



Instytut Genomiki i Medycyny Molekularnej

CMS CODE sp. z o.o.

RAPORT

Analiza wyników sekwencjonowania eksomu (WES - Whole Exome Sequencing) pacjenta pod kątem wykrywania wariantów sekwencyjnych genów związanych z zaburzeniami płodności.

Kierownik Instytutu Genomiki i Medycyny
Molekularnej CMS CODE sp. z o.o.

Prof. UM dr hab. Tadeusz Pietrucha

Analitik

Hubert Salamaga

INFORMACJE DOTYCZĄCE WYNIKÓW OPRACOWANIA

Użyty genom referencyjny: GCF_000001405.39 (GRCh38.p13).

Kryteria określające jakość uzyskanych wyników:

- Warianty uzyskane zostały poprzez algorytm który korzystając z tzw. „złotego standardu” kwalifikuje warianty w naszej próbce jako potencjalnie prawdziwe, następnie dokonano filtrowania tak aby usunąć wyniki fałszywie pozytywne. Warto zaznaczyć, że niemożliwe jest pełne odfiltrowanie wyników fałszywie pozytywnych i powinno to wpływać na ewentualną interpretację
- Informacje dotyczące konsekwencji wariantów zostały uzyskane za pomocą VEP (Variant effect predictor) przy użyciu baz danych które są dostępne przez portal ENSEMBL
- Warianty występujące w populacji z częstością powyżej 5% prawdopodobnie należą do wariantów łagodnych. Prawdopodobieństwo to rośnie, gdy są one obecne w sekwencjach intronowych nieodpowiadających za regulację genów.
- SIFT score przewiduje, bazując na homologii i właściwościach aminokwasów, w jakim stopniu wariant wpływa na funkcje białka. Skala od 0 do 1 (0,0–0,05 szkodliwy, 0,05–1 łagodny); im bliżej skrajności tym bardziej prawdopodobne, że wynik jest precyzyjny.
- PolyPhen score bazując na homologii przewiduje wpływ wariantu na strukturę białka. Skala od 0 do 1 (0,908–1 prawdopodobnie szkodliwy, 0,446–0,908 możliwe szkodliwy, 0–0,446 łagodny).
- Sekwencjonowanie zostało wykonane przez firmę SEQme s.r.o., przy użyciu NovaSeq6000.
- Analiza danych przeprowadzona została przez Instytut Genomiki i Medycyny Molekularnej (IGiMM) przy CMS CODE.
- Przeanalizowano warianty sekwencyjne w badanym genomie ponad 250 genów związanych z niepłodnością męską (baza genów związanych z niepłodnością męską i żeńską opracowana przez IGiMM CMS CODE na podstawie źródeł literaturowych oraz genomowych baz danych).
- Prezentowany poniżej raport może zawierać błędy: w wyniku kontaminacji próbki, rzadkiego błędu technicznego lub wystąpienia u pacjenta zmian genetycznych niemożliwych do wykrycia przy zastosowanej technologii. Raport powinien być uznawany jedynie jako jeden z elementów mających wpływ na postawienie diagnozy oraz na przebieg leczenia, ale sam w sobie nie stanowi narzędzia diagnostycznego. Wynik powinien zostać omówiony przez lekarza specjalistę lub/i genetyka klinicznego.



PODSUMOWANIE WYNIKÓW

W wyniku przeprowadzonej analizy eksomowego DNA, po przeanalizowaniu ponad 270 genów związanych z niepłodnością męską i odfiltrowaniu wyników niepewnych, zidentyfikowano w 6 genach zmienności w zapisie kodu genetycznego, które mogą mieć związek z zaburzeniami płodności u badanego pacjenta.

1. Gen: *DNAH5*

Schorzenia związane z genem:

- Pierwotna dyskineza rzęsek (PCD)
- Zespół Kartagenera

Wykryty wariant polimorficzny:

- pozycja chr5:13824314
- heterozygota A/T
- aminokwas Leu2155Glu
- **SIFT = 0**
- **Polyphen = 1**
- **Częstość występowania w populacji: nieznaną**

Gen *DNAH5* koduje łańcuch ciężki białka motorycznego dyneiny. Dyneina jest białkiem motorycznym odpowiedzialnym za ruch zarówno rzęsek komórek jak i wici plemnika.

Wykryty u pacjenta wariant polimorficzny genu *DNAH5* nie jest odnotowany w genomowych bazach danych. Bazując na wynikach scoringu SIFT oraz PolyPhen możemy wnioskować, że zmiana ta ma znaczący wpływ zarówno na strukturę jak i właściwości białka dyneiny kodowanego przez gen *DNAH5*.

Dwa inne znane warianty polimorficzne tego genu, u których zmiany w sekwencji DNA występują w niewielkiej odległości od zmiany wykrytej w genie badanego pacjenta, kojarzone są z występowaniem pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)^{1,2}.

Schorzenie to może dotyczyć rzęsek w obrębie układu oddechowego i rzęsek innych komórek. Zaburzenia w budowie dyneiny prowadzą także do powstawania plemników niezdolnych do zsynchronizowanego i efektywnego ruchu wici.

PCD jest schorzeniem dziedziczonym w sposób recesywny w odniesieniu do znanych wariantów polimorficznych genu *DNAH5*. Ponieważ opisany wyżej wariant polimorficzny genu pacjenta nie jest dotąd odnotowany w dostępnej literaturze naukowej czy genomowych bazach danych, nie jest więc też znany sposób jego dziedziczenia. Nie można wykluczyć, że ten właśnie wariant polimorficzny może nie podlegać znanym z wcześniejszych wariantów schematom dziedziczenia i wywiera wpływ na konformację łańcucha ciężkiego dyneiny powodując zaburzenia w jej funkcjonowaniu jako białka motorycznego wici plemnika.

.

1.Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegau M, Loges NT, Wildhaber J, Noone PG, Kennedy M, Antonarakis SE, Blouin JL, Bartoloni L, Nüsslein T, Ahrens P, Griese M, Kuhl H, Sudbrak R, Knowles MR, Reinhardt R, Omran H. *DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects*. Am J Respir Crit Care Med. 2006 Jul 15;174(2):120-6. doi: 10.1164/rccm.200601-084OC. Epub 2006 Apr 20. PMID: 16627867; PMCID: PMC2662904.

2.Raidt J, Wallmeier J, Hjejij R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, Olbrich H, Häffner K, Dougherty GW, Omran H, Werner C. *Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J. 2014 Dec;44(6):1579-88. doi: 10.1183/09031936.00052014. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25186273.

2. Gen: *CFTR*

Schorzenia związane z genem:

- Mukowiscydoza
- Brak drożności kanalików nasiennych

Wykryty wariant polimorficzny:

- rs1800120
- heterozygota G/T
- aminokwas Arg1162Leu
- **SIFT = 0.0**
- PolyPhen = 0.828

Częstość występowania w populacji:
<1 %

Wariant wykryty u pacjenta został wykryty przez Fanen i wsp. u osób dotkniętych mukowiscydozą jednakże nie został wskazany jako jej przyczyna¹. Bazując na wynikach z szeroko zakrojonych badań² wariant ten prowadził do wystąpienia mukowiscydozy jedynie u pacjentów u których występowały inne polimorfizmy związane z mukowiscydozą. U pacjenta posiadającego wyżej wymieniony wariant, którego przypadek został opisany przez Casals T. i wsp. nie wykazano związku między polimorfizmem, a zaburzeniami płodności³.

1. Fanen, P., Ghanem, N., Vidaud, M., Besmond, C., Martin, J., Costes, B., ... Goossens, M. (1992). Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 Novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics*, 13(3), 770–776. doi:10.1016/0888-7543(92)90152-i

2. Claustres M, Thèze C, des Georges M, Baux D, Girodon E, Bienvenu T, Audrezet MP, Dugueperoux I, Férec C, Lalau G, Pagin A, Kitzis A, Thoreau V, Gaston V, Bieth E, Malinge MC, Reboul MP, Fergelot P, Lemonnier L, Mekki C, Fanen P, Bergougnoux A, Sasorith S, Raynal C, Bareil C. CFTR-France, a national relational patient database for sharing genetic and phenotypic data associated with rare CFTR variants. *Hum Mutat.* 2017 Oct;38(10):1297-1315. doi: 10.1002/humu.23276. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28603918.

3. Casals T, Aparisi L, Martínez-Costa C, et al. Different CFTR mutational spectrum in alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis? *Pancreas.* 2004 May;28(4):374-379. DOI: 10.1097/00006676-200405000-00004. PMID: 15097853.

3. Gen: *LRRC56*

Schorzenia związane z genem:

- Pierwotna dyskineza rzęsek (PCD)

Wykryty wariant polimorficzny:

- rs10902171
- heterozygota G/C
- aminokwas Asp523His
- **SIFT = 0.01**
- Polyphen = 0.615

Częstość występowania w populacji: >5%

Gen *LRRC56* koduje białko zawierające powtarzające się sekwencje bogate w leucynę, które jest niezbędne do składania ramion dyneiny, białka motorycznego warunkującego ruch rzęsek komórek i wici plemników. Bierze ono również udział w wewnątrz wiciowym transporcie dyneiny poprzez oddziaływanie z białkiem IFT88.

Zidentyfikowany u pacjenta wariant polimorficzny istnieje w bazie ENSEMBL, ale nie jest połączony z żadnym fenotypem. Jednakże inne warianty bialleliczne występujące w tym genie zostały powiązane z defektami funkcjonalnymi rzęsek w układzie oddechowym¹ co może mieć

przełożenie na działanie plemników z racji podobieństwa morfologicznego tych dwóch struktur. Warianty wymienione w wyżej wspomnianym artykule nie prowadziły do zaburzenia struktury wici, a jedynie do zaburzeń jej funkcji. Z racji swojej heterozygotyczności oraz stosunkowo częstego występowania w populacji (powyżej 5%) wykryty wariant w genie *LRRC56* ma niskie prawdopodobieństwo bycia decydującym czynnikiem w ograniczeniu płodności.

Z kolei niski parametr SIFT świadczący o szkodliwym wpływie potencjalnej zamiany aminokwasu Asp w pozycji 523 na His oraz parametr PolyPhen pozwalają kwalifikować tę zmianę jako "możliwie szkodliwą", a więc mogącą wywierać niekorzystny wpływ na funkcje białka, a tym samym upośledzać funkcjonowanie dyneiny, w wyniku zaburzenia transportu i składania jej ramion.

1. Bonnefoy S, Watson CM, Kernohan KD, Lemos M, Hutchinson S, Poulter JA, Crinnion LA, Berry I, Simmonds J, Vasudevan P, O'Callaghan C, Hirst RA, Rutman A, Huang L, Hartley T, Grynspan D, Moya E, Li C, Carr IM, Bonthron DT, Leroux M; Care4Rare Canada Consortium, Boycott KM, Bastin P, Sheridan EG. Biallelic Mutations in *LRRC56*, Encoding a Protein Associated with Intraflagellar Transport, Cause Mucociliary Clearance and Laterality Defects. *Am J Hum Genet.* 2018 Nov 1;103(5):727-739. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.10.003. PMID: 30388400; PMCID: PMC6218757.

4. Gen: *FSIP2*

Schorzenia związane z genem:

- Multiple Morphological Abnormalities of Sperm Flagella (MMAF).

Wykryty warianty polimorficzne:

Wariant 1:

- rs182740901
- heterozygota A/G
- aminokwas Lys2900Glu
- **SIFT = 0.01**
- Polyphen = 0
- **Częstość występowania w populacji: <1%**

Wariant 2:

- rs17826534
- homozygota A/A
- aminokwas Arg5775Gln
- **SIFT = 0.02**
- Polyphen = 0.026
- **Częstość występowania w populacji: 30%**

Gen *FSIP2* koduje białko związane z włóknistą osłonką plemnika i jest ono niezbędne dla prawidłowej budowy wici plemnika. Znane warianty tego genu zostały powiązane z występowaniem zespołu MMAF (ang. Multiple Morphological Abnormalities of Sperm Flagella) - wielorakie morfologiczne nieprawidłowości wici plemnika¹. Według autorów cytowanej pracy gen *FSIP2* jest jednym z głównych genów odpowiedzialnych za zespół MMAF.

Wykryte u pacjenta polimorfizmy nie są niestety opisane w bazach danych ani w cytowanej poniżej literaturze. Oznacza to, że ich znaczenie nie jest jeszcze poznane. W przypadku pierwszego wariantu jego wynik scoringu SIFT oraz niska częstość występowania w populacji wskazują na patologiczny charakter wykrytej zmienności. W drugim wariantie polimorficznym genu FSIP2 niski scoring SIFT (0,02) wskazuje na szkodliwość tej homozygotycznej zmiany, ale wysoka częstość jej występowania poddaje w wątpliwość rzeczywiste szkodliwe oddziaływanie tego polimorfizmu na funkcje kodowanego białka. Tak więc ewentualnie negatywne skutki wykrytych w genie FSIP2 u badanego pacjenta można przypisać tylko wariantowi I.

Warto zaznaczyć że u pacjenta w obrębie tego genu występuje wiele innych wariantów, ale żaden z nich nie wykazuje odpowiednio niskich wyników SIFT/Polyphen lub częstości występowania poniżej 1% aby je tu uwzględnić. Jednakże sam fakt wystąpienia 17 mutacji zmiany sensu w obrębie jednego genu wskazuje na potrzebę rozważenia go jako przyczyny niepłodności.

1. Martinez G, Kherraf ZE, Zouari R, Fourati Ben Mustapha S, Saut A, Pernet-Gallay K, Bertrand A, Bidart M, Hograindleur JP, Amiri-Yekta A, Kharouf M, Karaouzène T, Thierry-Mieg N, Dacheux-Deschamps D, Satre V, Bonhivers M, Touré A, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. Whole-exome sequencing identifies mutations in FSIP2 as a recurrent cause of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Hum Reprod.* 2018 Oct 1;33(10):1973-1984. doi: 10.1093/humrep/dey264. PMID: 30137358.

5. Gen: SOS1

Schorzenie związane z genem:

- Zespół Noonan

Wykryty wariant polimorficzny:

- rs142004123
- heterozygota G/T
- aminokwas Leu791Ile
- SIFT = 0.14
- PolyPhen = 0.699

Częstość występowania w populacji:
<1%

Gen *SOS1* koduje białko będące czynnikiem odpowiedzialnym za regulację działania białek z rodziny Ras poprzez zamianę GTP na GDP.

W badaniu wariantów polimorficznych genów związanych z zespołem Noonan¹, dwóch pacjentów dotkniętych tym schorzeniem posiadało ten wariant, ale bynajmniej nie oznacza to, że jest to jakiś uznany marker tego zaburzenia. Mężczyźni z zespołem Noonan mogą wykazywać podwyższone stężenie FSH z normalnymi odczytami testosteronu oraz LH. W niektórych przypadkach może występować wewnątrzowo wraz z towarzyszącą oligozoospermia².

Wariant wykryty u pacjenta zgodnie z danymi zawartymi w bazach danych jest wariantem o łagodnym i/lub niepewnym znaczeniu³.

1. Lepri FR, Scavelli R, Digilio MC, et al. Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. *BMC Medical Genetics.* 2014 Jan;15:14. DOI: 10.1186/1471-2350-15-14. PMID: 24451042; PMCID: PMC3915031.

2. Elswawi MM, Pryor JP, Klufio G, Barnes C, Patton MA. Genital tract function in men with Noonan syndrome. *J Med Genet.* 1994 Jun;31(6):468-70. doi: 10.1136/jmg.31.6.468. PMID: 7915331; PMCID: PMC1049925.

6. Gen: NOS3

Schorzenie związane z genem:

- Stres oksydacyjny

Wykryty wariant polimorficzny:

- rs1799983
- heterozygota T/G
- aminokwas Asp298Glu
- SIFT = 1
- Polyphen = 0
- Częstość występowania w populacji >5%

Gen NOS3 koduje syntazę tlenku azotu (NO). jego nadekspresja może prowadzić do stresu oksydacyjnego.

Wariant wykryty u pacjenta mimo wyników SIFT oraz Polyphen wskazujących na jego nieszkodliwość, został powiązany z syndromem metabolicznym¹ (na podstawie bazy ENSEMBL) oraz idiopatyczną niepłodnością u mężczyzn^{2,3}. Różnice w dotkliwości tych schorzeń między heterozygotą a homozygotą G/G nie są dobrze poznane, ale samo wystąpienie jednej kopii allelu G według niektórych autorów zdaje się mieć wpływ na osłabienie męskiej płodności^{2,3}.

1. Dupont C, Faure C, Daoud F, Gautier B, Czernichow S, Lévy R; ALIFERT collaborative group. Metabolic syndrome and smoking are independent risk factors of male idiopathic infertility. *Basic Clin Androl.* 2019 Jul 1;29:9. doi: 10.1186/s12610-019-0090-x. PMID: 31304019; PMCID: PMC6600889.

2. Faure C, Leveille P, Dupont C, Julia C, Chavatte-Palmer P; Alifert Group, Sutton A, Levy R. Are superoxide dismutase 2 and nitric oxide synthase polymorphisms associated with idiopathic infertility? *Antioxid Redox Signal.* 2014 Aug 1;21(4):565-9. doi: 10.1089/ars.2014.5831. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24444339.

3. Chavoshi R, Khalifeh Zadeh Kaleybar SB. Association of nitric oxide synthase3 gene rs1799983 G/T polymorphism with idiopathic asthenozoospermia in Iranian Azeri males: a case-control study. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2020 Jun 29;41(4). doi: 10.1515/hmbci-2020-0014. PMID: 32598309.

Wnioski:

Wykryte warianty polimorficzne 3 genów (*DNAH5*, *LRRC56*, *FSIP2* wariant 1) wskazują na uwarunkowane genetycznie zaburzenia dotyczące właściwości i funkcji białek motorycznych wici plemników (dyneiny, białka niezbędnego do składania ramion dyneiny i biorącego udział w wewnątrz wiciowym transporcie dyneiny poprzez oddziaływanie z białkiem IFT88 oraz białka związanego z włóknistą osłonką plemnika, które jest niezbędne dla prawidłowej budowy wici plemnika). W efekcie zmiany te mogą skutkować zaburzeniami w ruchliwości plemników, niekoniecznie objawiającymi się poprzez brak ruchu wici, a na przykład przez jego

asynchroniczność co uniemożliwia sprawny ruch w kierunku komórki jajowej a tym samym zapłodnienie.

Wariant polimorficzny genu *CFTR* rs1800120 posiada najniższy z możliwych parametr SIFT (wynoszący 0,0), co świadczy o jego szkodliwości bazując na homologii i właściwości aminokwasów zamienionych aminokwasów wskutek zmiany zapisu genetycznego i ich wpływu funkcje białka. Charakteryzuje się on również niską, poniżej 1%, częstością występowania w populacji, co potwierdza ewentualny szkodliwy charakter tej zmienności w genie *CFTR*. Jednakże u pacjentów u których stwierdzono wystąpienie tego wariantu oraz mukowiscydozę nie był on jedynym polimorfizmem w genie *CFTR*. W przypadku pacjenta TS nie wykryto innych zmian w obrębie tego genu.

Warianty polimorficzne genów *FSIP2 variant 2*, *SOS1*, *NOS3*, bazując na łącznej analizie takich parametrów jak częstość występowania w populacji, scoringu SIFT i PolyPhen, nie wydają się mieć istotnego wpływu na zaburzenie płodności u badanego pacjenta.

WPŁYW POLIMORFIZMÓW PACJENTA NA LECZENIE PRZY POMOCY ZNANYCH LEKÓW STOSOWANYCH W TERAPII LECZENIE NIEPŁODNOŚCI

W trakcie analizy nie zostały znalezione polimorfizmy wpływające negatywnie lub pozytywnie na efektywność leków odnotowanych w bazie IGiMM CMS CODE.