

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, DYC1X1 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.

مروری بر علل ژنتیکی آستنوزوسپرمی

اروند اکبری^۱، زهرا انوار^۲، مجتبی جمفری نیا^۳، مهدی توتوچی^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: آستنوزوسپرمی به عنوان شایع‌ترین اختلال منجر به ناباروری مردها، به صورت کمبود شدید حرکت پیش‌روندۀ اسپرم در هر انزال تعریف می‌شود. این فوتیپ می‌تواند هم به صورت غیرسترنومی و هم به صورت سترنومی وجود داشته باشد که در حالت دوم به عنوان یک عارضه جانبی سترنوم مژک‌های بی‌حرکت بروز می‌کند. در دهه گذشته به واسطه ظهور تکنولوژی‌های جدید توالی‌بایی، ژن‌های متعددی در رابطه با بیماری‌های مختلف شناسایی شده‌اند. در این مقاله مروری به ژن‌هایی که به واسطه مطالعات ژنتیک نقش آن‌ها در آستنوزوسپرمی شناسایی شده است، می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها: با بررسی مقالات مستخرج از PubMed استراتژی‌های مورد استفاده در مطالعات پژوهشی مورد بررسی قرار گرفته و سپس به مرور ژن‌هایی پرداخته می‌شود که با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر توالی‌بایی نسل جدید در رابطه با آستنوزوسپرمی و سترنوم مژک‌های بی‌حرکت معرفی شده‌اند.

نتایج: تابه‌حال ژن‌های *DNAH1*, *SEPT12*, *SLC26A8*, *CATSPER1*, *CATSPER2*, *CCDC39*, *DNAI1*, *DNAI5*, *DNAAF2*, *DNAH5*, *DNAI11*, *DYCIK1* و *LRRC6* منجر به ایجاد سترنوم مژک‌های بی‌حرکت و آستنوزوسپرمی به صورت سترنومی می‌شوند.

نتیجه‌گیری: مطالعات مبتنی بر توالی‌بایی نسل جدید و به خصوص مطالعات توالی‌بایی اگزوم در خانواده‌های شامل چند فرد مبتلا در سالیان اخیر، موفقیت چشم‌گیری در معرفی واریته‌های ژنتیکی بیماری‌زا و افزایش داشن نسبت به ژنتیک ناباروری ایفا کرده است.

وازگان کلیدی: آستنوزوسپرمی، سترنوم مژک‌های بی‌حرکت، توالی‌بایی نسل جدید، توالی‌بایی اگزوم

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۸، صفحات ۳۳۳-۳۱۸

مقدمه

در آزوسپرمی هیچ اسپرمی در مایع منی وجود ندارد. اولیگوزوسپرمی به معنی داشتن تعداد کمتر از ۳۹ میلیون اسپرم در هر انزال یا غلظت کمتر از ۱۵ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر از مایع منی است. تراتوزوسپرمی به معنی وجود مورفو‌لوزی طبیعی در کمتر از ۴ درصد نمونه‌ها تعریف شده و در آستنوزوسپرمی کمتر از ۳۲ درصد اسپرم‌ها قادر حرکت پیش‌روندۀ هستند [۱]. فراوانی جهانی ناباروری در زوج‌ها ۱۵-۲۰ درصد است و طبق آمار، ۵۰ درصد از موارد ناباروری به دلیل نقص در مردها ایجاد می‌شوند [۲]. هرچند که مطالعات جدیدتر نقش عامل مذکور در خاورمیانه را ۶۰-۷۰ درصد معرفی می‌کنند که بالاتر از میانگین جهانی است [۳]. عامل ایجاد‌کننده ناباروری مردها در ۲۵ درصد موارد همچنان ناشناخته است که بر اساس بررسی کیفی مایع منی به دو دسته ایدیوپاتیک idiopathic و ناشناخته unexplained تقسیم می‌شوند. در حالت ناشناخته پارامترهای اسپرم در محدوده طبیعی هستند و به عبارتی علت ایجاد ناباروری مشخص نیست. در حالت ایدیوپاتیک این پارامترها خارج از محدوده طبیعی قرار دارند و عموماً یک یا چند مورد از اختلالات ذکر شده، قابل مشاهده است. هرچند که در هر دو حالت، عامل ایجاد‌کننده ناباروری بر اساس روش‌های معمول قابل تشخیص نیست [۴]. پیش‌بینی بر این است که درصد زیادی از موارد ایدیوپاتیک و ناشناخته عامل ایجاد‌کننده

طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت، ناباروری، بیماری دستگاه تولیدمثلی بوده و به معنای عدم ایجاد باروری پس از حداقل ۱۲ ماه مقاربت مکرر و بدون پیش‌گیری است [۱]. بر اساس دستورالعمل این سازمان، اختلالات متعددی می‌توانند منجر به ناباروری در مردها شوند که عمدۀ ترین آن‌ها عبارت هستند از: آزوسپرمی azoospermia اولیگوزوسپرمی oligozoospermia، تراتوزوسپرمی teratozoospermia و آستنوزوسپرمی asthenozoospermia.

۱. گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

۳. مرکز تحقیقات ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴. بخش زنان و زایمان، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۵. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمت جهاد

دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمت، گروه ژنتیک، تهران، ایران

۶. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی تکوینی، تهران

***لشان نویسنده مسئول:**

تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم، پژوهشگاه رویان، گروه ژنتیک ناباروری

تلفن: ۰۹۱۲۷۳۸۷۸۰-۵، دوچرخه‌سوار: ۰۲۱۳۵۶۲۵۰-۷

پست الکترونیک: m.totonchi@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱/۲۶ تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

[۱۰]. ساختار اسکلت سلولی مهم دیگر در ساختار تازک اسپرم غلاف فیبروزی است. در گذشته تصور می شد که این غلاف فقط نقش یک عامل محافظت کننده محکم برای تازک را دارد [۱۱]. اما امروزه مشخص شده است که نقش فعالی در حرکت اسپرم ایفا می کند. پروتئین های زیادی که در مسیرهای تنظیم کننده 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 فیبروزی AKAP3 و AKAP4 نام دارند. AKAP3 ساختار پایه غلاف را می سازد و AKAP4 این ساختار را تکمیل می کند [۱۲]. عدم وجود پروتئین AKAP4 منجر به کاهش شدید حرکت اسپرم و ناباروری می شود [۱۳]. پروتئین مهم دیگری به نام GAPDS با غلاف فیبروزی در ارتباط است. موش های مدلی که برای این پروتئین فروپیخته (knockout) شدند اسپرم های دارای تحرك ضعیف داشتند [۱۴]. همچنین غلاف فیبروزی نقش مهمی در حفاظت اسپرم از استرس اکسیداتیو (oxidative stress) دارد. شکل شماره ۱ آنatomی اسپرم و پروتئین های ساختاری اجزای مختلف را نشان می دهد.

تنظیم حرکت اسپرم

اسپرم اکثر پستانداران دو نوع حرکت فیزیولوژیک دارند. حرکت فعال (activated motility) که در اسپرم انزال شده دیده می شود و حرکت بیش فعال (hyper-activated motility) که در اکثر اسپرم های استخراج شده از جایگاه لقاح به چشم می آید [۱۵]. تازک یک اسپرم فعال یک حرکت موجی متقارن و کم دامنه ایجاد می کند که اسپرم را کمایش در یک خط مستقیم در یک محیط غیر متراکم مثل مایع منی به جلو می راند. اکثر اسپرم های فاقد حرکت فعال، نمی توانند به محل اتصال لوله رحمی به رحم برسند و بنابراین توانایی لقاح در شرایط درون تنی (in vivo) را ندارند. این موضوع به خوبی در موش های صحرایی نشان داده شده و شواهد بالینی متعددی در حمایت از آن در سایر پستانداران وجود دارد [۱۶]. پس از رسیدن اسپرم به لوله رحمی الگوی تنش تازک به حالتی نامتقارن و با دامنه وسیع تر تغییر می کند. به این نوع حرکت، بیش فعال گفته می شود. این نوع حرکت به اسپرم امکان جداسدن از اپیتلیوم لوله رحمی و حرکت در این محیط متراکم را برای اسپرم فراهم می کند؛ در حالی که حرکت فعال برای پیش روی اسپرم در این محیط کافی نیست. همچنین این نوع حرکت برای نفوذ به لایه های بیرونی تخمک نیز ضروری بدنظر می رسد [۱۷]. حرکت بیش فعال در واقع، بخشی از فرآیندی به نام توانمندسازی (capacitation) است که طی آن علاوه بر حرکت بیش فعال، غشای آکروزوم در سر اسپرم نیز نایابی دارد می شود تا اسپرم برای

ناباروری ژنتیکی باشد و آستنوزوسپرمی درصد زیادی از موارد ایدیوپاتیک را تشکیل می دهد. در یک مطالعه روی هزار فرد نابارور مراجعه کننده به یک مرکز ناباروری، ۷۱/۱۸ درصد 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 نمونه گیری اتفاقی این درصد بسیار قابل توجه است [۶]. پاتوفیزیولوژی آستنوزوسپرمی به دو دسته کلی نقش های ساختاری دم اسپرم و متابولیک تقسیم بندی می شود. شکل گیری صحیح ساختار دم اسپرم از بالاترین اهمیت در حرکت صحیح آن برخوردار است و نقش در ساختار و نحوه فعالیت پروتئین های تشکیل دهنده آکسونم منجر به آستنوزوسپرمی می شود [۷]. از جمله نقش های متابولیک می توان به نقش در مسیرهای تنظیمی حرکت اسپرم، ساختار کانال های یونی غشای اسپرم، تأمین ATP لازم برای حرکت دم و نقش در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی اشاره کرد. در ادامه ساختار دم اسپرم پستانداران و مسیرهای تنظیمی حرکت اسپرم به اختصار توضیح داده می شوند.

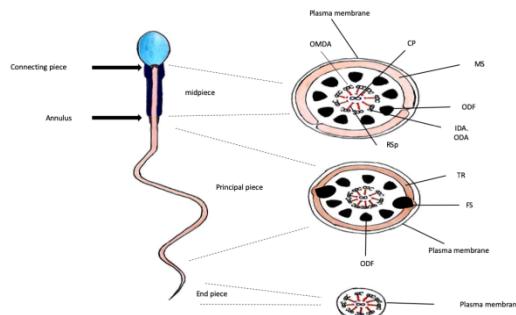
ساختار دم اسپرم پستانداران شکل گیری دم اسپرم در اسپرماتیدها انجام شده و با تبدیل شدن یکی از سانتریول ها به آکسونم (axoneme) آغاز می شود. در جریان اسپرمیوژنر شکل گیری صحیح ساختار دم اسپرم برای عملکرد صحیح آن ضروری است. دم اسپرم پستانداران از یک ساختار اصلی به نام آکسونم و تعدادی ساختار جانبی همراه آن تشکیل شده است که شامل غلاف میتوکندریال یا (Outer Mitochondrial Sheath)، رشته های خارجی ضخیم (Dense Fibers) و غلاف فیبروزی (FS) است. آکسونم یک ساختار محافظت شده در تمام سلول های یوکاریوت تازک و مژک دار است، اما ساختارهای جانبی نام برده شده تنها در تازک اسپرم مشاهده می شوند. این ساختارها از اهمیت زیادی برای حرکت دم اسپرم برخوردار هستند و نقش در آنها منجر به ایجاد بدشکلی در دم اسپرم می شود. به جز سر اسپرم، بخش های 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 میتوکندریالی است که میتوکندری های اسپرم در آن ناحیه قرار دارند و به صورت مارپیچ ODF ها را احاطه کرده اند. نقش ODF دادن توانایی کشش غیرفعال به تازک است [۸]. پروتئین اصلی حاضر در این ساختار ODF1 نام دارد [۹] که با سایر پروتئین ها از جمله: OIP1، SPAG4، ODF2 و SPAG5 بر هم کشش برقرار می کند

های مشاهده شده در موش هایی که زیر واحد کاتالیتیک (C) ایزوفرم مختص اسperm آنزیم در آنها حذف شده بود، ناباروری جنس مذکور بر اثر تحرک بسیار ضعیف اسperm است [۲۲]. بنابراین PKA پیشنهاد شد که مکانیسم cAMP از طریق تاثیر بر مخنثی عملکرد تازک را کنترل کند، یک مکانیسم آن از طریق فسفریلاسیون سرین/ترئونین پروتئین های هدف و در ادامه فعل-سازی تیروزین کینازها و یا کینازهای پایین دست است که عموماً در تازک قرار دارند. فسفریله شدن تیروزین در این پروتئین های پایین دست منجر به حرکت خواهد شد. یکی از این پروتئین ها، بازو های دایتین آکسونم هستند که همان طور که اشاره شد، فسفریله شدن آنها برای ایجاد زنش تازک ضروری است [۲۳]. علاوه بر این، cAMP مسیرهای دیگری در اسperm و بیضه ها از جمله cyclic nucleotide-gated ion channel و فاکتورهای فسفریلاسیون/ دفسفریلاسیون تیروزین در پروتئین های تازک برای شروع و پایان حرکت بیش فعال نیز در پریمات ها و جوندگان ضروری است. یکی از پروتئین های مهم در این مسیر AKAP4 (A-kinase anchor protein) شامل AKAP (A-kinase anchor protein) نام دارد. خانواده PKA به نتایج متفاوت 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 بیش فعال مهم است و باعث دسترسی سریع این آنزیم به پروتئین های هدف در نقاط مختلف می شود [۲۴].

رسیدن به لایه های خارجی تخمک و واکنش آکروزومی (acrosome reaction) آماده شود [۱۸]. ساختار صحیح تازک برای عملکرد آن ضروری است. آکسونم به عنوان موتور حرکتی در تمام سلول های یوکاریوتی دارای مژک و تازک عمل می کند. در اسperm پستانداران پروتئین های دایتین (dynein) حاصل از جفت میکرو توبول های خارجی منشأ می گیرند [۱۹]. بازو های دایتین دارای خاصیت ATPase هستند و وقتی فسفریله می شوند، این خاصیت در آنها فعال می شود. انرژی حاصل از هیدرولیز ATP باعث لغزیدن جفت میکرو توبول های خارجی مجاور روی یکدیگر می شود. از آنجایی که آکسونم به سر اسperm اتصال دارد، این لغزش تا انتهای تازک ادامه داشته، منجر به خم شدن و زنش تازک می شود. دفسفریله شدن دایتین (calcineurin) که به توسط آنزیم پروتئین فسفاتاز کلسینورین (calmodulin or CaM) وابسته است این فرآیند را معکوس کرده و تازک را از خمیدگی خارج می کند. این فرآیند به صورت تک سویه انجام می شود. یعنی با فسفریله شدن، بازو های دایتین داخلی تازک به یک سمت خم می شود سپس با فسفریله شدن به حالت اویلیه برمی گردد و در ادامه با فسفریله شدن بازو های دایتین خارجی به سمت مقابله خم خواهد شد [۲۰]. تنظیم فرآیند حرکت اسperm در پستانداران از طریق دو مسیر اصلی cAMP/PKA و کلسیم انجام می شود.

cAMP/Protein Kinase A

فسفریلاسیون وابسته به cAMP پروتئین های تازک، مسؤول شروع و حفظ حرکت فعال در اسperm پستانداران است [۲۱]. آنزیم PKA یک سرین/ترئونین کیناز است. یکی از فنوتیپ-



شکل شماره ۱- آناتومی اسperm. تازک اسperm از طریق متصل کننده با سر متصل می شود و از سه قطعه میانی، اصلی و انتهایی تشکیل شده است. قطعات اصلی و میانی توسط Annulus از هم جدا شده اند. بر شعری قطعه میانی شامل غشای پلاسمایی و غلاف میتوکندریالی (MS) است که ۹ رشته ضخیم بیرونی (ODF) را احاطه می کنند. در داخل این رشته ها اجزای تشکیل دهنده آکسونم قرار دارند که عبارت هستند از ۹ جفت میکرو توبول تحت عنوان OMDA و بازو های dynein یعنی IDA و ODA، محورهای شعاعی (RSp) و جفت میکرو توبول های مرکزی (CP). در بر شعری قطعه اصلی غشای پلاسمایی هفت ODF را احاطه کرده و دو ODF توسط دو ستون غلاف فیبروزی (FS) (جا گزین شده اند. این دو ستون توسط ستون های عرضی (TR) به هم متصل هستند. در بر شعری قطعه انتهایی غلاف فیبروزی و ODF در این قطعه وجود ندارد و آکسونم با غشای پلاسمایی احاطه شده است.

SEPTIN12 ڙن

پروتئین‌های septin متعلق به گروهی از پروتئین‌های GTPase با قابلیت پلیمر سازی هستند که فیلامنت‌های همو یا هترودایمیر تشکیل می‌دهند و در فرآیندهای سلولی متنوعی از جمله SEPTIN1، سیتوکینز و مورفوژنر نقش دارند. پروتئین‌های 1 از SEPTIN12، SEPTIN6، SEPTIN4، SEPTIN7 و SEPTIN1 اجزای تشکیل دهنده قطعه اتصال گردن به سر اسپرم (annulus) در شکل گیری 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 شکل گیری annulus، خم شدگی دم و چیش غیر طبیعی میتوکندری‌ها در قطعه میانی هستند [۳۰، ۳۱]. همچنین پروتئین 12 septin با پروتئین‌های alpha-tubulin و beta-tubulin نیز بر هم کنش دارد و بنابراین به نظر می‌رسد در فرآیندهای واپسی میکرو‌توبول‌ها در تمایز سر اسپرم نیز نقش داشته باشد. در مطالعه‌ای اگزون‌های ۱۲ SEPT1 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 خم شدگی غیر طبیعی در ناحیه دم اسپرم را نشان داد. بررسی مایع منی بیمار دارای جهش p.Asp197Asn ساختار غیرطبیعی و خم شدگی دم اسپرم، نقص در ساختار annulus و عدم وجود پروتئین 12 SEPT1 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].

CATSPER، ژن‌های

پروتئین CATSPER یک پروتئین کانالی است که به صورت اختصاصی در غشای پلاسمایی قطعه اصلی دم اسperm انسان و موش قرار دارد و وجود آن برای دست یابی به حرکت بیش فعال ضروری است [۳۴، ۳۳]. این پروتئین از چهار زیر واحد تشکیل دهنده يخشن، کانال به نام آلفا و سه زیر واحد کمک، به نام های بتا، گاما و

مسیر کلسیم

وجود کلسیم خارج سلولی در اپیدیدیم برای کسب توانایی حرکتی ضروری است و این یون در تنظیم هر دو نوع حرکت فعال و بیش فعال نقش مهمی دارد [۲۵]. یک مکانیسم مهم که طی آن کلسیم به طور مستقیم در فعالیت تاثیرگذارد، از طریق تنظیم فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز محلول (soluble adenylyl cyclase or sAC) است. این آنزیم با تولید cAMP باعث فعال شدن PKA می شود و بنابراین برای حرکت اسپرم بسیار مهم است. آنزیم sAC با انواع تراویشایی آدنیلیل سیکلاز (transmembrane adenylyl cyclase or tmAC) از نظر بیوشیمیایی متفاوت بوده و به صورت اختصاصی به هر دو یون کلسیم و بیکربنات (HCO_3^-) حساس است [۲۶]. این که چطور غلظت یون کلسیم در داخل اسپرم به طور ناگهانی بالا می رود، کامل مشخص نشده است. اما پیشنهاد شده که ذخیره های داخل سلولی برای یون کلسیم وجود دارد که مخصوصاً در هنگام ایجاد شدن حرکت بیش فعال که اسپرم به کلسیم زیادی نیاز دارد، آزاد می شوند. هرچند که به جز آکروزوم هنوز جایگاهی برای ذخیره کلسیم تعیین نشده است [۲۷]. صرف نظر از ذخیره های داخل سلولی، شواهد متعددی برای ورود کلسیم خارج سلولی از طریق کانال های مختلف به اسپرم وجود دارد. این کانال ها شامل کانال های وابسته به ولتاژ، کانال های Cyclic nucleotide-gated (CNG) و کانال های خانواده CatSper است. موش های فروریخته برای ژن های خانواده CatSper نابارور بوده، توانایی ایجاد حرکت بیش فعال را ندارند. از سوی دیگر، کلسیم در غلظت بالا باعث مهار حرکت اسپرم می شود. بدین ترتیب که از طریق گیرنده کالمودولین و آنزیم کلسینورین که به کالمودولین و کلسیم وابسته است، بازو های دایتین دفسفریله می شوند [۲۸]. شکل ۲ شماره ۲ مسیر های مهم در تنظیم حرکت اسپرم را نشان می دهد.

ژن‌هایی که تا به امروز در رابطه با آستنوزوپیرمی غیرسندرومیک با قطعیت و مطالعات عملکردی گستردۀ معرفی شده‌اند، عبارت هستند از *SLC26A8*, *DNAH1* و *SEPT12*. *CATSPER* ژن‌های سازنده زیر واحدهای پروتئین *CATSPER* و *SEPT12* در سرمه‌بندی و شکل‌گیری صحیح ساختار و مورفو‌لوژی دم اسپرم نقش دارند. در حالی که ژن‌های *SLC26A8* و *CATSPER* 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 برسی می‌شوند.

ژن *DNAH1*

ناهنجاری‌های شکلی و ساختاری دم اسپرم از عمدۀ مواد ایجاد آستنزوسپرمی هستند. یکی از فنوتیپ‌های مهمی که در این رابطه توصیف شده است، ناهنجاری‌های چندگانه دم اسپرم (MMAF) است که در گذشته دیسپلازی غلاف فیبروزی (DFS) یا فلاژلوم کوتاه نامیده می‌شد. در این حالت، مجموعه‌ای از ناهنجاری دم اسپرم در برسی نمونه مایع منی قابل مشاهده است که جمع شدگی، خمیدگی، کوتاهی و یا عدم وجود دم اسپرم را شامل می‌شود [۴۲]. ژن *DNAH1* مسؤول تولید زنجیره سنگین IDA آکسونم است و اوکلین‌بار در یک مطالعه گروهی آستنزوسپرمی جهش در آن در بیماران گزارش شد [۴۳]. جهش در این ژن منجر به حذف جفت میکروتوپول‌های مرکزی از ساختار آکسونم می‌شود و در واقع ساختار آن از $9+0$ تغییر می‌کند. جفت میکروتوپول نقش عمدۀ ای 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 فیبروزی و حذف شدگی غلاف میتوکندریالی شود. مدل موشی فروریخته ژن *Dnah1* نیز فنوتیپ آستنزوسپرمی را نشان می‌دهد. هرچند که ناهنجاری‌های ساختاری آکسونم در موش به اندازه انسان شدید نیست و به همین دلیل پیش‌بینی می‌شود که در مسیر بیوژن آکسونم در موش و انسان تفاوت‌های تکاملی به وجود آمده باشد [۴۴، ۴۳].

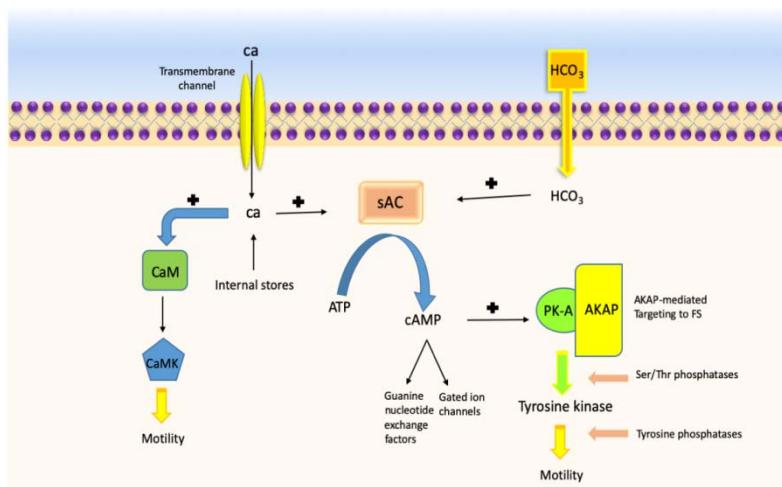
ژن *SLC26A8*

این ژن که با نام (1) *Testis AnionTransporter* (*TAT1*) 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 تحرك اسپرم، نقص در ظرفیت پذیری و اختلالات شدید ساختاری *annulus* می‌شود. اکثر پروتئین‌های خانواده *SLC26* وظیفه انتقال یون‌های یک‌ظرفیتی و دو‌ظرفیتی مانند سولفات، کلرید، بیکربنات، یدید و اگزلات را بر عهده دارند [۴۵]. علاوه بر این، این انتقال‌دهنده‌ها از جمله *SLC26A3*, *A4*, *A5*, *A6* و *A9* در بافت‌های مختلف با پروتئین کاتالی *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) کمپلکس ایجاد می‌کنند که جهت تنظیم فعالیت *CFTR* ضروری است. کاتال CFTR در ناحیه استوایی سر و قطعه میانی دم اسپرم نیز وجود دارد. این کاتال وظیفه انتقال یون کلر به داخل اسپرم را بر عهده دارد

دلتا تشکیل شده است. زیرواحدهای آلفا توسط ژن‌های *CATSPER4*, *CATSPER3*, *CATSPER2*، *CATSPER1* بیان می‌شوند در حالی که زیرواحد بتا توسط ژن *CATSPERB* و زیرواحد بتا توسط ژن *CATSPERD* بیان می‌شوند. فعالیت این کاتال 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 دلتا *CatSperδ* منجر به عدم توانایی اسپرم در ایجاد حرکت پیش‌فعال بهدلیل عدم توانایی کاتال در افزایش میزان کلسیم ورودی می‌شود [۳۶، ۳۷]. با توجه به بیان اختصاصی این پروتئین در دم اسپرم و نقش مهم آن در تنظیم غلاظت یون کلسیم، اورتولوگ‌های انسانی ژن‌های کد کننده زیرواحدهای *CATSPER* در انسان، گرینه‌های مناسی برای برسی وجود جهش در مردهای نابارور بودند. به همین ترتیب، تا به امروز جهش در ژن‌های *CATSPER1* و *CATSPER2* در مردهای آستنزوسپرمیک شناسایی شدند، اما تاکنون جهش بیماری‌زاوی در دیگر ژن‌های کد کننده زیرواحد آلفا یعنی *CATSPER3* و *CATSPER4* و یا زیرواحدهای کمکی در انسان گزارش نشده است [۳۸، ۳۹]. در مطالعه‌ای روی یک خانواده با شیوع بالای آستنزوسپرمی، حذف دو اگرلون پایانی ژن *CATSPER2* گزارش شد [۴۰]. و در مطالعه دیگری روی سه خانواده ایرانی غیر خوبی‌شاؤند حذف‌های گسترده شامل کلّ ژن *CATSPER2* به ثبت رسید [۳۹]. و همکاران دو خانواده ایرانی دارای فرزندان حاصل از ازدواج خوبی‌شاؤندی را مورد مطالعه قرار دادند که در آن‌ها آستنزوسپرمی غیر سندرومیک با الگوی توارثی اتوزوم مغلوب مشاهده شد. در افراد نابارور، عدم تحرك یا تحرک بسیار اندک، تعداد کم و نقص‌های مورفو‌لولژیک اسپرم گزارش شده بود. نقشه‌یابی هموزیگوستی 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 درج شدگی -5.539- 540insT و 540insT-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 ترانسمیبران پروتئین *CATSPER1* و ناحیه کاتال و یا عدم ترجمه mRNA بر اثر مکانسیم nonsense-mediated decay شد [۴۱].

می‌دهند، در محیط *in vitro* باعث از بین رفتن کمپلکس با CFTR ناپایداری پروتئین و آسیب‌پذیری آن به تجزیه توسط کمپلکس‌های پروتئازوم می‌شوند. بررسی نمونه مایع منی افراد ناقل جهش SLC26A8 و عدم جای‌گیری صحیح آن در غشاء اسپرم را نشان داد. همچنین، رنگ‌آمیزی میتوکندری اسپرم یک بیمار ناقل جهش داد. p.Glu812Lys SLC26A8 بهم خودگی 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 درون‌تی و برون‌تی (in vitro) با آن بر هم کش فیزیکی برقرار می‌کند [۴۷]. برای ارزیابی نقش جهش‌های ژن SLC26A8 در تحرک اسپرم، این ژن در ۱۴۶ مرد نابارور آستنوزو‌سپرمیک توالی‌بایی 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 سیکلаз محلول (sAC) از دو طریق کلسیم و یون بیکربنات فعل شده و ATP را به cAMP تبدیل می‌کند. PKA برای فعالیت ضروری است و منجر به ایجاد زنش تازک می‌شود. از سوی دیگر غلظت بالای کلسیم از طریق گیرنده آن کالمودولین (CaM) و آنزیم فسفاتاز کلسینورین باعث مهار حرکت و بازگشت جفت میکروتوبول‌های آکسونم به حالت اولیه و صاف شدن تازک می‌شود.

(whole exome sequencing or WES) به صورت 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].

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 ترانسمبران 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 توالی‌بایی اگزونم در یک خانواده ایرانی با میزان خویشاوندی بالا، یک جهش تغییر قاب در این ژن شناسایی شد که منجر به بر هم خوردگی ساختار دامنه کاتیلیتیک

ژن SPAG17

این ژن در بیضه موش و انسان بیان می‌شود و پروتئین محصول آن در جفت مرکزی میکروتوبول‌های آکسونم در ساختار قرار می‌گیرد [۵۰]. این پروتئین با SPAG6 بر هم کنش دارد و پیش‌تر گزارش شده است که موش‌های دارای نقش عملکردی spag6 به دلیل تحرک ضعیف اسپرم دچار ناباروری هستند [۵۱]. همچنین، در موش‌های دارای spag6 جهش‌یافته، پروتئین spag17 وجود ندارد [۵۲، ۵۰]. این پروتئین در یوکاریوت‌ها بسیار محافظت شده است، به نحوی که همولوگ آن، در *PF6* در *Chlamydomonas* برای زنش تازک 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 آستنوزو‌سپرمی شدید، جهش c.G4343A; p.R1448Q به

Chlamydomonas شناسایی شد [۵۵]. ساختار تازک و مژک در روند تکامل به طور قابل ملاحظه‌ای حفاظت شده است و به همین دلیل مطالعاتی که بر اساس روش ژن کاندید برو اساس داده‌های مطالعات روی Chlamydomonas انجام شده است موفق به شناسایی چهش‌های ژنتیکی متعددی بیماران مبتلا به PCD شده است. همچنین مدل‌های موش و سگ فروریخته برای ژن‌های مسؤول ایجاد ساختارهای آکسونم نیز با موفقیت ساخته شده‌اند [۵۶]. تابه‌حال جهش در ۲۸ ژن به عنوان عامل PCD گزارش شده است و به این ترتیب عامل ایجاد بیماری در حدود ۷۰ درصد موارد قابل تشخیص است [۵۷،۷]. در بسیاری از موارد این بیماری با آستنوزوسپرمی همراه است اما متأسفانه این بخش از بیماری در برخی از مطالعات نادیده گرفته شده است یا فنوتیپ با جزئیات تشریح نشده است. آستنوزوسپرمی سندرومیک در این حالت معمولاً با اسپرم بدون تحرک به دلیل نقص ساختاری دم اسپرم بر اثر حذف بازووهای دایشین، جایگاهی غیر طبیعی میکروتووبول‌ها، بهم‌ریختگی ساختار ۹+۲ آکسونم و یا عدم تشکیل میله‌های شعاعی (radial spokes) ایجاد می‌شود. در جدول شماره ۱ ژن‌های مرتبط به PCD که در رابطه با آن‌ها آستنوزوسپرمی نیز در بیماران گزارش شده است، فهرست شده‌اند.

آنژیم و ایجاد یک کدون توقف زودرس می‌شود. هر دو فرد آستنوزوسپرمیک خانواده برای این جهش هموزیگوت بودند و پیش‌بینی شد که عدم فعالیت آنژیم cAMP 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].

آستنوزوسپرمی سندرومیک

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

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

منبع	نوع آسیب ایجادشده	جایگاه در ساختار آکسونم	ژن
[۵۸]	کوتاه یا حذف شدن بازووهای خارجی دایشین	بازوی خارجی دایشین (ODA)	DNAII
[۵۹]	ناهنجاری در ساختار ODA	ODA	DNAH5
[۶۰]	حذف بازووهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازووهای دانین در سیتوپلاسم	DNAAF2
[۶۱]	حذف IDA، ناهنجاری ساختاری جفت میکروتووبول‌های محیطی، جای‌گیری اشتباه یا حذف جفت میکروتووبول مرکزی	سر هم‌بندی IDA و میله‌های شعاعی	CCDC39
[۶۲]	حذف بازووهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازووهای دانین در سیتوپلاسم	DYXIC1
[۶۳]	حذف بازووهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازووهای دانین در سیتوپلاسم	LRRK6
منبع	نوع آسیب ایجادشده	جایگاه در ساختار آکسونم	ژن
[۵۸]	کوتاه یا حذف شدن بازووهای خارجی دایشین	بازوی خارجی دایشین (ODA)	DNAII
[۵۹]	ناهنجاری در ساختار ODA	ODA	DNAH5
[۶۰]	حذف بازووهای خارجی و داخلی دایشین	سر هم‌بندی کمپلکس‌های بازووهای دانین در سیتوپلاسم	DNAAF2

	(IDA)	در سیتوپلاسم
[۶۱]	حذف IDA، ناهنجاری ساختاری جفت میکروتوبول‌های محیطی، جای‌گیری اشتباه یا حذف جفت میکروتوبول مرکزی	سر همبندی IDA و میله‌های شعاعی سر همبندی کمپلکس‌های بازوهای دانین در سیتوپلاسم
[۶۲]	حذف بازوهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	CCDC39
[۶۳]	حذف بازوهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	DYXIC1
[۵۸]	نوع آسیب ایجادشده جایگاه در ساختار آکسونم منبع کوتاه یا حذف شدن بازوهای خارجی بازوی خارجی دایشین (ODA) دایشین	LRRK6
[۵۹]	ناهنجاری در ساختار ODA	DNAI1
[۶۰]	حذف بازوهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	DNAH5
[۶۱]	حذف IDA، ناهنجاری ساختاری جفت میکروتوبول‌های محیطی، جای‌گیری اشتباه یا حذف جفت میکروتوبول مرکزی	CCDC39
[۶۲]	حذف بازوهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	DYXIC1
[۶۳]	حذف بازوهای خارجی و داخلی دایشین (IDA)	LRRK6

لازم در نظر گرفته شده است.

۲) در صورتی که مطالعه بر مبنای فرکانس یک آل 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 یک 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 واریته خاص بوده و به سایر واریته‌های احتمالی همان ژن مورد مطالعه توجه نشده است. البته در صورتی که ژن مورد مطالعه طول زیادی داشته باشد، توالی‌بایی تمام نواحی آن و یا حتی توالی‌بایی نواحی اگزون با استفاده از

طبق بررسی‌ها حدود ۲۳۰۰ ژن در پروسه اسپرماتوزن دخالت دارند که تا سال ۲۰۱۴ تنها ۲۰۱۴ ژن از این تعداد با مطالعات مبتنی بر ژن کاندید مورد بررسی قرار گرفتند. این نوع مطالعات عموماً مبتنی بر توالی‌بایی 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 (Polymerase Chain Reaction or PCR) در قالب پلیمراز (PCR) با توالی‌بایی 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 هر کدام از این مطالعات به‌تهاهی زیاد نیست، با توجه به تعداد مطالعات انجام شده 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 نمی‌آمد. 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 اسپرمیوزن و بیان بالا در اسپرماتید و اسپرماتوسیت‌های موشی به عنوان ژن کاندید انتخاب و در افراد نایارور توالی‌بایی شد. نتایج توالی‌بایی نشان داد که افراد نایارور دارای یک جهش تغییر معنی در آخرین نوکلئوتید اگزون شماره ۴ این ژن هستند TRP اتفاق p.R283Q. این جهش در دامنه بسیار حفاظت‌شده (DNA) اتفاق می‌افتد که برای بر هم کنش پروتئین SPATA16 با سایر پروتئین‌های دخیل در تولید آکروزوم بسیار مهم است. همچنین این جهش عدم شناسایی این جایگاه توسط کمپلکس اسپلایسوزوم و اسپلایسینگ نامتعارف در mRNA نایان 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 کاوشنگ روی یک خانواده با پدر و مادر خویشاوند و پنج فرزند مبتلا به گلوبوزوپرمی 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 چفت از طریق دارا بودن ۳۰ عدد SNP ژنوتیپ هموزیگوت در هر چهار نفر به عنوان 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 قطبی‌سازی (polarization) اسپرم به عنوان کاندید انتخاب شد. پیش‌تر مطالعه روی اورتولوگ این ژن (DPY-19) در C. Elegans فعالیت آن را در قطبیت سلول‌های نوروپلاست نشان داده بود. نتایج PCR روی افراد مبتلا نشان داد که یک حذف ۲۰۰ کیلو چفت بازی منجر به حذف کامل ژن DPY19L2 شده است و مکانیسم این حذف گسترده نوترکیبی همولوگ غیرآلی (Nonallelic Homologous Recombination or NAHR) به دلیل وجود دو ناحیه تکرار کم نسخه (Low Copy Repeat or LCR) پیشنهاد شد. همچنین این ناحیه در ۲۱ فرد دیگر مبتلا به گلوبوزوپرمی بررسی شد که ۴ نفر از آنها همین حذف را نشان دادند [۷۲]. در همان سال در مطالعه دیگری روی ۲۰ فرد گلوبوزوپرمیک، حذف کامل ژن DPY19L2 در ۱۵ نفر تأیید شد [۷۳]. ماکروزوپرمی نوعی از تراتوزوپرمی است که در آن اسپرم‌ها سر بسیار بزرگ و بیش از یک دم دارند و پلی‌پلولوئید (polyploid) هستند. میزان تحرک اسپرم نیز در این ژنوتیپ عموماً پایین است. در مطالعه‌ای روی ده فرد مبتلا به ماکروزوپرمی یک جهش تغییر قاب در ژن AURKC شناسایی شد. در این مطالعه ابتدا چهار نفر از این افراد که همگی فرزندان والدین

توالی‌بایی سنگر با هزینه زیادی همراه می‌شد و در بسیاری موارد عامل هزینه، باعث عدم پیشرفت مطالعه شده است [۶۵, ۶۶].
مطالعات ارتباط‌بایی 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 میکرو‌آرایه‌های (DNA) microarray است، بدین‌ نحو که کاوشنگ (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 کاوشنگ‌ها قرار می‌گیرد و کاوشنگ‌ها با نواحی مکمل خود در DNA هیبرید تشکیل می‌دهند. هر کاوشنگ به یک ترکیب رنگی فلورسانس اتصال دارد که پس از تشکیل هیبرید این ترکیب فعال شده و سیگنال ساطع شده 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 ارائه شده به صورت تجاری حاوی SNP ۱۴۹۴ بود، اما امروزه جدیدترین آرایه‌ها حاوی حدود ۵/۲ میلیون کاوشنگ هستند. طبق گزارش کنسرسیوم پروژه هزار ژنوم، به طور 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 درج-شدگی‌های کوچک هستند [۶۹]. بر این اساس، مطالعات زیادی برای شناسایی ارتباط SNP ها با ژنوتیپ‌های مختلف منجر به نایاروری از جمله آزوپرمی، اولیگوزوپرمی و گلوبوزوپرمی بر اساس استراتژی مورد-شاهد انجام شد [۷۰]. بیشترین موفقیت نتایج کاربرد آرایه SNP در مطالعات ژنتیک نایاروری مربوط به گلوبوزوپرمی (globozoospermia) و ماکروزوپرمی (macrozoospermia) است. مطالعه گلوبوزوپرمی در دو خانواده دارای چند فرزند مبتلا به این ژنوتیپ به عمل آمد. گلوبوزوپرمی یکی از شدیدترین و نادرترین حالت‌های تراتوزوپرمی بوده که در آن به دلیل عدم تشکیل آکروزوم، اسپرم‌ها قابلیت بارور کردن تخمک را ندارند و سر آنها به دلیل نداشتن آکروزوم به شکل کروی در می‌آید. یکی از این مطالعات روی یک خانواده با پدر و مادر خویشاوند و سه فرزند مذکور مبتلا به گلوبوزوپرمی انجام شد. در این مطالعه، با استفاده از آرایه SNP با ۱۰ هزار کاوشنگ، ابتدا نواحی (Run Of SNP) از آرایه ROH با Homozygosity مشترک در سه فرد مبتلا شناسایی شدند و سپس ارتباط عملکردی ژن‌های واقع در این نواحی با

متلا انجام شده است، این نواحی ROH اوایله از نواحی متعنج از مطالعات مورد- شاهد غیر خویشاوند کوچکتر هستند. در این حالت می‌توان با به کار بردن نشانگرهای بیشتر که داخل ناحیه ROH اوایله قرار دارند، ناحیه هموزیگوت مشترک را به طور دقیق- تری تعیین کرد. از سوی دیگر، در این نوع مطالعات که موقبیت- 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 اورتوولوگ 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 اگزون 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 [۷۸، ۷۹]. 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 Medical Genetics and Genomics or ACMG (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 اوئین کاربرد موفق توالی‌یابی اگزوم در شناسایی عامل ژنتیکی بیماری‌های وراثتی انسان در سال ۲۰۰۹ به چاپ رسید [۸۰]. طی سالیان اخیر این مطالعات در حوزه ژنتیک تاباروری نیز موفقیتی قابل توجه کسب کرده‌اند. از جمله پیشرفت‌های حاصل شده، حل شدن مشکل توالی‌یابی نواحی ROH است که از طریق آنالیز پیوستگی (Linkage Analysis) در مطالعات GWAS به دست می‌آمدند. امروزه می‌توان این نواحی را به طور کامل از طریق توالی‌یابی هدفمند (targeted sequencing) و یا نواحی اگزونی ژن‌های واقع در این ناحیه را از طریق توالی‌یابی GWAS روی اگزوم توالی‌یابی کرد. به طور مثال در یک مطالعه

خوبشاوند بودند و نسل‌های قبلشان 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 متلا دارای یک حذف سیتوزین در اگزون 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 بررسی شده دارای هر دو کروموزوم X و Y بودند که نشان از نقص در تقسیم میوز I در پروسه اسپریماتوژن دارد [۷۴]. در رابطه با PCD که در آن برخی افراد آستنتوزوسپرمی 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 متلا به PCD بودند GWAS با استفاده از ۱۸۸ نشانگر پلی‌مورفیک انجام شد. این مطالعه درنهایت PCD را به شدت هتروژن و چند لوکوس وسیع را در کروموزوم‌های متعدد به عنوان 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 متلا به PCD با ۴۶۲ نشانگر میکرو‌ستلایت ۱۱-۳۲ (نشانگر در هر کروموزوم) انجام شد. در نهایت ناحیه‌ای به طول ۵/۳ cM در بازوی بلند کروموزم ۱۵ به- عنوان جایگاه احتمالی جهش عامل بیماری معرفی شد [۷۶]. به نظر می‌رسد دلیل موفق نبودن این مطالعات استفاده از نشانگرهای با فاصله زیاد است که بدلیل 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 ایجاد کننده 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 خوبشاوند و چندین فرزند

TFIIFH3 زیرواحد p34 فاکتور رونویسی TFIIFH را تولید می- کند و جهش مذکور که در ناحیه‌ای با حفاظت شدگی تکاملی بالا اتفاق می‌افتد منجر به نقص عملکردی در زیرواحد p34 می‌شود. فاکتور TFIIFH از طریق این زیرواحد منجر به فعالسازی گیرنده- آلفای رتینوئیک اسید Retinoic Acid Receptor alpha می- شود 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، اتفاقی در این زمینه به وقوع پیوسته و تعداد ژن‌های معروفی شده در پایگاه‌های داده معتبر همچون OMIM و HGMD در ارتباط با بیماری‌های وراثتی به طرز بی- سابقه‌ای رو به افزایش است. در انواع شدیدتر فنوتیپ‌های منجر به oligozoospermia و azoospermia ناباروری مردها همچون teratozoospermia باشد که معمولاً بیشتر جهش‌های مرتبط با آستنوزوسپرمی سندرومیک معرفی شده‌اند. این پیشرفت در مورد فنوتیپ‌های باشد که معمولاً بیشتر جهش‌های مرتبط با آستنوزوسپرمی غیر سندرومیک جهش‌های بیماری‌زا تنها در تعداد اندک شماری از ژن‌ها معرفی شده‌اند. عموماً بیشتر جهش‌های مرتبط با teratozoospermia و asthenozoospermia معمولاً محدودی در رابطه با آستنوزوسپرمی شناخته شده‌اند. اگرچه جهش‌های بیماری‌زا در تعداد ژن‌های بیشتری در ارتباط با آستنوزوسپرمی غیر سندرومیک معرفی شده‌اند اما در ارتباط با آستنوزوسپرمی غیر سندرومیک جهش‌های بیماری‌زا تنها در تعداد اندک شماری از ژن‌ها معرفی شده‌اند. عموماً بیشتر جهش‌های مرتبط با teratozoospermia و asthenozoospermia معمولاً محدودی در رابطه با آستنوزوسپرمی شناخته شده‌اند. بدین ترتیب پیشنهاد می‌شود در کشور وراثتی اتوژروم مغلوب پیروی می‌کنند. جهش‌های منجر به ما که همچون سایر کشوری‌های خاورمیانه ازدواج خویشاوندی با نرخ بالای اتفاق می‌افتد، مطالعات خانوادگی در مقیاس وسیع صورت گیرد تا بتوان این جهش‌های مغلوب را در خانواده‌های دارای چند فرزند مبتلا که والدین خویشاوند دارند، با نرخ موقفيت 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

(Premature Ovarian Tخمدان Insufficiency or POI) 7p21.1- 7q21.3-22.2 و 15.3 موجود در این ناحیه، سه ژن DLX5، DLX6 و DSS1 با ادبیات به عنوان ژن کاندید انتخاب شد و نواحی اگزونی و تنظیمی آن‌ها با روش سنگر مورد توالی‌بایی قرار گرفت. اما واریته بیماری زایی در این سه ژن شناسایی نشد [۸۱]. دو سال بعد همین گروه این ناحیه را با توالی‌بایی اگزوم مورد توالی‌بایی قرار دادند و این- بار یک حذف تکنوکلثوتیدی 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). 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]. به طور کلی احتمال به نتیجه رسیدن مطالعات مبتنی بر توالی‌بایی اگزوم در کلینیک و بدون در نظر گرفتن موارد خانوادگی ۲۵ درصد پیش‌بینی شده است [۸۳]. در حالی که در صورت وجود شجره بیماری و مبتلا شدن پیشتر 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 شده است. همچنین بیماری مورد مطالعه نفوذ کاهش یافته (reduced penetrance) ندارد، فنوتیپ (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 اشتباہ به عنوان 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. به طور 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)، افراد هموزیگوت برای این جهش مبتلا به آزوسپرمی و افراد هتروزیگوت مبتلا به اولیگوزوسپرمی بودند. ژن

پژوهشگاه رویان انجام شد و نویسنده‌گان 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] Gaddum-Rosse 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 demembranated 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, Karaouzène 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, Karaouzène 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, Hurricane 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, Sapolisky 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, Koscienski 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] Koscienski 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, Zahri 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, Sail 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, Koscienski 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.