7 *Spermien och genetiken*

ULRIK KVIST

Spermien

Vanlig celldelning – mitos – är den överlägset mest effektiva formen av fortplantning från kvantitativ synpunkt. En encellig varelse, t.ex. en bakterie som E. coli, har en generationstid på 20 minuter och behöver under optimala betingelser endast 17 timmar för att via mitoser bilda en cellkoloni bestående av de 50 biljoner celler som bygger upp en könsmogen människa. Alla dessa bakterier blir genetiskt identiska och om betingelserna kan döda en kan alla slås ut. Hur kan vi, med en biologisk generationstid på ca 15 år, klara konkurrensen med de encelliga organismerna? Den väsentliga skillnaden är att varje flercellig individ har en helt unik uppsättning arvsmassa som skapar förutsättningen för ett eget och unikt immunförsvar riktat mot "allt främmande". Ogynnsamma betingelser kan slå ut många individer men, beroende på den genetiska variationen, inte alla.

En flercellig individ utvecklas via mitoser från en befruktad äggcell med unik arvsmassa som i sin tur härrör från två könsceller, spermie och äggcell, båda med unik arvsmassa. Den meiotiska celldelningen har möjliggjort detta, och dess slutresultat är könsceller med halverad uppsättning av arvsmassa som dessutom är unikt kombinerad.

Inför utvecklingen av flercelliga djur har således en "ny" typ av celldelning – meiosen – uppkommit. Vid sidan av mutationer, som skapar genetisk variation genom att nya gener bildas, leder meiosen till nya kombinationer av de gener som redan finns hos endera föräldern. Genom naturligt urval bland dessa nya gener och genrekombinationer fortskrider evolutionen. Spermien, vanligen försedd med en rörlig svans, är hanens transportform för den unika arvsmassan.

Spermien upptäcks

På 1670-talet byggde Leeuwenhoek sitt första mikroskop och 1678 rapporterade han om rörliga "animalculi seminales" i mannens säd. Hans inlaga startade en 150 år lång tvist mellan ovisterna, som ansåg att den nya individen härrörde helt från ägget, och animalculisterna, som ansåg att spermien var ett frö till ny individ vilket mannen sådde hos kvinnan. Ovisternas förhärskande syn konserverade barnlöshetsproblematiken till ett problem för kvinnan. Ovisterna byggde sin empiriska bevisning på bl.a. fågeläggen – däggdjursägget upptäcktes först på 1830-talet. Vår egen Linné var ovist. Mannens roll vid barnalstring bestod i att "initiera" utvecklingen hos kvinnan. Linné tolkade spermierna som parasiter med ursprung i dricksvattnet och deras sejour hos mannen var en del i deras egen reproduktionscykel.

Vid en revision av nomenklaturen gav van Baer 1827 "parasiterna" deras nuvarande namn "sädes-djur" – spermatozoer. Sex år tidigare, 1824, stod det dock klart för Dumas och Prevost att grodyngel bara kunde bildas av spermier och ägg tillsammans, och 1841 beskrev Kölliker att spermierna bildades genom celldelningar i testiklarna och att de endast fanns hos mogna och fertila handjur.

Spermien aktiverar ägget

Kontakten mellan spermiens och äggcellens cellmembraner ger en signal som aktiverar ägget. Äggcellens membran depolariseras, vilket leder till en kedja av händelser. Äggcellens membran blockeras så att ägget inte kan ta emot fler spermier (block mot polyspermi), äggets andra meiotiska delning avslutas, DNA-skador i den manliga och kvinnliga arvsmassan repareras och DNA i kromosomerna kopieras inför det befruktade äggets första mitos, som sker ungefär 24 timmar efter befruktningen.

Spermien och placentautvecklingen

För normal fosterutveckling krävs dels "normala ritningar för utvecklingen", dels tillgång till näringsämnen. Informationen för embryonalutveckling ligger inbyggd i arvsmassan. Liknande differentieringsgener har hittats hos bananfluga och människa. Näringstillförseln har lösts på olika sätt hos olika djurslag. Hos placentabärande däggdjur styr embryot utvecklingen av ett "nytt" näringsutbytesorgan – placenta – med vars hjälp näring tas från modern för den fortsatta fosterutvecklingen. De hittills okända signaler som startar utvecklingen av placenta kommer sannolikt från spermien.

Hos icke-placentabärande djur är närvaron av anlag från både hane och hona inte nödvändiga för att en frisk avkomma skall utvecklas. Hos placentabärande däggdjur blir resultatet med två äggcellskärnor endast begränsad tillväxt av embryonalvävnad och resultatet med två spermiekärnor endast tillväxt av extra embryonalvävnad (chorionvilli–placentaanlag). En ny funktion har alltså uppstått i spermier hos placentabärande däggdjur, som om skadad kan ha betydelse för utebliven implantation, avvikande placentautveckling, missfall och låg födelsevikt.

Spermien och centriolfunktionen

Centriolen är en cellorganell eller organism som lever i symbios med våra celler sedan urminnes tider (figur 7.1). Den kan bilda rörliga trådar som flimmerhår, spermiesvansar och kärnspole. Trådarna i kärnspolen fördelar arvsmassan vid mitos och meios.

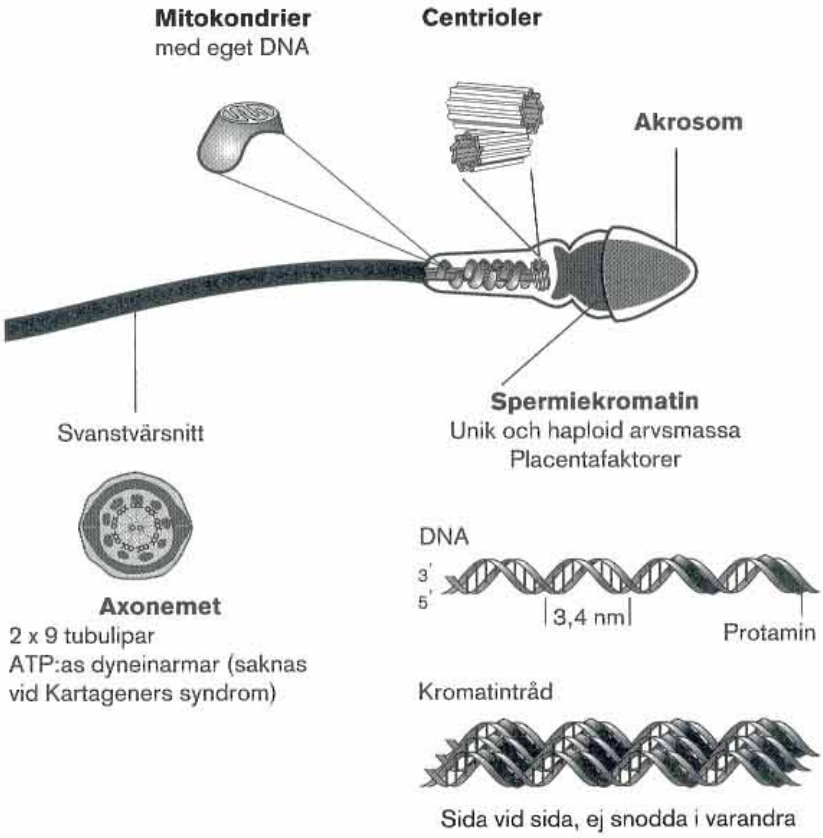
Inför celldelning bildar centriolen två dottercentrioler, som vandrar till vardera sidan av cellen. Dottercentriolerna bildar tubulintrådar, som fäster vid den s.k. kinetokoren i kromosomernas centromer. Inför celldelning kontraheras trådarna och varje centriol "drar hem" sin halva av arvsmassan. En skadad centriolfunktion leder till att fördelningen av arvsmassa till dottercellerna blir störd. De överblivna, icke uppdelade kromosomerna kan slumpvis hamna i den ena eller den andra dottercellen eller i en "tredje kärna", en s.k. mikrokärna. Resultaten blir dotterceller med för lite eller för mycket arvsmassa.

Spermien för med sig två centrioler till ägget. En av dessa har varit aktiv vid kondenseringen av spermiehuvudet och den andra har bildat spermiesvansen. Frågan om huruvida spermiens centrioler hos däggdjur deltar vid äggets första celldelning eller senare under embryonalutvecklingen är ännu inte besvarad. Hos t.ex. sjöborreembryot tycks centriolen i olika celler komma omväxlande från hane och hona.

Normal centriolfunktion behövs alltså för mitos av spermatogonier, för meios, packning av spermiearvsmassa, differentiering av spermiesvans och för utveckling av normal spermierörlighet. Kartageners syndrom (s. 74) är ett exempel på hur störd centriolfunktion leder till orörliga cilier och därmed orörliga spermier.

Spermien och mitokondrierna

Mitokondrien är ursprungligen en bakterie, med eget cirkulärt DNA, som lever i symbios med våra celler. Den mänskliga spermien har en kedja av 8–12 hopkopplade mitokondrier i sitt mellanstycke. Mitokondrierna förser sper-



Figur 7.1. Spermien.

miesvansens tubulin med ATP. Med hjälp av ett ATP:as, som finns i dyneinarmarna, frigörs energin, och tubulintrådarna i svansen "klättrar" på varandra så att svansen rörs. När spermien penetrerat ägget bryts dess mitokondrier ner. Avkommans mitokondrier härrör alltså från modern. Man har påvisat ärftliga sjukdomstillstånd som beror på mutationer i mitokondriens DNA. Dessa sjukdomar ärvs alltså från moder till både söner och döttrar. Döttrar för anlaget vidare, men ej söner. Exempel på en sådan sjukdom är Lebers optikusatrofi.

Spermien och främmande DNA

När spermien penetrerar ägget går spermiens membran samman med äggets och endast den "nakna" membranfria spermien går in i äggets cytoplasma. Det innebär att främmande DNA, som endast binder vid spermiens yta eller endast finns i omgivningen, lämnas utanför. Försök från Italien har visat att spermien dock under vissa betingelser kan ta upp (internalisera) främmande DNA och att spermien kan bära med sig detta DNA in i ägget vid penetrationen. Det finns således alltid en potentiell extra DNA-källa i spermiens omgivning (från mannen, från kvinnan, främmande DNA från virus eller bakterier). När embryologen väljer en spermie för injektion in i ägget sätts det naturliga genetiska urvalet ur spel (kapitel 12). Metodens säkerhet från genetisk synpunkt har inte till fullo dokumenterats, men används nu på barnlösa par med motiveringen att de inte har annat behandlingsalternativ. Att det naturliga urvalet sätts ur spel torde i det korta perspektivet ha få genetiska implikationer. Risken med att inducera människor med främmande DNA (humant, viralt eller bakteriellt) måste dock beaktas, speciellt då spermie och medium injiceras in i ägg.

Biologiska aspekter på spermatogenesen

I spermatogenesen ingår tre olika biologiska funktioner.

- Vid meiosen skapas den unika haploida arvsmassan – den genetiska lotten.
- Genom spermatogoniernas mitoser innan de går in i meios skapas förutsättningen för det stora antalet "genetiska lotter".
- Vid spermiogenesen genomgår cellen en metamorfos till spermie, varvid genmaterialet får sin slutliga transportform.

Faktaruta 7.1
SPERMIENS UPPGIFT

Spermiens uppgift är att:
- Aktivera äggcellen så att
  - block mot polyspermi upprättas
  - dess andra meiotiska delning avslutas
  - spermie-DNA kan repareras och
  - paternella och maternella kromosomer kopieras och kondenseras till metafaskromosomer inför den första mitosen.
- Avge unik, haploid arvsmassa till ägget, som därmed befruktas och en zygot uppkommer.
- Avlämna en centriol (?) som möjliggör zygotens vidare mitotiska celldelningar.
- Avge faktorer (DNA? mRNA? annat?) för differentiering av placenta.

Unik haploid arvsmassa – meios

Arvsmassans kopiering liksom genutbytet sker före den första meiotiska delningen. Liksom i somatiska celler som står inför mitos består arvsmassan i den primära spermatocyten av 46 kromosomer, var och en bestående av två identiska kopior (2 kromatider). Kromosomerna 1–23 från fadern ställs upp bredvid kromosomerna 1–23 från modern, och intilliggande kromatider från far och mor paras exakt, ända ned på molekylär nivå, och hålls ihop av ett protein – "blixtlås" – synaptonemalkomplexet. Man får 23 s.k. bivalenter. De intilliggande kromatiderna byter genstrukturer med varandra. En s.k. rekombinationsknuta kan ses i komplexet efter crossing over. När kromosomerna sedan skiljs från varandra hänger de överkorsade delarna ihop något. Sådant kors benämns *chiasma*. Hos mannen har man observerat i genomsnitt 50 chiasmata, vilket innebär att man har drygt två genutbyten per kromosompar.

Om vi antar att minst ett genutbyte sker per kromosompar blir utfallet 4 kromatider med olika gensammansättning per kromosompar. Fördelningen av de totalt 4×23 kromatiderna sker i två steg. I steg 1, dvs. i den första meiotiska delningen, fördelas en kromosom från varje par i en av två sekundära spermatocyter. Direkt därefter följer den andra meiotiska delningen då kromatiderna i varje kromosom delas upp så att dottercellerna, de runda spermatiderna, får var sin unik kromatid. Då varje meios alltså resulterar i fyra olika celler och kromatider från totalt 23 kromosompar fördelas kommer arvsmassan i en spermatid att utgöra en kombination av totalt 4^{23} (= 1: 70×10^{12} = en av 70 biljoner) olika möjligheter.

Den genetiska variationsförmågan är lika stor hos kvinnan som hos mannen, dvs. en på 70 biljoner möjligheter, men kvinnan avger normalt en enda genetisk lott. Den befruktade äggcellen kommer därför att vara en genetisk kombination av totalt $4\,900 \times 10^{24}$ möjligheter. Mannens kromosomuppsättning är normalt 46,XY, varför hälften av spermierna normalt får kromosomuppsättning 23,X och hälften 23,Y.

Efter den första meiotiska delningen har de olika stadierna av könsceller (sekundära spermatocyter, spermatider och spermier) ett genetiskt innehåll som avviker från kroppens övriga celler. Dessa "kroppsfrämmande" celler måste skyddas från immunologisk destruktion. I tubuli seminiferi bidrar blod–testisbarriären till detta skydd (kapitel 1.) Hur resten av de manliga genitalorganen normalt skyddar spermierna från det immunologiska systemet är inte känt.

Antalet spermier

Hos t.ex. broskfiskar sker hela spermieproduktionen i cystor bestående av en Sertolicell och ett spermatogonium som ger upphov till totalt 64 spermier. Hos däggdjuren har cystorna differentierats till kanaler, tubuli seminiferi, men man kan fortfarande utgå från att den funktionella spermieproducerande enheten i testikeln utgörs av en Sertolicell med ett spermatogonium. Ju fler primära spermatocyter som bildas från spermatogonien innan meiosen sätter i gång (spermatocytogenes), desto fler spermier kan produceras totalt. Det maximala antalet spermier som kan bildas per viss tid bestäms således av antalet funktionella enheter (Sertolicell–spermatogonium), vilket normalt är proportionellt mot testikelstorleken, och antalet proliferativa mitoser som ett spermatogonium genomgår (spermatocytogenesen). Från ett spermatogonium bildas hos människa normalt en klon av 64 primärspermatocyter, vilket i sin tur kan ge upphov till 256 spermier. Hela "klonen" hålls samman med cytoplasmabryggor under hela utvecklingen och "försörjs" av sin egen Sertolicell.

Proliferationen av Sertoliceller sker tidigt i fosterutvecklingen; den är beroende av FSH-stimulering och hämmas av östrogenpåverkan. Användningen av östrogener inom medicin och "animalieproduktion" har ökat de senaste 50 åren. Ökad östrogenexposition skulle kunna vara en förklaring till att fertila mäns ejakulat nu tycks innehålla färre spermier än för 50 år sedan.

Optimalt antal spermier

Antalet spermier kan ses som ett uttryck för den genetiska variationsförmågan. För detta talar att antalet bildade spermier per bildat ägg står i relation till antalet crossing over hos arten. Varför bildar då kvinnan endast ett ägg medan mannen producerar flera miljarder spermier per månad? Det är uppenbart att evolutionen från yttre till inre befruktning och övergången till placentabärande djur har inneburit att honor selekterats att producera färre ägg. Honan har ju inte kapacitet att bära mer än ett fåtal foster samtidigt. Motsvarande selektionstryck finns inte på den manliga sidan. Det är "billigt" att producera spermier och det finns ingen begränsning för mannen att ge ut en mångfald genetiska lotter genom spermiebildning. Antalet spermier kan dock hos olika arter vara utsatt för olika selektionstryck beroende dels på konkurrens mellan hanar om honor (ägg), dels på kvinnliga genitaliaas uppbyggnad, där förluster i de kvinnliga gångsystemen kan selektera för ett ökat spermieantal.

Varför når bara ett fåtal spermier äggledarna?

Efter samlag kommer endast några hundratal spermier fram till äggledarna. Därför uppstår frågan om dessa är utvalda redan i ejakulatet eller om det sker en selektion hos honan. Om det i ejakulatet bara finns ett fåtal "utvalda" spermier som klarar uppgiften – en på miljonen – skulle nuvarande spermaanalyser vara rätt meningslösa – vi har i så fall studerat fel spermier. Ett sådant urval av spermier finns hos vissa insekter med inre befruktning. De bildar ett fåtal s.k. euspermier för befruktningen, medan flertalet, s.k. paraspermier, saknar fullständig arvsmassa och stannar i honans nedre genitalia.

Idén att bara de bästa och snabbaste spermierna tar sig fram tycks ha flest förespråkare, men detta löser inte det fundamentala problemet varför så få når äggledarna. En möjlig förklaring är att kvinnan aktivt väljer bort de flesta spermierna. Spermier är för kvinnan artfrämmande "parasiter" och bör i princip alltid angripas. Kan det vara så att kvinnans försvarssystem inte riktigt hinner med så att i varje fall några hundratal snabba och välformade spermier hinner nå en immunologiskt privilegierad miljö i äggledarna eller bland cellerna i cumulus oophorus innan hennes skydd mot "mikroorganismer" slår till. För detta talar att de nedre delarna av kvinnliga genitalia invaderas av leukocyter efter samlag.

Omvandling till spermie – spermiogenes

Spermiogenesen innebär en metamorfos, varvid det unika haploida genomet förpackas och förbereds för transport. Vid differentieringen från rund spermatid till färdig spermie inaktiveras DNA, RNA-kopiering avstannar och onödig barlast, som reparationsenzymer för DNA-skador, elimineras. Här behandlas endast de aspekter av spermiogenesen som berör arvsmassan. (Se i övrigt spermiogenesen i kapitel 1.)

Förpackning av spermiens arvsmassa

Spermiens arvsmassa har lång väg till ägget och den måste göras oåtkomlig för skador under färden men ändå vara lättillgänglig vid framkomsten.

I somatiska celler förpackas DNA med histoner. Volymen av den haploida DNA-spiralen enbart, utan histoner, motsvarar spermiehuvudets volym. De ämnen som stabiliserar och förpackar DNA i spermiehuvudet måste därför rymmas inom själva DNA-spiralen. Under differentieringen från rund till avlång spermatid ersätts de somatiska histonerna efter hand med protaminer, vilka tillsammans med DNA utgör spermiekromatinet.

Protaminerna är korta proteiner uppbyggda av ca 50 aminosyror, som innehåller rikligt med den basiska aminosyran arginin, zinkbindande histidin och svavelrikt, tillika zinkbindande cystein. Protaminmolekylerna binds ihop till långa strängar som viras in i själva DNA-dubbelspiralen. Denna förpackas alltså som långa rep, där två kardeler utgörs av DNA-dubbelspiralen och den tredje av hopkopplade protaminmolekyler. Protaminet "neutraliserar" DNA-molekylens negativa laddningar och DNA-protaminrepen kan då packas tätt intill varandra i en nära nog vattenfri kristallik struktur. Protaminrepen hålls samman med hjälp av bindningar mellan svavelrika cystein- och histidingrupper, och saltbryggor med zink eller svavelbryggor antas spela en viktig roll för att stabilisera strukturen.

Skador på spermiens arvsmassa

Överföringen av spermier från mannen till kvinnan innebär en viss risk för att arvsmassan skadas. Hos de arter som studerats överförs spermierna från hane till hona i en zinkrik miljö. Vid ejakulationen slungas hos människan spermier ut med zinkrikt prostatasekret mot cervixsekretet. Spermier som i stället slungas ut med sädesblåsesekret förlorar zink i spermiekromatinet och spermiekärnan luckras upp partiellt. Hos oförklarligt barnlösa män ses ofta låga zinknivåer i spermiekromatinet och nedsatt kromatinstabilitet, som antyder en avvikande ejakulationssekvens. Det är sannolikt att en sådan zinkbristbetingad uppluckring av spermiekromatinet med ökat vatteninnehåll som följd kan öka risken för skador på arvsmassan och därmed nedsätta mannens fruktsamhet.

När arvsmassan kondenseras gör spermien sig av med de reparationsenzymer som alla celler, även äggcellen, normalt har för reparation av skador i arvsmassan. Dels kan enskilda baser i den genetiska koden skadas, dels kan brott uppkomma på den ena eller båda DNA-molekylerna i dubbelspiralen. Detta innebär att eventuella skador som uppstår i spermiens DNA inte kan repareras av spermien själv. Trots att reparationsenzymer saknas är spermiens kärna förhållandevis okänslig för strålning och effekter av olika mutagena, DNA-skadande ämnen. Detta beror troligen på att den kristallina struktur som protaminerna erbjuder DNA-molekylen är nära nog vattenfri. Omkring 90% av skadeverkningarna vid röntgenbestrålning orsakas av syreradikaler som röntgenbestrålningen "slår loss" ur vatten.

Faktaruta 7.2
SKADOR PÅ SPERMIENS ARVSMASSA

Spermien är den enda cell som saknar reparationsenzymer för DNA-skador – ökad risk för skada torde föreligga om

- kromatinstabiliteten är nedsatt till följd av
  - defekta packningsprotaminer
  - zinkbrist vid felaktig ejakulationssekvens
- spermien åldrats
  - i mannens avförande gångsystem (lång väntan på ejakulation)
  - in vitro, i avvaktan på senare insemination
  - i kvinnan i väntan på ovulation.

Effekter av skador på spermiens DNA

Spermien kan överföra en skadad arvsmassa till ägget (faktaruta 7.2). Skadorna kan uppstå dels under spermatogenesen i testiklarna, dels under lagringen och transporten i både manliga och kvinnliga genitalia. Spermier som "åldrats" på vägen kan ge upphov till avvikande arvsmassa i den befruktade äggcellen och ökad frekvens av tidiga embryonala förluster. Hos människa ser man en ökad frekvens missfall i de fall spermien fått vänta i kvinnliga genitalia mer än två dygn före ägglossningen. Normalt kan spermier lagras 7–10 dagar i bitestikeln. Därefter ser man embryonalförluster i ökande frekvens. Hos mushanar har man hindrat nyproducerade spermier att nå spermiedepån i bitestikeln och vid kopulation kunde därför endast "gamla" spermier från denna depå rekryteras. Hanarna fick kopulera dagligen med honor, och frekvensen kromosomavvikelser ökade redan sex dagar efter det att tillförseln av nyproducerade spermier från testikeln stoppats.

Generellt gäller att ju längre tid spermier lagras, desto större risk för skada. Normalt har naturen minimerat denna väntetid: de neurohormonella signaler som leder till ägglossning ger också signaler från hona till hane, och hos de flesta djur är såväl coitusfrekvens som samordning av coitus och ägglossning optimal. Här torde människan utgöra ett undantag. Man kan anta att samordning mellan ägglossning och coitus är extra viktig för att bevara spermie-DNA intakt, i de fall förhållandena för spermielagring hos man och kvinna inte är optimala. Skador i spermie-DNA blir bestående om de repareras ofullständigt eller felaktigt i äggcellen.

Faktaruta 7.3
REPARATION AV SKADOR I SPERMIENS ARVSMASSA

DNA-skador kan repareras fullständigt, ofullständigt eller felaktigt av äggets reparationsenzymer:

- repareras de i ägget uppstår ingen skada
- repareras de i ägget men felaktigt, erhålles bestående skada
- repareras de inte alls uppstår bestående skada.

Genetiken

Kromosomer och kromosomanalys

Människans DNA är fördelat på 46 DNA-molekyler, och inför celldelning (mitos eller meios) kopieras DNA-slingorna och kondenseras till kortare strukturer som kan ses i mikroskop – kromosomer. Kromosomerna indelades ursprungligen i 22 par, numrerade efter storlek från 1–22 (44 autosomer) och två olika och "obekanta" som betecknades med X och Y. När dessa könskromosomer senare identifierades fick de behålla sina ursprungsbeteckningar. Kvinnan har två X-kromosomer och mannen en X- och en Y-kromosom.

Beroende på centromerens läge i mitten, vid sidan av mitten och längst ut, indelas kromosomer i metacentriska, submetacentriska och akrocentriska. Med hjälp av s.k. bandningsteknik eller kromosomspecifika fluorescerande prober kan kromosomerna identifieras. För sedvanlig kromosomanalys krävs att cellerna är

i delning. Kromosomanalys kan göras på lymfocyter i perifert blod. Blod, taget i heparinrör, blandas med odlingsmedium och cellerna stimuleras till mitos. Före skörd av celler behandlas de med kolchicin, som förstör centriolernas kärnspole. Celldelningen avstannar då och man sprider ut de icke-separerade kromosomerna på objektglas. Efter färgning analyseras preparaten. Från snabbt växande vävnad, t.ex. benmärg, chorionvilli och testiklar, är antalet celler i delning så stort att preparat för kromosomanalys kan göras direkt utan odling. I preparat från testikelbiopsi kan dessutom de meiotiska synaptonemalkomplexen studeras.

Inaktivering av X-kromosomen

För normal meios krävs att mannens enda X-kromosom inaktiveras. Hos kvinnor är bara den ena X-kromosomen aktiv och den andra, den inaktiverade, kan ses som en "färgad prick" – könskromatin – i cellerna. I kvinnans somatiska celler är det slumpvis X-kromosomen från fadern eller modern som är aktiv. I extraembryonal vävnad är det framför allt X-kromosomen från pappan som inaktiveras. Även den inaktiva X-kromosomen har i ena ändan en aktiv del.

Kromosomavvikelser

Kromosomavvikelser kan ha en avgörande betydelse för mannens fortplantningsförmåga. Man skiljer på numeriska och strukturella avvikelser. Det är även praktiskt att skilja på de fall då mannen har nedsatt fertilitet till följd av kromosomavvikelse (diagnostiseras som kromosomavvikelse i perifert blod från mannen) och de fall då avkomman (embryot–fostret–barnet) fått en avvikelse till följd av skador i spermiens DNA (diagnostiseras hos avkomman).

Kromosomavvikelser hos mannen

Konstitutionella kromosomavvikelser, dvs. avvikelser i alla celler, förekommer i en frekvens av 2–9% hos barnlösa män medan frekvensen hos barnlösa kvinnor endast är 0,6%, vilket inte är klart förhöjt jämfört med frekvensen hos nyfödda. En konstitutionell kromosomavvikelse hos mannen kan ge nedsatt fertilitet, men den kliniska bilden visar mycket stora variationer, från uppenbart störd manlig könsutveckling till störd spermiebildning eller enbart nedsatt fruktsamhet beroende på avvikelser i spermiens arvsmassa.

Kromosomavvikelser hos avkomman

Avvikelser i avkommans arvsmassa kan bero antingen på konstitutionell avvikelse hos mannen eller på skador i det manliga genomet orsakade under spermiebildningen i testikeln, under spermiens transport till ägget eller efter befruktningen i ägget. Dessa skador kan yttra sig på olika sätt. Är skadan funktionellt stor dör den befruktade äggcellen, blastocyten eller embryot tidigt, innan graviditet kan konstateras. Är skadan mindre kan embryot leva vidare en tid, och skadan yttrar sig senare som tidigt eller sent missfall. Är skadan funktionellt liten kan barnet födas med medfödd kromosomavvikelse som kan yttra sig som missbildning och eller påverkad somatisk eller psykisk utveckling. I vissa fall påverkas inte barnets första utveckling, utan skadan uppenbaras sent i form av påverkad pubertetsutveckling eller endast som nedsatt fertilitet när barnet vuxit upp.

Numeriska kromosomavvikelser

Numeriska kromosomavvikelser hos mannen

Med numeriska avvikelser menas att kromosomantalet avviker från det normala antalet, 46 (tabell 7.1). De numeriska avvikelser som påverkar mannens fertilitet är framför allt extra X-kromosom(er). Det förekommer även fall

Tabell 7.1. Frekvens av kromosomavvikelser hos nyfödda.

Numeriska avvikelser	
Trisomi 21	0,1 %
Trisomi 13, 18, 8	0,02 %
Könskromosomavvikelse hos pojkar	
47,XXY	0,09 %
47,XYY	0,10 %
Strukturella avvikelser (pojkar och flickor)	0,24 %
Kromosomavvikelser	
– hos barnlösa män	2–9 %
– hos barnlösa kvinnor	0,6 %
– hos mannen eller kvinnan som fått två eller fler missfall, oavsett antal normala graviditeter	7 %

med en extra Y-kromsom, men detta har inte visats påverka fertiliteten. Incidensen av könskromosomavvikelse hos nyfödda pojkar är 0,26%, frekvensen med 47,XXY (Klinefelters syndrom) uppgår till 0,09% och frekvensen 47, XYY till 0,10%.

Klinefelters syndrom (47, XXY)

Män med Klinefelters syndrom har azoospermi till följd av en fullständigt hämmad spermatogenes. I vuxen ålder är testiklarna små (5 mL eller mindre) och tubuli seminiferi är tillbakabildade och tomma på celler (hyaliniserade). FSH är regelmässigt förhöjt eftersom feedback av inhibin saknas (kapitel 3). Leydigcellernas testosteronproduktion varierar kraftigt från fall till fall, och männen har ofta behov av extra tillförsel av testosteron. Hos män med två eller tre extra X-kromosomer (48,XXXY, 49,XXXXY) är de somatiska symtomen än mer uttalade än hos Klinefelterpatienten.

Numeriska avvikelser hos avkomman

Den normala kromosomuppsättningen är diploid (2n = 46 kromosomer), och haploida individer (1n = 23 kromosomer) förekommer inte hos människa. Den haploida arvsmassan i en spermie kan dock fördubblas (kopieras) i ägget om spermien befruktar ett ägg utan funktionell kärna. Detta är den vanligaste orsaken till uppkomst av druvbörd (mola hydatidosa). Arvsmassan vid druvbörd har alltså uppsättningen 46,XX och båda X-kromosomerna kommer från fadern. Avvikelsen 46,YY har aldrig rapporterats.

Flertalet fall av triploidi (3n = 69 kromosomer) går bort som missfall, och i de fall barnet föds är det gravt skadat och dör snart efter födelsen. Den vanligaste orsaken till triploidi är att två spermier befruktar samma ägg, och moderkakan uppvisar ofta molaliknande förändringar. Triploidi kan även uppkomma om äggets första eller andra meiotiska delning uteblir. Bland missfall har även tetraploidi (4n = 96 kromosomer) beroende på trispermi beskrivits.

Aneuplodi innebär att individen saknar en eller flera kromosomer eller har en eller flera kromosomer för mycket. Saknas en kromosom kallas detta monosomi och finns en för mycket kallas det trisomi. Med undantag av Turners syndrom (45,X) är monosomier mycket ovanliga hos människa.

Trisomier är vanligare och hos levande födda förekommer trisomi 8, 13, 18 och 21. Endast individer med trisomi 21, Downs syndrom, når reproduktiv ålder. Flertalet embryon med trisomi, inklusive trisomi 21, förloras dock som missfall. Hos djur har man sett ökad frekvens trisomi då befruktning skett med åldrade spermier genom att tillförseln av färska spermier stängts av med ligatur av bitestikeln. Risken för trisomi 21 ökar med kvinnans ålder och ökad ålder hos mannen har en additativ effekt till denna risk.

Huvudorsak till aneuploidi hos födda barn anges vara felaktig fördelning av kromosomer vid meiosen i testikeln eller ovariet eller vid äggets första celldelningar. Detta kan bero på att kromosomerna aldrig paras eller på felaktig centriolfunktion – skada på kärnspolen. En kromosomkopia som inte aktivt "tas hem" till endera sidan vid celldelning kommer slumpvis

Faktaruta 7.4
TÄNKBARA UTFALL VID BESTÅENDE SKADA I SPERMIEARVSMASSAN

Stor skada
- tidig embryonaldöd – ingen implantation – normal menstruation
- tidig postimplantationsdöd – ingen känd graviditet – normal menstruation, ingen mensstruations förskjutning
- tidig postimplantationsdöd – ingen klinisk graviditet men eventuellt positivt graviditetstest och fördröjd menstruation
- tidig postimplantationsdöd – klinisk graviditet och tidigt missfall
- embryonal död/ fosterdöd – tidigt eller sent missfall
- dödfött barn, med eller utan missbildning/ kromosomavvikelse
- levande barn med kromosomavvikelse och missbildning eller störd psykosomatisk utveckling
- levande barn med kromosomavvikelse utan missbildning men med störd pubertetsutveckling
- levande, friskt barn med balanserad kromosomavvikelse, således normal utveckling och pubertet, men nedsatt framtida fertilitet (störd spermiebildning eller äggproduktion på grund av avvikande arvsmassa i gameterna).

Ingen skada
- helt friskt barn.

att hamna i den ena eller andra dottercellen och resultatet blir en dottercell med trisomi och en med monosomi.

Inte lika uppmärksammade är de fel som kan uppstå vid det befruktade äggets första delningar. Sker feldelning av en kromosom vid t.ex. den första mitotiska delningen blir resultatet två celler, en med för mycket och en med för lite arvsmassa. Dottercellen med monosomi (45 kromosomer) går vanligtvis under, medan cellen med trisomi, 47 kromosomer, kan utvecklas vidare. Om feldelning sker vid ett senare tillfälle kan individen förutom den normala cellinjen med 46 kromosomer få en extra cellinje med 47 kromosomer. Individen får därför en blandning – mosaik – vad gäller kromosomuppsättningen (46/47).

Trisomi kan även orsakas av att en kromosom kopierats en extra gång. Inför den första celldelningen efter befruktningen kopieras (dupliceras) såväl kromosomerna från mannen som från kvinnan. Om de stoppsignaler som normalt stänger av kopieringen inte fungerar kan denna fortsätta och individen kan teoretiskt få extra kopior av antingen moderns eller faderns kromosomer.

Mosaicism och chimärism

Vid mosaicism har individen två eller fler cellinjer som utgår från samma zygot. Orsaken är felseparation av kromosomer under zygotens tidiga celldelningar (se ovan).

Ibland kan det inträffa att såväl äggcell som polkropp befruktas av var sin spermie och att de båda befruktade cellerna utvecklas till *en* individ. Denna individ består egentligen av två olika individer och utgör en s.k. chimär (chimärism).

Strukturella kromosomavvikelser

Till strukturella avvikelser räknas *deletioner* (kromosombrott som lett till att en del av en kromosom förlorats), *duplikationer* (kromosombrott som felreparerats med en extra kopia av kromosomfragmentet), "fragile sites" (platser där en kromosom lätt går av; de består av upprepade DNA-sekvenser som kan bli allt längre för varje generation), *inversioner* (kromosombrott som reparerats fel – biten har vänts), *translokationer* (kromosombrott i flera kromosomer som reparerats fel genom att de olika bitarna läkt fast vid fel kromosom). Dessa felreparationer kan ske i ägget efter befruktningen.

Hos undersökta levande individer är omkring 80% av avvikelserna balanserade, dvs. avsak-

nad av arvsmassa kan inte påvisas, medan 20% är obalanserade, dvs. har för lite eller för mycket arvsmassa.

Män med deletioner på Y-kromosomen och män med balanserade inversioner och translokationer kan ha nedsatt fruktsamhet. Män med obalanserade avvikelser på andra kromosomer kan ha en påverkan på fertiliteten, men de har som regel en påverkad psykosomatisk utveckling och ses sällan på barnlöshetsmottagningen.

Deletioner på Y-kromosomen

Sedan 1976 är det känt att azoospermi och oligozoospermi förekommer hos patienter med deletion på den långa armen på Y-kromosomen (Yq). För närvarande kan endast större deletioner som ger synliga förändringar på Y-kromosomens långa arm diagnostiseras med sedvanlig kromosomanalys. Det aktuella genområdet, som innehåller sju upprepade gener – konserverade från bananfluga till människa – ligger i området Yq11.22–23 på vanliga bandfärgade metafaskromosomer. Med DNA-teknik har mikrodeletioner påvisats i denna region hos infertila män där den vanliga kromosomanalysen inte räckt till för att påvisa deletionen.

Män med Yq11-deletioner kan ha hypoplastiska testiklar, vissa är kortvuxna, deras LH-värden kan vara normala eller lätt förhöjda, testosteronvärdena kan vara normala medan FSH-värdena som regel är kraftigt förhöjda.

Testikelbiopsi visar stopp (arrest) i utvecklingen på spermatogonienivå (störd spermatocytogenes), tidig spermatocytnivå eller komplett avsaknad av könsceller, s.k. Sertolicell only syndrome. Tubulär fibroskleros (hyalin skleros = helt acellulära tubuli) ses ofta.

Kromosomanalys kan visa normal karyotyp 46,XY; brott på långa Y-armen (46,XYq), dicentrisk Y-kromosom (46,XYnf) eller fullständig avsaknad av Y-kromosomen (45,X). De senare (45,X) är till skillnad från kvinnor med Turners syndrom (45,X) fenotypiskt män. Sannolikt finns i dessa fall resterande Y-material translokerat till annan kromosom. Vid sidan av sedvanlig kromosomanalys torde DNA-teknik komma att utvecklas till en kliniskt användbar metod för att tidigt i barnlöshetsutredningen urskilja de män där azoospermi beror på mikrodeletion på Y-kromosomen; därmed kan de besparas verkningslös hormonterapi.

Reciproka translokationer

Reciproka translokationer ger problem med kromosomparning och fördelning av kromosomer vid meios. Vid en balanserad translokation där arvsmassa från en kromosom bytt plats med arvsmassa på en annan kromosom involveras totalt fyra kromosomer vid kromosomparningen inför meios. Härvid kan parningen bli felaktig så att meiosen fördröjs eller stannar upp, vilket kan yttra sig som oligozoospermi eller azoospermi. Även fördelningen av arvsmassa kan gå fel. Celler som utvecklas vidare kan bli spermier innehållande antingen normal arvsmassa, avvikande men balanserad arvsmassa eller avvikande obalanserad arvsmassa (för lite eller för mycket arvsmassa). Detta kan sedan yttra sig som utebliven graviditet (tidig embryonal död), missfall eller barn med obalanserad eller balanserad kromosomavvikelse.

Eftersom de reciproka translokationerna kan involvera kromosomfragment av olika betydelse på olika kromosomer är det svårt att förutsäga vilken effekt en translokation har på bärarens fertilitet. Eftersom graden av obalans i könsceller varierar kan man förvänta sig att bäraren ibland förblir barnlös, ibland löper ökad risk att ge upphov till missfall eller missbildade barn och ibland har en till synes normal fruktsamhet och får friska barn.

Risken för en man eller kvinna med reciprok translokation att ge upphov till missfall eller missbildade barn uppgår till 10–15%, men variationen är stor. Varje familj med känd translokation (eller inversion) bör därför utredas noggrant med kromosomanalys och fertilitetsanamnes. Vad som skett tidigare i familjen är den bästa indikatorn för framtida fertilitet.

Robertsonska translokationer

Kromosomerna 13, 14, 15, 21, 22 är akrocentriska och om de växer samman i centromerregionen kallas detta Robertsonsk translokation. Antag att en individ har en Robertsonsk translokation mellan en kromosom 14 och 21, 14:21. Då denna kromosom 14 fördelas vid meios får man så att säga på köpet med en kromosom 21. Om den andra kromosom 21 fördelas till samma blivande dottercell blir resultatet en könscell med en kromosom 14:21 och en extra kromosom 21, medan den andra könscellen kommer att sakna kromosom 21. Kvinnor med en Robertsonsk translokation har en risk av 10–15% att avkomman skall få en obalanserad kromosomuppsättning, medan risken för män är mindre än 1%. Å andra sidan tycks män med Robertsonsk translokation oftare förbli barnlösa. Detta måste innebära antingen att spermiebildningen påverkats eller att embryon med obalanserad arvsmassa från mannen oftare går förlorade tidigt i graviditeten med fortsatt barnlöshet som följd.

En man med Robertsonsk translokation uppvisar således nedsatt fertilitet och skulle graviditet inträffa finns en risk på 1% att avkomman har en avvikande kromosomuppsättning. Fosterdiagnostik kan komma ifråga om patienten så önskar.

Inversioner

Man skiljer på pericentrisk och paracentrisk inversion. Vid pericentrisk inversion innehåller den inverterade kromosomdelen även centromeren. Om brottpunkterna inte ligger mitt i en gen ger inversionen normalt inga kliniska manifestationer. Problem uppstår dock vid parning och genutbyte, crossing over inför den första meiotiska delningen. Om ett genutbyte sker i den inverterade delen kommer kromosomerna att få för lite eller för mycket arvsmassa. Crossing over tycks dock inte ske helt slumpmässigt, och sannolikheten för att få spermier med obalanserad kromosomuppsättning beror därför på om det inverterade segmentet ligger i ett område med hög crossing over-frekvens. Man kan därför säga att om ett stort inverterat segment ligger i ett område med hög crossing over-frekvens är risken stor för att könscellerna skall få obalanserad arvsmassa. Den genomsnittliga risken för en inversionsbärare att få avkomma med obalanserad kromosomuppsättning uppgår till 2–4%, men eftersom variationen är stor mellan olika inversioner gäller även här att en noggrann familjeutredning med fertilitetsanamnes, och kromosomanalys är bästa indikatorn för framtida fertilitet. Är individen den första i sin släkt som har inversionen kan inga precisa förutsägelser ges. Har paret långvarig infertilitet eller upprepade missfall är det sannolikt att inversionen är en orsakande faktor. Skulle graviditet inträffa finns risk för obalanserad kromosomuppsättning hos avkomman. Paret bör informeras om detta och om möjligheter till fosterdiagnostik.

Monogena avvikelser – mutationer

Mutationer, dvs. bestående förändringar i arvsmassan, kan uppstå vid felreparation av skadat DNA och vid fel vid kopieringen av DNA (replikationsfel). Drabbar mutationen arvsmassan i en befruktande spermie kan mutationen få betydelse för avkomman. Mutationer är betydelsefulla då de i ett längre tidsperspektiv utgör underlag för selektion och därmed underlag för människans evolution. Om en mutation i spermien medför en defekt funktion i en gen kan motsvarande gen ärvd från modern täcka denna brist och individen kan bli helt symtomfri. Det nya anlaget betecknas då som recessivt. Om mutationen skapar ett anlag som slår igenom på fenotypen är anlaget dominant. Mutationsfrekvensen för anlag som ger kända dominanta sjukdomar är 1 på 10 000 till 1 på miljonen. För varje känd dominant sjukdom kan vi alltså anta att av spermaprovets 100 miljoner spermier finns det 100–100 000 spermier som genom ny mutation fått det aktuella dominanta sjukdomsanlaget.

Risk för mutation i mannens spermatogoniereserv, spermatogenesens stamceller, ökar med mannens ålder, och redan efter 35 års ålder kan en ökad frekvens dominanta sjukdomar ses hos avkomman. Stamcellerna genomgår omkring tjugo celldelningar per år, och vid 35 års ålder, dvs. ungefär tjugo år efter puberteten, har de genomgått 400 celldelningar, var och en med en risk för felreplikation.

Bland monogena tillstånd med effekt på mannens fruktsamhet finns bl.a. mutationer i gener för androgenreceptorn, mutationer i gener för testosteronsyntes och defekt androgenmetabolism (5α-reduktasbrist, kapitel 3), cystisk fibros (defekt funktion i cellmembranens kloridtransportsystem förenad med agenesi/atrofi av Wolffska gångsystemet) och Kartageners syndrom (defekt i cilierörlighet – orörliga spermiesvansar).

Androgenreceptorn och androgenokänslighet

Androgenokänslighetssyndrom visar stor klinisk variation i allvarlighet och kliniskt uttryck. Patienten har en normal 46, XY-karyotyp men kan uppvisa tecken på undervirilisering. De allvarligast drabbade får en helt kvinnlig fenotyp (tidigare kallad testikulär feminisering), andra uppvisar ofullständig virilisering med hypospadi, gynekomasti, små testiklar och nedsatt kroppsbehåring.

Agenesi av Wolffska gångsystemet och cystisk fibros

Män med agenesi eller atrofi av Wolffska gångsystemet (bitestikel, vas deferens och sädesblåsor) har ofta cystisk fibros, som karakteriseras av patologiskt kloridsvett-test. Spermaprovet har ringa volym, innehåller huvudsakligen surt och zinkrikt prostatasekret och visar därför lågt pH, rikligt med zink samt saknar spermier och fruktos.

Anlag för cystisk fibros är vanligt förekommande i befolkningen, 3–4% är anlagsbärare. Män med cystisk fibros och endast avsaknad av vas deferens kan ha normal spermiebildning och levande spermier i bitestikeln. I de fall där man övervägt provrörsbefruktning med spermier uttagna från bitestikeln har man utfört bärardiagnostik på kvinnan för att utröna om hon är bärare av samma recessiva gen.

Kartageners syndrom – orörliga cilier

Kartageners syndrom kännetecknas av att alla cilier är orörliga. Hälften av patienterna har situs inversus, samtliga har en anamnes med upprepade luftvägsinfektioner och männen har orörliga spermier. Diagnos erhålls med elektronmikroskopisk undersökning av spermiesvansen. Olika slag av strukturella defekter kan påvisas hos olika män. Mutationer i flera olika gener kan därför ge upphov till orörliga cilier. Vissa mutationer kan ge strukturella avvikelser som endast yttrar sig som avvikande motilitetsmönster med 100% långsamt simmande spermier. Enda behandling, teoretiskt sett, torde vara assisterad befruktning med mikroinjektion av spermier antingen under zona pellucida eller direkt in i äggcellens cytoplasma (kapitel 11). Risken för att fadern skall överföra ett anlag till barnet är då 100 %, medan risken att modern skall ha samma anlag och överföra det till ägget torde kunna beräknas till 1%. Risken för att barnet får samma tillstånd som fadern är därför 100 × 1, dvs. 1%.

Undersökning av spermiekromatin

Kromatinstabilitet

Män med nedsatt kromatinstabilitet är överrepresenterade i infertilitetsmaterial och de löper sannolikt en större risk än andra män för att få

skador i spermie-DNA. En orsak till nedsatt kromatinstabilitet är relativ zinkbrist i kärnan, vilket kan orsakas av en avvikande ejakulationssekvens – spermier ejakulerade med sädesblåsesekret (kapitel 8). En annan tänkbar orsak till nedsatt kromatinstabilitet är felaktigheter i protaminets sammansättning.

Kromatinstabilitet kan studeras genom att ejakulerade spermier exponeras för en detergent. Normalt motstår spermiekromatinet denna behandling, men hos cirka en fjärdedel av män i barnlösa relationer, oavsett fynden hos kvinnan, förekommer en hög andel spermier (>20%) med instabilt spermiekromatin. Kromatinstabilitet kan även studeras med flödescytometri. Fluoroforen akridinorange som binds vid enkelsträngat DNA ger röd fluorescens, men binds den till normalt förpackat dubbelsträngat DNA fluorescerar den i grönt. Metoden används utomlands och kan, om förutsättningar ges, komma att få betydelse vid diagnostik och utvärdering av behandling av den barnlöse mannen även i Sverige.

Protaminsammansättningen

Avvikelser i protaminsammansättningen kan diagnostiseras genom separation av protaminer och analys av protaminmönstret i spermier från män med ofullständigt stabiliserad spermiearvsmassa.

Mutationsfrekvens i spermier

I ett spermaprov med 100 miljoner spermier kan man förvänta sig att 100 spermier har mutation i en bestämd gen om mutationsfrekvensen är 1 på miljonen. Med PCR- (polymerase chain reaction) teknik kan den eventuellt muterade genen mångfaldigas och man kan avgöra om individen har denna gen i förväntad eller ökad frekvens. Metoden kan få tillämpning vid studier av mutagena faktorer och vid studier av vissa sjukdomar där gener förändras mellan generationer.

Kromosomuppsättning i spermier

Kromosomuppsättningen i mänskliga spermier kan studeras efter det att spermierna tillåtits penetrera äggceller från annat djurslag (äggceller från hamster befriade från sin zona pellucida). Metoden har för närvarande endast värde som forskningsinstrument.

Specifika gener i spermiens kromosomer

Forskningen kring spermiens kromatinstabilitet har lett till att man kan dekondensera spermiekromatinet in vitro så att spermiens DNA kan studeras med s.k. DNA-teknik. En känd gen eller ett kromosomfragment kan identifieras.

Meiotiska kromosomer – synaptonemalkomplex

I färskpreparerat testikelbiopsimaterial kan meioskromosomer studeras. I en studie med selekterade barnlösa män med normal kromosomuppsättning befanns ca 70% ha frekventa avvikelser i tidig meios, varav 30% endast kunde avslöjas genom specifik analys av synaptonemalkomplexet.

Indikation för kromosomanalys

Kromosomanalys kan vara meningsfull vid långvarig barnlöshet och rekommenderas av gynekologer efter tre tidiga missfall, efter sent missfall eller vid dödfött barn (tabell 7.2). Upp till 2–9 % av män med reproduktionsproblem (infertilitet eller upprepade missfall) har konstitutionella kromosomavvikelser. Av par som fått två eller flera missfall har 7% kro-

Tabell 7.2. Risk för missfall eller skada på barnet.

Risken bestäms utifrån släkthistoria och kromosomanalys.	
Genomsnittsrisken är för	
– man med reciprok translokation	10–15 %
– man med Robertsonsk translokation	1 %
– man med inversion.	2–4 %

mosomavvikelse hos endera parten. Kromosomanalys görs vanligtvis på lymfocyter från perifert blod (10 mL blod i heparinrör kan sändas med normal postbefordran till kliniskt genetiskt laboratorium).

Litteratur

HULTEN, M.: *Cytogenetic Aspects of Human Male Meiosis.* Akademisk avhandling. Karolinska institutet, 1974.

KJESSLER, B.: *Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic.* Monographs in Human Genetics, 2. Karger, Basel, New York 1966.

KNOBIL, E & NEILL, J.D. (red.): *The Physiology of Reproduction,* volym 1 och 2, Raven Press, New York 1988.

KVIST, U., BJÖRNDAHL, L., KJELLBERG, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. & PLÖEN, L.: Importance of zinc for stabilization of sperm chromatin. I: *Comparative Spermatology* (red. B. Baccetti), s. 49–54, Serono Symposia Publications, volym 75, Raven Press, New York 1992.

LAMMING, G.E. (red.): *Marshall's Physiology of Reproduction,* volym 1: Reproductive cycles of vertebrates. Churchill Livingstone, Edinburgh 1984.

LINDSTEN, J. & ISELIUS, L. (red.). *Klinisk genetik,* Natur och Kultur, Stockholm 1989.