Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/119743

File ID	119743
Filename	Samenvatting, conclusies en implicaties voor toekomstig onderzoek

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Unraveling the genetics of spermatogenic failure
Author	G.H. Westerveld
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2008
Pages	128
ISBN	978-90-6464-295-1

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/288572

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting, Conclusies & Implicaties voor toekomstig onderzoek

opmaak westerveld.indd 109 15-10-2008 10:20:18

opmaak westerveld.indd 110 15-10-2008 10:20:18

Subfertiliteit wordt gedefinieerd als het uitblijven van een zwangerschap na één jaar onbeschermde coïtus. De oorzaak van subfertiliteit ligt in circa 50% van de gevallen bij de man waarbij er dan sprake is van verminderde semenkwaliteit, gedefinieerd als één of meerdere semen parameters die niet voldoen aan de WHO criteria. Slechte semenkwaliteit c.q. een falende spermatogenese kan zowel door exogene factoren zoals chemo- of radiotherapie, als door endogene factoren zoals genetische aandoeningen worden veroorzaakt. In de meeste gevallen is de oorzaak van de slechte semenkwaliteit onbekend, waardoor subfertiliteit van de man zelden is te behandelen. Hierdoor is tot op heden het toepassen van geassisteerde voorplantingstechnieken, zoals intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI), de enige manier om tot een zwangerschap te komen bij paren van wie de man verminderde semenkwaliteit heeft. Hoewel de huidige follow-up studies van jonge kinderen geboren na ICSI geruststellend zijn, zijn de lange termijneffecten van geassisteerde voortplanting op de gezondheid van deze kinderen onbekend.

Er zijn tot op heden maar enkele bekende genetische oorzaken van een falende spermatogenese. Deze genetische defecten zijn structurele en numerieke chromosomale afwijkingen en submicroscopische Y-chromosoom deleties. Chromosomale aandoeningen worden in ongeveer 6% van de mannen met een slechte semenkwaliteit gevonden. De frequentie van Y-chromosoom deleties in mannen met een slechte semenkwaliteit varieert tussen de 6 en 13%. Daarnaast zijn er nog enkele zeldzaam voorkomende mutaties in het *USP9Y*, *SYCP3* en *SPATA16* gen gevonden, die tot een falende spermatogenese in verder gezonde mannen leiden. Een 4-bp deletie, die exon 7 skipping in het *USP9Y* gen veroorzaakt, is gevonden in één van de 576 onderzochte infertiele mannen. De 643delA mutatie in het *SYCP3* gen werd gevonden in twee van de 77 gescreende azoosperme mannen. De azoospermie bij deze mannen werd veroorzaakt door maturatie arrest. Daarnaast is recent een casuïtische mededeling gepubliceerd die een homozygote mutatie in het *SPATA16* gen beschrijft. Deze mutatie leidde in drie aangedane broers tot globozoospermie, maar werd niet teruggevonden in 29 additioneel gescreende mannen met (partiële) globozoospermie.

In tegenstelling tot de weinige bekende genetische defecten die leiden tot een falende spermatogenese, zijn in de literatuur vele studies beschreven die een associatie claimen tussen een bepaalde genetische variant -een genetische risicofactor- en slechte semenkwaliteit. De meeste van deze beschreven genetische varianten zijn echter door slechts een enkele onderzoeksgroep bestudeerd en beschreven. Alleen de associatie tussen de verlengde CAG repeat lengte variant in het *AR* gen, de geen10/geen10 CAG repeat lengte variant in het *POLG* gen en de *gr/gr* deletie van het Y chromosoom en een falende spermatogenese zijn door meerdere onderzoeksgroepen bestudeerd, die overigens tegenstrijdige resultaten lieten zien.

Met dit proefschrift is getracht onze kennis over genetische oorzaken van een falende spermatogenese te vergroten d.m.v. het screenen op mutaties in mannen met een slechte semenkwaliteit in vier kandidaatgenen, namelijk het *HNRNP G-T*, *NALP14*, *BOULE* en *FKBP6* gen. *HNRNP G-T* en *NALP14* zijn gelokaliseerd in de chromosomale regio 11p15, die geassocieerd is met mannelijke subfertiliteit. Beide genen komen uitsluitend tot expressie in

opmaak westerveld.indd 111 15-10-2008 10:20:18

humaan testisweefsel en lijken daarom belangrijk te zijn voor spermatogenese. *BOULE* en *FKBP6* zijn meiosespecifieke genen. Van deze genen is in diermodellen aangetoond dat zij essentieel zijn voor een normale spermatogenese. Tevens hebben we drie associatie studies uitgevoerd, waarbij gekeken is naar het al dan niet bestaan van eerder beschreven associaties tussen drie genetische varianten, namelijk de verlengde CAG repeat variant in het *AR* gen, de geen10/geen10 CAG repeat lengte variant in het *POLG* gen en de *gr/gr* deletie en een falende spermatogenese.

Het doel van dit proefschrift, uiteengezet in **hoofdstuk 1**, was het beantwoorden van drie vragen.

De **hoofdstukken 2 en 3** behandelen de eerste vraag:
Veroorzaken mutaties in twee testisspecifieke genen die gelokaliseerd zijn in de chromosomale regio 11p15, namelijk HNRNP G-T en NALP14, falende spermatogenese?

Het heterogene nucleaire ribonucleoproteine G-T (*HNRNP G-T*, ook bekend als *RBMXL2*) gen is gelokaliseerd in de chromosomale regio 11p15. Deze regio is geassocieerd met mannelijke subfertiliteit. *HNRNP G-T* is lid van de grotere *hnRNP* genfamilie en komt met name tot expressie in pachytene spermatocyten en ronde spermatiden, waar het een functie lijkt te hebben in splicing en signaaltransductie.

In deze studie zochten wij naar mutaties in het *HNRNP G-T* gen die de slechte semenkwaliteit bij idiopathisch subfertiele mannen zou kunnen verklaren. Dit deden wij door middel van sequencing van het *HNRNP G-T* gen in mannen met azoospermie of ernstige oligozoospermie. Tevens werd het vóórkomen van de gevonden mutaties in de patiëntengroep vergeleken met een controlegroep van normosperme mannen.

Acht sequentie varianten werden gevonden in onze patiëntengroep, die bestond uit 153 mannen. Twee van de acht mutaties, namelijk R100H en G388del, werden niet teruggevonden in onze controlegroep van 143 normosperme mannen en zouden daarom mogelijk de oorzaak van slechte semenkwaliteit kunnen zijn. Beide mutaties werden ieder in één patiënt gevonden en beiden waren heterozygoot. De R100H mutatie was afkomstig van de moeder, het overervingpatroon van de G388del mutatie was onbekend. De R100H mutatie veroorzaakt verlies van een geconserveerd arginine. Dit aminozuur is gelokaliseerd in een zogenaamd RXRcluster, wat een veronderstelde methylatieplaats is. Verandering in de samenstelling van deze methylatieplaats door de R100H mutatie kan mogelijk leiden tot eiwitfunctie verandering van het *HNRNP G-T* gen en dientengevolge tot falende spermatogenese. Omdat wij niet beschikten over testismateriaal van de man met deze mutatie, konden wij deze hypothese helaas niet bevestigen. De G388del mutatie veroorzaakt verlies van een niet-geconserveerde glycine die gelokaliseerd is aan het einde van het eiwit, dat geen bekende eiwitfunctie heeft. Hierdoor lijkt deze mutatie minder interessant.

opmaak westerveld.indd 112 15-10-2008 10:20:18

Samenvattend kunnen wij concluderen dat mutaties in het *HNRNP G-T* gen een zeldzame oorzaak van falende spermatogenese zijn. De gevonden R100H mutatie zou zo'n mutatie kunnen zijn.

Een ander gen (*NALP14*, ook bekend als *NLRP14*) werd recent geannoteerd en gelokaliseerd in dezelfde chromosomale regio 11p15. *NALP14* ligt tussen het *ZNF214* en *HNRNP G-T* gen.

NALP14 behoort tot de NALP eiwitfamilie. Deze familie bestaat uit 14 cytoplasmatische eiwitten die gekarakteriseerd worden door een **NA**CHT, **L**RR (Leucine-Rijke-Repeat) en een **P**YD domein. Deze NALP-familie behoort tot de grotere en sterk geconserveerde CATERPILLAR familie. Omdat NALPs nog maar recent zijn beschreven, is er weinig bekend over de functie van deze eiwitten. Er wordt echter verondersteld dat ze een functie hebben in apoptose en pro-inflammatoire processen.

Met deze studie hebben we getracht te achterhalen of *NALP14* een functie heeft in normale spermatogenese en zo ja, of mutaties in dit gen kunnen leiden tot falende spermatogenese.

Om te ontdekken of *NALP14* specifiek tot expressie komt in testisweefsel, hebben we twee verschillende 'Multiple Tissue Nothern blots' gebruikt. Daarna hebben we immunohistochemische testen gedaan met anti-NALP antiserum, om zo te kunnen bepalen in welke cellen van de spermatogenese *NALP14* tot expressie komt. Tevens hebben we de expressie van beide allelen in twee verschillende SNPs (single nucleotide polymorphisms) in testisweefsel getest om te bepalen of *NALP14* een geïmprint gen is. Uiteindelijk hebben we een mutatiescreening verricht in een groep van 157 azoo- en ernstig oligozoosperme mannen d.m.v. sequencing. Onze controlegroep bestond uit 158 normosperme mannen.

NALP14 komt, net als de drie andere door ons onderzochte genen in de chromosomale regio 11p15 (*ZNF214*, *ZNF215* en *HNRNP G-T*), uitsluitend tot expressie in testis. *NALP14* komt specifiek tot expressie in ('dark') type A spermatogonia, mid en late spermatocyten en spermatiden. *NALP14* is niet geïmprint.

Met behulp van mutatiescreening werden vijf mutaties gevonden die alleen in de patiëntengroep voorkwamen. Alle mutaties waren heterozygoot. Eén van deze mutaties was een stopcodon mutatie, die leidt tot een verkort eiwit waarbij dientengevolge de functionele NACHT en LRR domeinen missen. De andere vier unieke mutaties waren alle 'missense' mutaties. Het ziekteveroorzakend effect van deze mutaties wordt mogelijk verklaard door veranderingen in de secundaire en tertiaire structuur van NALP14, waardoor het eiwit niet meer goed kan functioneren.

Samenvattend lijkt *NALP14* een goed kandidaatgen te zijn voor een falende spermatogenese, omdat dit eiwit tot expressie komt in verschillende stadia van spermatogenese en unieke mutaties gevonden werden bij mannen met een slechte semenkwaliteit. Deze unieke mutaties leiden mogelijk tot een falende spermatogenese door verstoring van de geprogrammeerde celdood in de tubuli van de testis. Er is meer onderzoek nodig naar de rol van *NALP14* in normale spermatogenese en specifiek naar het effect van de gevonden mutaties op semenkwaliteit. Zodra een muishomoloog van *NALP14* beschikbaar is, zouden testen met dit muismodel meer inzicht kunnen geven in de werkelijke functie van *NALP14*.

opmaak westerveld.indd 113 15-10-2008 10:20:19

De **hoofdstukken 4 en 5** richten zich op de tweede vraag van dit proefschrift:
Veroorzaken mutaties in twee meiosespecifieke kandidaatgenen (BOULE en FKBP6) falende spermatogenese?

BOULE is de voorouder van de *DAZ*-gen familie, bestaande uit het *DAZ* ('deleted in azoospermia'), *DAZL* ('deleted in azoospermia-like') en *BOULE* (ook bekend als *BOLL*) gen. Vele studies hebben aangetoond dat deze genfamilie belangrijk is voor (normale) spermatogenese in verschillende species, waaronder de mens. Het humane *BOULE* gen is sterk geconserveerd en is gelokaliseerd op chromosoom 2. Het komt uitsluitend tot expressie in secundaire spermatocyten en ronde spermatiden. *BOULE* is essentieel voor normale kiemcelontwikkeling. Het ontbreken van dit gen veroorzaakt in vliegen azoospermie door maturatie arrest.

In deze studie zochten we naar mutaties in het *BOULE* gen van 156 mannen met azoospermie of ernstige oligozoospermie. Dit werd gedaan met behulp van 'Denaturing High-Performance Liquid Chromotography' (WAVE). Indien een variant werd gevonden, werd het specifieke fragment gesequenced en gescreend op sequentievarianten. Van iedere in een patiënt gevonden sequentievariant, werd middels een restrictie lengte polymorfisme assay de frequentie bepaald in de controlegroep. De controlegroep bestond uit 214 normosperme mannen.

Er werden maar twee sequentievarianten gevonden. Eén missense mutatie (S9Y) werd gevonden in twee patiënten en in één controle. De tweede variant, gelegen in het 4e intron, werd gevonden in één patiënt. Beide SNPs lijken geen functionele betekenis te hebben.

Concluderend kunnen we stellen dat mutaties in het *BOULE* gen zelden vóórkomen bij patiënten met een slechte semenkwaliteit. Mogelijk komt dit doordat er een sterke selectie is tegen zulke ziekteveroorzakende mutaties. Deze hypothese wordt ondersteund door het feit dat *BOULE* een sterk geconserveerd gen is en een essentiële functie in meiose heeft.

FKBP6 is een eiwitcomponent van het synaptonemale complex, dat een essentiële functie heeft in chromosoomparing en meiotische deling. Het humane *FKBP6* gen is gelokaliseerd op chromosoom 7 en komt voornamelijk tot expressie in testis. Een nulmutatie in *Fkbp6* veroorzaakt zowel in ratten als in muizen azoospermie. Deze data suggereren dat *FKBP6* een goed kandidaatgen is voor falende spermatogenese. Wij zochten daarom naar mutaties in dit gen die kunnen leiden tot azoospermie in de mens.

Eén-en-vijftig mannen met niet-obstructieve azoospermie werden gescreend op mutaties in het *FKBP6* gen middels sequencing. Er werden geen homozygote mutaties gevonden. Wel vonden wij twee heterozygote sequentie varianten (T173T en R183C) die mogelijk de functie van het FKBP6 eiwit zouden kunnen veranderen. Deze varianten werden echter ook in de controlegroep, bestaande uit 218 normosperme mannen, gevonden en zijn daarom niet ziekteveroorzakend. Er werden nog twee andere varianten gevonden, die echter beiden niet tot een disfunctioneel eiwit zouden leiden.

opmaak westerveld.indd 114 15-10-2008 10:20:19

In een recent gepubliceerde casuïtische mededeling wordt een man met het William Beuren syndroom, dat veroorzaakt wordt door een heterozygote deletie van de chromosomale regio waarin *FKBP6* gelokaliseerd is, beschreven die op natuurlijke wijze een zwangerschap tot stand heeft gebracht. Deze casuïtische mededeling en de resultaten van onze studie suggereren dat zowel heterozygote deleties als mutaties in *FKBP6* geen azoospermie veroorzaken.

Concluderend kunnen we stellen dat heterozygote genetische varianten vóórkomen in *FKBP6*, maar dat de frequentie zeer laag is en dat deze mutaties niet leiden tot azoospermie. Mogelijk kunnen homozygote mutaties wel tot azoospermie leiden, maar deze werden niet gevonden in onze patiëntenpopulatie. Samenvattend lijken genetisch defecten in het *FKBP6* gen geen frequente oorzaak van azoospermie bij de mens te zijn.

De **hoofdstukken 6, 7 en 8** focussen op de laatste vraag:
Bestaat er een associatie tussen falende spermatogenese en de volgende genetische varianten: de verlengde CAG repeat variant in het AR gen, de geen10/geen10 CAG repeat lengte variant in het POLG gen en de gr/gr deletie?

Op grond van onderzoek bij mannen met spino bulbaire musculaire atrofie (ofwel de ziekte van Kennedy), bij wie verminderde virilisatie, slechte semenkwaliteit, testiculaire atrofie en infertiliteit wordt gezien, is gepostuleerd dat het Androgeen Receptor (*AR*) gen een kandidaatgen voor falende spermatogenese zou kunnen zijn. Mannen met de ziekte van Kennedy hebben een expansie van de CAG repeat in exon 1 van het *AR* gen van meer dan 40 kopieën. Er werd daarom in de literatuur gesuggereerd dat verlenging van deze repeat tot 40 kopieën kan leiden tot slechte semenkwaliteit in verder gezonde mannen. Pas vele jaren later werd het eerste artikel over repeat lengte verlenging bij infertiele mannen gepubliceerd. Het artikel beschrijft dat mannen met een CAG repeat lengte boven de 28 een viermaal zo hoog risico hebben op infertiliteit. Bovendien leek te gelden: des te slechter de semenkwaliteit, des te groter het aantal mannen met een langere CAG repeat. Na deze publicatie zijn er vele associatie studies over dit onderwerp gepubliceerd, met tegenstrijdige resultaten. Deze tegenstrijdige resultaten zijn meest waarschijnlijk te verklaren door verschillen in methodologie.

Door de tegenstrijdige resultaten van eerder verrichte onderzoeken en onze zorgen om de gebruikte methodologie, vonden wij het noodzakelijk het onderzoek naar de gevonden associatie tussen een verlengde CAG repeat in het *AR* gen en falende spermatogenese te herhalen in een groot cohort bestaande uit mannen met verschillende semenkwaliteit.

Zevenhonderd mannen die ons Centrum voor Voortplantingsgeneeskunde bezochten, werden, ongeacht hun semenkwaliteit, geïncludeerd. Het gemiddeld semen volume was 3,4 ml (±1,5), de mediane sperma concentratie was $48{,}5 \times 10^6$/ml (15,0-87,5), de mediane progressieve motiliteit was 33,5% (19,6-43,5), de gemiddelde normale morfologie was 37,2% (±15,7), het mediane totaal sperma aantal (TC) was $144{,}2 \times 10^6$ (42,4-281,3) en het mediane totaal motiel

opmaak westerveld.indd 115 15-10-2008 10:20:19

sperma aantal (TMC) was $46{,}9 \times 10^6$ (5,5-108,4). De gemiddelde repeat lengte was 21,5±3,1 (9-35). Het verschil in CAG repeat lengte tussen de etnische subgroepen varieerde van 19,9±3,0 (11-27) in mannen afkomstig uit Centraal Afrika tot 21,9±3,0 (12-34) in Nederlandse mannen.

De Spearman correlatie coëfficiënt, die de correlatie tussen variatie in CAG repeat lengte en de semen parameters volume, concentratie, motiliteit, morfologie, totaal sperma aantal en totaal motiel sperma aantal beschrijft, was laag voor alle semen parameters and varieerde van -0,013 voor het percentage spermatozoa met normale morfologie (p=0,613) tot 0,073 voor semen volume (p=0,057). Dit correspondeert respectievelijk met 0,02% en 0,5% verklaarde variatie.

Een sterk punt van ons onderzoek is dat we het effect van variatie in CAG repeat lengte in het *AR* gen op spermatogenese hebben onderzocht in een groot consecutief geïncludeerd cohort, dat bestaat uit subfertiele mannen met verschillende semenkwaliteiten. Eerder onderzoek had een patiënt-controle opzet en de meeste studies vergeleken de gemiddelde CAG repeat lengte bij mannen met een slechte kwaliteit met die van fertiele controles, van wie de semenkwaliteit onbekend was. De resultaten van onze studie benadrukken het belang van een correcte methodologische opzet, met name bij het opzetten van associatie studies naar falende spermatogenese. Semen productie is een kwantitatieve 'trait' en moet dan ook op die manier bestudeerd worden. Met andere woorden, bij associatie studies in ons onderzoeksveld moeten de semenparameters geanalyseerd worden als continue variabelen, en niet zoals in eerder onderzoek dichotome variabelen. De meest geschikte studie opzet bij onderzoek naar het effect van een genetische variant op spermatogenese bij subfertiele mannen is daarom screening van een groot cohort van mannen met verschillende semenkwaliteiten, gevolgd door het vergelijken van de semenkwaliteit van mannen met die specifieke genetisch variant versus mannen zonder deze variant, zoals gedaan in onze studie.

Concluderend hebben we, door middel van een cohort opzet, kunnen aantonen dat er geen enkele associatie bestaat tussen verlenging van de CAG repeat in het *AR* gen en verminderde semenkwaliteit. Screening van de CAG repeat lengte in mannen met een slechte semenkwaliteit is daarom niet zinvol.

In 2001 werd een artikel gepubliceerd dat een associatie beschreef tussen de homozygote geen10 CAG-repeat variant in het *POLG* gen en mannelijke subfertiliteit. De auteurs vonden dat (1) de frequentie van de geen10/geen10 CAG-repeat variant hoger was in mannen met een slechte semenkwaliteit in vergelijking met normosperme mannen en dat (2) de frequentie van deze variant in mannen van subfertiele koppels hoger was dan in mannen van fertiele koppels. Sindsdien zijn er meerdere patiënt-controle studies gepubliceerd die het effect van deze geen10/geen10 CAG-repeat lengte variant in *POLG* op mannelijke fertiliteit en semenkwaliteit hebben onderzocht. Helaas waren de resultaten van deze studies niet eenduidig. Mogelijk zou dit verklaard kunnen worden door de gebruikte patiënt-controle opzet, dat erg gevoelig is voor vertekening op basis van selectie. Hierdoor was op het moment dat wij onze studie initieerden de klinische betekenis van deze genetische variant onduidelijk.

opmaak westerveld.indd 116 15-10-2008 10:20:19

Het doel van onze studie was het effect van CAG-repeat lengte variatie in *POLG* op semenkwaliteit te achterhalen door middel van een genotypische in plaats van een fenotypische benadering. Hiervoor onderzochten wij de verschillen in semenkwaliteit tussen de drie *POLG* genotype-groepen in een groot consecutief geïncludeerd cohort, bestaande uit mannen met verschillende semenparameters.

Met behulp van sequencing bepaalden wij de CAG-repeat lengte van *POLG* in het al eerder gebruikte cohort van 700 subfertiele mannen. Er werden geen verschillen in semenkwaliteit tussen de drie *POLG* genotype groepen gevonden. De frequentie van de geen10/geen10 variant was 4,7%. Er werden wel frequentieverschillen tussen de etnische subgroepen gevonden; de frequentie van de homozygote geen10 CAG-repeat variant was 3,7% in Nederlandse mannen versus 11,0% in Afrikaanse mannen. Subgroepanalyse in de twee grootste etnische subgroepen (Nederlands en Afrikaans) toonde aan dat in Nederlandse mannen het *POLG* genotype geen enkele invloed had op semenkwaliteit, terwijl in Afrikaanse mannen het heterozygote genotype (10/geen10) leek te leiden tot een betere semenkwaliteit.

Het verschil in effect van de *POLG* genotypes op semenkwaliteit in de Nederlandse en Afrikaanse subgroepen is waarschijnlijk te verklaren door het relatief kleine aantal mannen in de drie genotype subgroepen van Afrikaanse mannen. Deze verschillen in frequentie tussen de etnische subgroepen illustreert het belang van een methodologisch juiste studie opzet bij het doen van associatie studies. In onze ogen is het cohort design de opzet van keuze bij het uitvoeren van een associatie studie, terwijl een case-control design de opzet van keuze is bij het uitvoeren van kandidaatgenscreening.

Uit ons onderzoek kunnen we concluderen dat de geen10/geen10 *POLG* variant niet geassocieerd is met een klinisch relevante afname in semenkwaliteit. Wij adviseren daarom om niet te screenen op variaties in CAG-repeat lengte in het *POLG* gen van mannen van subfertiel koppels.

Deleties van de *azoospermie factor a (AZFa), b (AZFb) en c* (AZFc) regio's, gelegen op het Y chromosoom, zijn bekende oorzaken van falende spermatogenese. De bij deze deleties geassocieerde fenotypes variëren van azoospermie tot ernstige oligozoospermie. Onlangs ontdekte onze onderzoeksgroep een nieuwe Y-chromosoom deletie, de zogenaamde *gr/gr* deletie, die leidt tot verlies van 50% van de genen gelegen in de *AZFc* regio. Deze deleties werden alleen gevonden in mannen met azoospermie of ernstige oligozoospermie. De gevonden associatie werd echter niet door alle daaropvolgende studies van andere researchgroepen bevestigd.

Het doel van deze studie was een beter inzicht te krijgen in het effect van de *gr/gr* deletie op semenkwaliteit. Hiervoor gebruikten wij een duale benadering. Allereerst hebben we een systematische review en meta-analyse verricht om de tot nog toe gevonden resultaten van het effect van de *gr/gr* deletie op semenkwaliteit te analyseren. Vervolgens hebben we een op genotype-gebaseerde screening uitgevoerd, waarbij we in een cohort van 1041 consecutief geïncludeerde mannen met variabele semenkwaliteiten hebben gescreend op *gr/gr* deleties.

opmaak westerveld.indd 117 15-10-2008 10:20:20

Vervolgens hebben we de semenkwaliteit van mannen met een *gr/gr* deletie vergeleken met de semenkwaliteit van mannen zonder deze deletie.

Er werden 17 relevante patiënt-controle studies gevonden, waarvan er zeven in de meta-analyse werden geïncludeerd. Het totaal aantal geïncludeerde patiënten in deze zeven studies was 1918. Daarnaast werden 1261 controles geïncludeerd. Bij 124 (6,5%) patiënten versus 34 (2,7%) controles werd een *gr/gr* deletie gevonden (OR 2,39 (95% CI 1,61 - 3,53)). In ons cohort hadden 25 (2,4%) mannen een *gr/gr* deletie. Het totaal sperma aantal (TC) bij mannen met een *gr/gr* deletie varieërde van 0 tot $321x10^6$. 32% van deze mannen had een totaal sperma aantal onder de WHO grens van normozoospermie in vergelijking met 24% van de mannen zonder een *gr/gr* deletie (range 0 - $972x10^6$). Mannen met een *gr/gr* deletie hadden een significant lagere mediane sperma concentratie ($34x10^6$/ml versus $52,7x10^6$/ml, p=0,034), totaal sperma aantal ($108x10^6$ versus $152x10^6$, p=0,012) en totaal motiel sperma aantal (TMC) ($19,6x10^6$ versus $50,1x10^6$, p=0,019) in vergelijking met mannen zonder deze deletie. Semen volume, motiliteit en morfologie verschilden niet significant.

Vervolgens hebben we het mediane totaal sperma aantal van mannen met en mannen zonder een *gr/gr* deletie uitgezet in een grafiek. De verdeling was significant verschillend (p=0,006). In de mannen met een *gr/gr* deletie kwam relatief meer azoospermie voor in vergelijking met de mannen zonder deletie (p=0,003). Omgekeerd hadden de *gr/gr*-gedeleteerde mannen geen van allen een totaal sperma aantal boven de $322x10^6$ in tegenstelling tot 23% van de niet-gedeleteerde mannen (p=0,013).

Concluderend kunnen we zeggen dat *gr/gr* deleties geassocieerd zijn met een verhoogd risico op een slechte semenkwaliteit.

opmaak westerveld.indd 118 15-10-2008 10:20:20

Conclusies

- Mutaties in twee kandidaatgenen gelegen in de chromosomaal region 11p15, *HNRNP G-T* en *NALP14*, worden gevonden in mannen met een falende spermatogenese, echter in een lage frequentie. Het blijft onzeker of deze mutaties ziekte-veroorzakend zijn, omdat testisweefsel van mannen met deze mutaties ontbreekt.
- Ondanks het feit dat de twee onderzochte meiose-specifieke kandidaatgenen *BOULE* en *FKBP6* in dieren essentieel zijn voor normale spermatogenese en mutaties in deze genen leiden tot falende spermatogenese, konden wij geen ziekte-veroorzakende mutaties vinden bij mannen met een verminderde semenkwaliteit.
- Door gebruik van een cohort opzet in plaats van de in eerdere associatie studies gebruikte patiënt-controle opzet, konden we de verlengde CAG-repeat lengte variant in het *AR* gen en de geen10/geen10 CAG-repeat lengte variant in het *POLG* gen uitsluiten als genetische risicofactoren van falende spermatogenese.
- Mannen met een *gr/gr* deletie hebben een verhoogd risico op verminderde semenkwaliteit. Deze *gr/gr* deletie is de eerst beschreven genetische risicofactor voor een falende spermatogenese.

opmaak westerveld.indd 119 15-10-2008 10:20:20

Implicaties voor toekomstig onderzoek

Het zoeken naar genetische oorzaken van falende spermatogenese is een ware uitdaging. Recent ontwikkelde genoom-wijde screeningsmethoden, zoals op microarray gebaseerde 'comparitive genomic hybridization' (microarray-CGH) en genoom-wijde 'single nucleotide polymorfisme' (SNP) methoden, stellen ons heden in staat om met hoge snelheid genoom-wijd te screenen op genetische varianten die geassocieerd zijn met een falende spermatogenese. Microarray-CGH is tevens in staat om vroeger niet detecteerbare grotere variaties in het genoom (anders dan SNPs) aan het licht te brengen. Deze variaties zijn onder andere 'copy number variations' (CNV's, ook wel bekend als 'copy-number polymorphisms' (CNP's) of 'large-scale copy-number variations' (LCV's)), inversies, deleties en andere complexe genetische veranderingen, waarvan de meesten niet gedetecteerd zouden worden met behulp van standaard cytogenetische methoden of DNA sequencing. Wij zijn daarom van mening dat genoom-wijde SNP associatie studies opgezet dienen te worden, met als doel tot dusver onbekende, met falende spermatogenese geassocieerde genetische regio's te detecteren. Het is vervolgens mogelijk om in deze chromosomale regio's kandidaatgenen te identificeren en te screenen op ziekte-veroorzakende mutaties in mannen met een falende spermatogenese.

De selectiecriteria voor het kiezen van de beste kandidaatgenen voor slechte semenkwaliteit zijn testisspecificiteit en een bewezen fenotype in een (knock-out) diermodel. De beste onderzoeksmethode voor kandidaatgenscreening is een patiënt-controle opzet. Patiënten zouden, afhankelijk van het te onderzoeken gen, mannen moeten zijn met een zeer specifiek en homogeen fenotype, zoals bijvoorbeeld azoospermie door Sertoli Cell Only (SCO) of geïsoleerde asthenozoospermie. Controles moeten mannen zijn met een uitstekende semenkwaliteit. Wat een heikel punt blijft in deze studies, is het bewijzen dat de gevonden unieke mutaties ook daadwerkelijk het fenotype veroorzaken. Idealiter zou men van iedere geïncludeerde man testisweefsel willen hebben om op eiwitniveau te kunnen bewijzen dat een specifieke mutaties leidt tot verminderde semenkwaliteit. Dit is echter om voor de hand liggende medisch-ethische redenen niet uitvoerbaar. Een andere mogelijkheid is om gebruik te maken van muismodellen. De ontwikkeling van zulke modellen is echter zeer tijdrovend en vraagt gespecialiseerd en ervaren personeel. Tenslotte zou men ook in-vitro modellen voor spermatogenese kunnen gebruiken. Helaas zijn deze in-vitro modellen tot op heden niet beschikbaar. De ontwikkeling van zulke modellen zal echter zeker bijdragen tot een beter begrip van spermatogenese in het algemeen en van verminderde semenkwaliteit in het bijzonder. Daarnaast kunnen in-vitro modellen gebruikt worden om te bepalen of een bepaalde mutatie inderdaad leidt tot het verwachte falend spermatogenese fenotype. De ontwikkeling van zo'n model is daarom essentieel in ons onderzoeksveld.

Het doen van associatie studies in een groot cohort bestaande uit mannen van subfertiele koppels met verschillende semenkwaliteiten is een andere goede optie als vervolg op de ontdekking van nieuw geassocieerde chromosomale regio's. In tegenstelling tot kandidaatgen studies, hebben associatie studies het doel om nieuwe genetische loci te detecteren

opmaak westerveld.indd 120 15-10-2008 10:20:20

die geassocieerd zijn met een bepaalde ziekte. Deze variaties zijn op zich niet (direct) ziekteveroorzakend, want ze worden zowel in patiënten als in controles gevonden, maar in deze laatste groep in een lagere frequentie. Omdat patiënt-controle studies gevoeliger zijn voor vertekening door selectie dan kandidaatgen studies, met als mogelijk gevolg het ten onrechte aantonen van een associatie (door bijvoorbeeld verschil in ethniciteit tussen de patiënten- en controlegroep), is de beste opzet voor associatie studie het cohort onderzoek waarin mannen van subfertiele koppels met verschillende semenkwaliteiten geïncludeerd worden.

Een ander belangrijk punt waar rekening mee gehouden dient te worden, is dat semen produktie een zogenaamde kwantitatieve 'trait' is. Dit heeft als gevolg dat semenparameters als continue, in plaats van dichotome, variabelen geanalyseerd dienen te worden. Bovendien moeten, om überhaupt een associatie te kunnen vinden, grote aantallen mannen geïncludeerd worden. Het benodigde aantal mannen is afhankelijk van de frequentie van de bestudeerde genetische variant en zijn penetrantie. Verder kunnen bepaalde factoren, zoals etniciteit en omgevingsfactoren, van invloed zijn op de onderzoeksresultaten. Hoewel het tot op heden onduidelijk is of en welke omgevingsfactoren van invloed zijn op semenkwaliteit, lijkt het verstandig deze variabelen wel te registreren.

Omdat falende spermatogenese waarschijnlijk een complexe aandoening is, waarin zowel genetische als omgevingsfactoren een rol spelen, zal uiteindelijk de combinatie van al deze factoren kunnen leiden tot de ontwikkeling van risicoprofielen voor slechte semenkwaliteit. Tenslotte stellen wij voor genetisch variaties die geassocieerd zijn met een falende spermatogenese, als genetische risicofactoren te benoemen.

Concluderend lijkt ons ultieme doel om te screenen op mutaties in alle genen bij een groot aantal mannen met falende spermatogenese, door de komst van nieuwe high-throughput screeningsmethoden en de kennis verkregen door het onderzoek beschreven in dit proefschrift, niet langer meer een 'mission impossible'.

opmaak westerveld.indd 121 15-10-2008 10:20:21