

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

In-vitro fertilizace a epigenetika
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Kubová**
Osobní číslo: **C21195**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: ***In-vitro* fertilizace a epigenetika**
Téma práce anglicky: ***In-vitro* Fertilization and Epigenetics**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma *In-vitro* fertilizace a epigenetika
 - Asistovaná reprodukce
 - Epigenetické poruchy, imprint

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem In-vitro fertilizace a epigenetika jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2024

Kateřina Kubová v.r. 2024

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za skvělý přístup, cenné rady a pomoc. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a svým přátelům, kteří mě plně podporovali po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zaměřuje na problematiku asistované reprodukce, zejména na IVF a epigenetiku. V úvodní části podrobně popisuje jednotlivé fáze IVF, včetně stimulace vaječníků, preimplantačního genetického testování a kryokonzervace. Následuje vysvětlení epigenetiky, vědního oboru, který studuje dědičné změny v genové expresi bez změn v samotné DNA sekvenci. Mezi hlavní epigenetické mechanismy, které stabilně ovlivňují genomovou aktivitu prostřednictvím mitózy, patří DNA metylace, histonová metylace a RNA interference. Práce se také zabývá genomickým imprintem, což je proces umlčování genů pomocí DNA metylace. V závěrečné části se soustředí na rizika vzniku imprintových chyb při asistované reprodukci a některé nemoci, které z těchto chyb mohou vyplývat.

KLÍČOVÁ SLOVA

IVF, epigenetika, metylace DNA, genomický imprint

TITLE

IVF and epigenetics

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on assisted reproduction, in particular on IVF and epigenetics. In the introductory part it describes in detail the different stages of IVF, including ovarian stimulation, preimplantation genetic testing and cryopreservation. This is followed by an explanation of epigenetics, a scientific field that studies heritable changes in gene expression without changes in the DNA sequence itself. The major epigenetic mechanisms that stably affect genomic activity through mitosis include DNA methylation, histone methylation, and RNA interference. This paper also discusses genomic imprinting, which is the process of gene silencing by DNA methylation. The final section focuses on the risks of imprinting errors in assisted reproduction and some of the diseases that can result from these errors.

KEYWORDS

IVF, epigenetics, DNA methylation, genomic imprinting

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD.....	12
1 Asistovaná reprodukce.....	13
1.1 První dítě pomocí IVF	13
1.1.1 IVF v Československé republice	13
2 In vitro fertilization	14
2.1 Stimulace vaječnicků.....	14
2.2 Odběr vajíčka.....	14
2.3 Oplodnění.....	15
2.4 Preimplantační genetické testování	15
2.4.1 Vyšetření monogenních dědičných poruch (PGT-M)	16
2.4.2 Vyšetření aneuploidních dědičných poruch (PGT-A)	16
2.4.3 Vyšetření strukturálních přestaveb dědičných poruch (PGT-SR)	17
2.5 Zrání in vitro	17
2.6 Přenos embryí	18
2.7 Kryokonzervace	18
3 Epigenetika	20
3.1 Methylace DNA.....	20
3.1.1 Hypomethylace a hypermethylace.....	21
3.1.2 Demethylace DNA.....	23
3.2 miRNA.....	23
3.3 Modifikace histonů	24
4 Genomický imprint.....	26
4.1 Imprintované geny	27

5 Riziko poruch imprintu u dětí počatých pomocí IVF	30
5.1 Nemoci.....	30
5.1.1 Beckwith-Wiedemannův syndrom.....	33
5.1.2 Silver-Russellův syndrom.....	34
5.1.3 Prader-Willi syndrom	34
5.1.4 Angelmanův syndrom.....	34
ZÁVĚR	36

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Preimplantační genetické testování.....	15
Obrázek 2 Methylace cytosinu	20
Obrázek 3 Methylace a demethylace DNA	22
Obrázek 4 Acetylace lysinu	24
Obrázek 5 Ilustrace mateřského a otcovského genomického imprintu	26
Obrázek 6 Exprese imprintovaných genů.....	28
Obrázek 7 Genetické a epigenetické změny vedoucí k Beckwith-Wiedemannovu syndromu (BWS) a Silver-Russellovu syndromu (SRS).....	33
Tabulka 1 Shrnutí doporučení týkajících se různých aspektů ET	19
Tabulka 2 Nemoci a syndromy.....	32

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

aCGH	Array komparativní genomová hybridizace (z angl. „Array comparative genomic hybridization“)
ART	Asistované reprodukční technologie
AS	Angelmanův syndrom
BWS	Beckwith-Wiedemannův syndrom
DMR	Diferenciálně metylované oblasti
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic acid“)
DNMT	DNA metyltransferáza (z angl. „DNA methyltransferase“)
DNMT1	DNA-(cytosin-5)-methyltransferáza 1
DNMT2	DNA-(cytosin-5)-methyltransferáza 2
DNMT3	DNA-(cytosin-5)-methyltransferáza 3
CpG	Cytosin-fosfát-Guanin (z angl. „Cytosine-phosphate-guanine“)
ET	Embryotransfer
FET	Transfer zmrazených embryí (z angl. „Frozen embryo transfer“)
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace (z angl. „Fluorescence in situ hybridization“)
GIFT	Intrafalopický přenos gamet (z angl. „Gamete Intrafallopian Transfer“)
HAT	Enzym histonacetyltransferáza
HDAC	Enzym histondeacetyláza
ICR	Kontrolovaná oblast imprintu
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie
IVF	In vitro fertilizace
IVM	In vitro maturace
LOM	Ztráta metylace (z angl. „Loss of methylation“)

MBD	Metyl-DNA vazebná doména (z angl. „Methyl-DNA binding domain“)
MeCP2	Metyl CpG vazebný protein 2 (z angl. „Methyl CpG binding protein 2“)
miRNA	MikroRNA (z angl. „microRNA“)
NGS	Sekvenování nové generace
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. „Polymerase chain reaction“)
PGC	Primordiální zárodečné buňky (z angl. „Primordial germ cells“)
PGT	Preimplantační genetické testování
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. „Ribonucleic acid“)
SAM	S-adenosyl- L-methionin (z angl. „S-adenosylmethionine“)
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
SRS	Silverův-Russellův syndrom
TDG	Thymin-DNA glykosyláza
TET	Tet metylcytosin dioxygenáza (z angl. „Tet methylcytosine dioxygenase“)
UPD	Uniparentální disomie

ÚVOD

Neplodnost je definována jako neschopnost počít dítě přirozenou cestou. Diagnostikuje se jako léčitelný zdravotní stav, který lze řešit změnou životního stylu nebo pomocí metod asistované reprodukce. V posledních letech se stále více využívá asistovaná reprodukce, přičemž jednou z nejrozšířenějších metod je In vitro fertilizace (IVF). Přestože jsou neustále zaváděna nová vylepšení ke zvýšení úspěšnosti léčby, existuje riziko vzniku epigenetických poruch. Tyto poruchy představují změny v genové expresi, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA.

Tato práce má za cíl představit problematiku asistované reprodukce, s důrazem na podrobný popis jednotlivých kroků metody IVF. Dále se zaměřuje na vysvětlení epigenetiky a na mechanismy, které ji ovlivňují. Poté se soustředí na genomický imprint, upozorňuje na rizika spojená s poruchami imprintu u dětí počatých touto metodou a shrnuje s tím související onemocnění.

1 Asistovaná reprodukce

Definicí neplodnosti je nejméně rok nechráněného pohlavního styku bez početí potomka nebo neschopnosti počít z důsledku nefunkčních reprodukčních schopností člověka, a to jednotlivce nebo v páru. K jejímu léčení se používá asistovaná reprodukce, která se provádí několika metodami. Je to buď nitroděložní inseminace (IUI), kdy se sperma aplikuje přímo do dělohy, čímž je umožněn průnik většího počtu spermií. Patří mezi nejméně invazivní a nejpřirozenější metody asistované reprodukce. Jako další metoda se používá intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI), při níž se vybrané spermie vtáhnou do mikrojuhly a pod mikroskopem jsou vpraveny do cytoplazmy zralého vajíčka. Dále je zde proces In vitro fertilizace, při kterém je oocyt vyjmut z těla ženy a až v laboratoři interaguje se spermii. Poté se embryo vrátí zpět do těla ženy. Pokud je ovšem nemožné z nějakého důvodu použít vlastní vajíčka či spermie, existuje možnost darovacího programu [1, 2].

1.1 První dítě pomocí IVF

První dítě počaté IVF metodou se narodilo ve Spojeném království manželům Lesley a Johnovi Brownovým roku 1978. Jejich dcera Louise Brownová byla při narození zdravá. Díky tomuto úspěšnému porodu začal počátek nové éry asistované reprodukce [3].

1.1.1 IVF v Československé republice

Pokusy umělého oplodnění byly neoficiálně započaty v brněnské nemocnici v 80. letech minulého století. Přestože tento tým neměl dobré podmínky, spočívající v nedostatečném kvalitním vybavení, po několika neúspěšných pokusech se jim to podařilo. Pominuli fázi vývoje embrya v laboratoři a při odebírání neoplozeného vajíčka zároveň vnesli spermii s vajíčkem do vejcovodu matky. Roku 1982 přišel císařským řezem na svět chlapec, první československé dítě ze zkumavky. Tento úspěch jim zařídil dostatečnou finanční podporu a díky tomu bylo prostřednictvím metody IVF počato dítě, které se narodilo roku 1984 [4].

Při pokusech o umělé oplodnění vznikla takzvaná Pilkova metoda GIFT. Při této metodě je vkládáno vajíčko i spermie do vejcovodu matky a až poté dojde k oplodnění. Je pojmenována po jednom z kolektivu odborníků, kteří pracovali na prvním umělém oplodnění v Československu, a to profesoru Ladislavu Pilkoví [4].

2 In vitro fertilization

Nejpoužívanější metoda při asistovaném početí dítěte se skládá z následujících kroků: stimulace vaječnicků, odběr zralého oocyty, oplodnění in vitro, přenos embrya do dělohy. Součástí tohoto procesu může být také preimplantační genetické testování a intracytoplazmatická injekce spermie. Pro uchování vajíček či embryí se používá kryokonzerzace, která nám umožní jejich zmrazení [2, 5].

2.1 Stimulace vaječnicků

Stimulace vaječnicků je nedílnou součástí technik ART. Jejím cílem je indikovat pokračující vývoj více dominantních folikulů a umožnit dozrání většímu počtu oocytů za účelem zvýšení šance na početí. Tento způsob zásahu do fyziologických mechanismů, které jsou základem výběru jednoho dominantního folikulu, se obvykle používá u normoovulačních žen. Je třeba jej jasně odlišit od indukce ovulace, jejímž cílem je vyvolat monofolikulární vývoj a ovulaci u anovulačních žen. Ovariální stimulace umožňuje získání velkého množství komplexů kumulus-oocyt. To umožňuje neefektivní následné zrání oocytů, oplodnění in vitro, kultivaci embryí, výběr embryí pro přenos a implantaci. U velké většiny pacientek lze přenést více embryí a volná embrya mohou být kryokonzervována, aby se umožnila následná šance na otěhotnění bez nutnosti opakované ovariální stimulace a odběru oocytů. Nyní existují tři hlavní protokoly pro stimulaci vaječnicků, a to krátký protokol, dlouhý protokol a protokol s antagonisty. V průběhu těchto protokolů se dostávají injekce, které mohou obsahovat folikuly stimulující hormon (FSH), luteinizační hormon (LH) nebo oba [2, 6, 7].

2.2 Odběr vajíčka

V počátcích se odběr oocytů prováděl laparotomií, později laparoskopii. Dnes se standardně provádí vaginálně pod ultrazvukovou kontrolou v celkové anestezii nebo sedaci při vědomí. Do každého folikulu se transvaginálně zavede jehla, která se navádí ultrazvukem a aspiruje folikulární tekutinu, která obvykle obsahuje oocyt. Větší počet získaných oocytů (až 15) je spojen s lepšími výsledky při narození živého dítěte [5].

Před zavedením transvaginálního přístupu pod ultrazvukovou kontrolou se prováděly laparoskopické nebo abdominální odběry oocytů. Ačkoli z velké části vypadly z praxe, jsou příležitostně používány k získání oocytů v případě vaginální ageneze nebo absenci vaječnicků v pánvi [5].

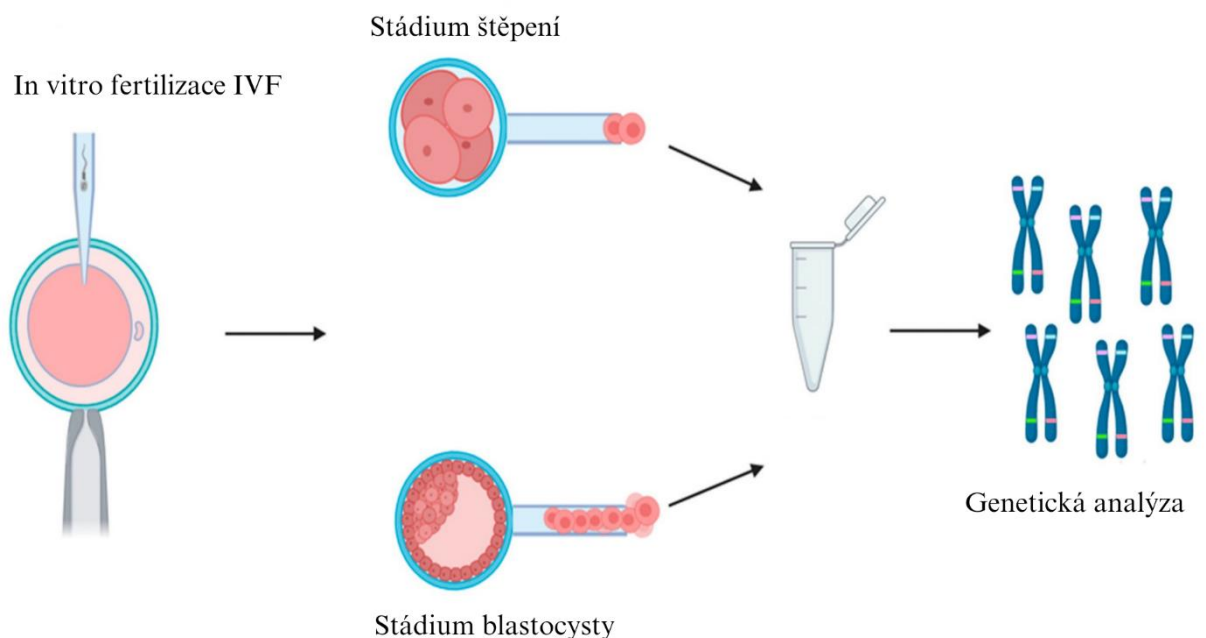
2.3 Oplodnění

K oplodnění in vitro dochází v kultivačním médiu smícháním oocytů se spermii. Spermie se získávají pomocí vzorku ejakulace nebo chirurgického odběru v případech obstrukční azoospermie a izolují se hustotní centrifugací a promytím v kultivačním médiu. U pacientů s anamnézou selhání oplodnění nebo s mužskou neplodností je zvažována ICSI, protože bylo prokázáno, že zlepšuje míru oplodnění. ICSI používá jedinou spermii, která je injikována přímo do cytoplazmy oocyty. Embryologové vybírají spermie pro ICSI s využitím morfologických parametrů [5].

Embrya jsou inkubována buď do 3. dne (stadium štěpení) nebo 5. dne (stadium blastocysty) přenosu. Přenosy 5. dne jsou častější a mají vyšší šanci na úspěch. Hodnocení vzhledu embryí více předpovídá úspěch v den 5 ve stádiu blastocysty spíše než v den 2 nebo 3 ve fázi štěpení, ve kterém jsou embrya pouze ze 4 nebo 8 buněk [5].

2.4 Preimplantační genetické testování

Preimplantační genetické testování (PGT) je diagnostický postup, který umožňuje analyzovat embrya v počátečních fázích vývoje, což umožňuje výběr a přenos zdravých embryí do dělohy matky, a tím snižuje riziko přenosu závažných genetických poruch a zvyšuje



Obrázek 1 Preimplantační genetické testování

Po cyklu asistovaného oplodnění se provede biopsie a vzorek extrahovaných buněk se poté podrobí genetické analýze za účelem určení, zda je embryo vhodné pro přenos či nikoliv [8].

pravděpodobnost úspěšného těhotenství. Navíc umožňuje párům vyhnout se náročnému rozhodnutí o ukončení těhotenství v případě embryí postižených závažnými genetickými poruchami. Techniky PGT jsou dnes široce využívány v klinické praxi a zároveň představují oblast značného zájmu, včetně komerčního, z hlediska vědeckého a technologického výzkumu. PGT zahrnuje multidisciplinární přístup, protože je neoddelitelný od technik lékařsky asistované reprodukce a umožňuje vyšetřování monogenních dědičných poruch (PGT-M) a numerických (PGT-A) a/nebo strukturálních (PGT-SR) chromozomálních abnormalit [8].

2.4.1 Vyšetření monogenních dědičných poruch (PGT-M)

Cílem testování PGT-M je zabránit přenosu embryí postižených určitou monogenní chorobou. Toho lze dosáhnout pouze výběrem embryí, která buď nejsou nositeli mutace, nebo jsou zdravými přenašeči (v případě recesivních onemocnění), jak se může stát u pacientů s pozitivní rodinnou nebo osobní anamnézou monogenního onemocnění. To vyžaduje předběžnou studii šitou na míru každému páru, do které se zapojí rodinní příslušníci [8, 9].

PGT-M vždy začíná biopsií trofoektodermy, ze které se odebere 5-10 buněk. Odtud se proces může rozdělit na cílovou amplifikaci nebo amplifikaci celého genomu. V případě cílové amplifikace lze provést multiplexní PCR, která identifikuje jak mutaci, tak genetické markery. V případě celogenomové amplifikace jsou na výběr multiplexní PCR, pole jednonukleotidových polymorfismů (SNP) nebo technologie sekvenování nové generace (NGS). Všechny tyto techniky jsou založeny na principu haplotypizace, která zahrnuje určení rizikového haplotypu spojeného s mutací pozorováním, jak vybrané informativní markery segregují s mutací. Tento přístup pomáhá určit, zda embryo zdědilo rizikovou alelu nebo alelu divokého typu. Jedná se o skutečnou vazebnou analýzu, která překonává omezení vyplývající z práce s malým množstvím DNA. Proto je během preklinického vyšetření nutné genotypování markerů SNP v blízkosti zájmového genu ve vzorcích DNA od páru a rodinných příslušníků se známým genetickým stavem [8, 9].

2.4.2 Vyšetření aneuploidních dědičných poruch (PGT-A)

PGT-A je indikován u párů s pokročilým věkem matky, opakovaným selháním implantace a opakovanými spontánními potraty. Cílem tohoto vyšetření je zjištění chromozomové výbavy embrya, a to převážně zjistit numerické chromozomální abnormality, jako například aneuploidii. Tyto poruchy v chromozomové výbavě mohou vést k narození postiženého dítěte nebo potratům. Výběr nejlepšího embrya je často založen na morfologickém hodnocení, protože jde o nenákladnou, rychlou a neinvazivní techniku. Tato technika však

navzdory svému rozšířenému používání není vhodná pro detekci genetických abnormalit. Aby se zlepšil počet živě narozených dětí při přenosu jediného embrya, výrazně se rozšířilo používání preimplantačního genetického testování na aneuploidii. Aneuploidie, které jsou často důsledkem meiotické nedisjunkce, přičemž nejčastější formou je trizomie, vedly k tomu, že PGT-A je považováno za definitivní nástroj pro výběr embryí na základě euploidie. Komplexní povaha PGT-A zahrnuje náročné bioptické postupy a následnou genetickou analýzu. Provádění biopsií ve stadiu štěpení může znamenat riziko výskytu menšího množství embryí, které dosáhnou stadia blastocysty [8, 10].

2.4.3 Vyšetření strukturálních přestaveb dědičných poruch (PGT-SR)

Preimplantační genetické testování strukturálních přestaveb se stalo slibnou technologií v oblasti reprodukční medicíny, která umožňuje párům s chromozomálními přestavbami snížit riziko přenosu genetických abnormalit na jejich potomky. Mezi nejčastější strukturální chromozomální přestavby patří inverze, delece a duplikace, ale především translokace, které mohou být zděděné nebo se mohou vyskytnout od počátku. Přítomnost takových změn významně zvyšuje riziko vzniku chromozomálně nevyvážených embryí, a to bez ohledu na věk ženy [8, 11].

Stejně jako u PGT-A byla první technikou použitou pro PGT-SR FISH se sondami specifickými pro daný lokus a rozlišením pro malé přestavby <2 Mb. Vyžadovala předklinické vyšetření, byla časově i finančně náročná a nepokrývala všech 24 chromozomů. Dnešní technologie umožňuje vyhodnotit celý chromozomální komplement páru a analyzovat tak chromozomy, které se podílejí na nerovnováze. Pro PGT-SR se používají různé metody, včetně FISH, aCGH a NGS. Tento typ genetického testování nevyžaduje preklinické nastavení a provádí se především na embryonálních biopsiích odebraných ve stadiu štěpení nebo blastocysty [8, 11].

2.5 Zrání in vitro

In vitro maturace (IVM) je obměnou tradičního IVF, kterou lze použít u vybraných pacientek, například u pacientek s rizikem ovariálního hyperstimulačního syndromu nebo u pacientek s rakovinou citlivou na estrogeny, které vyžadují časově náročnou gonadotoxickou léčbu. Při IVM se ve fázi od zárodečných váčků po metafázi II odebírají nezralé folikuly s minimálním nebo žádným vystavením hormonální stimulaci. Při folikulární přípravě se obvykle krátce aplikuje FSH s podáním hCG nebo bez něj. Odběr a kultivace musí být upraveny tak, aby se získaly a dozrály nezralé oocyty před oplozením. Kandidátky na IVM jsou ženy

s relativní kontraindikací k IVF a měly by být poučeny, že míra dosažení stadia blastocysty je při IVF nižší. Je pravděpodobné, že i počet těhotenství je u této metody nižší [5, 12].

2.6 Přenos embryí

Přenos embrya je považován za kritický krok v procesu oplodnění in vitro. Tato technika prošla pomalým vývojem, ale pro několik lékařů zůstává tento krok po léta praxe poměrně konzistentní. Samotný postup je relativně krátký. Pro každý z příslušných kroků mají lékaři často specifické preference z důvodu podložených důkazů, nabytých znalostí od mentorů, zkušeností a individuálních úspěchů. Úspěšnost embryotransferu (ET) je proto statistickým údajem, který vyvolává mezi lékaři značnou hrdost, a který kliniky často sledují jako ukazatel kontroly kvality. Zajímavé je, že mezi lékaři existují významné rozdíly ve výsledcích [13].

Přestože je postup ET relativně jednoduchý a krátký, jedná se o kritický krok v rámci IVF, který může mít zásadní vliv na výsledek léčby. Byla studována řada různých technik a postupů používaných při ET. Některá doporučení můžete najít v Tabulce 1. Pro některé z nich jsou důkazy spolehlivé, zatímco pro jiné jsou omezené. Následující přehled zahrnuje klinická doporučení pro ET [13].

Po přenosu embrya se luteální fáze obvykle podporuje progesteronem a estrogenem, aby se podpořila implantace a pokračování těhotenství [5].

2.7 Kryokonzervace

V důsledku zdokonalení ART a zejména výkonnosti kryokonzervačních programů se v posledních letech výrazně rozšířila praxe zmrazování oocytů nebo zmrazování kvalitních embryí pro následný transfer zmrazených embryí (FET) v době, která je vhodnější z důvodů prevence ovariálního hyperstimulačního syndromu, zdravotních problémů, účinnosti nebo vhodnosti [14].

V průběhu let se díky rostoucím nárokům na léčbu neplodnosti a zdokonalování kryokonzervačních technik stala strategie "freeze all" uznávanou a cennou alternativou přenosu čerstvých embryí v rámci ART. Důkazy celkově naznačují, že výsledky elektivní FET jsou stejně dobré jako výsledky přenosu čerstvých embryí v běžné populaci vyžadující léčbu neplodnosti, a v některých populacích lepší. To z něj činí atraktivní možnost v řadě lékařských nebo elektivních scénářů, kdy je výhodné uchovat oocyty nebo embrya a odložit přenos embrya na pozdější dobu [14].

Tabulka 1 Shrnutí doporučení týkajících se různých aspektů ET

Úroveň důkazů je klasifikována takto:

Známka A: Existují dobré důkazy podporující doporučení, ať už pro, nebo proti.

Známka B: Existují dostatečné důkazy pro podporu doporučení, ať už pro, nebo proti.

Známka C: Důkazy pro doporučení jsou nedostatečné, ať už pro, nebo proti [13].

Typ techniky	Doporučení	Síla důkazu
Břišní ultrazvukové vedení	Břišní ultrazvukové vedení během ET zlepšuje živou porodnost.	Známka A
Vaginální ultrazvukové vedení	Vaginální ultrazvukové vedení během ET vede k podobnému klinickému těhotenství a porodnosti jako ultrazvuk břicha, ale může snížit úroveň nepohodlí.	Známka A
Odstranění cervikálního hlenu	Odstranění cervikálního hlenu před ET může zlepšit míru porodnosti.	Známka B
Typ katétru	Použití měkkých ET katétrů zvyšuje míru porodnosti ve srovnání s pevnými katétry.	Známka A
Umístění externího katétru	Nízká kvalita důkazů naznačuje, že externí (vodící) katétr by neměl být zaváděn za vnitřní cervikální os.	Známka C
Umístění embrya	Při umístění embrya do děložní dutiny by vzdálenost mezi fundem a špičkou katétru měla být >10 mm.	Známka B
Rychlost injekce	Neexistují dostatečné důkazy pro doporučení rychlosti injekce pro vypuzení embrya.	Známka C
Délka procedury	Existují protichůdné důkazy o dopadu délky procedury na výsledek reprodukce.	Známka C
Rotace katétru	Existují protichůdné důkazy o vlivu rotace katétru během vytahování na reprodukční výsledek.	Známka C
Načasování vytažení katétru	Okamžité stažení katétru není spojeno s nižší klinickou graviditou nebo porodností.	Známka B

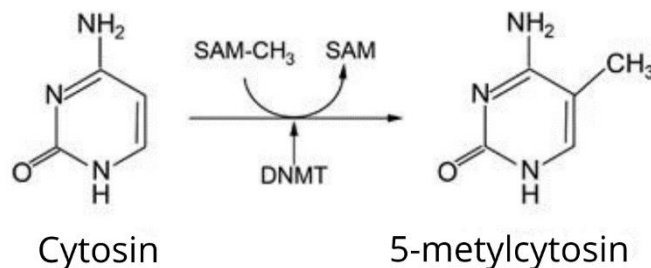
3 Epigenetika

Epigenetika je obor zabývající se změnami v genetické expresi, které, oproti mutacím, nejsou způsobeny změnami v sekvenci DNA. Tento obor byl objeven v počátku 40. let 20. století zásluhou britského embryologa Conrada Waddingtona. Přišel na to, že interakce mezi geny a prostředím ovlivňují vývoj a embryologii. Tento zásadní průlom odstartoval nespočet studií epigenetických mechanismů. Bylo prokázáno, že DNA a histony mohou procházet chemickými modifikacemi jako je metylace a acetylace (pouze u histonů), které řídí navíjení DNA kolem histonů a určují kompakci chromatinu. Těmto chemickým modifikacím se říká epigenetické “značky“. Interakce mezi DNA a histony způsobují buď konformaci euchromatinu, kde je gen přístupný a aktivní, nebo konformaci heterochromatinu, kde je gen nepřístupný a potlačený. Epigenetická regulace probíhá na třech úrovních, na DNA, histonech a nukleozomech. Epigenetické mechanismy kódují informace nad rámec sekvence DNA a hrají rozhodující roli při vývoji mozku a dlouhodobém působení vlivů prostředí na mozek před narozením a po něm [15, 16, 17].

Mezi tři hlavní mechanismy epigenetiky patří metylace DNA, modifikace histonů a regulace RNA. V následujících podkapitolách budou popsány jejich funkce [18].

3.1 Methylace DNA

Již zmíněná metylace DNA je jedním z nejvýznamnějších mechanismů epigenetiky, při kterém jsou metylovány cytosinové báze v DNA molekule. Methylace DNA je obvykle odstraněna během tvorby zygoty a poté se v embryu obnoví přibližně v době implantace. Převážná část metylace DNA je nezbytná pro normální vývoj a hraje velmi důležitou roli v řadě klíčových procesů, včetně genomického imprintingu, inaktivace chromozomu X a potlačení



Obrázek 2 Methylace cytosinu

Konverze cytosinu na 5-methylcytosin pomocí DNA metyltransferázy (DNMT). DNMT katalyzuje přenos metylové skupiny (CH₃) z S-adenosylmethioninu (SAM) do polohy 5 uhlíků cytosin [22].

transkripce a transpozice repetitivních elementů. V případě dysregulace, přispívá k nemoce, jako je rakovina. Je zodpovědná za správnou regulaci genové exprese a stabilní umlčení genů v buňkách. Společně s modifikací histonů je zásadní pro fungování genomu změnou architektury chromatinu. Tato epigenetická značka může ovlivnit, jak jsou geny exprimovány. V případě genomického imprintingu je metylace DNA klíčovým mechanismem pro označení genů buď jako paternal nebo maternal alely v závislosti na původu dané chromozomální kopie [18, 19, 20, 21].

Dochází zde ke kovalentnímu přidání metylové skupiny obvykle na pátou pozici cytosinu, při čemž napomáhá enzym metyltransferáza. Tento enzym je zodpovědný za vytvoření a udržení metylového vzorce. K tomuto přidání dochází na cytosin-fosfát-guaninových (CpG) dinukleotidech, které jsou seskupeny ve větších skupinách nazývaných CpG ostrůvky. U nádorových buněk se nemetylované CpG ostrůvky mění na metylované, což vede ke ztrátě genové exprese. Hypermetylace CpG ostrůvků se objevuje na 5' konci regulační oblasti genu (tj. promotor a první exon) a může způsobit umlčení genu [18, 19, 21, 23, 24].

DNA metyltransferázy (DNMTs) provádějí metylaci DNA a lze je rozdělit do rodin DNMT1, DNMT2 a DNMT3. Tyto tři rodiny jsou sice vzdáleně příbuzné, ale předpokládá se, že se oddělily od svých společných předků ještě před rozdělením živočišné a rostlinné říše. Bylo zjištěno, že členové rodin DNMT1 a DNMT3 mají aktivní transmetylázovou aktivitu. Rodina DNMT3 se zabývá především vytvářením nových metylačních vzorců, zatímco rodina DNMT1 je zodpovědná hlavně za udržování těchto vzorců během buněčného dělení [21, 25].

3.1.1 Hypometylace a hypermetylace

Za normálních fyziologických okolností je metylováno přibližně 80 % CpG dinukleotidů mimo promotorové oblasti. Hypometylace, což je globální snížení metylace DNA, má významný funkční dopad, zejména pokud se vyskytuje v kódujících oblastech genů. To může vést k alternativním verzím nebo úrovním messengerové RNA. Jedním z prvních popsaných epigenetických jevů v nádorech byla globální hypometylace DNA u pacientů s rakovinou tlustého střeva. Tato hypometylace je považována za faktor přispívající ke karcinogenezi, protože podporuje mitotickou rekombinaci vedoucí k delecím, translokacím a chromozomálním přestavbám, známým jako genomová nestabilita. Většina DNA v nádorech je celkově hypometylovaná, přičemž dochází i k hypermetylaci specifické pro jednotlivé geny. Hypometylace se obecně zvyšuje s postupem nádoru. Konkrétně hypometylace repetitivních

Je důležité zmínit, že hypermetylace je také běžným fyziologickým procesem, například při inaktivaci druhého X chromozomu u žen. Dále hypermetylace souvisí se stárnutím a metylace způsobující transkripční represy repetitivních elementů DNA přispívá k prevenci chromozomální nestability [16].

3.1.2 Demethylace DNA

U savců hraje demethylace DNA také důležitou roli ve vývoji a nádorovém bujení. Demethylace DNA, k níž dochází v primordiálních zárodečných buňkách (PGC) a v raných embryích, je nezbytná pro návrat buněk do pluripotentního stavu. Největší úbytek metylace v PGC je pozorován v intronech, intergenních oblastech a repeticích, následují exony a poté promotory. U rakoviny způsobuje globální genomová hypometylace nestabilitu genomu a aktivaci onkogenů, což ovlivňuje repetitivní sekvence, imprintované geny, tkáňově specifické geny, onkogeny a geny spojené s invazí a metastázami. Naopak mnoho tumor supresorových genů je hypermetylováno a umlčeno. Demethylaci DNA řídí rodina proteinů TET (TET1, TET2 a TET3), které odstraňují methylovou skupinu z 5-mC prostřednictvím různých oxidačních kroků s využitím kofaktoru α -KG. TET proteiny oxidují 5-mC a katalyzují jeho přeměnu na 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC), což je relativně stabilní mezistupeň a méně náchylný k další oxidaci ve srovnání s 5-mC. Další oxidace může vést k tvorbě 5-formylcytosinu (5-fC) a 5-karboxycytosinu (5-caC). Tyto produkty mohou být excidovány thymin-DNA glykosylázou (TDG) a následně opraveny na nemodifikovaný cytosin. [20, 29].

3.2 miRNA

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA molekuly, které mají délku přibližně 18-25 nukleotidů. Hrají klíčovou roli jako regulátory genové exprese. Nacházejí se v nekódujících oblastech genomu a mohou být přítomny i v intronických nebo exonických částech genů kódujících proteiny. U mnohobuněčných organismů se miRNA účastní prakticky všech biologických procesů, včetně buněčné proliferace a diferenciaci, vývoje, fyziologie a různých patologií. Předpokládá se, že miRNA zajišťují stabilitu embryonálního vývoje tím, že tlumí genetický šum, zejména za stresových podmínek, což přispívá k fenotypové stabilitě. Na druhou stranu mohou podporovat vznik nových fenotypů modulací vývojových a fyziologických drah, což může ovlivnit adaptaci, diverzifikaci a speciaci [29, 30, 31].

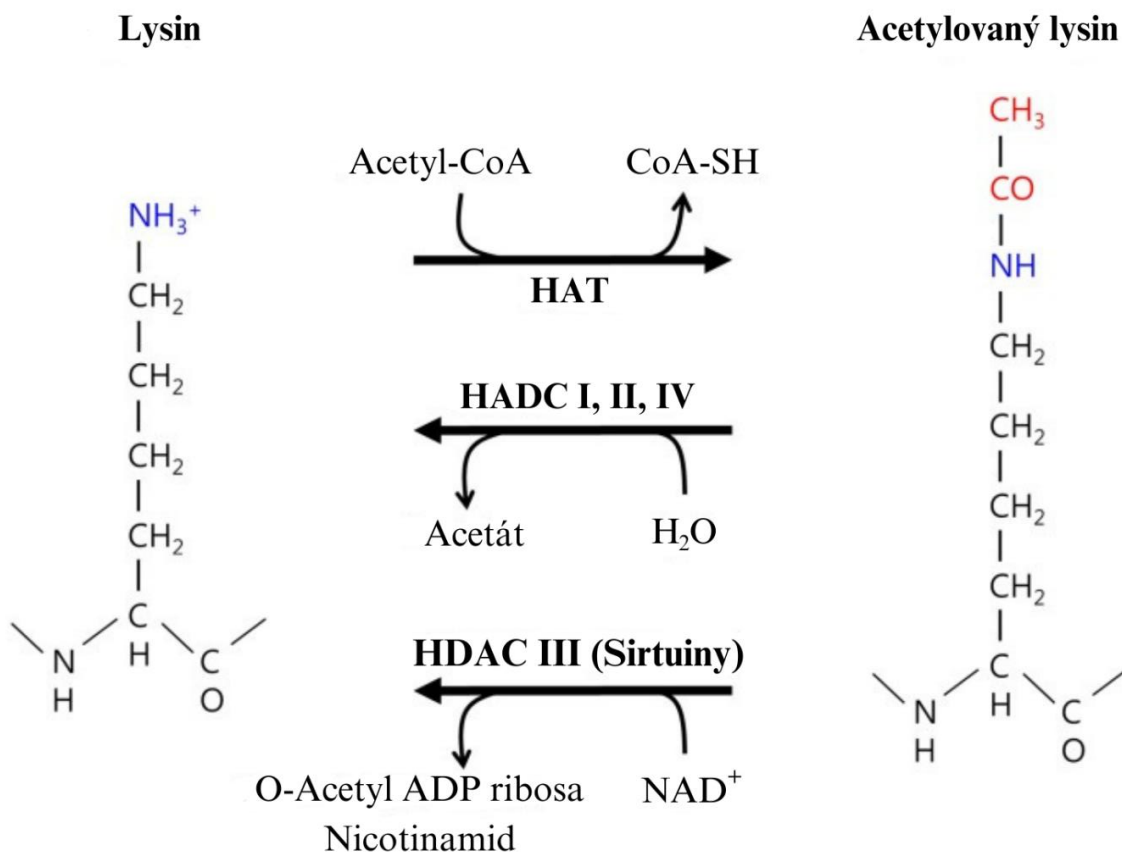
Umlčování miRNA je jedním z epigenetických mechanismů a bylo prokázáno, že se zaměřují na různé cíle, včetně kódujících oblastí, 3' UTR, 5' UTR a promotorů. Kromě toho se

ukázalo, že podskupina genů miRNA, známá jako epi-miRNA, se podílí na regulaci genů kódujících epigenetický aparát [30, 31].

Existuje tedy několik epigenetických konceptů spojených s miRNA: miRNA mohou umlčovat nebo aktivovat cílové geny, včetně těch, které kódují epigenetický aparát, a mohou být samy epigeneticky regulovány jako jakýkoli jiný gen kódující protein [30, 31].

3.3 Modifikace histonů

Histony jsou globulární proteiny s flexibilním N-koncem (ocas), který vyčnívá z nukleozomu. Tyto proteiny tvoří základní strukturní složku chromatinu. Existuje několik typů posttranslačních modifikací, které mohou ovlivnit histonové ocase. Tyto modifikace mohou ovlivnit interakce mezi DNA a histony, což vede ke změnám v transkripci genů, opravě DNA, replikaci DNA, a dokonce i v organizaci chromozomů. Tyto modifikace se odehrávají převážně na histonových N-koncových koncích s vysokými podíly aminokyselin lysinu a argininu. Mezi nejvíce prozkoumané histonové modifikace patří metylace, acetylace (Obrázek 4), fosforylace a ubikvitinilace [16, 18, 23].



Obrázek 4 Acetylace lysinu

Acetylace a deacetylace histonů. Enzymy zapojené do těchto drah jsou vyznačeny tučně. HAT: histon acetyltransferázy, HDAC: histon deacetylázy [32].

Jednou z nejlépe prozkoumaných modifikací histonů je acetylace lysinového zbytku. Obecně je acetylace histonů spojena s transkripční aktivací za přítomnosti enzymu HAT (histonacetyltransferáza) a deacetylace s transkripční represí za přítomnosti HDAC (histondeacetylázy). Acetylace neutralizuje kladně nabitý lysinový zbytek v histonovém ocasu, čímž snižuje pevnost vazby mezi histonovým ocasem a DNA. Tento jev otevírá komplex DNA/histon tak, že je přístupný transkripčním faktorům. Acetylovaný histon H3 lysin-9 (H3K9ac) a acetylovaný histon H3 lysin-27 (H3K27ac) jsou běžné acetylované formy histonu H3 spojené s otevřeným chromatinem a aktivní genovou transkripcí. Jsou obohaceny v aktivních genoregulačních oblastech jako jsou promotory a enhancery. Zároveň se podílejí na prenatálním intrauterinním programování [16, 23, 33].

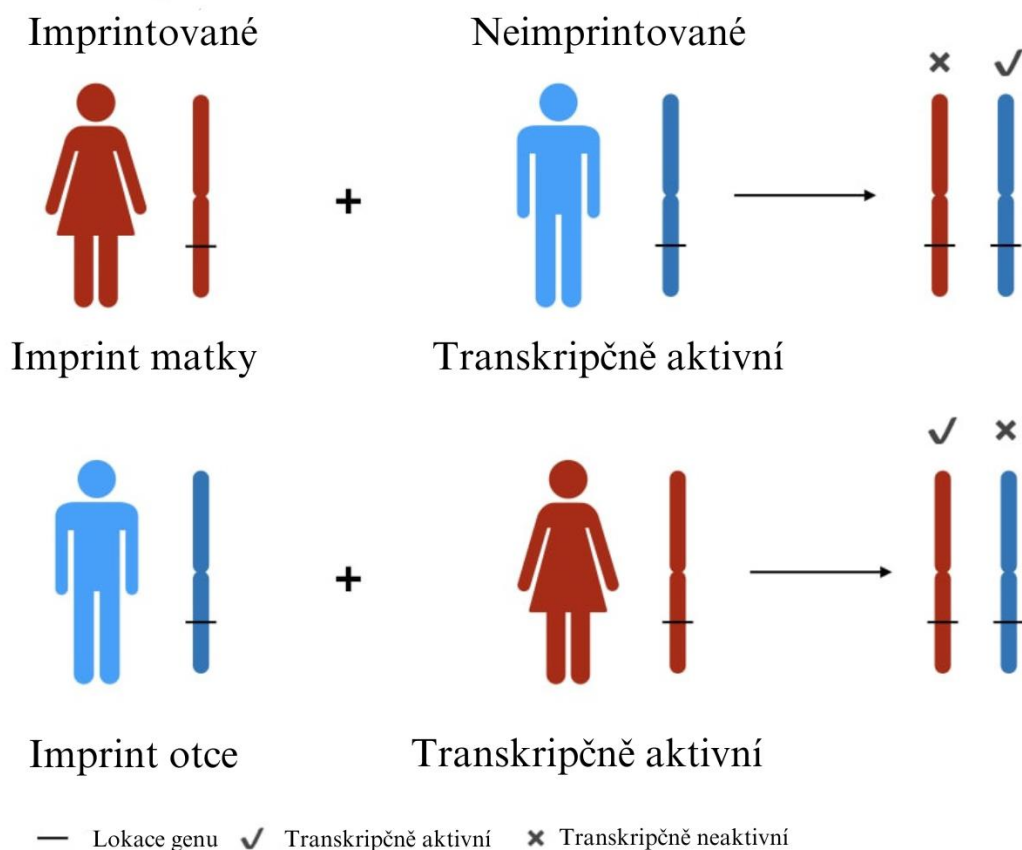
Metylace histonů může pozitivně nebo negativně ovlivňovat transkripci. Může také docházet ke spolupráci mezi metylací DNA a modifikacemi histonů. Lysinové a argininové zbytky jsou často metylovány. Tyto metylované lysiny jsou nejlépe pochopenými značkami histonového kódu, protože specifické metylované lysiny dobře odpovídají stavům genové exprese. Například metylace lysinu H3K4 a H3K36 koreluje s transkripční aktivací, zatímco demethylace H3K4 koreluje s umlčením genomové oblasti. Také H3K4me3 je slibný biomarker k identifikaci genů, které byly transkripčně aktivní [16, 33].

Vzhledem ke všem různým modifikacím a kombinacím změn je složitost chromatinových modifikací pozoruhodná a je stále oblastí intenzivního výzkumu.

4 Genomický imprint

První zmínka o genomickém imprintu byla v polovině 80. let 20. století. Za jeho objevem stojí Davor Solterem, Azimem Suranim a jejich kolegové. Díky nim byl poskytnut základ pro studium epigenetické dědičnosti a epigenetické kontroly genové aktivity a represe genů, obzvláště během vývoje [34].

Tato forma genové regulace vede k expresi jedné alely, zatímco druhá je potlačena. Genomický imprinting je proces umlčování genů prostřednictvím metylace DNA. Potlačená alela je metylovaná, přičemž aktivní alela je nemetylovaná. Tento proces ražení, nazývaný metylace, je chemická reakce, která připojuje malé molekuly zvané metylové skupiny k určitým segmentům DNA. Metylace DNA je biochemický proces rozhodující pro normální vývoj u vyšších organismů a je to nejdůkladněji prozkoumaná epigenetická značka. Tento proces je



Obrázek 5 Ilustrace mateřského a otcovského genomického imprintu

Pokud je určitý gen imprintovaný mateřsky, je aktivní pouze alela tohoto genu. Podobně, pokud je gen imprintovaný otcovsky, je aktivní pouze alela tohoto genu [35].

nezbytný pro normální vývoj savců. Savčí genom obsahuje malý počet genů, které propadají genomickému imprintu. Epigenetické označení, dle rodičovského původu, genů udává, která alela je exprimována, zatímco je druhá potlačena. Předpokládá se, že rodičovský otisk je zasazen do zárodečné linie, protože to je okamžik, kdy jsou genomy v odlišných kompartmentech a díky tomu je lze různě modifikovat. Po početí dochází k celkovému epigenetickému přeprogramování většiny genů, aby se vytvořil epigeneticky „čistý štít“ a umožnila se správná diferenciaci různých specializovaných buněk. Tento proces zahrnuje celkovou demetylaci DNA v oplodněném vajíčku, po níž následuje remetylace, která resetuje genomy rodičů pro správnou genovou expresi. Během vývoje oplodněného vajíčka jsou geny různě aktivovány a inaktivovány pomocí epigenetických značek, což řídí vývoj a diferenciaci různých buněčných typů. V této fázi je epigenom plodu nejvíce náchylný k vlivům mateřského prostředí a jakékoliv chyby v signalizaci mohou vést k nepříznivým fenotypovým výsledkům. Malá část vzorců metylace DNA zůstává transgeneračně stabilní a uniká normálnímu resetování, ke kterému dochází při početí. Je třeba poznamenat, že ačkoli řada imprintovaných genů zůstává imprintována po celý život organismu, mnoho genů je imprintováno tkáňově nebo časově specifickým způsobem. I když se předpokládá, že převažující úloha těchto neobvyklých genů je během růstu a vývoje plodu a placenty, začínají být uznávány postnatální role některých z těchto imprintovaných genů [17, 36, 37].

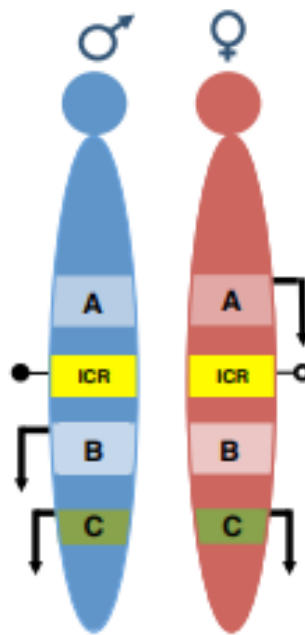
Metylaci DNA CpG dinukleotidů v diferenciatně metylovaných oblastech (DMR) slouží jako epigenetická značka (imprint metylace) a funguje jako kontrolní centrum imprintů. Proces resetování imprint metylace zahrnuje vymazání imprintů v primordiálních zárodečných buňkách a získání nových imprintů specifických pro pohlaví. Některé studie ukázaly, že mateřská metylace těchto genů v lidských oocytech již začala v dospělých nerostoucích oocytech, ale nebyla zahájena v neonatálních oocytech. U mužských spermií začíná imprintová metylace (H19, Rasgrf1 a Gtl2) prenatálně před meiózou a je dokončena během pachytenické fáze postnatální spermatogeneze. Důležité je, že metylace DNA genomického imprintingu je stanovena před oplodněním během gametogeneze. Imprinty gamet se udržují stabilně v raném embryu i přes celkové epigenetické přeprogramování [38].

4.1 Imprintované geny

V dnešní době bylo již přibližně 90 genů popsáno jako imprintované, avšak se nepředpokládá, že byly identifikovány všechny otištěné geny. Imprintované geny se často vyskytují ve shlucích o délce přibližně 1 Mb, které obsahují jednu nebo více oblastí kontroly imprintingu. ICR často vykazují různé vzorce metylace DNA v závislosti na tom, zda je alela

dědičná otcovsky nebo mateřsky. Epigenetické znaky specifické pro rodičovskou alelu jsou dědičné pro dceřiné buňky, ale musí být resetovány v každé následující generaci, aby se vytvořily specifické otisky rodičů. U savců probíhají během gametogeneze a časně embryogeneze dvě hlavní události epigenetického přeprogramování celého genomu [17, 36].

Imprintované geny hrají klíčovou roli nejen v embryonálním růstu a vývoji placenty, ale také v postnatální energetické homeostáze a chování (Obrázek 6). Byly však identifikovány i četné imprintované geny specifické pro placentu, což naznačuje, že požadavky na imprintované geny jsou odlišné v embryonálních a extraembryonálních liniích [39].



Obrázek 6 *Expresa imprintovaných genů*

Zobrazeny jsou otcovské (modré) a mateřské (červené) chromozomy s exprimovanými alelami označenými šipkou. Metylace, znázorněná plným kroužkem v oblasti kontroly imprintingu (ICR, žlutý rámeček), způsobuje represi genu A a expresi genu B na otcovské alele. Naopak, absence metylace (otevřený kroužek v ICR) na mateřské alele vede k expresi genu A a represi genu B. Gen C je exprimován z obou alel [39].

Většina známých imprintovaných genů kóduje proteiny, ostatní kódují nepřekládané transkripty RNA. Další skupinou rodičovských genomových otisků, kterou je třeba odlišit od dobře charakterizovaných příkladů monoalelicky exprimovaných genů, jsou metylační rodičovské otisky rozptýlené po celém genomu, u nichž nebyla prokázána funkčnost nebo souvislost s konkrétními geny. Jako příklad imprintovaného genového shluku lze uvést shluk na 15q11-q13, který obsahuje řadu transkriptů exprimovaných paternálně i maternálně a je

poměrně dobře zachovávan mezi savci, ať už jde o obsah genů nebo stav imprintu. Tento shluk byl velmi intenzivně studován, jelikož ztráta exprese prostřednictvím genetických a epigenetických mutací vede ke dvěma odlišným neurovývojovým poruchám, jako je Prader-Willsonův syndrom a Angelmannův syndrom [17].

5 Riziko poruch imprintu u dětí počatých pomocí IVF

V posledních letech byl zaznamenán zvýšený počet hlášení výskytu vzácných poruch imprintu spojených s technologií asistované reprodukce. Zjištění epigenetických změn na imprintovaných lokusech u ART kojenců bylo spojeno s tím, že techniky ART mohou způsobovat větší náchylnost embryí k zisku chyb v imprintu a onemocnění. Hodnocení rizik spojených s ART není snadné, protože pacienti podstupující ART se mohou od běžné populace demograficky i geneticky lišit. Obvykle mají nižší plodnost, vyšší míru reprodukčních ztrát a jsou starší, což je spojeno s různými abnormalitami plodu a novorozence. Tyto matoucí faktory ztěžují hodnocení a odhad rizika. Rovněž je obtížné určit, jakou roli hrají imprintové chyby v případných abnormalitách u dětí počatých pomocí ART [38, 40].

Postupy ART zahrnují izolaci, manipulaci a kultivaci gamet a raných embryí a stimulaci vaječnicků v době, kdy jsou epigenetické značky v imprintovaných lokusech citlivé na vlivy prostředí. Raná embryogeneze je klíčovým obdobím epigenetické regulace a je náchylná k vlivům prostředí. Z tohoto důvodu jsou tyto techniky spojeny s vyšším rizikem vzniku poruch imprintingu, jako je Beckwith-Wiedemannův syndrom (BWS) a Silver-Russellův syndrom (SRS). Metody jako IVF a ICSI jsou spojovány se zvýšeným rizikem těchto poruch, i když není přesně známo, kdy během procesu tyto chyby vznikají [38, 40].

5.1 Nemoci

Genomický imprint je klíčovým mechanismem nezbytným pro mnoho aspektů vývoje, takže není překvapením, že existuje mnoho případů vývojových defektů způsobených chybami v imprintu, ať už přirozeně nebo během lidských zásahů (Tabulka 2) [25].

U nemocných lidí je v současné době spojováno šest imprintovaných oblastí. Mnoho z těchto imprintových poruch nelze vysvětlit absencí pouze jediného genového produktu. Fenotypová rozmanitost spojená s jednotlivými syndromy totiž odpovídá absenci exprese nebo chybné expresi více genů v dané oblasti. Nesprávná exprese může být způsobena mutacemi v imprintovaných genech, metylačními defekty v imprintingových kontrolních oblastech nebo jiných regulačních oblastech, nebo uniparentální disomií (UPD), kdy je imprintovaná chromozomální oblast od jednoho rodiče nahrazena stejnou oblastí od druhého rodiče [39].

V některých případech vede nadměrná exprese paternálně exprimovaných genů k onemocnění, například na chromozomu 6q24, což způsobuje přechodný novorozenecký diabetes mellitus typu I. V některých případech je příčina - nadměrná exprese nebo ztráta exprese - nejasná, jako například při otcovské uniparentální disomii na chromozomu 14q32,

kteřá vede k obličeřovým dysmorfismům a kosterním abnormalitám včetně zvonovitého tvaru hrudníku a žeber ve tvaru "věšáku na kabáty" [39, 41, 42].

V jiných případech může nesprávná exprese otce nebo matky na stejném genetickém lokusu způsobit různé poruchy. Selhání exprese mateřské alely UBE3A na chromozomu 15q11.2 vede k Angelmanovu syndromu (AS), který se vyznačuje ataxickými pohyby, opožděným vývojem, mentálním postižením a epilepsií. Naopak selhání exprese otcovských alel ve stejné oblasti vede k Prader-Williho syndromu, který je charakterizován hypotonií, mentální retardací, malým vzrůstem, hypogonadotropním hypogonadismem, malýma rukama a nohama a obezitou [39, 43, 44].

Kromě toho existují dvě imprintingové poruchy způsobené genetickými nebo epigenetickými změnami ve stejné oblasti chromozomu 11, které vedou k opačným růstovým fenotypům. Několik genů v této oblasti reguluje růst a v závislosti na povaze imprintingové aberace vedou buď k BWS, nebo k SRS. Oba syndromy se projevují v různém rozsahu od mírného po závažné onemocnění, což naznačuje, že některé změny se vyskytují pouze v části buněk. Russellův-Silverův syndrom, porucha nedostatečného růstu, je způsoben nadměrnou expresí mateřských alel a ztrátou exprese otcovského genu na chromozomu 11p15.5. Ve stejné oblasti chromozomu 11p15.5 vede nadměrná exprese otcovských alel a ztráta exprese mateřských genů k Beckwith-Wiedemannovu syndromu, poruše nadměrného růstu. Za zmínku stojí, že SRS může být také způsoben mateřskou UPD pro chromozom 7 [38, 39].

Tabulka 2 Nemoci a syndromy

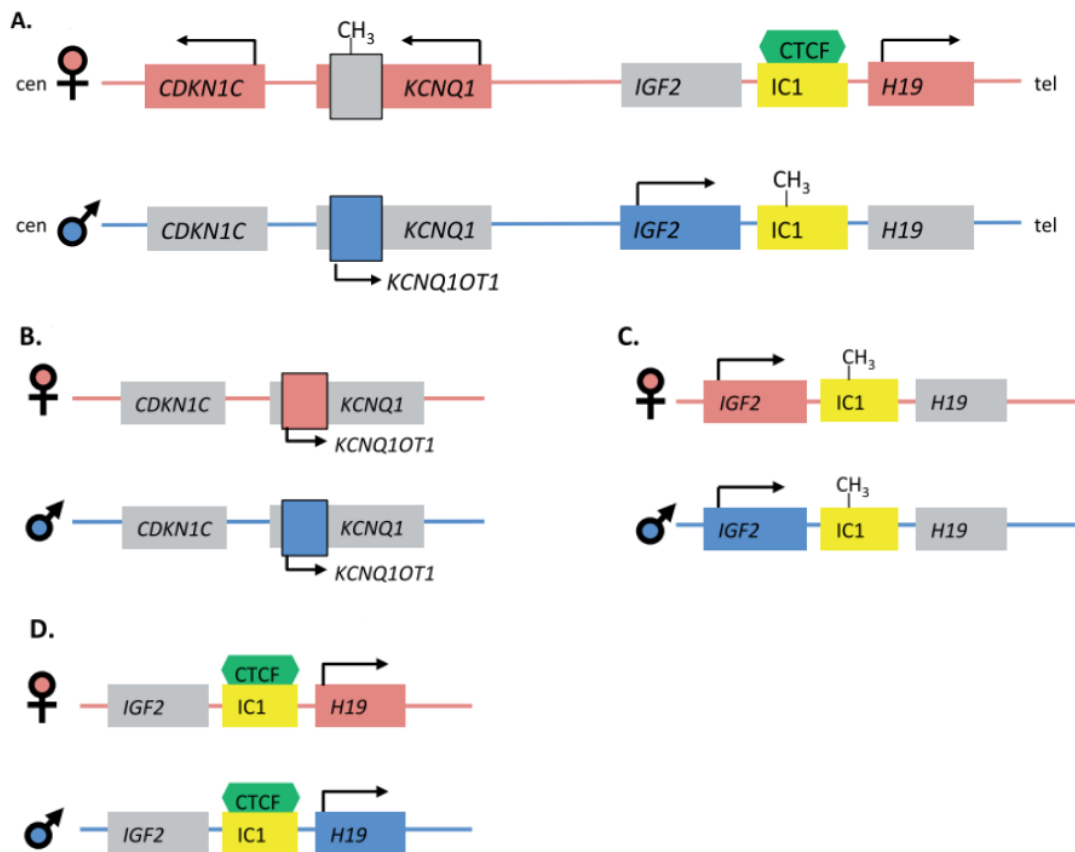
Některé nemoci a syndromy, které vyplývají z problémů s imprintovanými mechanismy nebo z chyb v imprintování genů [25].

Porucha	Postižené geny	Fenotyp
Angelmanův syndrom	Chromozom 15 – mateřská kopie, ztráta imprintu SNRPN	Mentální retardace, ataxická chůze, záchvaty, společenská dispozice
Autismus	Neznámý gen vázaný na X (ne vždy spojen s imprintem)	Narušený vývoj řeči, problémy se sociálními a motorickými dovednostmi
Beckwith-Wiedemannův syndrom	Oblast 11p15 – změněná exprese IGF2, H19 a LIT1	Nesestouplá varlata, velký novorozenec, křeče, defekty břišní stěny
Rakovina	Proměnná, např. IGF2 u rakoviny plic (ne vždy spojena s imprintem)	Nádory
Paragangliom	Paternální mutace SDHA (PGL1) a PGL2	Glomus tumory parasympatických ganglií hlavně v oblasti hlavy a krku, bývají pomalu rostoucí a benigní
Prader-Willi syndrom	Chromozom 15 – otcovská kopie	Nesestouplé testy, mentální retardace, malý vzrůst, obezita malé ruce a nohy
Pseudohypoparatyreóza typu IA (Albrightova dědičná osteodystrofie)	Potlačený cluster GNAS	Odolnost parathormonu, malý vzrůst, kulatý obličej a krátké kosti na rukou
Pseudohypoparatyreóza typu IB	Potlačený cluster GNAS	Rezistence parathormonu lokalizovaná v ledvinovém systému, způsobující hypokalcémii a hyperfosfatemii
Rettův syndrom	MeCP2	Dětská neurovývojová porucha postihující především ženy. Ztráta motorických funkcí a mentální retardace
Silver-Russell syndrom	Případy, které souvisejí s imprintingem – chromozom 7	Malý vzrůst, nadměrné pocení, trojúhelníkový obličej, dovnitř zahnuté 5. prsty a barevné skvrny na kůži
Přechodný novorozenecký diabetes	Imprintovaný gen na 6q24. Kandidáti jsou ZAC & HYMAI	Zpomalení růstu a diabetes, které se vyvinou během prvních 6 měsíců života, ale upraví se do 18 měsíců
Turnerův syndrom	Úplná nebo částečná ztráta druhého X chromozomu	Postihuje ženy – nízký vzrůst, sociální problémy a selhávání vaječníků
Wilmsův nádor	IGF2 ztrácí imprint	Dětský nádor ledviny

5.1.1 Beckwith-Wiedemannův syndrom

Beckwith-Wiedemannův syndrom (BWS) je nejčastější poruchou imprintingu s výskytem 1 na 13 700 živě narozených dětí, přičemž incidence je stejná u mužů i žen. BWS je spojen se ztrátou metylace (LOM) v centromerické oblasti ICR2/KCNQ1 na mateřské alele nebo se získáním metylace v telomerické oblasti ICR1/IGF2/H19 na mateřské alele. Tento druhý epigenetický defekt je spojen se zvýšeným rizikem vzniku nádorů, například nefroblastomu [45, 46].

BWS se vyznačuje nadměrným růstem jak fetálním, tak i extraembryonálním, včetně makrosomie, makroglosie, visceromegalie, mezenchymální dysplazie, placentomegalie a zvýšeným výskytem embryonálních nádorů. Nadměrný růst se projevuje během fetálního i postnatálního vývoje [45, 46].



Obrázek 7 Genetické a epigenetické změny vedoucí k Beckwith-Wiedemannovu syndromu (BWS) a Silver-Russellovu syndromu (SRS)

(A) Normální imprinting a metylace v lokusu 11p15.

(B) Hypometylace v lidském ICR (IC2) v lokusu KCNQ1 vedoucí k BWS.

(C) Hypermetylace v IC1 v lokusu H19/IGF2 vedoucí k BWS.

(D) Hypometylace v IC1 vedoucí k RSS [39].

5.1.2 Silver-Russellův syndrom

Silver-Russellův syndrom se vyznačuje závažnou prenatalní a postnatální růstovou retardací, která zahrnuje malý vzrůst při normální velikosti hlavy, trojúhelníkový obličej s vystouplým čelem a asymetrií kostry nebo končetin. Syndrom je také spojen s intrauterinní růstovou restrikcí, nízkou porodní hmotností, pomalým postnatálním růstem a tělesnou asymetrií. Diagnostika SRS je obzvláště obtížná, protože mnoho klinických příznaků je nespecifických a základní molekulární příčina může být identifikována pouze u 60 % pacientů. Nejčastějším mechanismem, uváděným u 30-60 % pacientů, je ztráta metylace v oblasti 11p15.5 na H19/IGF2. Alternativním mechanismem je mateřská UPD chromozomu 7, která se vyskytuje u 5-10 % pacientů se SRS. Nicméně, neexistuje žádný konzistentní vzorec, podle kterého by byly u pacientů se SRS narušeny imprintované geny chromozomu 7 [44, 46].

5.1.3 Prader-Willi syndrom

Jedinci s Prader-Williho syndromem (PWS) vykazují širokou škálu symptomů, včetně omezeného růstu, potíží s učením a svalové hypotonie. Tento syndrom, poprvé popsán Praderem a jeho kolegy v roce 1956, je komplexní neurobehaviorální porucha postihující více systémů těla. Genomické a epigenetické změny způsobující PWS ovlivňují geny na chromozomu 15q11.2-q13, které jsou exprimovány otcem. Klinické příznaky PWS byly od té doby dobře vymezeny prostřednictvím studií přirozeného průběhu onemocnění. Přesná incidence PWS není známa, ale odhaduje se na 1 případ na 15 000–20 000 živě narozených dětí. Molekulárním mechanismem PWS je absence genů exprimovaných z otcovské alely na chromozomu 15q11-q13. Na mateřském chromozomu 15q11-q13 jsou tyto geny strukturálně neporušené, ale epigeneticky potlačené a transkripčně neaktivní. Tento jedinečný molekulární defekt u PWS představuje zajímavou příležitost pro výzkum epigenetické terapie, která by mohla reaktivovat expresi potlačených genů z mateřského chromozomu [43, 44].

Stejná delece na chromozomu 15q11-q13 se také podílí na Angelmanově syndromu, těžké neurovývojové poruše charakterizované hlubokým intelektuálním postižením a epilepsií. PWS a AS se staly prototypy poruch genomového imprintu u lidí, přičemž u obou poruch je delece spojena s odlišným rodičovským původem. Delece u PWS je otcovského původu, zatímco u AS je mateřského původu [43, 44].

5.1.4 Angelmanův syndrom

Angelmanův syndrom (AS) je vážná neurovývojová porucha, která se projevuje problémy v učení, minimální verbální komunikací nebo úplnou absencí řeči, ataxií, záchvaty a

abnormalitami EEG. Vyskytuje se u přibližně 1 z 15 000 osob. AS je obvykle způsoben delecí na mateřském chromozomu 15q11-q13, což vede k nedostatečné expresi dvou genů, UBE3A a ATP10C, které jsou normálně ztlumovány z otcovské strany. Vzácné mutace však naznačují, že klíčovým imprintovaným genem pro Angelmanův syndrom je UBE3A [44, 47].

ZÁVĚR

Asistovaná reprodukce je stále častěji využívanou metodou, která pomáhá neplodným párům dosáhnout těhotenství. Jednou z nejrozšířenějších metod umělého oplodnění je In vitro fertilizace. Tento proces začíná hormonální stimulací vaječnicků za účelem získání zralých oocytů. Poté jsou v laboratoři k těmto vajíčkům přidány spermie, které mohou proniknout buď přirozeně, nebo pomocí specifických laboratorních technik. Po oplodnění se provádí biopsie a vzorek odebraných buněk se podrobí genetické analýze. Tento postup, známý jako preimplantační genetické testování, umožňuje vybrat zdravá embrya. Tímto testováním se zjišťují monogenní dědičné poruchy, numerické anebo strukturální chromozomální abnormality. Na základě výsledků testů jsou vhodná oplodněná vajíčka při embryotransferu umístěna zpět do dělohy ženy.

Epigenetika je obor genetiky, který se zaměřuje na studium změn v genové expresi, které nejsou přímo zakódovány v DNA sekvenci. Zabývá se tedy přenosem informací mezi generacemi. Klíčovými mechanismy epigenetiky jsou metylace DNA, konkrétně cytosinu, při které se cytosin metyluje pomocí DNA metyltransferáz. Modifikace histonů je proces, díky němuž se může ovlivnit interakce mezi DNA a histony. Příkladem je acetylace lysinu a následná regulace genové exprese pomocí miRNA. MikroRNA se nacházejí v nekódujících oblastech genu a mohou umlčovat nebo aktivovat cílové geny (resp. jejich mRNA) nebo mohou být samy epigeneticky regulovány.

Genomický imprinting je proces, při kterém je jedna alela umlčena a druhá alela exprimována. To je dosaženo metylací DNA, která označuje imprintované geny. Tyto epigenetické modifikace mohou být přeprogramovány během gametogeneze a časně embryogeneze, což může vést ke vzniku chyb.

V poslední době se u dětí počatých metodou IVF stále častěji vyskytují nemoci spojené s poruchou imprintu. Existuje mnoho důvodů, proč jsou tyto děti náchylnější k těmto poruchám. Jedním z hlavních faktorů může být skutečnost, že metody asistované reprodukce zahrnují izolaci, manipulaci a kultivaci gamet a raných embryí. V tomto kritickém období jsou epigenetické značky v imprintovaných lokusech velmi citlivé na vlivy prostředí. Mezi nejčastější poruchy patří Beckwith-Wiedemannův syndrom a Silver-Russellův syndrom, které jsou způsobeny změnami ve stejné oblasti chromozomu 11, ale projevují se rozdílnými příznaky. Dalšími poruchami jsou Prader-Williho syndrom a Angelmanův syndrom. Tyto mají stejnou oblast změn na chromozomu 15q11-13, ale liší se rodičovským původem. Dalším

z důvodů může být věk rodičů, který bývá u IVF vyšší což s sebou nese riziko vzniku genetických poruch.

V této práci byl představen proces jednotlivých kroků In vitro fertilizace. Dále byly popsány základy epigenetiky, vědy zabývající se změnami v genové expresi, které nejsou způsobeny změnami v sekvenci DNA. Byly vysvětleny jednotlivé mechanismy epigenetiky a jejich fungování. Rovněž byl objasněn pojem genomický imprint a popsána rizika poruch imprintu u dětí počatých metodou IVF. Na závěr byla shrnuta některá onemocnění spojená s poruchami imprintu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Online. *Fertility and Sterility*. 2020, roč. 113, č. 3, s. 533-535. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.11.025>. [cit. 2023-12-02]
- [2] FERTICARE PRAGUE. In vitro fertilizace [online]. Dostupné z: <https://www.ferticareprague.eu/cz/ivf/> [cit. 2023-01-12].
- [3] Kamel, Remah Moustafa. "Assisted reproductive technology after the birth of louise brown." *Journal of reproduction & infertility* vol. 14,3 (2013): 96-109. [cit. 2023-12-02]
- [4] MUDR. HULVERT, Jaroslav. Počátky IVF v Česku. Online. In: Merck. Praha, 2021. ISSN CZ-NONF-00059. Dostupné z: <https://www.medimerck.cz/cz/home/support/news/813-pubftrl-Pocatky-IVF-v-cesku.html>. [cit. 2024-01-06].
- [5] Jain, M., Singh, M. Assisted Reproductive Technology (ART) Techniques. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 7. červen 2023 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576409/> [cit. 2024-06-04].
- [6] MACKLON, Nick S.; STOUFFER, Richard L.; GIUDICE, Linda C. a FAUSER, Bart C. J. M. The Science behind 25 Years of Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization. Online. *Endocrine Reviews*. 2006, roč. 27, č. 2, s. 170-207. ISSN 0163-769X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/er.2005-0015>. [cit. 2023-12-02]
- [7] MAYO CLINIC. In vitro fertilization (IVF) [online]. 2020 Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/in-vitro-fertilization/about/pac-20384716> [cit. 2023-12-02].
- [8] GIULIANO, Roberta; MAIONE, Anna; VALLEFUOCO, Angela; SORRENTINO, Ugo a ZUCCARELLO, Daniela. Preimplantation Genetic Testing for Genetic Diseases: Limits and Review of Current Literature. Online. *Genes*. 2023, roč. 14, č. 11. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes14112095>. [cit. 2024-02-15].
- [9] GENETIKA PLZEŇ, S.R.O. PGT-M: Preimplantační Genetické Testování pro familiární Monogenní onemocnění. Online. NextLab Genetika. 2018, 2024. Dostupné z: <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/pgt-m-preimplantacni-geneticke-testovani-pro-familiarni-monogenni-onemocneni>. [cit. 2024-02-15].
- [10] GENETIKA PLZEŇ, S.R.O. PGT-A: Preimplantační Genetické testování Aneuploidií. Online. NextLab Genetika. 2018, 2024. Dostupné z: <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/pgt-a-preimplantacni-geneticke-testovani-aneuploidii>. [cit. 2024-02-15].

- [11] GENETIKA PLZEŇ, S.R.O. PGT-SR: Preimplantační Genetické Testování pro familiární Strukturní chromosomovou aberaci/přestavbu. Online. NextLab Genetika. 2018, 2024. Dostupné z: <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/pgt-sr-preimplantacni-geneticke-testovani-pro-familiarni-strukturni-chromosomovou-aberaci-prestavbu>. [cit. 2024-02-15].
- [12] HO, V. N. A.; PHAM, T. D.; LE, A. H.; HO, T. M. a VUONG, L. N. Live birth rate after human chorionic gonadotropin priming in vitro maturation in women with polycystic ovary syndrome. Online. Journal of Ovarian Research. 2018, roč. 11, č. 1. ISSN 1757-2215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0445-5>. [cit. 2024-02-15].
- [13] MIZRACHI, Yossi a MCQUEEN, Dana B. Embryo transfer success: It is in our hands. Online. Fertility and Sterility. 2022, roč. 118, č. 5, s. 815-819. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.08.858>. [cit. 2024-02-17].
- [14] BOSCH, Ernesto; DE VOS, Michel a HUMAIDAN, Peter. The Future of Cryopreservation in Assisted Reproductive Technologies. Online. Frontiers in Endocrinology. 2020, roč. 11. ISSN 1664-2392. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00067>. [cit. 2024-02-19].
- [15] TOPART, Clémence, Emilie WERNER a Paola B. ARIMONDO, 2020. Wandering along the epigenetic timeline. Clinical Epigenetics. 12(1). ISSN 1868-7075. Dostupné z: [doi:10.1186/s13148-020-00893-7](https://doi.org/10.1186/s13148-020-00893-7). [cit. 2024-03-15].
- [16] HAMILTON, James P. Epigenetics: Principles and Practice. Online. *Digestive Diseases*. 2011, roč. 29, č. 2, s. 130-135. ISSN 0257-2753. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000323874>. [cit. 2024-03-15].
- [17] BAJRAMI, Emirjeta a SPIROSKI, Mirko. Genomic Imprinting. Online. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. 2016, roč. 4, č. 1, s. 181-184. ISSN 1857-9655. Dostupné z: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.028>. [cit. 2024-04-03].
- [18] Sigma-Aldrich. Epigenetics [online]. 2024 Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/applications/genomics/epigenetics> [cit. 2024-06-04].
- [19] KULIS, M. a M. ESTELLER. DNA Methylation and Cancer. Epigenetics and Cancer, Part A. *Advances in Genetics*. 27-56. 2010, doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2 [cit. 2024-06-04].
- [20] JIN, B.; LI, Y. a ROBERTSON, K. D. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? Online. Genes & Cancer. 2011, roč. 2, č. 6, s. 607-617. ISSN 1947-6019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>. [cit. 2024-06-04].
- [21] ROTONDO, John Charles; LANZILLOTTI, Carmen; MAZZIOTTA, Chiara; TOGNON, Mauro a MARTINI, Fernanda. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation.

- Online. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689624>. [cit. 2024-06-13].
- [22] GIBNEY, E R a NOLAN, C M. Epigenetics and gene expression. Online. *Heredity*. 2010, roč. 105, č. 1, s. 4-13. ISSN 0018-067X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54>. [cit. 2024-04-03].
- [23] Al Aboud, N. M., Tupper, C., Jialal, I. Genetics, Epigenetic Mechanism [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024 Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532999/#_article-22137_s5_ [cit. 2024-06-04].
- [24] Fialová, B., & Trtková, K. (2009). DNA metylace u buněčných linií odvozených z nádorů prostaty. In XXXIII. Brněnské onkologické dny a XXIII. Konference pro sestry a laboranty. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/dna-metylce-u-bunecnich-linii-odvozenych-z-nadoru-prostaty/> [cit. 2024-06-12].
- [25] SWALES, A K E a SPEARS, N. Genomic imprinting and reproduction. Online. *Reproduction*. 2005, roč. 130, č. 4, s. 389-399. ISSN 1470-1626. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00395>. [cit. 2024-06-12].
- [26] EHRLICH, Melanie. Dna Hypomethylation In Cancer Cells. Online. *Epigenomics*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 239-259. ISSN 1750-1911. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>. [cit. 2024-06-15].
- [27] PEINADO, Miguel A. Hypomethylation of DNA. Online. In: SCHWAB, Manfred (ed.). *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, s. 1791-1792. ISBN 978-3-642-16482-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_2923. [cit. 2024-06-15].
- [28] Hofmanová, J. Epigenetické změny v karcinogenezi. Genotoxicita a karcinogeneze [online]. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, 2013, Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/04_epigenet.html [cit. 2024-06-15].
- [29] BOUYAHYA, Abdelhakim; MECHCHATE, Hamza; OUMESLAKHT, Loubna; ZEOUK, Ikrame; ABOULAGHRAS, Sara et al. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. Online. *Biomolecules*. 2022, roč. 12, č. 3. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom12030367>. [cit. 2024-06-15].
- [30] DESVIGNES, Thomas; SYDES, Jason; MONTFORT, Jérôme; BOBE, Julien; POSTLETHWAIT, John H et al. Evolution after Whole-Genome Duplication: Teleost

- MicroRNAs. Online. *Molecular Biology and Evolution*. 2021, roč. 38, č. 8, s. 3308-3331. ISSN 1537-1719. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab105>. [cit. 2024-06-11].
- [31] HROVATIN, Karin a KUNEJ, Tanja. Classification of miRNA-Related Sequence Variations. Online. *Epigenomics*. 2018, roč. 10, č. 4, s. 463-481. ISSN 1750-1911. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0126>. [cit. 2024-06-11].
- [32] KIM, Jung-Ae a YEOM, Young Il. Metabolic Signaling to Epigenetic Alterations in Cancer. Online. *Biomolecules & Therapeutics*. 2018, roč. 26, č. 1, s. 69-80. ISSN 2005-4483. Dostupné z: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.185>. [cit. 2024-06-15].
- [33] WEI, Shuhua; LI, Chunxiao; YIN, Zhongnan; WEN, Jie; MENG, Hui et al. Histone methylation in DNA repair and clinical practice: new findings during the past 5-years. Online. *Journal of Cancer*. 2018, roč. 9, č. 12, s. 2072-2081. ISSN 1837-9664. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/jca.23427>. [cit. 2024-05-15].
- [34] FERGUSON-SMITH, Anne C a BOURCHIS, Deborah. The discovery and importance of genomic imprinting. Online. *ELife*. 2018, roč. 7. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.42368>. [cit. 2024-04-10].
- [35] Chauhan, T. The Molecular Mechanism of Genomic Imprinting. *Genetic Education* [online]. 11.01.2023 Dostupné z: <https://geneticeducation.co.in/the-molecular-mechanism-of-genomic-imprinting/> [cit. 2024-06-20].
- [36] IDERAABDULLAH, Folami Y.; VIGNEAU, Sebastien a BARTOLOMEI, Marisa S. Genomic imprinting mechanisms in mammals. Online. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2008, roč. 647, č. 1-2, s. 77-85. ISSN 00275107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.08.008>. [cit. 2024-04-10].
- [37] BARBARA, Maria Andria; ABDILLA, Ylenia a CALLEJA-AGIUS, Jean. An Introduction to Epigenetics. Online. *Neonatal Network*. 2017, roč. 36, č. 3, s. 124-128. ISSN 0730-0832. Dostupné z: <https://doi.org/10.1891/0730-0832.36.3.124>. [cit. 2024-06-12].
- [38] HIURA, Hitoshi; OKAE, Hiroaki; CHIBA, Hatsune; MIYAUCHI, Naoko; SATO, Fumi et al. Imprinting metylation errors in ART. Online. *Reproductive Medicine and Biology*. 2014, roč. 13, č. 4, s. 193-202. ISSN 1445-5781. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12522-014-0183-3>. [cit. 2024-04-10].
- [39] KALISH, Jennifer M.; JIANG, Connie a BARTOLOMEI, Marisa S. Epigenetics and imprinting in human disease. Online. *The International Journal of Developmental Biology*. 2014, roč. 58, č. 2-3-4, s. 291-298. ISSN 0214-6282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1387/ijdb.140077mb>. [cit. 2024-06-12].

- [40] COPPEDÈ, Fabio; BHADURI, Utsa; STOCCORO, Andrea; NICOLÌ, Vanessa; DI VENERE, Eleonora et al. DNA Methylation in the Fields of Prenatal Diagnosis and Early Detection of Cancers. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 14. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms241411715>. [cit. 2024-06-12].
- [41] YORIFUJI, Tohru; HIGUCHI, Shinji; HOSOKAWA, Yuki a KAWAKITA, Rie. Chromosome 6q24-related diabetes mellitus. Online. *Clinical Pediatric Endocrinology*. 2018, roč. 27, č. 2, s. 59-65. ISSN 0918-5739. Dostupné z: <https://doi.org/10.1297/cpe.27.59>. [cit. 2024-06-15].
- [42] IRVING, Melita D.; BUITING, Karin; KANBER, Deniz; DONAGHUE, Celia; SCHULZ, Reiner et al. Segmental paternal uniparental disomy (patUPD) of 14q32 with abnormal methylation elicits the characteristic features of complete patUPD14. Online. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010, roč. 152A, č. 8, s. 1942-1950. ISSN 1552-4825. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33449>. [cit. 2024-06-15].
- [43] KIM, Yuna; WANG, Sung Eun a JIANG, Yong-hui. Epigenetic therapy of Prader–Willi syndrome. Online. *Translational Research*. 2019, roč. 208, s. 105-118. ISSN 19315244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.02.012>. [cit. 2024-06-13].
- [44] HORÁNSZKY, Alex; BECKER, Jessica L.; ZANA, Melinda; FERGUSON-SMITH, Anne C. a DINNYÉS, András. Epigenetic Mechanisms of ART-Related Imprinting Disorders: Lessons From iPSC and Mouse Models. Online. *Genes*. 2021, roč. 12, č. 11. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes12111704>. [cit. 2024-06-12].
- [45] Le Bouc, Y., Rossignol, S., Azzi, S., Brioude, F., Cabrol, S., Gicquel, C., Netchine, I. Epigenetics, genomic imprinting and developmental disorders [online]. *PubMed*, 2010, 194(2), s. 287-297. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21166119/> [cit. 2024-06-04].
- [46] KALISH, Jennifer M.; JIANG, Connie a BARTOLOMEI, Marisa S. Epigenetics and imprinting in human disease. Online. *The International Journal of Developmental Biology*. 2014, roč. 58, č. 2-3-4, s. 291-298. ISSN 0214-6282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1387/ijdb.140077mb>. [cit. 2024-06-11].
- [47] ISLES, Anthony R. The contribution of imprinted genes to neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. Online. *Translational Psychiatry*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2158-3188. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01972-4>. [cit. 2024-06-17].