCheck (62) preverili prisotnost polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) in izbrali tiste brez prisotnih SNP-jev. Na enak način smo izbrali tudi oligonukleotidne začetnike za eksone, kateri so imeli vertikalno pokritost manjšo od 10. Izbrani oligonukleotidni začetniki so navedeni v Preglednici VI.

Preglednica VI. Uporabljeni oligonukleotidni začetniki in njihove lastnosti.

Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'	Dolžina produktov (bp)	T _m – temperatura prileganja (°C)	% GC
FGFR1e4F	cctttgtctctcccctcctc	667	60.19	60
FGFR1e4R	tagtgggcagcagtttctga		59.59	50
PROK2e2F	gggcatttcactgctaattt	526	58.26	38.1
PROK2e2R	agcacgttaccagtccttc		59.21	55
PROKR2e1F	tgagtcaactctccccaagg	1059	60.23	55
PROKR2e1R	ctcttgccctccaaagattg		59.81	50
GNRHRe1F	aaggcagaataaaaacaggactt	997	57.64	34.78
GNRHRe1R	gaaccaagctcttaaggtaat		57.2	39.13
CHD7e29F	cccttcccacactgtcatt	729	59.82	50
CHD7e29R	gagcctttctttggtgtca		60.23	50
PROK2e1F	agaccacaaaagcgggtcc	586	56.7	52.6
PROK2e1R	cctctagcctgccttcag		61	63.2
NSMFe1F	cctcagttccccgctct	674	58.2	61.1
NSMFe1R	caggggaccaggaagagg		60.5	66.7

3.2.7.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Reagenti in raztopine

- Komercialno dostopna reakcijska mešanica za reakcijo PCR GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, ZDA), raztopina oligonukleotidnih začetnikov (10 pmol/ μ L) (*Preglednica VI.*), voda primerna za reakcijo PCR, vzorec – gDNA s koncentracijo 100 ng/ μ L

Inštrumenti in materiali

- Reakcijske epruvete (200 μ L) in pripadajoči pokrovčki, nosilci za vzorce in podstavki za nosilce vzorcev, pipete (2 μ L, 10 μ L), sterilni nastavki za pipete
- Centrifuga, vibracijski mešalnik, aparat za PCR, ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)

Delovni postopek

Za vsak vzorec smo potrebovali tri 200 μ L reakcijske epruvete. V prvi dve smo dodali 10 μ L reakcijske mešanice GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, ZDA), 1 μ L F in 1 μ L R oligonukleotidnega začetnika s koncentracijo 10 pmol/ μ L, 1 μ L izolirane gDNA s koncentracijo 100 ng/ μ L in 7 μ L vode primerne za reakcijo PCR. Tretja 200 μ L reakcijska epruveta je služila za slepo kontrolo, zato smo vanjo dodali vse zgoraj navedene reagentne razen vzorca. Reakcijo pomnoževanja smo izvedli na aparatu za PCR, ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

- 95 °C / 10 min
- 35 ciklov 94 °C / 30 s; 59 °C / 30 s; 72 °C / 30 s
- 72 °C / 7 min
- Hlajenje reakcijske mešanice na 10 °C

3.2.7.3 Agarozna elektroforeza

Reagenti in raztopine

- 10 x TBE (1 M Tris HCl, 650 mM boratna kislina, 20 mM EDTA, destilirana voda), 1 x pufer TBE, agarozna, barvilo SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, San Diego, CA, ZDA), označevalec velikosti odsekov DNA, 50 bp (Sigma – Aldrich, St. Louis, Misuri, ZDA), vzorec – produkt reakcije PCR

Inštrumenti in materiali

- Erlenmajerica (250 mL), merilni valj (100 mL), urno steklo, pipeta (10 µL), nastavki za pipete, tehtnica, mikrovalovna pečica, sistem za agarozno elektroforezo: nosilec za gel in glavniček, parafilm, komora za vizualizacijo gelov G:BOX

Delovni postopek

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z določanjem dolžine pomnoženih odsekov z agarozno elektroforezo. Za elektroforezno ločbo smo iz 1,6 g agaroze, 80 mL 1 x Tris – Borat – EDTA (TBE) pufera in 8 µL barvila SYBR Safe DNA Gel Stain pripravili 2 % agarozni gel. Raztopine pomnoženih odsekov smo nanegli v žepke gela, poleg katerih smo nanegli tudi označevalec velikosti odsekov. Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti 90 V. Po ločbi smo gel v komori za vizualizacijo gelov s pomočjo programa GeneSnap pogledali pod UV svetlobo.

3.2.7.4 Sekvenčna reakcija

Reagenti in raztopine

- Encimska mešanica ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA), Big-Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), voda primerna za PCR, oligonukleotidni začetniki (10 pmol/µL) (*Preglednica VI.*), natrijev acetat, etanol (100 %, 70 %), formamid

Inštrumenti in materiali

- Sterilne mikrocentrifugirne epruvete (1,5 mL), pipete (2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L) in sterilni nastavki za pipete, reakcijska ploščica z 96 vdolbinicami, MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- Vibracijski mešalnik, centrifuga, komora za sterilno delo, aparat za PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), sekvenator ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)

Delovni postopek

Pred sekvenčno reakcijo smo PCR produkt očistili z mešanico dveh hidrolitičnih encimov, katera sta razgradila nevgrajene dNTP-je, oligonukleotidne začetnike in ostale neželene produkte tvorjene med pomnoževanjem. K 2,5 μ L produkta reakcije PCR smo dodali 1 μ L ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, ZDA), ki je vseboval alkalno fosfatazo in eksonukleazo I. Mešanico inkubirali 15 minut pri 37 °C, nato pa v aparatu ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) s 15 minutno inkubacijo pri 80 °C povzročili deaktivacijo encima.

Sekvenčno reakcijo smo izvedli ločeno v obe smeri z istimi oligonukleotidnimi začetniki kot smo jih uporabili za reakcijo PCR (*Preglednica VI.*). Očiščenim pomnoženim odsekom PCR smo dodali 16,2 μ L osnovne mešanice za sekvenciranje Big-Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), ki je pomešan s pufrom za sekvenciranje in 0,3 μ L F ali R oligonukleotidnega začetnika. Na aparatu za PCR ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) smo izvedli sekvenčno reakcijo po temperaturnem protokolu:

- 96 °C / 1min
- 25 ciklov 96 °C / 10 s, 50 °C / 5 s, 60 °C / 4 min
- Hlajenje reakcije na 4 °C

Po reakciji smo zmes nastalih odsekov obarjali z dodatkom 2 μ L 3 M natrijevega acetata (pH 4.8) in 50 μ L 100 % etanola, inkubirali na ledu 10 minut ter centrifugirali 45 minut pri 1500 g. Supernatant (nevgrajeni ddNTP - ji) smo takoj odstranili, dodali 70 μ L 70 % etanola in centrifugirali 15 minut pri 1500 x g, supernatant ponovno odstranili ter posušili

oborino na sobni temperaturi. Nato smo oborino raztopili v 20 μ L formamida, inkubirali 5 minut na 94 °C, ohladili na 10 °C in prenesli na sekvenator ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Nukleotidno zaporedje smo analizirali z programom Sequencing Analyses Software 5.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA).

3.2.7.5 Analiza in interpretacija rezultatov

Sekvenator je podal rezultate v obliki elektroferograma, v katerem so zeleni vrhovi predstavljali adenin (A), modri citozin (C), črni gvanin (G) in rdeči timin (T).

S programskim orodjem BLAST (63) smo primerjali spremembe nukleotidnega zaporedja z referenčnim nukleotidnim zaporedjem gena, objavljenega v bazi podatkov GenBank (64). V podatkovni bazi mutacij HGMD (57) in bazi polimorfizmov dbSNP (58) smo preverili, ali je sprememba že opisana. Novo odkrite spremembe smo poimenovali na dva načina, glede na proteinsko zaporedje in komplementarno DNA (cDNA).

Rezultate sekvenciranja po Sangerju smo primerjali z rezultati analize NGS. Če so se med seboj ujemali, smo potrdili prisotnost vzročnih sprememb.

4 REZULTATI

4.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV

Enajst preiskovancev je bilo obravnavanih zaradi klinične diagnoze HH in eden zaradi kasne pubertete ter zapoznele rasti. V *Preglednicah VII. in VIII.* so podrobneje opisane značilnosti preiskovancev, kot so spol, starost, država rojstva, družinska anamneza, klinična diagnoza, druge prirojene nepravilnosti in zdravljenje. Trije preiskovanci (C, F, L) so imeli poleg reproduktivnih motenj tudi nekatere druge prirojene nepravilnosti, ki so značilne za prirojeni HH z ali brez anozmije. To so sensorinevralna naglušnost, barvna slepota, hipertelorizem, dolge okončine, težave z učenjem in bimanualna sinkinezija. Rezultati slikanja hipotalamično-hipofiznega območja z MRI niso bili znani. Nekateri od preiskovancev so prejeli hormonsko nadomestno zdravljenje, kar je omogočilo normalen razvoj sekundarnih spolnih značilnosti in funkcij.

Preglednica VII. Značilnosti preiskovancev (*M – moški spol, Ž – ženski spol, SLO – Slovenija, KS – Kallmannov sindrom, nHH – normozmični prirojeni hipogonadotropni hipogonadizem, / - družinska anamneza ni poznana, DHH – družinska hipokalciurična hiperkalcemija, HNZ – hormonsko nadomestno zdravljenje*).

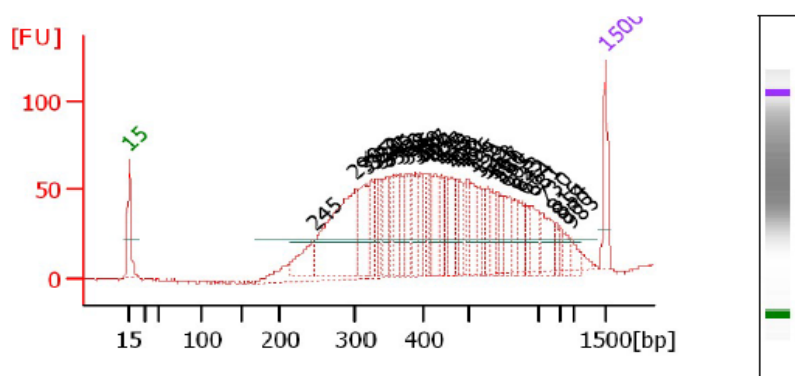
Preiskovanec	Spol / starost / država rojstva	Družinska anamneza	Klinična diagnoza	Druge prirojene nepravilnosti	Zdravljenje (HNZ z androgeni)
A	M, 67, SLO	/	KS	Klinodaktilija, krajša 4. dlančna kost	Da
B	M, 57, SLO	/	nHH	/	Da
C	M, 38, SLO	/	KS	Senzorinevralna naglušnost	Da
D	M, 37, SLO	/	KS	/	Da
E	M, 35, SLO	KS več članov	KS	/	Da
F	M, 32, SLO	/	nHH	Barvna slepota	Da

Preglednica VIII. Nadaljevanje Preglednice VII.

Preiskovanec	Spol / starost / država rojstva	Družinska anamneza	Klinična diagnoza	Druge prirojene nepravilnosti	Zdravljenje (HNZ z androgeni)
G	M, 24, SLO	DHH Oče: anozmija	KS	/	Da
H	M, 23, SLO	/	nHH	Shizofrenija	Da
I	M, 22, SLO	/	KS	/	Da
J	M, 21, SLO	/	Kasna puberteta, zapoznala rast	/	Ne
K	Ž, 17, SLO	Oče: kasna puberteta, anozmija, zmanjšana poraščenost Očetova sestra: pozna menarha, nikoli zrastel 4. zob	KS	/	Priporočeno
L	M, 16, Slovaška	/	KS	Prirojena srčna napaka, hipertenzija, dolge okončine, težave z učenjem, sinkinezija	Priporočeno

4.2 PRIPRAVA DNA-KNJIŽNICE

Med pripravo knjižnice DNA smo odsekom DNA, označenih z indeksnimi oligonukleotidi, z bioanalizatorjem Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) izmerili njihovo koncentracijo in dolžino. Primer kromatograma in fotografije agarozne elektroforeze za vzorec A je prikazan na Sliki 5. Večina odsekov knjižnice DNA je dolgih med 300 bp in 1000 bp, zato je knjižnica primerna za nadaljnje sekvenciranje.



Slika 5: Primer določanja koncentracije in dolžine odsekov knjižnice DNA z bioanalizatorjem Agilent 2100.

4.3 GENETSKA ANALIZA

Z analizo NGS (MiSeq, Illumina) in pripadajočimi programskimi orodji smo v skupini 12 preiskovancev pri polovici (A, B, F, H, K, L) prepoznali 6 različnih sprememb, ki bi lahko bile vzročne in sicer v genih *PROK2*, *GNRHR*, *PROKR2*, *FGFR1* in *CHD7*. Med njimi smo opredelili tri že opisane in tri nove spremembe, te so natančneje opisane v *Preglednici IX*. Še neopisane spremembe smo poimenovali kot je priporočeno z mutacijsko nomenklaturo Human Genome Variation Society (65), s štetjem smo pričeli pri začetni aminokislini metionin (kodon ATG). Gre za spremembe: c.171_172delTT (p.Ile57MetfsTer17) v 2. eksonu gena *PROK2*, c.196T>C (p.Typ66Arg) v 4. eksonu gena *FGFR1* in c.5759A>G (p.Tyr1920Cys) v 29. eksonu gena *CHD7*.

S sekvenciranjem po Sangerju smo potrdili vseh šest sprememb, opredeljenih z analizo NGS (Priloga 1). Pri enem preiskovancu (B) smo s potrditveno metodo v genu *GNRHR* poleg spremembe c.416G>A (p.Arg139His), opredeljene z obema metodama, določili tudi spremembo c.511G>A (p.Ala171Thr).

Pri preiskovancih C, D, E, G, I in J, kjer z analizo NGS nismo opredelili sprememb v izbranih genih, smo s spletnim orodjem Galaxy (51) preverili vertikalno pokritost posameznih eksonov teh genov. Pokritost pod 10 sta imela le eksona 1 v genu *PROK2* in

genu *NSMF*, zato smo v teh področjih s sekvenciranjem po Sangerju preverili prisotnost možnih genetskih sprememb. V teh področjih dodatnih sprememb nismo opredelili.

Preglednica IX. Vzročne spremembe, ki smo jih prepoznali pri preiskovancih s klinično diagnozo HH z NGS analizo in potrditveno Sangerjevo metodo.

Bolnik	Gen	Ekson	Genotip	Vzročna sprememba	Vzročna sprememba opisana v HGMD (57)
A	<i>PROK2</i>	2	Heterozigot	NM_001126128.1:c.171_172delTT NP_001119600.1:p.Ile57MetfsTer17	Nova vzročna sprememba
B	<i>GNRHR</i>	1	Heterozigot	NM_000406.2:c.416G>A NP_000397.1:p.Arg139His	CM012141
				NM_000406.2:c.511G>A NP_000397.1:p.Ala171Thr	CM030883
F	<i>GNRHR</i>	1	Heterozigot	NM_000406.2:c.317A>G NP_000397.1:p.Gln106Arg	CM970686
H	<i>PROKR2</i>	1	Heterozigot	NM_144773.2:c.254G>T NP_658986.1:p.Arg85Leu	CM100860
K	<i>FGFR1</i>	4	Heterozigot	NM_023110.2:c.196T>C NP_075598.2:p.Typ66Arg (NM_001174067:c.295T>C NP_001167538.1:p.Typ99Arg)	Nova vzročna sprememba
L	<i>CHD7</i>	29	Heterozigot	NM_017780.3:c.5759A>G NP_060250.2:p.Tyr1920Cys	Nova vzročna sprememba

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo pri preiskovancih s klinično diagnozo HH želeli s tehnologijo NGS opredeliti genetsko ozadje prirojenega HH. Z analizo NGS smo analizirali 24 genov, povezanih z razvojem bolezni. Kot potrditveno metodo smo uporabili sekvenciranje po Sangerju.

Do sedaj obstaja le nekaj študij, v katerih so za preučevanje genetskega ozadja prirojenega HH z ali brez anozmije uporabili tehnologijo NGS (66, 67). V večini študij so za opredelitev genetskega vzroka razvoja prirojenega HH uporabili sekvenciranje po Sangerju (68-70).

5.1 POMEN GENETSKE DIAGNOSTIKE PRIROJENEGA HH

Usmerjene genetske preiskave se pri preiskovancih s klinično diagnozo HH opravijo z namenom odkritja genetskega vzroka bolezni in dokončne ter zgodnje opredelitve diagnoze. Rezultati genetske analize omogočajo tudi ciljno prepoznavanje bolezni pri družinskih članih. Za takšne analize se lahko preiskovančevi sorodniki odločijo v okviru genetskega svetovanja.

Pri bolnikih s prirojenim HH so klinične značilnosti lahko izražene v obliki kriporhizma in/ali mikropenisa že pri novorojenčku moškega spola in kot druge prirojene nepravilnosti, kot so razcepljena ustnica ali nebo, bimanualna sinkinezija, odsotnost zob ali ledvice, okvara sluha, anomalije ušes ali oči pri obeh spolih (14, 19, 22). Bolniki s KS imajo poleg HH prisotno tudi anozmijo ali hipozmijo. Diagnoza se po navadi postavi, ko puberteta zakasni oziroma ne nastopi. Hitra postavitev diagnoze in potrditev na genetskem nivoju je pomembna predvsem zaradi uvedbe hormonskega zdravljenja. V puberteti je cilj hormonskega nadomestnega zdravljenja z androgeni doseči mladostnikov popoln pubertetni razvoj, pri odraslih bolnikih pa sistemsko delovanje testosterona in estrogena (3,

27). Za obnovo spermatogeneze in gametogeneze pri odraslem bolniku je potrebno zdravljenje z gonadotropini ali GnRH, s čimer se omogoči plodnost pri bolniku (3, 27).

5.2 GENETSKE SPREMEMBE PRI BOLNIKI S KLINIČNO DIAGNOZO HH

S sekvenciranjem naslednje generacije (MiSeq, Illumina, San Diego, CA, ZDA) smo pri dvanajstih preiskovancih s klinično diagnozo HH analizirali 24 genov, povezanih z razvojem HH z ali brez anozmije (*KALI*, *AXL*, *CHD7*, *KISS1*, *KISS1R*, *LEPR*, *PROK2*, *SOX10*, *TACR3*, *FGF8*, *FGFR1*, *GNRH1*, *GNRHR*, *NSMF*, *PROKR2*, *SOX2*, *TSHZ1*, *HESX1*, *HS6ST1*, *LEP*, *NR0B1*, *SEMA3A*, *TAC3*, *WDR11*). Z analizo NGS smo pri polovici preiskovancev (6/12) opredelili šest različnih vzročnih sprememb, eno delecijo in pet sprememb s spremenjenim pomenom, ki so se nahajale v genih *PROK2*, *GNRHR*, *PROKR2*, *FGFR1* in *CHD7* (Preglednica IX.). Med njimi tri genetske spremembe v genih *FGFR1*, *PROK2* in *CHD7* še niso bile opisane pri bolnikih s prirojenim HH in niso navedene v bazah ClinVar (71), HGMD (57) ali dbSNP (58), *in silico* metodi (Sift, PolyPhen) pa predvidevata, da naj bi bile patološke. S Sangerjevo metodo smo potrdili vse genetske spremembe, ki smo jih prepoznali z NGS analizo. Izstopal je le preiskovanec B, pri kateremu smo s sekvenciranjem po Sangerju v 4. eksonu gena *GNRHR* poleg spremembe opredeljene z NGS analizo prepoznali v istem eksonu še eno dodatno spremembo s spremenjenim pomenom.

Genetske spremembe, ki smo jih opredelili in do sedaj še niso opisane pri bolnikih s prirojenim HH z ali brez anozmije predstavljajo kar 43 % (3/7) vseh opredeljenih sprememb v naši raziskavi. S tem smo razširili spekter genetskih sprememb, ki so vzročno povezane z razvojem prirojenega HH in odpiramo vrata nadaljnjim funkcijskim študijam, ki bi podrobneje pojasnile točen pomen teh sprememb in njihov vpliv na razvoj bolezni.

5.2.1 GEN *PROK2*

Gen *PROK2* se nahaja na kratki ročici kromosoma 3 (3p13) in nosi zapis za protein »Prokineticin 2« (*PROK2*), ligand za receptor *PROKR2*. Sistem *PROK2/PROKR2* se izraža v centralnem živčnem sistemu, in sicer v subventrikularni coni ter olfaktornih bulbusih (72). Sistem sodeluje pri razvoju olfaktornih bulbusov in spolnem dozorevanju (73). Znano je, da se genetske spremembe v homozigotni ali heterozigotni obliki v genu *PROK2* pojavljajo pri manj kot 10 % bolnikov s HH z ali brez anozmije (74-77).

5.2.1.1 Genetska sprememba p.Ile57MetfsTer17

Pri preiskovancu A s klinično diagnozo KS smo v eksonu 2 gena *PROK2* v heterozigotni obliki opredelili delecijo dveh timinov c.171_172delTT. Na proteinski ravni se to kaže kot sprememba bralnega okvirja, vključitev 16 nesorodnih aminokislin, ki jim sledi prezgodnji terminacijski kodon (p.Ile57MetfsTer17). Sprememba še ni bila opisana pri bolnikih s prirojenim HH z ali brez anozmije in ni opisana v bazah ClinVar (71), HGMD (57) ali dbSNP (58). Metodi Sift in PolyPhen predvidevata, da je genetska sprememba patološka.

Trenutno je v bazi HGMD (57) v genu *PROK2* opisanih 19 vzročnih sprememb, od tega 16 pri bolnikih s KS, ena pri bolniku z izolirano anozmijo, dve pri bolniku z nHH. Med njimi je le ena manjša delecija (c.163delA), ki je bila opisana v homozigotni obliki pri dveh bratih s KS in sestri z nHH ter v heterozigotni obliki pri asimptomatskem bratu (76). Navedena sprememba je pri homozigotnih bolnikih povzročila nastanek krajšega, nefunkcionalnega proteina *PROK2* ali razgradnjo mRNA, zaradi česar ni prišlo do aktivacije sistema *PROK2/PROKR2*. V študiji so zaključili, da je homozigotna sprememba c.163delA pri bolnikih vzrok za nastanek prirojenega HH z ali brez anozmije. Poudarili so, da je za nastanek bolezni dovolj heterozigotna oblika vzročne spremembe gena *PROK2* le ob še eni ali več prisotnih vzročnih spremembah v drugih genih (digensko ali oligogensko dedovanje) (76).

Domnevamo, da je pri preiskovancu A heterozigotna genetska sprememba, ki je povzročila prezgodnjo uvedbo STOP kodona, povzročila nastanek okrnjenega proteina. Ta ni aktiviral

sistema PROK2/PROKR2 in posledično se olfaktorni bulbusi niso normalno razvili, kar je vplivalo tudi na moten razvoj in migracijo GnRH-nevronov. Vse to je verjetno vzrok za klinično sliko KS pri preiskovancu A. Potrebno bi bilo preveriti, ali ima preiskovanec sorodnike s podobno klinično sliko. V tem primeru bi lahko analizirali prisotnost opredeljene spremembe pri obolelem sorodniku. Seveda pa ne moremo izključiti možnosti obstoja dodatnih vzročnih sprememb v genih, ki jih v naši raziskavi nismo analizirali. Zato bi lahko pri preiskovancu izvedli dodatno analizo celotnega eksoma. To bi omogočilo opredelitev sprememb v genih, za katere trenutno še ne vemo, da so vpleteni v patologijo prirojenega HH.

5.2.2 GEN *FGFR1*

Gen *FGFR1* se nahaja na dolgi ročici kromosoma 8 (8p11.2) in nosi zapis za receptor fibroblastnega rastnega faktorja 1 (angl. *Fibroblast growth factor receptor 1* - FGFR1) (32). Ta sodeluje pri razvoju olfaktornih bulbusov in migraciji GnRH-nevronov (78, 79). Preiskovanci zbolijo že ob enem okvarjenem alelu gena *FGFR1* (AD dedovanje) (31). Genetske spremembe v tem genu se pojavljajo pri približno 10 % bolnikov s prirojenim HH z ali brez anozmije (80). Trenutno je v bazi HGMD (57) v genu *FGFR1* zabeleženih 197 sprememb, od tega jih je 140 opisanih pri bolnikih s KS, 18 pa pri bolnikih z nHH. Večina med njimi (146) je točkovnih nesmiselnih ali drugačnosmiselnih sprememb.

5.2.2.1 Genetska sprememba p.Trp66Arg (p.Trp99Arg)

V eksonu 4 gena *FGFR1* smo pri preiskovanki K s klinično diagnozo KS v heterozigotni obliki opredelili genetsko spremembo c.196T>C (c.295T>C), ki na mestu 66 zamenja aminokislino triptofan v arginin (p.Trp66Arg, p.Trp99Arg). Sprememba še ni zavedena v bazah ClinVar (71), HGMD (57) ali dbSNP (58). *In silico* metodi SIFT in PolyPhen sta predvidevali, da je opredeljena sprememba patološka.

Genetska sprememba pri preiskovanki najverjetneje povzroči nastanek škodljivega nefunkcionalnega proteina, kar bi lahko bilo vzrok za razvoj njene klinične slike.

Domnevamo, da je mutiran alel gena *FGFR1* podedovala po očetu, saj tudi on kaže klinične znake KS. Oče je imel pozno puberteto, ima anozmijo in zmanjšano poraščenost po celem telesu. Pri preiskovančevem očetu in ostalih obolelih sorodnikih bi bilo priporočljivo opraviti usmerjene genetske preiskave povezane z razvojem prirojenega HH, kjer bi določili prisotnost mutacije, ki smo jo opredelili pri preiskovanki K.

5.2.3 GEN *CHD7*

Gen *CHD7* se nahaja na kratki ročici kromosoma 8 (8q12) in kodira DNA vezni protein helikazne kromodomene 7 (angl. *Chromodomain helicase DNA binding protein 7*, *CHD7*) (32). Heterozigotne spremembe v genu *CHD7* so bile opredeljene pri več kot 60 % bolnikov s sindromom CHARGE (81). To je več sistemska AD ali sporadična motnja pri kateri se pojavljajo klinični znaki, kot so majhna očesna šarenica (coloboma), srčne napake, atrezija hoan (malformacija zadnjega dela nosne votline), zaostalost v rasti in razvoju, hipogonadizem in nepravilnosti v razvoju ušes (82). Vzročne spremembe v *CHD7* se pojavljajo tudi pri 5-10 % heterozigotnih bolnikov s HH z ali brez anozmije (22). Protein *CHD7* sodeluje pri razvoju olfaktornih bulbusov in migraciji GnRH-nevronov. V genu *CHD7* je v bazi HGMD (57) trenutno opisanih kar 699 sprememb, od tega 615 pri bolnikih s sindromom CHARGE, 48 pri bolnikih s KS in 5 pri bolnikih z nHH. Večina med njimi (301) je točkovnih nesmiselnih in drugačnosmiselnih sprememb.

5.2.3.1 Genetska sprememba p.Tyr1920Cys

Tudi pri preiskovancu L s klinično diagnozo KS smo v eksonu 29 gena *CHD7* opredelili genetsko spremembo c.5759A>G, ki še ni opisana v ClinVar (71), HGMD (57) ali dbSNP (58). Heterozigotna sprememba na mestu 1920 spremeni aminokislino tirozin v cistein (p.Tyr1920Cys). *In silico* metodi (SIFT, PolyPhen) sta predvidevali, da je opredeljena sprememba patološka.

Preiskovanec ima izražene reproduktivne motnje, ki so značilne za HH. To so nepopoln pubertetni razvoj, ginekomastija, višina glasu ostaja pri 16-ih letih še vedno visoka,

zmanjšan volumen testisov in debelost. Poleg navedenega je prisotna tudi anozmija, hipertelorizem, dolge okončine, težave z učenjem in bimanualna sinkinezija. Najverjetneje je pri preiskovancu sprememba c.5759A>G v genu *CHD7* vzrok za nastanek značilne klinične slike KS. Kljub temu, da družinski člani normalno zaznavajo vonj, bi bilo tudi pri njih priporočeno opraviti usmerjeno genetsko analizo.

5.2.4 GEN *PROKR2*

Gen *PROKR2* se nahaja na kratki ročici kromosoma 20 (20p12.3) in kodira receptor za prokineticin (angl. *Prokineticin receptor 2*, *PROKR2*). Sistem *PROK2/PROKR2* sodeluje pri razvoju olfaktornih bulbusov in spolnem dozorevanju (73). V *PROKR2* je v bazi HGMD (57) trenutno opisanih 45 sprememb, od tega 30 pri bolnikih s KS in ena pri bolniku z nHH. Genetske spremembe se v homozigotni ali heterozigotni obliki v genu *PROKR2* pojavljajo pri manj kot 10 % bolnikov s HH z ali brez anozmije (74-77).

5.2.4.1 Genetska sprememba p.Arg85Leu

V eksonu 1 gena *PROKR2* smo pri preiskovancu H opredelili znano heterozigotno spremembo c.254G>T, ki na mestu 85 spremeni arginin v levcin (p.Arg85Leu). Ta je že bila opisana pri bolnikih s prirojenim HH v homozigotni ali heterozigotni obliki (83, 84). V bazi HGMD (57) je zapisana s CM kodo CM100860. Opredeljena sprememba je pri preiskovancu najverjetneje vzrok za njegovo klinično sliko. Pri obolelih družinskih članih bi bilo potrebno opraviti genetsko svetovanje in opredeliti segregacijo sprememb.

5.2.5 GEN *GNRHR*

GNRHR je lociran na kratki ročici kromosoma 4 (4q13.2). Slednji je nosilec informacij receptorja za gonadotropin sproščujoči hormon (angl. *Gonadotropin releasing hormone receptor*, *GNRHR*). *GNRHR* se nahajajo na površini celic adenohipofize, preko katerih se uravnava izločanje LH in FSH iz hipofize. Večina genetskih sprememb v genu *GNRHR*

vodi v zmanjšano ali odsotno vezavno aktivnost GnRH, zaradi česar so gonadotropini in spolni hormoni zmanjšani ali jih sploh ni (32). V genu *GNRHR* je v bazi HGMD (57) opisanih 49 sprememb, od tega 44 pri bolnikih z nHH in le dve pri bolnikih s KS. Večina sprememb (41) je točkovnih nesmiselnih in drugačnosmiselnih sprememb. Spremembe v *GNRHR* se pojavljajo pri 16 – 40 % bolnikov s prirojenim HH z normalnim občutkom za vonj (15, 85).

5.2.5.1 Sestavljen heterozigot za genetski spremembi p.Arg139His in p.Ala171Thr

Pri preiskovancu B smo v eksonu 1 gena *GNRHR* opredelili dve heterozigotni spremembi. Prva sprememba c.416G>A na mestu 139 spremeni aminokislino arginin v histidin (p.Arg139His), druga sprememba c.511G>A povzroči na mestu 171 zamenjavo alanina s treoninom (p.Ala171Thr). Obe sta že bili opisani v HGMD (57) (CM012141, CM030883) in sicer obe pri bolnikih s prirojenim HH.

V literaturi sta navedeni genetski spremembi opisani pri homozigotnih bolnikih in pri sestavljenih heterozigotih s prirojenim HH z normalnim občutkom za vonj (15, 85). Po do sedaj objavljenih podatkih še ni bil opisan bolnik s prirojenim HH, ki bi bil sestavljeni heterozigot za obe v naši raziskavi opredeljeni genetski spremembi. Pri bolniku sta spremembi tako vzrok za klinično sliko prirojenega HH le, če se dedujeta na različnih alelih. Zaradi tega je potrebno opredeliti segregacijo obeh sprememb v družini.

5.2.5.2 Genetska sprememba p.Gln106Arg

Pri preiskovancu F smo v eksonu 1 gena *GNRHR* v heterozigotni obliki opredelili genetsko spremembo c.317A>G, ki povzroči spremembo aminokislinske glutamin v arginin na mestu 106 (p.Gln106Arg). Sprememba je bila opisana le v obliki različnih sestavljenih heterozigotov pri bolnikih z raznoliko klinično sliko, značilno za nHH (86-89). V bazo HGMD (57) je zapisana s kodo CM970686 pri bolnikih s prirojenim HH, v ClinVar (71) pa je zabeležena kot patogena in vzročno povezana z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije.

Pri preiskovancu opredeljena sprememba samostojno ne more popolnoma pojasniti njegove klinične slike, saj smo to spremembo opredelili le na enem alelu gena *GNRHR*. Potrebno bi bilo preveriti prisotnost opredeljene spremembe pri ostalih obolelih sorodnikih. Ne izključujemo pa tudi možnosti, da obstajajo dodatne vzročne spremembe genov, ki jih v raziskavi nismo analizirali. Analiza celotnega eksoma bi omogočila opredelitev sprememb v genih, za katere do danes še ne vemo, da so vpleteni v razvoj prirojenega HH z ali brez anozmije.

5.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI TEHNIK NGS V PRIMERJAVI S SEKVENCIRANJEM PO SANGERJU

Prve tehnike določanja nukleotidnega zaporedja naslednje generacije so se na trgu pojavile pred desetimi leti (leta 2005). Tehnologija temelji na hkratni določitvi nukleotidnega zaporedja velike količine (več milijonov) odsekov DNA, ki so prostorsko ločeni in imobilizirani na trden nosilec (pretočno celico, kroglice). Pri določanju nukleotidnega zaporedja z NGS metodami se porabi manjša količina reagentov, proces pridobivanja genetske informacije je hitrejši in cenejši v primerjavi s sekvenciranjem po Sangerju. Poleg navedenega je prednost NGS metod tudi pridobitev večje količine podatkov v enem eksperimentu (večja pretočnost (angl. *Throughput*)), kar je delno posledica razvoja zmogljivejših bioinformatičnih programskih orodij za obdelavo velike količine pridobljenih podatkov (45, 47, 50). Trenutno Illumina ponuja najzmogljivejše aparature (HiSeq X Ten, Illumina, San Diego, CA, ZDA) in platforme, s katerimi se doseže največji pretok pridobivanja genetskih informacij (do 1.8 Tb sekvenc na eksperiment) za nizko ceno na določen nukleotid (48, 49).

Poleg zahtevnejše obdelave podatkov ima tehnologija NGS v primerjavi s sekvenciranjem po Sangerju še vedno nekaj omejitev, kot so krajša bralna dolžina in manjšo točnost določitve nukleotidnega zaporedja. Vendar se vpliv teh omejitev učinkovito zmanjšuje z veliko količino hkratnih odčitkov in obojestranskim branjem nukleotidnega zaporedja odsekov DNA (smerno in protismerno) (45, 47, 48, 50).

Pristop NGS omogoča pri bolnikih s prirojenim HH z ali brez anozmije občutno hitrejšo opredelitev vzročnih genetskih sprememb. S pristopom NGS namreč lahko analiziramo naenkrat 24 genov (239 eksonov), povezanih z razvojem prirojenega HH, s sekvenciranjem po Sangerju pa bi analizirali posamezne kodirajoče odseke vsakega gena, kar bi bistveno podaljšalo čas analize. Pristop NGS za bolnika s prirojenim HH z ali brez anozmije pomeni, da v krajšem času pridobimo več genetskih informacij in s tem povečamo verjetnost za hitrejšo dokončno postavitve diagnoze. V naši skupini bolnikov smo to dosegli pri kar polovici preiskovancev, kar sovpada z opisanimi podatki (27). V raziskavah (68, 70), kjer so za določanje nukleotidnega zaporedja uporabili le sekvenciranje po Sangerju, so uspeli opredeliti genetske spremembe pri manj kot 30 % preiskovancev s klinično diagnozo HH, kar je manj kot v naši raziskavi. Vse navedeno kaže, da je za opredelitev genetskega ozadja bolnikov s prirojenim HH z ali brez anozmije pristop NGS boljše izbira kot samostojna uporaba sekvenciranja po Sangerju, zato ga bo NGS verjetno v bodoče v celoti nadomestil.

6 SKLEP

Na osnovi rezultatov naše raziskave lahko zaključimo:

- Za vsakega od 12-ih preiskovancev s klinično diagnozo HH smo pripravili knjižnico DNA in s pristopom NGS analizirali kodirajoče regije ter eksonsko - intronske meje 24 genov, povezanih z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije.
- Pri polovici preiskovancev smo z NGS prepoznali šest heterozigotnih sprememb, eno delecijo in pet sprememb s spremenjenim pomenom, med katerimi jih je polovica že opisanih v bazi HGMD. Vzročne spremembe, ki še niso opisane v bazi HGMD, smo prepoznali v genu *PROK2* (c.171_172delTT, p.Ile57MetfsTer17), genu *FGFR1* (c.295T>C, p.Trp99Arg) in v genu *CHD7* (c.5759A>G, p.Tyr1920Cys). *In silico* metodi (Sift, PolyPhen) pa sta predvideli, da naj bi bile vse navedene genetske spremembe patološke.
- Kodirajočim predelom genov *PROK2*, *GNRHR*, *PROKR2*, *FGFR1*, *CHD7*, kjer smo s pristopom NGS opredelili vzročne spremembe, smo naknadno s Sangerjem določili nukleotidno zaporedje in s tem potrdili vse prepoznane spremembe.
- Pri enem preiskovancu smo s potrditveno metodo v istem eksonu gena *GNRHR* prepoznali dodatno vzročno spremembo.
- Pri treh preiskovancih je bila horizontalna pokritost manjša ali enaka 30, zato smo NGS ponovili, rezultate obeh analiz združili in podatke ponovno analizirali.
- Šestim preiskovancem, ki jim s pristopom NGS nismo opredelili vzročnih sprememb v 24 genih, ki so povezani z razvojem prirojenega HH z ali brez anozmije, smo s spletnim orodjem Galaxy preverili vertikalno pokritost tarčnih odsekov. Prvima eksonoma gena *PROK2* in gena *NSMF*, ki sta bila izredno slabo pokrita (< 10-krat), smo naknadno s Sangerjem določili nukleotidno zaporedje. V teh predelih nismo opredelili dodatnih vzročnih genetskih sprememb.
- Pri polovici preiskovancev smo uspeli opredeliti genetsko ozadje prirojenega HH z ali brez anozmije. Rezultati genetske analize so bili osnova za dokončno potrditev klinične diagnoze HH.

Z raziskavo smo potrdili vse zastavljene hipoteze. S pristopom NGS in potrditvenim sekvenciranjem po Sangerju je mogoče učinkovito opredeliti genetsko ozadje prirojenega HH z ali brez anozmije, saj je bil delež preiskovancev, pri katerih smo prepoznali vzročne spremembe, primerljiv s podatki iz literature. Z navedenim pristopom smo pri bolnikih s klinično diagnozo HH prepoznali poleg že opisanih genetskih sprememb v bazi HGMD tudi do sedaj še ne opisane vzročne spremembe, ki predstavljajo kar 43 % (3/7) vseh opredeljenih sprememb v naši raziskavi. S tem odpiramo vrata nadaljnjim funkcijskim študijam, ki bodo pojasnile natančnejši pomen teh sprememb in njihov vpliv na razvoj prirojenega HH z ali brez anozmije.

7 LITERATURA

1. Burtis CA, Ashwood ER, Border B, Tietz NW. *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Fifth edition. Philadelphia, Saunders, 2001: 518-28, 832-3, 876-97.
2. Kobal B. Nevroendokrina kontrola reprodukcije. In: Romih J, Žmitek A. Zbornik: Na stičiščih psihiatrije in ginekologija. Begunje: Psihiatrična bolnišnica Begunje, 2000: 36-45.
3. Košnik M. *Interna medicina*, četrta izdaja. Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 851-60, 879-80, 937-54.
4. Valdes-Socin H, Almanza MR, Fernández-Ladred MT, Guillaume Debray F, Bours V, Beckers A. Reproduction, smell and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Front Endocrinol*. 2014; 5(1):109.
5. Valdes-Socin H, Debray FG, Parent AS, Lebrethon MC, Bourguignon JP, Bours V, Beckers A. How to explore...congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Rev Med Liege*. 2010; 65(11):634-41.
6. Semple RK, Topaloglu AK. The recent genetics of hypogonadotropic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol*. 2010; 72(4):427-35.
7. Wray Dr. S. From Nose to Brain: Development of gonadotropin releasing hormone - 1 neurons. *J Neuroendocrinol*. 2010; 22(7):743-753.
8. Messina A, Giacobini P. Semaphorin signaling in the development and function of the gonadotropin hormone - releasing hormone system. *Front Endocrinol*. 2013; 4(1):133.
9. Schwarting GA, Wierman ME, Tobet SA. Gonadotropin releasing hormone neuronal migration. *Semin Reprod Med*. 2007; 25(5):305-312.
10. Fraietta R, Zylberstejn DS, Esteves SC. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics*. 2013; 68(1):81-88.
11. Gontijo Silveira LF, Latronico AC. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013, 98(5):1781-1788
12. Hayes FJ, Seminara SB, Crowley WF Jr. Hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin*. 1998; 27(4):739-63.
13. Aminzadeh M, Kim HG, Layman LC, Cheetham TD. Rarer syndromes characterized by hypogonadotropic hypogonadism. *Front Horm Res*. 2010; 39 (1):154-67.

- 14.** Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L, Raivio T. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011; 6(1):41.
- 15.** Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 5(10):569-76.
- 16.** Buck C, Balasubramanian R, Crowley WF. Isolated gonadotropin releasing hormone (GnRH) deficiency. *GeneReviews*. 2013.
- 17.** Acharya S, Shukla S, Mahajan SN, Kothari N. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH) with Pickwickian syndrome, Cor pulmonale and insulin resistance. *JIMSA*. 2013; 26(4):227-8.
- 18.** Teixeira L, Guimiot F, Dodé C, Fallet-Bianco C, Millar RP, Delezoide AL, Hardelin JP. Defective migration of neuroendocrine GnRH cells in human arrhinencephalic conditions. *J Clin Invest*. 2010, 120(10):3668-72.
- 19.** Han TS, Bouloux PM. What is the optimal therapy for young males with hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Endocrinol*. 2010, 72(6):731-7.
- 20.** Palmert MR, Dunkel L. Delayed Puberty. *N Engl J Med*. 2012, 366:443-53
- 21.** Darby E, Anawalt BD. Male hypogonadism : an update on diagnosis and treatment. *Treat Endocrinol*. 2005, 4(5):293-309.
- 22.** Karges B, Neulen J, de Roux N, Karges W. Genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism: Role of GnRH receptor and other genes. *International Journal of Endocrinology*. 2011.
- 23.** Bonomi M, Libri DV, Guizzardi F, Guarducci E, Maiolo E, Pignatti E, Asci R, Persani L. New understandings of the genetic basis of isolated idiopathic central hypogonadism. *Asian J Androl*. 2012, 14(1):49-56.
- 24.** Dodé C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009, 17, 139–46.
- 25.** Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, Azcona C, MacColl GS, Jacobs HS, Conway GS, Besser M, Stanhope RG, Bouloux PM. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol*. 2001, 55(2):163-74.
- 26.** Oliveira LMB, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, Costa EMF, Latronico AC, Crowley WF, Vallejo M. The importance of autosomal genes

in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86(4): 1532-8.

27. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, Dwyer AA, Giacobini P, Hardelin JP, Juul A, Maghnie M, Pitteloud N, Prevot V, Raivio T, Tena-Sempere M, Quinton R, Young J. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism - pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015.

28. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF, Seminara SB, Crowley WF, Pitteloud N. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci.* 2010, 107(34):15140-4.

29. Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, Salenave S, Kamenicky P, Brailly-Tabard S, Chanson P, Guiochon-Mantel A, Young J. Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships. *Eur J Endocrinol.* 2010, 162(5):835-51.

30. Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, Williams T, Chorich LP, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 2011, 96(6):1424-30.

31. Marino M, Moriondo V, Vighi E, Pignatti E, Simoni M. Central hypogonadotropic hypogonadism: genetic complexity of a complex disease. *International Journal of Endocrinology.* 2014.

32. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.omim.org/>. (dostopno: 1.6.2015)

33. Salian-Mehta S, Xu M, Knox AJ, Plummer L, Slavov D, Taylor M, Bevers S, Hodges RS, Crowley WF, Wierman ME. Functional consequences of AXL sequence variants in hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014, 99(4):1452-60.

34. Ragancokova D, Rocca E, Oonk AM, Schulz H, Rohde E, Bednarsch J, Feenstra I, Pennings RJ, Wende H, Garratt AN. TSHZ1-dependent gene regulation is essential for olfactory bulb development and olfaction. *J Clin Invest.* 2014, 124(3):1214-27.

- 35.** Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S, Wierman ME. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol Endocrinol.* 2008, 22(11):2481-95.
- 36.** Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, Ha KS, Itokawa Y, Meliciani I, Wenzel W, Lee D, Rosenberger G, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Nagase T, Tekin M, Kim SH, Kim CH, Ropers HH, Gusella JF, Kalscheuer V, Choi CY, Layman LC. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010, 87(4):465-79.
- 37.** Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, Fouveaut C, Leroy C, V erier-Mine O, Francannet C, Dupin-Deguine D, Archambeaud F, Kurtz FJ, Young J, Bertherat J, Marlin S, Goossens M, Hardelin JP, Dod e C, Bondurand N. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 2013 May 2;92(5):707-24.
- 38.** Stark Z, Storen R, Bennetts B, Savarirayan R, Jamieson RV. Isolated hypogonadotropic hypogonadism with SOX2 mutation and anophthalmia/microphthalmia in offspring. *Eur J Hum Genet.* 2011, 19(7):753-6.
- 39.** Newbern K, Natrajan N, Kim HG, Chorich LP, Halvorson LM, Cameron RS, Layman LC. Identification of HESX1 mutations in Kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 2013; 99(7):1831-7.
- 40.** Jadhav U, Harris RM, Jameson JL. Hypogonadotropic hypogonadism in subjects with DAX1 mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2011, 346(1-2): 65–73.
- 41.** Ritz en EM. Undescended testes: a consensus on management. *Eur J Endocrinol.* 2008, 159(1):S87-90.
- 42.** Dod e C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009, 17, 139–46.
- 43.** Quinn SM, Rubin DJ. Treatment options for females with hypogonadotropic hypogonadism and thromboembolism. *Endocrinology Studies.* 2011, 1(15):64-6.
- 44.** Skafba P, Guz M. Hypogonadotropic hypogonadism in women. *Polish Journal of Endocrinology.* 2011, 62(6): 560–7.
- 45.** Progar V, Petrovi  U. Vpliv parametrov sekvenciranja naslednje generacije na zanesljivost rezultatov v metagenomskih študijah. *Informatica Medica Slovenica.* 2013, 18(1/2): 1-8.

- 46.** Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008, 9:387-402.
- 47.** Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics.* 2014, 30(9): 418–26.
- 48.** Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of Next-Generation Sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012.
- 49.** Illumina. <http://www.illumina.com/>. (dostopno: 6.5.2015)
- 50.** Berlec A, Štrukelj B. Nova generacija tehnik določanja nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini. *Farmacevtski vestnik.* 2010, 61(4): 203-8.
- 51.** Galaxy. <https://galaxyproject.org/>. (dostopno: 13.6.2015)
- 52.** FlexiGene DNA Handbook for purification of DNA from human whole blood, buffy coat, cultured cells, 2010.
- 53.** http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf. (dostopno: 6.5.2015)
- 54.** Illumina TruSight One Sequencing Panel library preparation guide. http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight_one/trusight-one-sequencing-panel-library-prep-guide-15046431-a.pdf. (dostopno: 24.2.2015)
- 55.** http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90014_DNA1000Assay_KG.pdf. (dostopno: 6.5.2015)
- 56.** Agilent Technologies, Agilent 2100 bioanalyzer. http://cmurdc.cmu.edu.tw/HVIS/5-introduction/Agilent%202100/Bioanalyzer_compendium.pdf . (dostopno: 24.2.2015)
- 57.** HGMD - The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. (dostopno: 22.2.2015)
- 58.** dbSNP – Short Genetic Variations. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. (dostopno: 22.2.2015)
- 59.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977, 74(12):5463-7.
- 60.** Life Technologies. <https://www.lifetechnologies.com/si/en/home.html>. (dostopno: 19.5.2015)
- 61.** Ensembl Genome Browser. <http://www.ensembl.org./index.html>. (dostopno: 4.3.2015)

62. SNPCheck.

<https://secure.ngsl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm;jsessionid=D93CC5E28F04CE1557F25AB3949B5631>. (dostopno: 22.2.2015)

63. BLAST - Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (dostopno: 22.2.2015)

64. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (dostopno: 22.2.2015)

65. Human Genome Variation Society. <http://www.hgvs.org/>. (dostopno: 23.6.2015)

66. Izatt L, Carroll P, Lillis S, Patel Y, Brodd L, Stone K, Ryan K, Ahn JW, Simpson M, Yau M. Whole exome sequencing in congenital hypogonadotropic hypogonadism. 2015.

67. Quaynor SD, Chorich LP, Kim HG, Layman LC. Using Targeted Next Generation Sequencing to identify putative mutations in genes associated with GnRH development and hypogonadotropic hypogonadism. The Endocrine Society's. 2013.

68. Tommiska J, Käsäkoski J, Christiansen P, Jørgensen N, Lawaetz JG, Juul A, Raivio T. Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism in Denmark. *Eur J Hum Genet.* 2014, 57: 345-8.

69. Shin SJ, Y Sul, Kim JH, Cho JH, Kim GH, Kim JH, Choi JH, Yoo HW. Clinical, endocrinological and molecular characterization of Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: a single center experience. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2015, 20(1):27–33.

70. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, Beenken A, Clarke J, Pers TH, Dworzynski P, Keefe K, Niedziela M, Raivio T, Crowley WF, Seminara SB, Quinton R, Hughes VA, Kumanov P, Young J, Yialamas MA, JE Hall, Vliet GV, Chanoine JP, Rubenstein J, Mohammadi M, Tsai PS, Sidis Y, Lage K, Pitteloud N. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4 and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2013, 92(5):725–43.

71. ClinVar. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. (dostopno: 9.6.2015)

72. Dodé C, Rondard. PROK2/PROKR2 signaling and Kallmann Syndrome. *Front Endocrinol.* 2013, 4:19.

73. Libri DV, Kleinau G, Vezzoli V, Busnelli M, Guizzardi F, Sinisi AA, Pincelli AI, Mancini A, Russo G, Beck-Peccoz P, Loche S, Crivellaro C, Maghnie M, Krausz C, Persani L, Bonomi M. Germline prokineticin receptor 2 (PROKR2) variants associated

with central hypogonadism cause differential modulation of distinct intracellular pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014, 99(3):458-63.

74. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toublanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* 2006, 2(10):e175.

75. Martin C, Balasubramanian R, Dwyer AA, Au MG, Sidis Y, Kaiser UB, Seminara SB, Pitteloud N, Zhou QY, Crowley WF. The role of the prokineticin 2 pathway in human reproduction: evidence from the study of human and murine gene mutations. *Endocr Rev.* 2011, 32(2):225-46.

76. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci.* 2007, 104(44):17447-52.

77. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van Vliet G, Pearce S, Crowley WF Jr, Zhou QY, Pitteloud N. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93(9):3551-9.

78. Kim SH, Hu Y, Cadman S, Bouloux P. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol.* 2008, 20(2):141-63.

79. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8(3):235-53.

80. Pitteloud N, Meysing A, Quinton R, Acierno JS Jr, Dwyer AA, Plummer L, Fliers E, Boepple P, Hayes F, Seminara S, Hughes VA, Ma J, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley WF. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. *Mol Cell Endocrinol.* 2006, 60(9): 254-5.

81. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF Jr,

Hoefsloot LH. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet.* 2009, 75(1):65-71.

82. Pinto G, Abadie V, Mesnage R, Blustajn J, Cabrol S, Amiel J, Hertz-Pannier L, Bertrand AM, Lyonnet S, Rappaport R, Netchine I. CHARGE syndrome includes hypogonadotropic hypogonadism and abnormal olfactory bulb development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90(10):5621-6.

83. Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Piñero A, Wolczynski S, Brailly-Tabard S, Bidet M, Ramos-Arroyo M, Mathieu M, Lienhardt-Roussie A, Morgan G, Turki Z, Bremont C, Lespinasse J, Du Boullay H, Chabbert-Buffet N, Jacquemont S, Reach G, De Talence N, Tonella P, Conrad B, Despert F, Delobel B, Brue T, Bouvattier C, Cabrol S, Pugeat M, Murat A, Bouchard P, Hardelin JP, Dodé C, Young J. A comparative phenotypic study of Kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, 95(2):659-69.

84. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Gregory LC, Alatzoglou KS, Tziaferi V, Sbai O, Rondard P, Masumoto KH, Nagano M, Shigeyoshi Y, Pfeifer M, Hulse T, Buchanan CR, Pitteloud N, Martinez-Barbera JP, Dattani MT. Variations in PROKR2, but not PROK2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013, 98(3):E547-57.

85. Chevrier L, Guimiot F, de Roux N. GnRH receptor mutations in isolated gonadotropic deficiency. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 346(1-2):21-8.

86. Karges B, Karges W, Mine M, Ludwig L, Kühne R, Milgrom E, de Roux N. Mutation Ala(171)Thr stabilizes the gonadotropin-releasing hormone receptor in its inactive conformation, causing familial hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88(4):1873-9.

87. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med.* 1997, 337:1597-603.

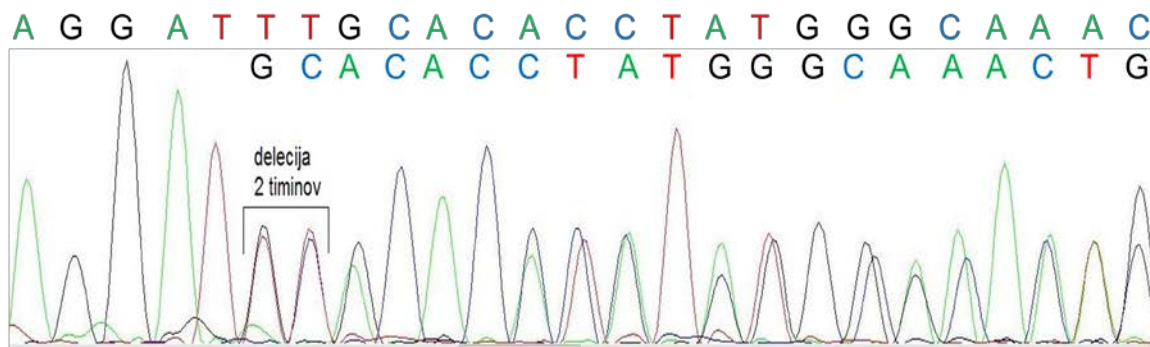
88. Costa EMF, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJP, Kaiser UB, Latronico AC. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86(6): 2680-6.

89. Kottler ML, Chauvin S, Lahlou N, Harris CE, Johnston CJ, Lagarde JP, Bouchard P, Farid NR, Counis R. A new compound heterozygous mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor (L314X, Q106R) in a woman with complete hypogonadotropic hypogonadism: chronic estrogen administration amplifies the gonadotropin defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85(9):3002-8.

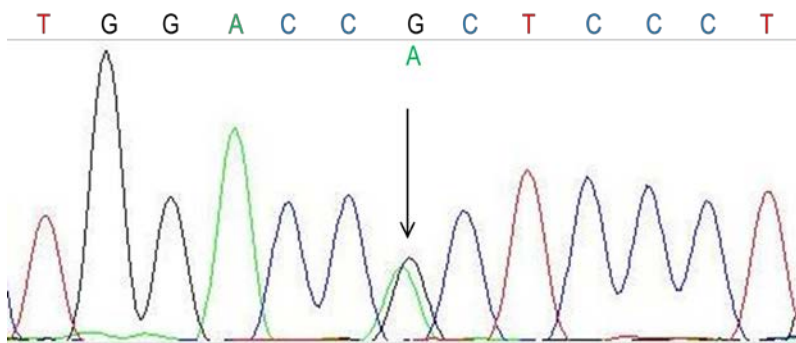
8 PRILOGA

Priloga 1: Genetske spremembe opredeljene s potrditvenim sekvenciranjem po Sangerju. Nukleotidi na elektroferogramu so prikazani z različnimi barvami, rdeči vrhovi predstavljajo timin (T), zeleni adenin (A), črni gvanin (G) in modri citozin (C).

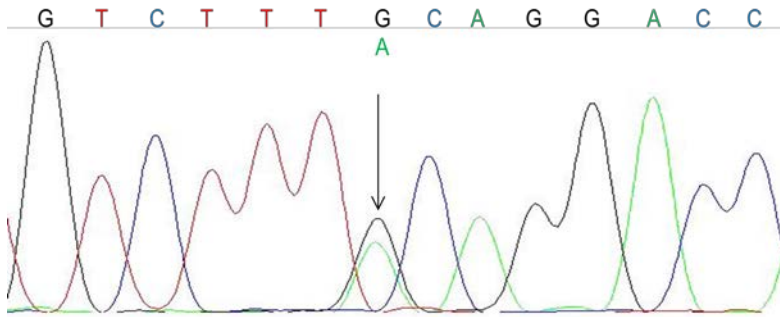
A) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_001126128.1:c.171_172delTT v genu *PROK2*, opredeljena pri preiskovancu A.



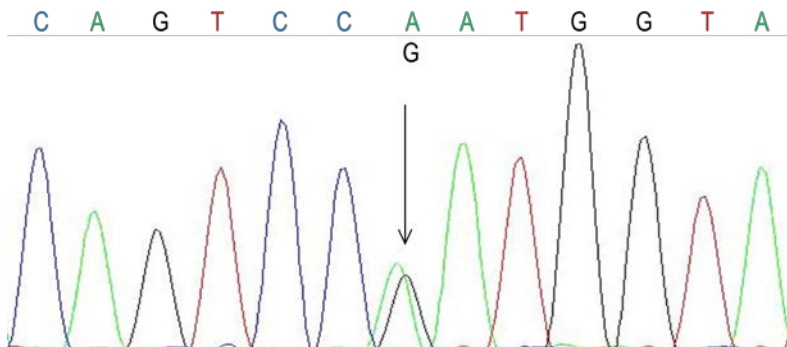
B) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_000406.2:c.416G>A v genu *GNRHR*, opredeljena pri preiskovancu B.



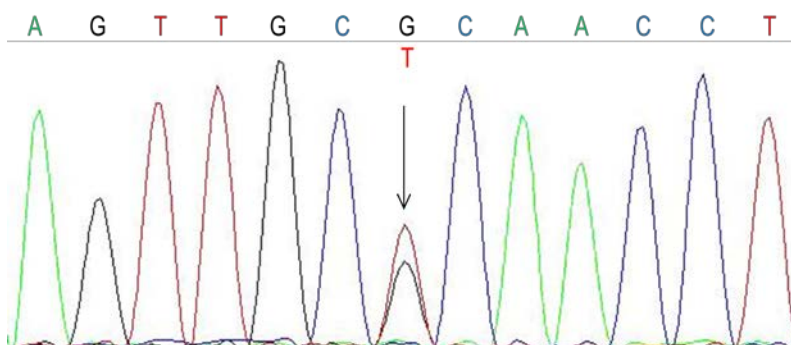
C) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_000406.2:c.511G>A v genu *GNRHR*, prav tako opredeljena pri preiskovancu B.



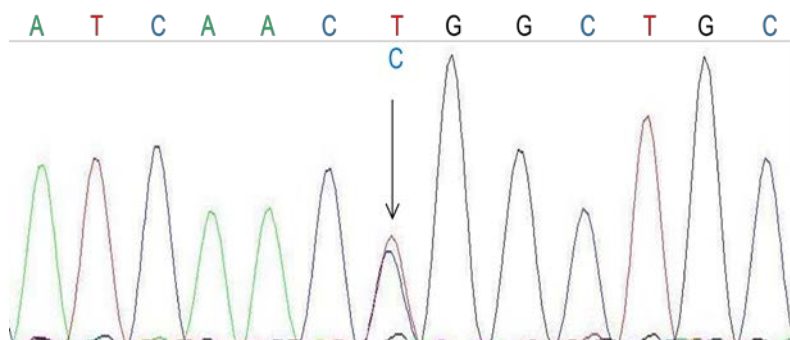
D) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_000406.2:c.317A>G v genu *GNRHR*, opredeljena pri preiskovancu F.



E) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_144773.2:c.254G>T v genu *PROKR2*, opredeljena pri preiskovancu H.



F) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_023110.2:c.196T>C v genu *FGFR1*, opredeljena pri preiskovanki K.



G) Heterozigotna nukleotidna sprememba NM_017780.3:c.5759A>G v genu *CHD7*, opredeljena pri preiskovancu L.

