

# Infertilitet hos män har ofta genetisk orsak

Y-kromosomdeletioner upptäcks med PCR-teknik

**Omkring 10 procent av i övrigt friska män har infertilitetsproblem, och hos cirka hälften av dessa finner man avvikelser i spermaprov utan specifik eller känd bakomliggande orsak. Flera internationella och egna studier visar att det hos 10–20 procent av dessa män finns DNA-förändringar inom tre specifika områden på Y-kromosomen. Dessa områden kan nu analyseras med en polymeras-kedjereaktionsbaserad teknik.**

Hos två tredjedelar av infertila par finner man bland annat en »manlig faktor» och hos en tredjedel endast »manlig faktor» som orsak till parets nedsatta fortplantningsförmåga. Störd spermiebildning utgör den enskilt vanligaste infertilitetsorsaken. Vidare har omkring 7 procent av i övrigt helt friska män en grav störning i spermiebildningen [1].

Vid större undersökningar av infertila män finner man att den etiologiska bakgrunden endast kan fastläggas hos 30–50 procent [1]. Efter uteslutande av andra orsaker till infertilitet återstår således en stor grupp infertila män (50–70 procent) med oförklarad nedsättning av

testikelfunktionen och spermieproduktionen (få eller inga spermier, abnormt formade spermier/och eller gravt nedsatt spermierörlighet). Etiologiskt utgör oligozoo- och azoospermi heterogena grupper. Differentialdiagnostik mellan testikulär orsak och hinder i uttransporten av spermier baseras säkrast på morfologisk undersökning av testikelbiopsier. I gruppen av män med testikulär skada ses en ytterst varierad bild av tidiga och sena störningar i olika faser av spermatogenesisen och i en del fall total avsaknad av germinalepitel (Sertoli cell only syndrome).

Infertilitetsutredningar måste bedrivas med sikte på att snabbt identifiera vilka faktorer hos mannen respektive kvinnan som bidrar till den nedsatta fertiliteten, att finna behandlingsbara orsaker och när detta inte är möjligt ge paret möjlighet till assisterad befruktning, donatorinsemination eller adoption. Det är väsentligt att undvika ex juvantibus-behandlingar utan rationell grund och utan eller med tveksamt dokumenterad effekt. När manlig faktor diagnostiseras (vanligen avvikelser i spermaprovet) är det nödvändigt att ge mannen en noggrann genomgång av undersökningsfynden och att diskutera dessa. Om patienten inte får adekvata besked är risken stor att dessa män kommer att hamna i en utredningskarusell med ofullständiga och inadekvata utredningar hos flera olika läkare. Det är därför viktigt att snabbt identifiera infertilitetsorsakerna i varje enskilt fall.

## Många infertila män har förändringar på Y-kromosomen

De senaste årens forskning har visat att en stor del av manlig »idiopatisk» infertilitet troligen har genetisk bakgrund. Tiepolo och Zuffardi [2] var de första som postulerade att ett område på Y-kromosomens långa arm (Yq) innehöll gener som är nödvändiga för normal spermatogenesis. Män med stora deletioner av Yq, iakttagbara vid kromosomanalys, visades ha azoospermi. Förekomst av en Yq-lokaliserad azoospermifaktor (AZF) har senare utretts och 1989 lokaliserades AZF till den distala regionen av den långa armen på Y-kromosomen, kallad Yq11.23 [3]. En mer

detaljerad analys av Y-kromosomen med hjälp av STS mapping (sequence tagged site) [4, 5] har använts för att kartlägga 98 procent av den eukromatiska (DNA-region med normalt fungerande gener) delen av Y-kromosomen.

Kartläggningen baseras på 207 lokus som identifieras av STS-startsekvenser och täcker det aktuella området på Yq med ett intervall av 220 kb (kilobaser) över den eukromatiska regionen. Metoden medger en högre upplösning än ljusmikroskopet för att identifiera deletioner men behöver förfinas för identifiering av samtliga gener inom området.

Markörernas inbördes lokalisation är ännu inte helt klarlagd och kartan revideras kontinuerligt i sina detaljer. Det är emellertid möjligt att med hjälp av de kända markörerna undersöka infertila män med avseende på »mikrodeletioner» på Y-kromosomen. De senaste studierna har visat att 10–20 procent av män med azoospermi eller grav oligozospermi har mikrodeletioner inom Yq, dvs små deletioner som inte kan visualiseras vid karyotypning [6-8].

## Tre områden på Y-kromosomen viktiga för spermatogenesisen

Mer detaljerade studier av män med deletioner och spermatogenesrubbingar tyder på att det finns minst tre »heta» regioner på Y-kromosomens långa arm som innehåller gener viktiga för spermatogenesisen. Regionerna kallas AZF a–c [6]. För två av dessa regioner, AZFb och AZFc, har man klonat kandidatgener (RBM1 och DAZ/SPGY) som överraskande kodar för proteiner med liknande struktur, samtliga innehållande RRM (RNA recognition motif) samt repeterade sekvenser [7]. Proteinerna kan således ha RNA-bindande egenskaper. Vilka eventuella RNA som binds och vad dessa i så fall har för funktion är inte känt. Alla kandidatgenerna är Y-specifika och endast uttryckta i testis. För DAZ finns emellertid en autosomalt lokaliserad homolog DAZ-LA (DAZ like autosomal).

## Bristande korrelation mellan genotyp och fenotyp

Hos män med mikrodeletioner på Y-kromosomen har man hittills inte funnit

## Författare

STEFAN ARVER

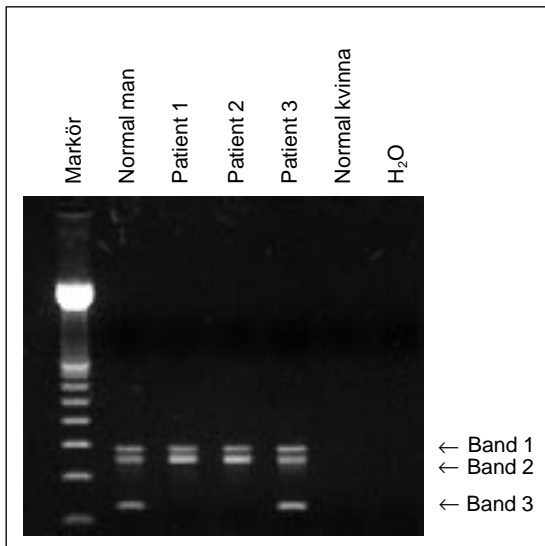
docent, biträdande överläkare, andrologienheten, Reproduktionsmedicinskt centrum, Karolinska sjukhuset, Stockholm

CHRISTINA ÖSTERLUND

fil kand, doktorand, neonatal och reproduktionsmedicinska forskningslaboratoriet, institutionen för kvinnors och barns hälsa, Karolinska institutet, Stockholm

ÅKE POUSETTE

överläkare, universitetslektor i klinisk experimentell andrologi, Karolinska institutet, enheten för klinisk kemi, Huddinge sjukhus, och Reproduktionsmedicinskt centrum, Karolinska sjukhuset, Stockholm.



**Figur 1.** Resultatet av en multiplex polymeras-kedjereaktion med tre primerpar. Den normala mannen samt patient 3 uppvisar samtliga tre band. Patient 1 och patient 2 saknar band 3 på grund av en deletion av detta område på Y-kromosomen. Den normala kvinnan (negativ kontroll) samt H<sub>2</sub>O-provet (kontaminationskontroll) ger inga band.

någon uppenbar korrelation mellan deletionernas storlek, lokalisering och den histologiska bilden i testikelbiopsier eller kliniskt uttryck. Hälften av männen har stegring av follikelstimulerande hormon FSH (endokrint tecken på spermatogenesskada), testosteronnivåerna synes lägre än hos friska kontroller och hos en majoritet är den ena eller bägge testiklarna av subnormal storlek. Särskilt DAZ-deletioner är förenade med minskad testikelvolym. Den histologiska bilden varierar från total avsaknad av germinalceller till olika former av stopp i spermiebildning eller spermieomnåd [9].

### Analys med PCR-teknik

Vi kan idag med hjälp av multiplex PCR (polymeras-kedjereaktion), dvs flera primerpar i samma PCR-mix (totalt 13 primerpar uppdelade på fem olika mixar), undersöka patienter för mikrodeletioner inom de tre intressanta områdena på Y-kromosomen, AZF a-c. Metoden går ut på att man preparerar DNA från patientens blod och därefter tillsätter startsekvenser specifika för olika intervall inom de tre områdena AZF a-c på Y-kromosomen. Med PCR amplifieras dessa utvalda intervall, och reaktionsblandningen analyseras sedan på en agarosgel där PCR-produkterna separeras med avseende på storlek. I varje reaktionsblandning kan man samtidigt mångfaldiga två till fyra intervall (multiplex PCR) på Y-kromosomen.

Om det undersökta intervallet är normalt ger detta ett band på gelen medan en deletion av intervallet resulterar i en avsaknad av PCR-produkt. PCR-metoden kräver både positiva kontroller (DNA från fertil man) som funktionskontroll av själva PCR-reaktionen och negativa kontroller (DNA från kvinna) som kontaminationskontroll av PCR-reaktionen (Figur 1). Dessutom kräver

denna typ av PCR-analys, som bygger på negativa resultat i form av en frånvaro av produkt, att analysen upprepas för alla patienter som saknar ett eller flera band, detta för att fastställa en säker diagnos. Våra egna samt tidigare publicerade resultat visar att 10–20 procent av män med oförklarlig azoospermi eller grav oligozoospermi har någon deletion inom dessa tre viktiga områden på Y-kromosomen [6-8]. Detta är i klinisk praxis mycket viktig information eftersom vi i dessa fall i regel inte behöver genomföra ytterligare utredningar.

### Assisterad befruktning möjliggör arv av deletioner

Hos 10–20 procent av män med spermatogenesstörning finner man således deletioner med hjälp av PCR-analys. En del av dessa män har oligozoospermi vilket möjliggör behandling med assisterad befruktning, oftast ICSI (intracytoplasmatic sperm injection). Om behandlingen lyckas och ger upphov till en manlig individ innebär det med största sannolikhet att »infertilitetsgenen» överförs till nästa generation. Det blivande barnet ärver faderns deleterade Y-kromosom och kommer själv med stor sannolikhet att bli subfertil.

Det är naturligtvis en svår fråga om man skall uppmuntra till att dessa deletioner med hjälp av assisterad befruktning förs vidare till nästa generation. Vi skall naturligtvis objektivt informera paret om vad vi vet men det måste bli paret själva som avgör om och hur behandling skall ske.

### Många frågor återstår

Vilken eller vilka gener inom de diskuterade områdena på Yq som har biologisk betydelse för mannens fertilitet är inte klarlagt. Ontogenetiska aspekter på förekomst av mikrodeletioner har inte närmare utretts. Det finns dock en-

staka observationer som talar för en successiv aggravering av spermatogenesskadorna. Vi och andra har lyckats följa utvecklingen hos några få män 10–15 år tillbaka i tiden. Det synes därvid som en initial oligozoospermi kan övergå i azoospermi och total germinalcells-förlust. Detta tyder på att män med vissa deletioner kan ha en kortvarig period med relativt normal fertilitet som efter en tid övergår i kraftigt störd spermatogenes.

Vi har själva framställt syntetiska peptider motsvarande specifika områden inom AZF a-c och framställt antikroppar mot dessa. Med immunhistologi kan man påvisa att dessa peptider är specifikt lokaliserade till olika delar av testikeln. Mycket arbete återstår dock innan vi kan kartlägga dessa ämnens biologiska betydelse och förstå hur vi kan behandla dessa avvikelser.

### Referenser

1. Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology. Male reproductive health and dysfunction.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1997; 3-8.
2. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genetics* 1976; 34: 119-24.
3. Chandley AC, Gosden JR, Hargreave TB, Spowart G, Speed RM, McBeth S. Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome (Yqs). *Journal of Medical Genetics* 1989; 26: 145-53.
4. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown GL, Beer-Romero P, Bogan SJ et al. The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258: 52-9.
5. Foote S, Vollrath D, Hilton A, Page DC. The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 1992; 258: 60-6.
6. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kieseewetter F et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 1996; 5: 933-43.
7. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics* 1995; 10: 383-93.
8. Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L et al. Substantial prevalence of microdeletions of the Y chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 1347-52.
9. Pryor JL, Kent-First MJ, Muallem A, Van Bergen AHV, Nolten WE, Meisner L et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New Engl J Med* 1997; 336: 534-9.

*Se även medicinsk kommentar i detta nummer.*