

Genetic etiology of Asthenozoospermia: A review

Akbari A^{1,2}, Anvar Z^{3,4}, Jaafarinia M^{1,2}, Totonchi M^{5,6*}

- 1- Department of Biology, Faculty of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I. R. Iran.
- 2- Department of Biology, Faculty of Science, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
- 3- Infertility Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
- 4- Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I. R. Iran.
- 5- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I. R. Iran.
- 6- Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2019/01/15 | Accepted: 2019/04/15

Abstract:

Background: Asthenozoospermia, as the most prevalent cause of male infertility, is defined as low percentage of progressively motile spermatozoa per ejaculate. It occurs in both non-syndromic and syndromic forms and later it manifests as a part of primary ciliary dyskinesia. In the last decade, with the advent of Next-generation sequencing technologies numerous genes have been introduced in the pathogenesis of different diseases. Here, we review the genes implicated in asthenozoospermia by genetic studies.

Materials and Methods: Strategies employed by infertility genetics studies in original research articles extracted from PubMed database are critically reviewed. Afterwards, genes implicated in asthenozoospermia and primary ciliary dyskinesia are discussed.

Results: Until today, pathogenic variants in DNAH1, SEPT12, SLC26A8, CATSPER1, CATSPER2 and ADCY10 have been reported to cause non-syndromic asthenozoospermia. Moreover, DNAI1, DNAH5, DNAAF2, CCDC39, DYX1X1 and LRRC6 have been implicated in primary ciliary dyskinesia and syndromic asthenozoospermia.

Conclusion: Next-generation sequencing technologies and especially whole-exome sequencing in families with multiple asthenozoospermic patients showed considerable success in introduction of genes involved in asthenozoospermia leading to a more comprehensive knowledge on genetics of infertility.

Keywords: Asthenozoospermia, Primary ciliary dyskinesia, Next-generation sequencing, Whole-exome sequencing

*Corresponding Author:

Email: m.totonchi@royaninstitute.org

Tel: 0098 912 738 7805

Fax: 0098 212 356 2507

Conflict of Interests: **No**

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 3, Pages 318-333

Please cite this article as: Akbari A, Anvar Z, Jaafarinia M, Totonchi M. Genetic etiology of Asthenozoospermia: a review. *Feyz* 2019; 23(3): 318-33.

[۱۰]. ساختار اسکلت سلولی مهم دیگر در ساختار تاژک اسپرم غلاف فیروزی است. در گذشته تصور می‌شد که این غلاف فقط نقش یک عامل محافظت‌کننده محکم برای تاژک را دارد [۱۱]. اما امروزه مشخص شده‌است که نقش فعالی در حرکت اسپرم ایفا می‌کند. پروتئین‌های زیادی که در مسیرهای تنظیم‌کننده حرکت اسپرم و مسیرهای متابولیک نقش دارند، از جمله تعدادی آنزیم دخیل در مسیر گلیکولیز در این غلاف قرار دارند. دو پروتئین ساختاری مهم غلاف فیروزی AKAP3 و AKAP4 نام دارند. AKAP3 ساختار پایه غلاف را می‌سازد و AKAP4 این ساختار را تکمیل می‌کند [۱۲]. عدم وجود پروتئین AKAP4 منجر به کاهش شدید حرکت اسپرم و ناباروری می‌شود [۱۳]. پروتئین مهم دیگری به نام GAPDS با غلاف فیروزی در ارتباط است. موش‌های مدلی که برای این پروتئین فروریخته (knockout) شدند اسپرم‌های دارای تحرک ضعیف داشتند [۱۴]. همچنین غلاف فیروزی نقش مهمی در حفاظت اسپرم از استرس اکسیداتیو (oxidative stress) دارد. شکل شماره ۱ آناتومی اسپرم و پروتئین‌های ساختاری اجزای مختلف را نشان می‌دهد.

تنظیم حرکت اسپرم

اسپرم اکثر پستانداران دو نوع حرکت فیزیولوژیک دارند. حرکت فعال (activated motility) که در اسپرم انزال‌شده دیده می‌شود و حرکت بیش‌فعال (hyper-activated motility) که در اکثر اسپرم‌های استخراج‌شده از جایگاه لقاح به چشم می‌آید [۱۵]. تاژک یک اسپرم فعال یک حرکت موجی متقارن و کم‌دامنه ایجاد می‌کند که اسپرم را کمابیش در یک خط مستقیم در یک محیط غیر متراکم مثل مایع منی به جلو می‌راند. اکثر اسپرم‌های فاقد حرکت فعال، نمی‌توانند به محل اتصال لوله رحمی به رحم برسند و بنابراین توانایی لقاح در شرایط درون تنی (in vivo) را ندارند. این موضوع به‌خوبی در موش‌های صحرایی نشان داده‌شده و شواهد بالینی متعددی در حمایت از آن در سایر پستانداران وجود دارد [۱۶]. پس از رسیدن اسپرم به لوله رحمی الگوی زنبق تاژک به حالتی نامتقارن و با دامنه وسیع‌تر تغییر می‌کند. به این نوع حرکت، بیش‌فعال گفته می‌شود. این نوع حرکت به اسپرم امکان جداسدن از اپیتلیوم لوله رحمی و حرکت در این محیط متراکم را برای اسپرم فراهم می‌کند؛ درحالی‌که حرکت فعال برای پیشروی اسپرم در این محیط کافی نیست. همچنین این نوع حرکت برای نفوذ به لایه‌های بیرونی تخمک نیز ضروری به‌نظر می‌رسد [۱۷]. حرکت بیش‌فعال درواقع، بخشی از فرآیندی به نام توانمندسازی (capacitation) است که طی آن علاوه بر حرکت بیش‌فعال، غشای آکروزوم در سر اسپرم نیز ناپایدار می‌شود تا اسپرم برای

ناباروری ژنتیکی باشد و آستنوزوسپرمی درصد زیادی از موارد ایدیوپاتیک را تشکیل می‌دهد. در یک مطالعه روی هزار فرد نابارور مراجعه‌کننده به یک مرکز ناباروری، ۷۱/۱۸ درصد از آن‌ها تنها مبتلا به آستنوزوسپرمی بودند؛ در حالی که ۱۳/۶۳ درصد آن‌ها آستنوزوسپرمی را همراه با یک اختلال دیگر مثل تراتوزوسپرمی یا اولیگوزوسپرمی نشان دادند. در مجموع ۸۴/۸۱ درصد از مراجعین آستنوزوسپرمیک بودند که با توجه به نمونه‌گیری اتفاقی این درصد بسیار قابل‌توجه است [۶]. پاتوفیزیولوژی آستنوزوسپرمی به دو دسته کلی نقص‌های ساختاری دم اسپرم و متابولیک تقسیم‌بندی می‌شود. شکل‌گیری صحیح ساختار دم اسپرم از بالاترین اهمیت در حرکت صحیح آن برخوردار است و نقص در ساختار و نحوه فعالیت پروتئین‌های تشکیل‌دهنده آکسونم منجر به آستنوزوسپرمی می‌شود [۷]. از جمله نقص‌های متابولیک می‌توان به نقص در مسیرهای تنظیمی حرکت اسپرم، ساختار کانال‌های یونی غشای اسپرم، تأمین ATP لازم برای حرکت دم و نقص در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. در ادامه ساختار دم اسپرم پستانداران و مسیرهای تنظیمی حرکت اسپرم به اختصار توضیح داده می‌شوند.

ساختار دم اسپرم پستانداران

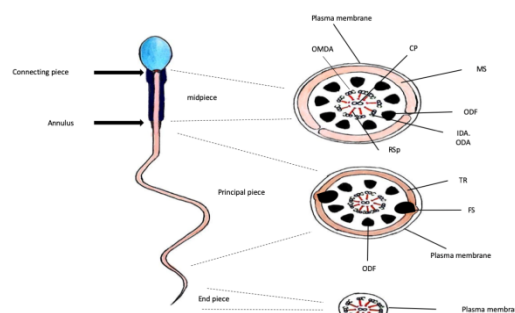
شکل‌گیری دم اسپرم در اسپرماتیدها انجام شده و با تبدیل شدن یکی از سانتیول‌ها به آکسونم (axoneme) آغاز می‌شود. در جریان اسپرمیوزن شکل‌گیری صحیح ساختار دم اسپرم برای عملکرد صحیح آن ضروری است. دم اسپرم پستانداران از یک ساختار اصلی به نام آکسونم و تعدادی ساختار جانبی همراه آن تشکیل شده‌است که شامل غلاف میتوکندریایی (Mitochondrial Sheath)، رشته‌های خارجی ضخیم (Outer Dense Fibers) و غلاف فیروزی (FS) است. آکسونم یک ساختار محافظت‌شده در تمام سلول‌های یوکاریوت تاژک و مزک-دار است، اما ساختارهای جانبی نام برده شده تنها در تاژک اسپرم مشاهده می‌شوند. این ساختارها از اهمیت زیادی برای حرکت دم اسپرم برخوردار هستند و نقص در آن‌ها منجر به ایجاد بدشکلی در دم اسپرم می‌شود. به جز سر اسپرم، بخش‌های دیگر آن یعنی قطعه میانی (midpiece)، قطعه اصلی (principal piece) و قطعه انتهایی (end piece) دارای آکسونم هستند. قطعه میانی نزدیک-ترین قطعه به سر اسپرم است و دارای غلاف میتوکندریایی است که میتوکندری‌های اسپرم در آن ناحیه قرار دارند و به‌صورت مارپیچ ODFها را احاطه کرده‌اند. نقش ODF دادن توانایی کشش غیرفعال به تاژک است [۸]. پروتئین اصلی حاضر در این ساختار ODF1 نام دارد [۹] که با سایر پروتئین‌ها از جمله: SPAG4، SPAG5، OIP1 و SPAG5، ODF2

های مشاهده شده در موش‌هایی که زیر واحد کاتالیتیک (C) ایزوفرم مختص اسپرم آنزیم در آن‌ها حذف شده بود، ناباروری جنس مذکر بر اثر تحرک بسیار ضعیف اسپرم است [۲۲]. بنابراین پیشنهاد شد که مکانیسم فعالیت cAMP از طریق تأثیر بر PKA در تحرک اسپرم مؤثر است. اگرچه PKA می‌تواند از مسیرهای مختلفی عملکرد تاژک را کنترل کند، یک مکانیسم آن از طریق فسفریلاسیون سرین/ترئونین پروتئین‌های هدف و در ادامه فعال-سازی تیروزین کینازها و یا کینازهای پایین دست است که عموماً در تاژک قرار دارند. فسفریله شدن تیروزین در این پروتئین‌های پایین دست منجر به حرکت خواهد شد. یکی از این پروتئین‌ها، بازوهای داینین آکسونم هستند که همان‌طور که اشاره شد، فسفریله شدن آن‌ها برای ایجاد زنش تاژک ضروری است [۲۳]. علاوه بر این، cAMP مسیرهای دیگری در اسپرم و بیضه‌ها از جمله cyclic nucleotide-gated ion channel و فاکتورهای guanine nucleotide exchange را نیز تنظیم می‌کند. فسفریلاسیون/دفسفریلاسیون تیروزین در پروتئین‌های تاژک برای شروع و پایان حرکت بیش‌فعال نیز در پریمات‌ها و جوندگان ضروری است. یکی از پروتئین‌های مهم در این مسیر AKAP4 نام دارد. خانواده AKAP (A-kinase anchor protein) شامل پروتئین‌هایی است که پس از فعال شدن PKA به آن متصل شده و وظیفه حمل آن را به نقاط مختلف سلول بر عهده دارند. حمل شدن PKA به نقاط مختلف برای حرکت بیش‌فعال مهم است و باعث دسترسی سریع این آنزیم به پروتئین‌های هدف در نقاط مختلف می‌شود [۲۴].

رسیدن به لایه‌های خارجی تخمک و واکنش آکروزومی (acrosome reaction) آماده شود [۱۸]. ساختار صحیح تاژک برای عملکرد آن ضروری است. آکسونم به‌عنوان موتور حرکتی در تمام سلول‌های یوکاریوتی دارای مژک و تاژک عمل می‌کند. در اسپرم پستانداران پروتئین‌های داینین (dynein) پروتئین‌های اصلی حرکتی هستند که از جفت میکروتوبول‌های خارجی منشأ می‌گیرند [۱۹]. بازوهای داینین دارای خاصیت ATPase هستند و وقتی فسفریله می‌شوند، این خاصیت در آن‌ها فعال می‌شود. انرژی حاصل از هیدرولیز ATP باعث لغزیدن جفت میکروتوبول‌های خارجی مجاور روی یکدیگر می‌شود. از آنجایی که آکسونم به سر اسپرم اتصال دارد، این لغزش تا انتهای تاژک ادامه داشته، منجر به خم شدن و زنش تاژک می‌شود. دفسفریله شدن داینین‌ها توسط آنزیم پروتئین فسفاتاز کلسینورین (calcineurin) که به کالمودولین (calmodulin or CaM) وابسته است این فرآیند را معکوس کرده و تاژک را از خمیدگی خارج می‌کند. این فرآیند به‌صورت تک‌سویه انجام می‌شود. یعنی با فسفریله شدن، بازوهای داینین داخلی تاژک به یک سمت خم می‌شود سپس با دفسفریله شدن به حالت اولیه برمی‌گردد و در ادامه با فسفریله شدن بازوهای داینین خارجی به سمت مقابل خم خواهند شد [۲۰]. تنظیم فرآیند حرکت اسپرم در پستانداران از طریق دو مسیر اصلی cAMP/PKA و کلسیم انجام می‌شود.

مسیر cAMP/Protein Kinase A

فسفریلاسیون وابسته به cAMP پروتئین‌های تاژک، مسؤول شروع و حفظ حرکت فعال در اسپرم پستانداران است [۲۱]. آنزیم PKA یک سرین/ترئونین کیناز است. یکی از فئوتیپ-



شکل شماره ۱- آناتومی اسپرم. تاژک اسپرم از طریق متصل‌کننده با سر متصل می‌شود و از سه قطعه میانی، اصلی و انتهایی تشکیل شده است. قطعات اصلی و میانی توسط Annulus از هم جدا شده‌اند. برش عرضی قطعه میانی شامل غشای پلاسمایی و غلاف میتوکندریایی (MS) است که ۹ رشته ضخیم بیرونی (ODF) را احاطه می‌کنند. در داخل این رشته‌ها اجزای تشکیل دهنده آکسونم قرار دارند که عبارت هستند از ۹ جفت میکروتوبول تحت عنوان OMDA و بازوهای dynein یعنی ODA و IDA، محورهای شعاعی (RSp) و جفت میکروتوبول‌های مرکزی (CP). در برش عرضی قطعه اصلی غشای پلاسمایی هفت ODF را احاطه کرده و دو ODF توسط دو ستون غلاف فیبروزی (FS) جایگزین شده‌اند. این دو ستون توسط ستون‌های عرضی (TR) به هم متصل هستند. در برش عرضی قطعه انتهایی غلاف فیبروزی و ODF در این قطعه وجود ندارد و آکسونم با غشای پلاسمایی احاطه شده است.

پروتئین‌های septin متعلق به گروهی از پروتئین‌های GTPase با قابلیت پلیمرسازی هستند که فیلامنت‌های هومو یا هتروداپمر تشکیل می‌دهند و در فرآیندهای سلولی متنوعی از جمله سیتوکینز و مورفوژنز نقش دارند. پروتئین‌های SEPTIN1، SEPTIN4، SEPTIN6، SEPTIN7 و SEPTIN12 از اجزای تشکیل‌دهنده قطعه اتصال گردن به سر اسپرم (annulus) هستند و شواهد زیادی مبنی بر اهمیت ایجاد کمپلکس‌های پایدار septin در شکل‌گیری صحیح ساختار دم اسپرم نیز وجود دارد [۲۹]. عدم فعالیت ژن *septin4* در موش، منجر به آستنوزوسپرمی از طریق ایجاد ناهنجاری ساختاری در دم اسپرم می‌شود. این ناهنجاری‌ها شامل عدم شکل‌گیری annulus، خم‌شدگی دم و چینش غیر طبیعی میتوکندری‌ها در قطعه میانی هستند [۳۱،۳۰]. همچنین پروتئین sept12 با پروتئین‌های alpha-tubulin و beta-tubulin نیز بر هم کنش دارد و بنابراین به نظر می‌رسد در فرآیندهای وابسته میکروتوبول‌ها در تمایز سر اسپرم نیز نقش داشته باشد. در مطالعه‌ای اگزون‌های ژن *SEPT12* در ۱۶۰ مرد نابارور و ۲۰۰ مرد بارور توالی‌یابی شدند. دو جهش هتروزیگوت در اگزون ۳ (p.Thr89Met) و اگزون ۶ (p.Asp197Asn) در نزدیکی دومین GTPase در دو بیمار آستنوزوسپرمیک شناسایی شدند. بررسی‌های *in vitro* نشان داد که جهش p.Thr89Met به طرز قابل توجهی توانایی پروتئین در تجزیه GTP را کاهش می‌دهد و جهش p.Asp197Asn نیز در اتصال GTP به آنزیم اختلال ایجاد می‌کند. این پروتئین‌های جهش‌یافته توانایی تشکیل صحیح فیلامنت‌ها را ندارند و بررسی آنالیز مایع منی بیمار دارای جهش p.Thr89Met نیز خم‌شدگی غیر طبیعی در ناحیه دم اسپرم را نشان داد. بررسی مایع منی بیمار دارای جهش p.Asp197Asn ساختار غیرطبیعی و خم‌شدگی دم اسپرم، نقص در ساختار annulus و عدم وجود پروتئین SEPT12 در آن را نشان داد. در مجموع، این شواهد نشان می‌دهند که نقص در توانایی هیدرولیز GTP توسط SEPT12 می‌تواند حتی به صورت هتروزیگوت منجر به آستنوزوسپرمی از طریق عدم ایجاد صحیح فیلامنت‌ها در annulus شود [۳۲].

ژن‌های CATSPER

پروتئین CATSPER، یک پروتئین کانالی است که به صورت اختصاصی در غشای پلاسمایی قطعه اصلی دم اسپرم انسان و موش قرار دارد و وجود آن برای دست‌یابی به حرکت بیش‌فعال ضروری است [۳۴،۳۳]. این پروتئین از چهار زیرواحد تشکیل‌دهنده بخش کانال به نام آلفا و سه زیرواحد کمکی به نام‌های بتا، گاما و

وجود کلسیم خارج سلولی در اپیدیدیم برای کسب توانایی حرکتی ضروری است و این یون در تنظیم هر دو نوع حرکت فعال و بیش‌فعال نقش مهمی دارد [۲۵]. یک مکانیسم مهم که طی آن کلسیم به‌طورمستقیم در فعالیت تاژک اثر می‌گذارد، از طریق تنظیم فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز محلول (soluble adenylyl cyclase or sAC) است. این آنزیم با تولید cAMP باعث فعال‌شدن PKA می‌شود و بنابراین برای حرکت اسپرم بسیار مهم است. آنزیم sAC با انواع تراغشایی آدنیلیل سیکلاز (transmembrane adenylyl cyclase or tmAC) از نظر بیوشیمیایی متفاوت بوده و به‌صورت اختصاصی به هر دو یون کلسیم و بیکربنات (HCO_3^-) حساس است [۲۶]. این‌که چطور غلظت یون کلسیم در داخل اسپرم به‌طور ناگهانی بالا می‌رود، کامل مشخص نشده است. اما پیشنهاد شده که ذخیره‌های داخل سلولی برای یون کلسیم وجود دارد که مخصوصاً در هنگام ایجاد شدن حرکت بیش‌فعال که اسپرم به کلسیم زیادی نیاز دارد، آزاد می‌شوند. هرچند که به جز آکروزوم هنوز جایگاهی برای ذخیره کلسیم تعیین نشده است [۲۷]. صرف‌نظر از ذخیره‌های داخل سلولی، شواهد متعددی برای ورود کلسیم خارج سلولی از طریق کانال‌های مختلف به اسپرم وجود دارد. این کانال‌ها شامل کانال‌های وابسته به ولتاژ، کانال‌های Cyclic nucleotide-gated (CNG) و کانال‌های خانواده CatSper است. موش‌های فروریخته برای ژن‌های خانواده CatSper نابارور بوده، توانایی ایجاد حرکت بیش‌فعال را ندارند. از سوی دیگر، کلسیم در غلظت بالا باعث مهار حرکت اسپرم می‌شود. بدین‌ترتیب که از طریق گیرنده کالمودولین و آنزیم کلسینورین که به کالمودولین و کلسیم وابسته است، بازوهای داینین دفسفریله می‌شوند [۲۸]. شکل شماره ۲ مسیرهای مهم در تنظیم حرکت اسپرم را نشان می‌دهد.

ژن‌های مرتبط با آستنوزوسپرمی غیرسندرومی

ژن‌هایی که تا به امروز در رابطه با آستنوزوسپرمی غیرسندرومیک با قطعیت و مطالعات عملکردی گسترده معرفی شده‌اند، عبارت هستند از *DNAH1*، *SEPT12*، *SLC26A8* و ژن‌های سازنده زیر واحدهای پروتئین CATSPER. ژن‌های *DNAH1* و *SEPT12* در سرهم‌بندی و شکل‌گیری صحیح ساختار و مورفولوژی دم اسپرم نقش دارند. در حالی که ژن‌های *CATSPER* و *SLC26A8* سازنده کانال‌های انتقال یون واقع در غشای اسپرم هستند. وجود یون‌های مورد انتقال این کانال‌ها در تنظیم حرکت دم اسپرم و ظرفیت‌پذیری ضروری است. در ادامه، این ژن‌ها و جهش‌های آن‌ها با جزئیات بیشتر بررسی می‌شوند.

ژن *DNAH1*

ناهنجاری‌های شکلی و ساختاری دم اسپرم از عمده موارد ایجاد آستنوزوسپرمی هستند. یکی از فنوتیپ‌های مهمی که در این رابطه توصیف شده است، ناهنجاری‌های چندگانه دم اسپرم (MMAF) است که در گذشته دیسپلازی غلاف فیروزی (DFS) یا فلاژلوم کوتاه نامیده می‌شد. در این حالت، مجموعه‌ای از ناهنجاری دم اسپرم در بررسی نمونه مایع منی قابل مشاهده است که جمع‌شدگی، خمیدگی، کوتاهی و یا عدم وجود دم اسپرم را شامل می‌شود [۴۲]. ژن *DNAH1* مسؤل تولید زنجیره سنگین IDA آکسونم است و اولین بار در یک مطالعه گروهی آستنوزوسپرمی جهش در آن در بیماران گزارش شد [۴۳]. جهش در این ژن منجر به حذف جفت میکروتوبول‌های مرکزی از ساختار آکسونم می‌شود و در واقع ساختار آن از 9+2 به 9+0 تغییر می‌کند. جفت میکروتوبول نقش عمده‌ای در پایداری ساختار آکسونم دارد. همچنین، بررسی‌های ساختاری نشان می‌دهد که جهش‌های ژن *DNAH1* می‌تواند باعث بر هم خوردگی ساختار رشته‌های ضخیم خارجی (ODF)، غلاف فیروزی و حذف‌شدگی غلاف میتوکندریایی شود. مدل موشی فروریخته ژن *Dnah1* نیز فنوتیپ آستنوزوسپرمی را نشان می‌دهد. هرچند که ناهنجاری‌های ساختاری آکسونم در موش به اندازه انسان شدید نیست و به همین دلیل پیش‌بینی می‌شود که در مسیر بیوژنز آکسونم در موش و انسان تفاوت‌های تکاملی به‌وجود آمده باشد [۴۴،۴۳].

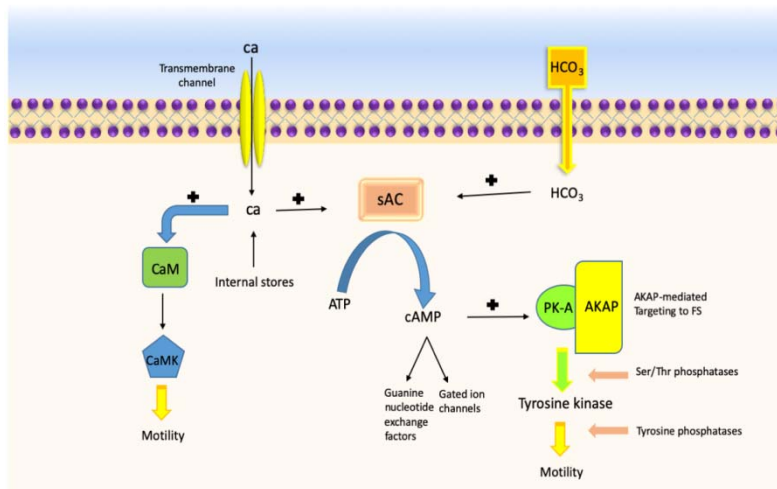
ژن *SLC26A8*

این ژن که با نام (Testis AnionTransporter 1) نیز شناخته می‌شود، به طور اختصاصی در سلول‌های رده زایای مردها بیان می‌شود. محصول پروتئینی این ژن عضوی از خانواده بزرگ انتقال‌دهنده آنیون SLC26 است و در بخش استوایی annulus اسپرم‌های بالغ قرار می‌گیرد. حذف‌های هموزیگوت *Slc26a8* در موش منجر به ناباروری بر اثر عدم تحرک اسپرم، نقص در ظرفیت‌پذیری و اختلالات شدید ساختاری دم و annulus می‌شود. اکثر پروتئین‌های خانواده SLC26 وظیفه انتقال یون‌های یک‌ظرفیتی و دوظرفیتی مانند سولفات، کلرید، بیکربنات، یدید و اگزالات را بر عهده دارند [۴۵]. علاوه بر این، این انتقال‌دهنده‌ها از جمله SLC26A3، A4، A5، A6 و A9 در بافت‌های مختلف با پروتئین کانالی (Cystic Fibrosis CFTR Transmembrane Conductance Regulator) کمپلکس ایجاد می‌کنند که جهت تنظیم فعالیت CFTR ضروری است. کانال CFTR در ناحیه استوایی سر و قطعه میانی دم اسپرم نیز وجود دارد. این کانال وظیفه انتقال یون کلر به داخل اسپرم را برعهده دارد

دلته تشکیل شده است. زیرواحدهای آلفا توسط ژن‌های *CATSPER1*، *CATSPER2*، *CATSPER3* و *CATSPER4* بیان می‌شوند در حالی که زیرواحد بتا توسط ژن *CATSPERB*، زیرواحد گاما توسط *CATSPERG* و زیرواحد دلته توسط ژن *CATSPERD* بیان می‌شوند. فعالیت این کانال توسط pH و cAMP تنظیم شده و وظیفه آن انتقال یون کلسیم است که برای حرکت اسپرم و ظرفیت‌پذیری ضروری است [۳۵]. مطالعات مدل‌های موشی نشان داد که از دست دادن هرکدام از زیرواحدهای آلفا (*Catsper1-4*) و زیرواحد کمکی دلته *CatSperδ* منجر به عدم توانایی اسپرم در ایجاد حرکت بیش‌فعال به دلیل عدم توانایی کانال در افزایش میزان کلسیم ورودی می‌شود [۳۷،۳۶]. با توجه به بیان اختصاصی این پروتئین در دم اسپرم و نقش مهم آن در تنظیم غلظت یون کلسیم، اورتولوگ‌های انسانی ژن‌های کدکننده زیرواحدهای *CATSPER* در انسان، گزینه‌های مناسبی برای بررسی وجود جهش در مردهای نابارور بودند. به همین ترتیب، تا به امروز جهش در ژن‌های *CATSPER1* و *CATSPER2* در مردهای آستنوزوسپرمیک شناسایی شدند، اما تاکنون جهش بیماری‌زایی در دیگر ژن‌های کدکننده زیرواحد آلفا یعنی *CATSPER3* و *CATSPER4* است [۳۹،۳۸]. در مطالعه‌ای روی یک خانواده با شیوع بالای آستنوزوسپرمی، حذف دو اگزون پایانی ژن *CATSPER2* گزارش شد [۴۰] و در مطالعه دیگری روی سه خانواده ایرانی غیر خویشاوند حذف‌های گسترده شامل کل ژن *CATSPER2* به ثبت رسید [۳۹]. *Avenarius* و همکاران دو خانواده ایرانی دارای فرزندان حاصل از ازدواج خویشاوندی را مورد مطالعه قرار دادند که در آنها آستنوزوسپرمی غیر سندرومیک با الگوی توارثی اتوزوم مغلوب مشاهده شد. در افراد نابارور، عدم تحرک یا تحرک بسیار اندک، تعداد کم و نقص‌های مورفولوژیک اسپرم گزارش شده بود. نقشه‌یابی هموزیگوسیتی ناحیه‌ای به طول ۱۱ cM در کروموزوم 11q13.1 را نشان داد که در افراد مبتلا به صورت مشترک هموزیگوت بود. ژن *CATSPER1* در این ناحیه قرار دارد و بررسی توالی این ژن در افراد مبتلا دو جهش درج‌شدگی -539c. 540insT و c.948-949insATGGC را نشان داد. این دو جهش تغییر قاب خوانش و پایان زودرس رونویسی در اثر ایجاد کدون خاتمه را در پی دارند [۳۸]. اگرچه امکان دسترسی به نمونه اسپرم افراد مبتلا برای بررسی‌های بیشتر وجود نداشت، اما جایگاه این جهش‌ها باعث از دست رفتن تمام دومین‌های ترانس‌ممبران پروتئین *CATSPER1* و ناحیه کانال و یا عدم ترجمه mRNA بر اثر مکانیسم nonsense-mediated decay خواهد شد [۴۱].

می‌دهند، در محیط *in vitro* باعث از بین رفتن کمپلکس با CFTR. ناپایداری پروتئین و آسیب‌پذیری آن به تجزیه توسط کمپلکس‌های پروتازوم می‌شوند. بررسی نمونه مایع منی افراد ناقل جهش p.Arg954Cys و p.Glu812Lys کاهش سطح پروتئین SLC26A8 و عدم جای‌گیری صحیح آن در غشای اسپرم را نشان داد. همچنین، رنگ‌آمیزی میتوکندری اسپرم یک بیمار ناقل جهش p.Glu812Lys به‌هم‌خوردگی ساختار قطعه میانی اسپرم را نشان داد که با میکروسکوپ الکترونی نیز تأیید شد [۴۹،۴۸].

و برای بالا رفتن pH داخل سلول و سطح cAMP ضروری است [۴۶]. مطالعات جدید نشان داده‌اند که پروتئین SLC26A8 در داخل سلول اسپرم در کنار CFTR قرار می‌گیرد و در هر دو شرایط درون‌تنی و برون‌تنی (*in vitro*) با آن بر هم کنش فیزیکی برقرار می‌کند [۴۷]. برای ارزیابی نقش جهش‌های ژن *SLC26A8* در تحرک اسپرم، این ژن در ۱۴۶ مرد نابارور آستروزوسپرمیک توالی‌یابی شد و سه جهش هتروزیگوت تغییر معنی (*missense*) که روی بر هم کنش SLC26A8 و CFTR اثرگذار هستند، شناسایی شدند. این جهش‌ها که در ناحیه داخل سیتوپلاسمی پروتئین رخ



شکل شماره ۲- مسیرهای مهم دخیل در تنظیم حرکت اسپرم پستانداران. مسیرهای cAMP/PKA و کلسیم در تصویر مشخص شده‌اند. آنزیم آدنیلیل سیکلاز محلول (sAC) از دو طریق کلسیم و یون بیکربنات فعال شده و ATP را به cAMP تبدیل می‌کند. cAMP برای فعالیت PKA ضروری است و منجر به ایجاد زنش تاژک می‌شود. از سوی دیگر غلظت بالای کلسیم از طریق گیرنده آن کالمودولین (CaM) و آنزیم فسفاتاز کلسینورین باعث مهار حرکت و بازگشت جفت میکروتوبول‌های آکسونوم به حالت اولیه و صاف شدن تاژک می‌شود.

واسطه توالی‌یابی اگزوم (whole exome sequencing or WES) به‌صورت هموزیگوت در هر دو فرد مبتلا شناسایی شد. بررسی با immunostaining و وسترن بلات نشان داد که این جهش احتمالاً باعث کاهش پایداری ساختار جفت میکروتوبول مرکزی و تأثیر منفی بر عملکرد آن می‌شود [۵۵].

ژن *ADCY10*

این ژن آنزیم آدنیلیل سیکلاز محلول را تولید می‌کند که تنها آنزیم آدنیلیل سیکلاز محلول در سیتوپلاسم است. سایر اعضای این خانواده (ADCY1-9) ساختار ترانس‌ممبران دارند. این آنزیم cAMP موردنیاز آنزیم PKA را در اسپرم بالغ فراهم می‌کند که عملکرد صحیح آن در تنظیم حرکت اسپرم ضروری است (شکل شماره ۲). در مطالعه توالی‌یابی اگزوم در یک خانواده ایرانی با میزان خویشاوندی بالا، یک جهش تغییر قاب در این ژن شناسایی شد که منجر به برهم‌خوردگی ساختار دامنه کاتالیتیک

ژن *SPAG17*

این ژن در بیضه موش و انسان بیان می‌شود و پروتئین محصول آن در جفت مرکزی میکروتوبول‌های آکسونوم در ساختار ۹+۲ قرار می‌گیرد [۵۰]. این پروتئین با SPAG6 بر هم کنش دارد و پیش‌تر گزارش شده‌است که موش‌های دارای نقص عملکردی *spag6* به‌دلیل تحرک ضعیف اسپرم دچار ناباروری هستند [۵۱]. همچنین، در موش‌های دارای جهش‌یافته، پروتئین *spag17* وجود ندارد [۵۲،۵۰]. این پروتئین در یوکاریوت‌ها بسیار محافظت شده‌است، به نحوی که همولوگ آن، PF6، در *Chlamydomonas* برای زنش تاژک از اهمیت بالایی برخوردار است [۵۳]. علاوه بر این، مدل موشی فروریخته ژن *spag17* عدم وجود جفت میکروتوبول مرکزی در ساختار مژک را نشان داد [۵۴]. در یک مطالعه در خانواده‌ای دارای دو فرزند دوقلوی مبتلا به آستروزوسپرمی شدید، جهش c.G4343A; p.R1448Q به

Chlamydomonas شناسایی شد [۵۵]. ساختار تاژک و مژک در روند تکامل به طور قابل ملاحظه‌ای حفاظت شده‌است و به همین دلیل مطالعاتی که بر اساس روش ژن کاندید بر اساس داده‌های مطالعات روی Chlamydomonas انجام شده است موفق به شناسایی جهش‌های ژنتیکی متعددی بیمارمان مبتلا به PCD شده‌است. همچنین مدل‌های موش و سگ فروریخته برای ژن‌های مسؤول ایجاد ساختارهای آکسونم نیز با موفقیت ساخته شده‌اند [۵۶]. تا به حال جهش در ۲۸ ژن به عنوان عامل PCD گزارش شده‌است و به این ترتیب عامل ایجاد بیماری در حدود ۷۰ درصد موارد قابل تشخیص است [۵۷،۷]. در بسیاری از موارد این بیماری با آستروزوسپرمی همراه است اما متأسفانه این بخش از بیماری در برخی از مطالعات نادیده گرفته شده است یا فنوتیپ با جزئیات تشریح نشده است. آستروزوسپرمی سندرومیک در این حالت معمولاً با اسپرم بدون تحرک به دلیل نقص ساختاری دم اسپرم بر اثر حذف بازوهای داینین، جابه‌جایی غیر طبیعی میکروتوبول‌ها، بهم‌ریختگی ساختار 9+2 آکسونم و یا عدم تشکیل میله‌های شعاعی (radial spokes) ایجاد می‌شود. در جدول شماره ۱ ژن‌های مرتبط به PCD که در رابطه با آن‌ها آستروزوسپرمی نیز در بیمارمان گزارش شده است، فهرست شده‌اند.

آنزیم و ایجاد یک کدون توقف زودرس می‌شود. هر دو فرد آستروزوسپرمیک خانواده برای این جهش هموزیگوت بودند و پیش‌بینی شد که عدم فعالیت آنزیم SAC و کمبود cAMP عامل ایجاد فنوتیپ باشد. در ادامه نمونه اسپرم از این دو فرد گرفته و با آنالوگ cAMP تیمار شد که منجر به بازگشت توانایی حرکت اسپرم شد [۵۶].

آستروزوسپرمی سندرومیک

آستروزوسپرمی می‌تواند به عنوان یک عارضه جانبی از (Primary Ciliary Dyskinesia or PCD) نیز بروز کند. این اختلال بر اثر نقص در زنش تاژک و مژک ایجاد می‌شود و می‌تواند در عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن انسان تأثیرگذار باشد [۵۱، ۵۰]. PCD عموماً به صورت عفونت‌های مزمن مجاری تنفسی با میزان شدت مختلف از سینوزیت تا برونشکتازی و ناباروری به دلیل عدم تحرک یا تحرک ضعیف اسپرم در مردها بروز می‌کند [۵۲]. در زنان نیز با شیوع کمتر، با عدم زنش مژک‌های سلول‌های اپیتلیوم لوله‌های فالوپ کاهش توانایی باروری ایجاد می‌شود [۵۳]. نرخ بروز، یک در هر ۱۵۰۰۰ تولد تخمین زده می‌شود. البته ممکن است به دلیل دشواری تشخیص در نوزادی، این نرخ از میزان واقعی کمتر باشد [۵۴]. اولین ژن معرفی شده در ارتباط با PCD ژن DNAI1 بود که طی مطالعه ساختار تاژک در

جدول شماره ۱- ژن‌های شناسایی شده در رابطه با PCD که آستروزوسپرمی نیز برای آن‌ها گزارش شده است. جایگاه محصول هر ژن در ساختار آکسونم و نوع آسیب ایجاد شده در جدول قابل مشاهده است.

| ژن | جایگاه در ساختار آکسونم | نوع آسیب ایجاد شده | منبع |
|---------------|---|---|------|
| <i>DNAI1</i> | بازوی خارجی داینین (ODA) | کوتاه یا حذف شدن بازوهای خارجی داینین | [۵۸] |
| <i>DNAH5</i> | ODA | ناهنجاری در ساختار ODA | [۵۹] |
| <i>DNAAF2</i> | سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازوهای دانتین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) | [۶۰] |
| <i>CCDC39</i> | سر هم‌بندی IDA و میله‌های شعاعی | حذف IDA، ناهنجاری ساختاری جفت میکروتوبول‌های محیطی، جای‌گیری اشتباه یا حذف جفت میکروتوبول مرکزی | [۶۱] |
| <i>DYX1C1</i> | سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازوهای دانتین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) | [۶۲] |
| <i>LRRC6</i> | سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازوهای دانتین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) | [۶۳] |
| ژن | جایگاه در ساختار آکسونم | نوع آسیب ایجاد شده | منبع |
| <i>DNAI1</i> | بازوی خارجی داینین (ODA) | کوتاه یا حذف شدن بازوهای خارجی داینین | [۵۸] |
| <i>DNAH5</i> | ODA | ناهنجاری در ساختار ODA | [۵۹] |
| <i>DNAAF2</i> | سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازوهای دانتین | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین | [۶۰] |

| | در سیتوپلاسم | (IDA) |
|--------|--|--|
| CCDC39 | سر همبندی IDA و میله‌های شعاعی | حذف IDA، ناهنجاری ساختاری جفت میکروتوبول‌های محیطی، جای‌گیری اشتباه [۶۱] یا حذف جفت میکروتوبول مرکزی |
| DYX1C1 | سر همبندی کمپلکس‌های بازوهای داینین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) [۶۲] |
| LRRC6 | سر همبندی کمپلکس‌های بازوهای داینین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) [۶۳] |
| ژن | جایگاه در ساختار آکسونم | نوع آسیب ایجاد شده منبع |
| DNAI1 | بازوی خارجی داینین (ODA) | کوتاه یا حذف شدن بازوهای خارجی داینین [۵۸] |
| DNAH5 | ODA | ناهنجاری در ساختار ODA [۵۹] |
| DNAAF2 | سر همبندی کمپلکس‌های بازوهای داینین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) [۶۰] |
| CCDC39 | سر همبندی IDA و میله‌های شعاعی | حذف IDA، ناهنجاری ساختاری جفت میکروتوبول‌های محیطی، جای‌گیری اشتباه [۶۱] یا حذف جفت میکروتوبول مرکزی |
| DYX1C1 | سر همبندی کمپلکس‌های بازوهای داینین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) [۶۲] |
| LRRC6 | سر همبندی کمپلکس‌های بازوهای داینین در سیتوپلاسم | حذف بازوهای خارجی و داخلی داینین (IDA) [۶۳] |

لازم در نظر گرفته شده است.

(۲) در صورتی که مطالعه بر مبنای فرکانس یک آلل موتانت در جمعیت است، افراد هر دو گروه بایستی حتی در نسل‌های گذشته نیز بومی همان منطقه بوده باشند که در بسیاری از این مطالعات این مورد رعایت نشده است.

(۳) تعداد نمونه اندک در این مطالعات در بسیاری موارد منجر به گزارش نتایج مثبت و منفی کاذب شده است. مثلاً گزارشات متعددی وجود دارد که ارتباط یک پلی‌مورفیسم خاص ژن با یک بیماری در یک جمعیت گزارش شده است؛ اما بررسی همان پلی‌مورفیسم در جمعیت دیگر به نتایج معنی‌دار منجر نشده است و به این ترتیب نتایج گزارش شده فاقد تکرارپذیری هستند.

(۴) در واقع در تعدادی از این مطالعات که ارتباط یک پلی‌مورفیسم با یک بیماری تأیید شده است، در بهترین حالت یک عامل خطر (risk factor) گزارش شده نه عامل ایجاد بیماری.

(۵) در اکثریت این مطالعات تأیید عملکردی نتایج در آزمایشگاه صورت نگرفته است. به عبارتی مطالعات follow-up خاصی روی نتایج انجام نشده است.

(۶) معمولاً تمرکز مطالعه روی یک وارسته خاص بوده و به سایر وارسته‌های احتمالی همان ژن مورد مطالعه توجه نشده است. البته در صورتی که ژن مورد مطالعه طول زیادی داشته باشد، توالی‌یابی تمام نواحی آن و یا حتی توالی‌یابی نواحی اگزون با استفاده از

طبق بررسی‌ها حدود ۲۳۰۰ ژن در پروسه اسپریماتوژنز دخالت دارند که تا سال ۲۰۱۴ تنها ۱۳۹ ژن از این تعداد با مطالعات مبتنی بر ژن کاندید مورد بررسی قرار گرفتند. این نوع مطالعات عموماً مبتنی بر توالی‌یابی سنگر بودند و روش کار در آن‌ها معمولاً شامل تعیین یک ژن دخیل در ناباروری بر اساس مطالعات gene knockout در مدل‌های جانوری و شناسایی همولوگ انسانی آن، بررسی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism or SNP) این ژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction or PCR) در قالب مطالعات مورد-شاهد (case-control)، توالی‌یابی محصولات PCR با توالی‌یابی سنگر بود و مقایسه نتایج دو گروه بود [۶۴]. این نوع مطالعات به دلیل هزینه کم، رایج‌ترین روش مطالعه اختلالات منجر به ناباروری بودند اما در واقع، هرچند که هزینه هرکدام از این مطالعات به‌تنهایی زیاد نیست، با توجه به تعداد مطالعات انجام‌شده به این روش، هزینه زیادی در مجموع صرف شده ولی موفقیت اندکی در تعیین ژن‌ها و جهش‌های جدید حاصل شده است. از جمله نقاط ضعف این نوع مطالعات که منجر به موفقیت اندک آن‌ها شده است، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: (۱) در بسیاری از این مطالعات، دقت لازم در انتخاب گروه‌های مورد و شاهد به عمل نمی‌آید. مثلاً در رابطه با ورود افراد به گروه کنترل، صرف دارا بودن فرزند از طریق بارداری طبیعی تنها شرط

شکل‌گیری آکروزوم در ادبیات بررسی شد. ژن SPATA16 به این ترتیب به دلیل نقش در ایجاد آکروزوم طی فرآیند اسپرمیوژنز و بیان بالا در اسپرماتید و اسپرماتوسیت‌های موشی به‌عنوان ژن کاندید انتخاب و در افراد نابارور توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که افراد نابارور دارای یک جهش تغییر معنی در آخرین نوکلئوتید اگزون شماره ۴ این ژن هستند (c.848G>A, p.R283Q). این جهش در دامنه بسیار حفاظت‌شده TRP اتفاق می‌افتد که برای برهم کنش پروتئین SPATA16 با سایر پروتئین‌های دخیل در تولید آکروزوم بسیار مهم است. همچنین این جهش عدم شناسایی این جایگاه توسط کمپلکس اسپلاسیوزوم و اسپلاسینگ نامتعارف در mRNA نابالغ را به دنبال دارد. والدین برای این جهش هتروزیگوت بودند و دیگر برادر این سه فرد که بارور است، هموزیگوت برای آلل طبیعی گزارش شد [۷۱]. مطالعه دیگری با استفاده از آرایه SNP با ۱۰ هزار کاوشگر روی یک خانواده با پدر و مادر خویشاوند و پنج فرزند مبتلا به گلوبوزوسپرمی انجام شد. نمونه DNA چهار نفر از افراد مبتلا با آرایه SNP مورد بررسی قرار گرفت و ناحیه مشترکی در کروموزم ۱۲ به طول ۴/۶ مگا جفت از طریق دارا بودن ۳۰ عدد SNP با ژنوتیپ هموزیگوت در هر چهار نفر به‌عنوان ROH شناسایی شد. این ناحیه شامل ۱۰۱ ژن است که ۴۰ ژن از آن‌ها در بیضه‌ها بیان می‌شوند. ژن DPY19L2 به دلیل بیان غالب در بیضه و نقش در قطب‌سازی (polarization) اسپرم به‌عنوان کاندید انتخاب شد. پیش‌تر مطالعه روی اورتولوگ این ژن (DPY-19) در *C. Elegans* فعالیت آن را در قطبیت سلول‌های نوروبلاست نشان داده بود. نتایج PCR روی افراد مبتلا نشان داد که یک حذف ۲۰۰ کیلو جفت بازی منجر به حذف کامل ژن DPY19L2 شده است و مکانیسم این حذف گسترده نوترکیبی همولوگ غیرآلی (Nonallelic Homologous Recombination or NAHR) (Low Copy Repeat or LCR) پیشنهاد شد. همچنین این ناحیه در ۲۱ فرد دیگر مبتلا به گلوبوزوسپرمی بررسی شد که ۴ نفر از آن‌ها همین حذف را نشان دادند [۷۲]. در همان سال در مطالعه دیگری روی ۲۰ فرد گلوبوزوسپرمیک، حذف کامل ژن DPY19L2 در ۱۵ نفر تأیید شد [۷۳]. ماکروزوسپرمی نوعی از تراتوزوسپرمی است که در آن اسپرم‌ها سر بسیار بزرگ و بیش از یک دم دارند و پلی‌پلوئید (polyploid) هستند. میزان تحرک اسپرم نیز در این فنوتیپ معمولاً پایین است. در مطالعه‌ای روی ده فرد مبتلا به ماکروزوسپرمی یک جهش تغییر قاب در ژن AURKC شناسایی شد. در این مطالعه ابتدا چهار نفر از این افراد که همگی فرزندان والدین

توالی‌یابی سنگر با هزینه زیادی همراه می‌شد و در بسیاری موارد عامل هزینه، باعث عدم پیشرفت مطالعه شده است [۶۶،۶۵]. مطالعات ارتباطی سراسر ژنوم (Genome-Wide Association Study) پس از معرفی تکنولوژی آرایه‌های پلی‌مورفیسم‌های تک-نوکلئوتیدی (SNP array) در سال ۱۹۹۸ توجه محققان زیادی برای شناسایی عوامل بیماری‌های وراثتی به این روش جلب شد [۶۷]. اصول این تکنیک مشابه با میکرو آرایه‌های DNA (DNA microarray) است، بدین‌نحو که کاوشگر (probe) های مکمل نواحی حاوی SNP های خاص روی یک سطح شفاف فیکس شده‌اند. مولکول DNA پس از خرد و تک‌رشته شدن در تماس با کاوشگرها قرار می‌گیرد و کاوشگرها با نواحی مکمل خود در DNA هیبرید تشکیل می‌دهند. هر کاوشگر به یک ترکیب رنگی فلورسانت اتصال دارد که پس از تشکیل هیبرید این ترکیب فعال شده و سیگنال ساطع‌شده توسط یک سیستم تشخیص سیگنال دریافت و ثبت می‌شود. تعیین ژنوتیپ نمونه در ناحیه SNP توسط نرم‌افزارهای مختص به شرکت تولیدکننده آرایه انجام می‌شود [۶۸]. اولین آرایه ارائه‌شده به‌صورت تجاری حاوی ۱۴۹۴ SNP بود، اما امروزه جدیدترین آرایه‌ها حاوی حدود ۵/۲ میلیون کاوشگر هستند. طبق گزارش کنسرسیون پروژه هزار ژنوم، به‌طور متوسط در ژنوم هر انسان ۴/۱-۵ میلیون عدم تطابق با ژنوم مرجع وجود دارد که بیش از ۹/۹۹ درصد از آن‌ها SNP ها و حذف-شدگی و درج‌شدگی‌های کوچک هستند [۶۹]. بر این اساس، مطالعات زیادی برای شناسایی ارتباط SNP ها با فنوتیپ‌های مختلف منجر به ناباروری از جمله آروسپرمی، اولیگوسپرمی و گلوبوزوسپرمی بر اساس استراتژی مورد-شاهد انجام شد [۷۰]. بیشترین موفقیت نتایج کاربرد آرایه SNP در مطالعات ژنتیک ناباروری مربوط به گلوبوزوسپرمی (globozoospermia) و ماکروزوسپرمی (macrozoospermia) است. مطالعه گلوبوزوسپرمی در دو خانواده دارای چند فرزند مبتلا به این فنوتیپ به عمل آمد. گلوبوزوسپرمی یکی از شدیدترین و نادرترین حالت‌های تراتوزوسپرمی بوده که در آن به دلیل عدم تشکیل آکروزوم، اسپرم‌ها قابلیت بارور کردن تخمک را ندارند و سر آن‌ها به‌دلیل نداشتن آکروزوم به شکل کروی در می‌آید. یکی از این مطالعات روی یک خانواده با پدر و مادر خویشاوند و سه فرزند مذکر مبتلا به گلوبوزواسپرمی انجام شد. در این مطالعه، با استفاده از آرایه SNP با ۱۰ هزار کاوشگر، ابتدا نواحی (Run Of Homozygosity or ROH) مشترک در سه فرد مبتلا شناسایی شدند و سپس ارتباط عملکردی ژن‌های واقع در این نواحی با

مبتلا انجام شده است، این نواحی ROH اولیه از نواحی متنج از مطالعات مورد- شاهد غیر خویشاوند کوچک تر هستند. در این حالت می توان با به کار بردن نشان‌گرهای بیشتر که داخل ناحیه ROH اولیه قرار دارند، ناحیه هموزیگوت مشترک را به طور دقیق- تری تعیین کرد. از سوی دیگر، در این نوع مطالعات که موفقیت- آمیز بوده‌اند معمولاً در ناحیه هموزیگوت نهایی ژن‌هایی شناسایی شده‌اند که از طریق مرور ادبیات و یا شواهد عملکردی به دست آمده از طریق مطالعه ژن‌های اورتولوگ آن‌ها در جانداران مدل مدرکی دال بر ارتباط آن‌ها با فنوتیپ مورد تحقیق یافت شده است [۷۷].

اهمیت توالی‌یابی اگزوم در مطالعات جدید

این روش رایج‌ترین روش توالی‌یابی DNA بر اساس NGS به شمار می‌رود. آخرین ویرایش ژنوم انسان، GRCH38، که توسط Genome Reference Consortium ارائه شده است، شامل ۲۰۳۰۰ ژن است و اگزوم به معنی تمام نواحی اگزوم این ژن‌هاست. در این روش این نواحی که حدود ۲ درصد از کل ژنوم را تشکیل می‌دهند، توالی‌یابی می‌شوند. اگرچه این نواحی حجم بسیار کمی از ژنوم را تشکیل می‌دهند، اما از آنجا که ۸۵ درصد تغییرات ژنتیکی بیماری‌زا در این نواحی قرار دارند، بررسی آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است [۷۹، ۷۸]. WES رایج‌ترین روش مورد استفاده در مطالعات ژنتیک جمعیت، ژنتیک بیماری‌ها و ژنتیک سرطان است. از جمله مشکلاتی که در روش هول اگزوم و هول ژنوم وجود دارد، برخورد با تعداد زیادی از تغییرات ژنتیکی است که شواهد کافی بر بیماری‌زا بودن یا نبودن آن‌ها وجود ندارد و طبق دستورالعمل (American College of Medical Genetics and Genomics or ACMG) اصطلاحاً (Variants of Unknown Significance or VUS) نامیده می‌شوند. البته به مرور زمان و با وجود مطالعات ژنتیکی گسترده‌ای که در سراسر جهان در حال انجام است، تعداد این واریته‌ها کم و کمتر خواهد شد. نتایج اولین کاربرد موفق توالی‌یابی اگزوم در شناسایی عامل ژنتیکی بیماری‌های وراثتی انسان در سال ۲۰۰۹ به چاپ رسید [۸۰]. طی سال‌های اخیر این مطالعات در حوزه ژنتیک ناباروری نیز موفقیتی قابل توجه کسب کرده‌اند. از جمله پیشرفت‌های حاصل‌شده، حل‌شدن مشکل توالی‌یابی نواحی ROH است که از طریق آنالیز پیوستگی (Linkage Analysis) در مطالعات GWAS به دست می‌آیند. امروزه می‌توان این نواحی را به طور کامل از طریق توالی‌یابی هدفمند (targeted sequencing) و یا نواحی اگزومی ژن‌های واقع در این ناحیه را از طریق توالی‌یابی اگزوم توالی‌یابی کرد. به طور مثال در یک مطالعه GWAS روی

خویشاوند بودند و نسل‌های قبلیشان اهل یک منطقه در آفریقای شمالی بودند، جهت یافتن نواحی ROH برای نشان‌گرهای ماکرو ستلایت در سراسر ژنوم بررسی شدند. از آنجا که قدرت تفکیک- پذیری کیت مورد استفاده چندان زیاد نبود و قابلیت بررسی به ازای هر ۱۰ cM را داشت ۶ ناحیه ROH شناسایی شد که در بررسی‌های بعدی با مارکرهای بیشتر به یک ناحیه در بازوی بلند کروموزم ۱۹ کاهش یافت. در مرحله بعدی این ناحیه در شش فرد ماکروزوسپرمیک دیگر نیز بررسی شد که آن‌ها نیز برای همین ناحیه هموزیگوت بودند. ژن AURKC با سطح بیان بالا در بیضه و نقش در میوز، میتوز و سیتوکینز در این ناحیه قرار دارد. کل ناحیه کدکننده این ژن در این افراد توالی‌یابی شد و افراد مبتلا دارای یک حذف سیتوزین در اگزوم سوم ژن AURKC بودند (c.144delC). این حذف یک جهش تغییر قاب بوده، منجر به ایجاد یک کدون توقف زودرس می‌شود (p.Leu49TrpfsTer22). این جهش در دومین کاتالیتیک پروتئین اتفاق می‌افتد. بررسی‌های عملکردی نشان داد که پروتئین تولیدشده قابلیت کاتالیتیک خود را از دست داده است. همچنین بررسی این جهش روی مدل موشی نشان داد که ۹۲ درصد از اسپرم‌های بررسی‌شده دارای هر دو کروموزوم X و Y بودند که نشان از نقص در تقسیم میوز I در پروسه اسپرماتوزن دارد [۷۴]. در رابطه با PCD که در آن برخی افراد آستروزوسپرمی را به- صورت بخشی از سندروم بروز می‌دهند نیز مطالعات GWAS انجام شده است. در مطالعه‌ای که روی ۳۱ خانواده شامل ۱۶۹ نفر که ۷۰ نفر آن‌ها مبتلا به PCD بودند GWAS با استفاده از ۱۸۸ نشان‌گر پلی‌مورفیک انجام شد. این مطالعه در نهایت PCD را به شدت هتروژن و چند لوکوس وسیع را در کروموزوم‌های متعدد به‌عنوان نقاط جالب توجه معرفی کرد اما ژن یا واریته خاصی را در مجموع این ۳۱ خانواده شناسایی نکرد [۷۵]. در مطالعه دیگری نیز که روی ۷۰ خانواده دارای فرد مبتلا به PCD با ۴۶۲ نشان‌گر میکروستلایت (۳۲-۱۱ نشان‌گر در هر کروموزوم) انجام شد. در نهایت ناحیه‌ای به طول ۵/۳ cM در بازوی بلند کروموزوم ۱۵ به- عنوان جایگاه احتمالی جهش عامل بیماری معرفی شد [۷۶]. به‌نظر می‌رسد دلیل موفق نبودن این مطالعات استفاده از نشان‌گرهایی با فاصله زیاد است که به دلیل قدرت تفکیک پایین منجر به شناسایی ROH وسیعی در حد فاصل دو نشان‌گر می‌شوند و به این ترتیب تعیین محل دقیق ناحیه هموزیگوت مشترک را که جهش ایجادکننده بیماری در آن قرار دارد، با استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR و توالی‌یابی سنگر با مشکل مواجه می‌کند. در مواردی که مطالعه روی خانواده‌ای با والدین خویشاوند و چندین فرزند

GTF2H3 زیر واحد p34 فاکتور رونویسی TFIIF را تولید می‌کند و جهش مذکور که در ناحیه‌ای با حفاظت‌شدگی تکاملی بالا اتفاق می‌افتد منجر به نقص عملکردی در زیر واحد p34 می‌شود. فاکتور TFIIF از طریق این زیر واحد منجر به فعال‌سازی گیرنده آلفای ریتینوئیک اسید Retinoic Acid Receptor alpha می‌شود و مطالعات حیوانات مدل نشان داده است که نقص عملکرد RAR alpha منجر به ناباروری می‌شود [۸۶].

نتیجه‌گیری

طی دهه اخیر، با ورود تکنولوژی NGS به تحقیقات ژنتیک بیماری‌های وراثتی، انقلابی در این زمینه به وقوع پیوسته و تعداد ژن‌های معرفی‌شده در پایگاه‌های داده معتبر همچون OMIM و HGMD در ارتباط با بیماری‌های وراثتی به طرز بی‌سابقه‌ای رو به افزایش است. در انواع شدیدتر فنوتیپ‌های منجر به ناباروری مردها همچون azoospermia و oligozoospermia نیز ژن‌های متعددی به‌خصوص با استفاده از مطالعات مبتنی بر توالی‌یابی اگزوم معرفی شده‌اند. این پیشرفت در مورد فنوتیپ‌های با شدت کمتر مثل asthenozoospermia و teratozoospermia کمتر اتفاق افتاده، به نحوی که از حدود ۲۳۰۰ ژنی که پیش‌بینی می‌شود در اسپرماتوژنز نقش مهمی داشته باشند، تنها تعداد معدودی در رابطه با آستنوزوسپرمی شناسایی شده‌اند. اگرچه جهش‌های بیماری‌زا در تعداد ژن‌های بیشتری در ارتباط با آستنوزوسپرمی سندرومیک معرفی شده‌اند اما در ارتباط با آستنوزوسپرمی غیر سندرومیک جهش‌های بیماری‌زا تنها در تعداد انگشت‌شماری از ژن‌ها معرفی شده‌اند. معمولاً بیشتر جهش‌های مرتبط با asthenozoospermia و teratozoospermia از الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب پیروی می‌کنند. جهش‌های منجر به oligozoospermia و azoospermia نیز در صورتی که در ژن‌های واقع در کروموزوم X ایجاد نشده باشند، عموماً الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب دارند. بدین ترتیب پیشنهاد می‌شود در کشور ما که همچون سایر کشورهای خاورمیانه ازدواج خویشاوندی با نرخ بالایی اتفاق می‌افتد، مطالعات خانوادگی در مقیاس وسیع صورت بگیرد تا بتوان این جهش‌های مغلوب را در خانواده‌های دارای چند فرزند مبتلا که والدین خویشاوند دارند، با نرخ موفقیت مناسبی شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم مهشاد مقاره عابد برای مساعدت در طراحی شکل‌ها کمال تشکر را داریم. این مطالعه تحت حمایت

نارسای زودرس تخمدان (Premature Ovarian Insufficiency or POI) دو ناحیه ROH واقع در 7p21.1-15.3 و 7q21.3-22.2 در افراد مبتلا شناسایی شد. از ۱۷۷ ژن موجود در این ناحیه، سه ژن DLX5، DLX6 و DSS1 با مرور ادبیات به‌عنوان ژن کاندید انتخاب شد و نواحی اگزونی و تنظیمی آن‌ها با روش سنگر مورد توالی‌یابی قرار گرفت. اما وارثه بیماری زایی در این سه ژن شناسایی نشد [۸۱]. دو سال بعد همین گروه این ناحیه را با توالی‌یابی اگزوم مورد توالی‌یابی قرار دادند و این بار یک حذف تک‌نوکلئوتیدی را به صورت هموزیگوت در افراد نابارور این شجره شناسایی کردند که منجر به یک جهش تغییر قاب در ژن STAG3 واقع در 7q22.1 می‌شود (c.968delC, p.F187Fs*7). این ژن یکی از زیرواحدهای پروتئین حلقه cohesion را کد می‌کند که اختصاصی میوز بوده، در اتصال صحیح کروماتیدهای خواهری نقش دارد. موش‌های مدل مؤنث فروریخته برای ژن *stag3* نابارور هستند و اووسیت‌های جنینی آن‌ها در مرحله پروفاز میوز I متوقف شده، پس از هفته اول دچار آپوپتوز می‌شوند [۸۲]. به‌طور کلی احتمال به نتیجه رسیدن مطالعات مبتنی بر توالی‌یابی اگزوم در کلینیک و بدون در نظر گرفتن موارد خانوادگی ۲۵ درصد پیش‌بینی شده‌است [۸۳]. درحالی‌که در صورت وجود شجره بیماری و مبتلا بودن بیشتر از یک فرد در خانواده احتمال موفقیت به ۶۰ درصد افزایش می‌یابد [۸۴]. البته باید دقت شود که این روش بر این ایده استوار است که دقت لازم در بررسی بالینی بیماران به عمل آمده، اطلاعات دقیق و قابل اعتماد فراهم و فنوتیپ بیماران به دقت تعیین شده‌است. همچنین بیماری مورد مطالعه نفوذ کاهش یافته (reduced penetrance) ندارد، فنوکپی (phenocopy) در آن وجود ندارد و ناهمگونی لوکوس (locus heterogeneity) در بیماری‌زایی آن رایج نیست. در غیر این صورت، به دلیل تفاوت جهش ژنتیکی عامل بیماری در بیماران ممکن است در فرآیند فیلتر کردن داده این جهش شناسایی نشده و یا به اشتباه به‌عنوان جهش غیر بیماری‌زا نادیده گرفته شود [۸۵]. در کشورهای خاورمیانه که ازدواج خویشاوندی از نظر فرهنگی مرسوم بوده، نسبت به جوامع دیگر فراوان‌تر هستند، مطالعات خانوادگی توانسته‌اند موفقیت قابل توجهی در حوزه ژنتیک ناباروری کسب کنند. به‌طور مثال در مطالعه‌ای در یک خانواده خویشاوند دارای ۴ فرزند مبتلا به آزوسپرمی و اولیگوزوسپرمی، یک جهش تغییر معنی در ژن GTF2H3 شناسایی شد (c.124144111T>C, p.Ser222Pro). افراد هموزیگوت برای این جهش مبتلا به آزوسپرمی و افراد هتروزیگوت مبتلا به اولیگوزوسپرمی بودند. ژن

پژوهشگاه رویان انجام شد و نویسندگان مراتب قدردانی خود را از آن پژوهشگاه محترم ابراز می‌دارند.

References:

- [1] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril* 2009; 92(5): 1520–4.
- [2] World Health Organization. Examination and processing of human semen. Geneva (Switzerland): WHO press; 2010
- [3] Nieschlag E, Behre H, Nieschlag S. Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction- Google Books. 3rd ed. New York City: Springer; 2010.
- [4] Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13(1): 37.
- [5] Jung JH, Seo JT. Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea? *Clin Exp Reprod Med* 2014; 41(3): 108–14.
- [6] Curi SM1, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, et al. Asthenozoospermia: Analysis of a large population. *Arch Androl* 2003; 49(5): 343–9.
- [7] Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: Spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update* 2015; 21 (4): 455–85.
- [8] Cao W, Gerton GL, Moss SB. Proteomic Profiling of Accessory Structures from the Mouse Sperm Flagellum. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5(5): 801–10.
- [9] Burmester S, Hoyer-Fender S. Transcription and translation of the outer dense fiber gene (Odf1) during spermiogenesis in the rat. A study by in situ analyses and polysome fractionation. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(1): 10–20.
- [10] Zarsky HA, Tarnasky HA, Cheng M, van der Hoorn FA. Novel RING finger protein OIP1 binds to conserved amino acid repeats in sperm tail protein ODF1. *Biol Reprod* 2003; 68 (2):543–52.
- [11] Fawcett DW. The anatomy of the spermatozoon after 300 years. *Kaibogaku Zasshi* 1975; 50(6): 326–7.
- [12] Baccetti B, Collodel G, Estenoz M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod* 2005; 20(10): 2790–4.
- [13] Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2003; 61(1): 103–15.
- [14] Miki K1, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(47): 16501–6.
- [15] Suárez SS, Osman RA. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod* 1987; 36(5): 1191–8.
- [16] GaddumRosse P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am J Anat* 1981; 160(3): 333–41.
- [17] Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: Function and regulation. *Reproduction* 2001; 122(4): 519–26.
- [18] Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 2013; 140(22): 4471 LP – 4479.
- [19] Milisav I. Dynein and dynein-related genes. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998; 39(4): 261–72.
- [20] Wargo MJ, Smith EF. Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in Chlamydomonas flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(1): 137–42.
- [21] San Agustin JT, Witman GB. Role of cAMP in the reactivation of demembrated ram spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; 27 (3): 206–18.
- [22] Skålhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS, Burton KA. Mutation of the Ca Subunit of PKA Leads to Growth Retardation and Sperm Dysfunction. *Mol Endocrinol* 2002; 16 (3): 630–9.
- [23] Tash JS, Bracho GE. Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251 (2):557–63.
- [24] Scott JD, Dell'Acqua ML, Fraser IDC, Tavalin SJ, Lester LB. Coordination of cAMP Signaling Events through PKA Anchoring. *Adv Pharmacol* 1999; 47(C): 175–207.
- [25] Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 2002; 250 (1): 208–17.
- [26] Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, et al. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 2005; 9(2): 249–59.
- [27] Ho HC, Suarez SS. Characterization of the Intracellular Calcium Store at the Base of the Sperm Flagellum That Regulates Hyperactivated Motility1. *Biol Reprod* 2003; 68(5): 1590–6.
- [28] Turner RM. Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(1–2): 25–38.
- [29] Kuo YC, Shen YR, Chen HI, Lin YH, Wang

- YY, Chen YR, et al. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *J Cell Sci* 2015; 128(5): 923–34.
- [30] Kissel H, Georgescu MM, Larisch S, Manova K, Hunnicutt GR, Steller H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev Cell* 2005; 8(3): 353–64.
- [31] Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, et al. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell* 2005; 8(3): 343–52.
- [32] Kuo YC, Lin YH, Chen HI, Wang YY, Chiou YW, Lin HH, et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum Mutat* 2012; 33 (4): 710–9.
- [33] Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, et al. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 2010; 18 (11): 1178–84.
- [34] Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online* 2015; 30(1): 28–38.
- [35] Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413 (6856): 603–9.
- [36] Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2011; 2(1): 153.
- [37] Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (4): 1219–23.
- [38] Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K, et al. Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am J Hum Genet* 2009; 84 (4): 505–10.
- [39] Yuzhou Zhang, Mahdi Malekpour, Navid AlMadani, Kimia Kahrizi, Marvam Zanganeh, Marzieh Mohseni, et al. Sensorineural deafness and male infertility: A contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet* 2007; 44 (4): 233–40.
- [40] Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattan D, Pariente A, Thulliez M, et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(7): 497–502.
- [41] Schultz R, Tyllis N. Prioritizing health-care delivery in the Solomon Islands: First things first. *Emerg Med Australas* 2005; 17(5–6): 526.
- [42] Amiri-Yekta A, Coutton C, Kherraf ZE, Karaouzen T, Le Tanno P, Sanati MH, et al. Whole-exome sequencing of familial cases of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) reveals new DNAH1 mutations. *Hum Reprod* 2016; 31(12): 2872–80.
- [43] Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzen T, Rendu J, Bidart M, et al. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 2014; 94 (1): 95–104.
- [44] Neesen J, Kirschner R, Ochs M, Schmiedl A, Habermann B, Mueller C, et al. Disruption of an inner arm dynein heavy chain gene results in asthenozoospermia and reduced ciliary beat frequency. *Hum Mol Genet* 2001; 10 (11): 1117–28.
- [45] Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2004; 447 (5): 710–21.
- [46] Escoffier J, Krapf D, Navarrete F, Darszon A, Visconti PE. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci* 2012; 125(2): 473–85.
- [47] Rode B, Dirami T, Bakouh N, Rizk-Rabin M, Norez C, Lhuillier P, et al. The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: A potential role during sperm capacitation. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (6): 1287–98.
- [48] Touré A, Lhuillier P, Gossen JA, Kuil CW, Lhôte D, Jégou B, et al. The Testis Anion Transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (15): 1783–93.
- [49] Toure A, Rode B, Hunnicutt GR, Escalier D, Gacon G. Septins at the annulus of mammalian sperm. *Biol Chem* 2011; 392 (8-9): 799–803.
- [50] Barker GA, Smith SN, Bromage NR. The bacterial flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L., eggs and its relationship to developmental success. *J Fish Dis* 1989; 12(4): 281–93.
- [51] Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A, et al. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax* 1994; 49 (7): 684–7.
- [52] Ibanez-Tallon I. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12(90001): 27R–35.
- [53] Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update* 2006; 12(4): 363–72.
- [54] Boon M, Jorissen M, Proesmans M, De Boeck K. Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur J Pediatr* 2013; 172(2): 151–62.
- [55] Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux AM, Cacheux V, Roger G, et al. Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to *Chlamydomonas reinhardtii* Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Hum Genet*

- 1999; 65 (6):1508–19.
- [56] Akbari A, Pipitone GB, Anvar Z, Jaafarinia M, Ferrari M, Carrera P. ADCY10 frameshift variant leading to severe recessive asthenozoospermia and segregating with absorptive hypercalciuria. *Hum Reprod* 2019; 34 (6).
- [57] Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, Sears PR, Davis SD, Wolf WE, et al. Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(6): 707–17.
- [58] Guichard C, Harricane MC, Lafitte JJ, Godard P, Zaegel M, Tack V, et al. Axonemal Dynein Intermediate-Chain Gene (DNAI1) Mutations Result in Situs Inversus and Primary Ciliary Dyskinesia (Kartagener Syndrome). *Am J Hum Genet* 2001; 68(4): 1030–5.
- [59] Fliegauf M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, et al. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171 (12): 1343–9.
- [60] Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, Tsukahara T, Loges NT, Hagiwara H, et al. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 2008; 456(7222): 611–6.
- [61] Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A, Legendre M, Amirav I, Bataille G, et al. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat Genet* 2011; 43 (1): 72–8.
- [62] Tarkar A, Loges NT, Slagle CE, Francis R, Dougherty GW, Tamayo JV, et al. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat Genet* 2013; 45 (9): 995–1003.
- [63] Horani A, Ferkol TW, Shoseyov D, Wasserman MG, Oren YS, Kerem B, et al. LRRC6 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Dynein Arm Defects. *PLoS One* 2013; 8(3).
- [64] Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: News from genome-wide association studies. *Andrology* 2014; 2(3): 315–21.
- [65] Pandis N. Case-control studies: Part 2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2014; 146(3):402-3.
- [66] Levin KA. Study design V. Case-control studies. *Evid Based Dent* 2006; 7 (3): 83–4.
- [67] Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280(5366): 1077–82.
- [68] LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 2009.
- [69] 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; 526 (7571): 68–74.
- [70] Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: News from genome-wide association studies. *Andrology* 2014; 2 (3): 315–21.
- [71] Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, et al. Homozygous Mutation in SPATA16 Is Associated with Male Infertility in Human Globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2007; 81 (4): 813–20.
- [72] Kosciński I, Elinati E, Fossard C, Redin C, Muller J, Velez de la Calle J, et al. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2011; 88 (3): 344–50.
- [73] Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 2011; 88(3): 351–61.
- [74] Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007; 39(5): 661–5.
- [75] Blouin JL, Meeks M, Radhakrishna U, Sainsbury A, Gehring C, Saif GD et al. Primary ciliary dyskinesia: A genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 2000; 8(2): 109–18.
- [76] Geremek M, Zietkiewicz E, Diehl SR, Alizadeh BZ, Wijmenga C, Witt M. Linkage analysis localises a Kartagener syndrome gene to a 3.5 cM region on chromosome 15q24-25. *J med genet*, 2006; 43(1).
- [77] Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, et al. Homozygous Mutation in SPATA16 Is Associated with Male Infertility in Human Globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2007; 81 (4): 813–20.
- [78] Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106 (45):19096–101.
- [79] Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2014; 59 (1): 5–15.
- [80] Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 2010; 42 (1):30–5.
- [81] Caburet S, Zavadakova P, Ben-Neriah Z, Bouhali K, Dipietromaria A, Charon C, et al. Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial premature ovarian failure. *PLoS one* 2012; 7 (3).
- [82] Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant Cohesin in

Premature Ovarian Failure. *N Eng J Med* 2014; 370 (10): 943–9.
[83] Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Eng J Med* 2013; 369(16): 1502–11.
[84] Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012; 20
[85] Rehman AU, Santos-Cortez RL, Drummond

MC, Shahzad M, Lee K, Morell RJ, et al. Challenges and solutions for gene identification in the presence of familial locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 1207–15.
[86] Clavijo RI, Arora H, Gibbs E, Cohen S, Griswold A, Bakircioglu E, et al. Whole Exome Sequencing of a Consanguineous Turkish Family Identifies a Mutation in GTF2H3 in Brothers With Spermatogenic Failure. *Urology* 2018; 120: 86–9.