

## Molecular Genetic Studies on AZF Region in Y Chromosome in Infertile Men with Spermatogenic Defects

삼성제일병원 생식생물 및 불임연구실

송 견 지

### I. 서 론

사람의 정자 (spermatozoa)는 정소 (testis)에서 여러 단계의 복잡한 발생과정 (spermatogenesis)을 거쳐 생산되어지는데, 이러한 정자형성과정의 심한 장애 (spermatogenic failure)로 인하여 불임이 되는 경우가 성인 남성의 2%나 된다고 한다. 지금까지 알려진 불임의 원인으로는 감염, 면역학적 요인, 그리고 해부학적 기형 요인 등이 있다. 그러나 비정상적인 정자형성 (abnormal spermatogenesis)의 유전학적 원인은 아직 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다. 최근, 생식보조술 즉, 체외수정 (IVF), 남자 세포질 내 정자직접주입술 (ICSI), 고환정자 적출술 (TESE) 등의 발달로 비정상적인 생식능력을 지닌 사람도 자신의 아기를 가질 수 있게 되었으나 이들의 자손은 불임유전자를 유전 받아 불임이 될 위험성을 갖고 태어날 것이다. 앞으로 이들의 원인 유전자를 찾아내고 돌연변이 분석을 실시하여 정자형성과정에 대한 이해를 돕고 남성 불임 치료의 초석을 다져야 할 것이다. 이에 저자는 지금까지 밝혀진 유전적 원인 및 그 빈도를 정리해 보고 새로운 유전자를 찾는 방법을 소개하고자 한다.

### II. AZF region in the Y chromosome

불임 남성의 발병 원인 중 유전적 원인으로 가장 잘 알려져 있는 것이 염색체의 수적 이상 즉, 47, XXY 클라인펠터 증후군일 것이다. 클라인펠터 증후군 외에도 핵형 분석 (karyotyping) 결과 Y 염색체와 상염색체간의 translocation와 Y 염색체의 장완 일부 소실 등이 불임과 관련있는 것으로 알려져 있다. 이러한 염색체 이상은 무정자증 환자의 12~27%, 희소정자증 환자의 2.1~8.5%에서 관찰된다고 한다 (Johnson *et al.*, 1998; Giltary *et al.*, 1999).

일찍이 Tiepolo와 Zuffardi는 무정자증 (azoospermia) 혹은 희소정자증 (oligozoospermia) 남성에서 Y 염색체 구조적 이상 즉, 장완의 일부 소실 (deletion)을 발견하고 이 부위에 정자형성과정을 조절하는 유전적 요소가 있다고 제안하고 그 유전적 요소를 Azoospermic Factor (AZF)로 정의했다 (1976). 그 이후 PCR의 발달로 많은 연구자들에 의해 핵형 분석으로 관찰되지 않았던 미세결실 (microdeletion) 존재 여부가 확인되었다. Y 염색체 장완 (Yq11)의 Sequence Tagged Sites (STS) primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 관찰된 이러한 미세결실은 불임 환자의 약 3.5%~37% 정도로 다양하게 관찰되고 있다. 이러한 미세결실의 빈도는 연구 대상 선정 기준이 다르기 때문에 결과마다 조금씩 다른 것으로 사료된다 (Table 1).

**Table 1.** Summary of the frequency of microdeletions in the Y chromosome

Source	Number of STS	Number of Patients with microdeletions (%)			Population
		Azoospermia	Oligospermia	Controls	
Kim <i>et al.</i> , 1999	37	8/40 (20) <sup>1</sup>		14	Korean
Song <i>et al.</i> , 2001	16	12/126 (10.3)	1/37 (2.7)	30	Korean
Reijo <i>et al.</i> , 1995, 1996	84	12/89 (13.5)	2/35 (5.7)	90	USA
Vogt <i>et al.</i> , 1996	76	13/370 (3.5) <sup>2</sup>		200	Germany
Kent-First, 1996	85	1/22 (4.5) <sup>2</sup>		200	USA
Foresta <i>et al.</i> , 1997	15	6/16 (37.5) <sup>3</sup>	5/22 (22.7) <sup>4</sup>	10	Italy

<sup>1</sup> Non-obstructive azoospermic patients, <sup>2</sup> Infertile men, <sup>3</sup> Severe OATS with hypospermatogenesis, <sup>4</sup> SCO patients.

### III. AZF candidate genes in AZF region

Tiepolo와 Zuffardi (1976)에 의해 AZF의 존재가 제안된 이후, 미세결실에 대한 여러 연구가 진행되는 가운데 Ma 등은 (1993) Yq11 interval 6 (AZFb) 부위에 존재하는 유전자를 찾아내었다. 이 유전자는 **YRRM1**과 **YRRM2**로서 RNA recognition motif를 가지고 있으며 RNA processing이나 translational regulation 기능을 수행할 것으로 추측되고 있다. 실제로 이 YRRM gene의 결실이 AZFb-deleted patients에서 심한 spermatogenic defects를 유발하는지는 아직 증명되지 않았는데, 이는 아마도 YRRM 유전자가 Y 염색체 장완과 단완에 넓게 퍼져 존재하는 multi-copy 유전자이기 때문일 것이다. YRRM 유전자의 functional copy 수나 그 기능이 아직 확실하게 밝혀지지 않았으며 AZF 후보 유전자로서 확실한 증거가 부족한 가운데, Reijo 등 (1995)은 새로이 관찰된 미세결실의 위치가 Ma 등이 보고한 AZF region과는 다른 부위임을 밝혀내고 새로운 유전자인 **Deleted in Azoospermia (DAZ)** 유전자를 보고하였다. 이 DAZ 유전자도 RNA binding motif를 갖는 단백질로서 male germ cell 특이적인 발현 양상을 보였다. 이 유전자는 가장 높은 빈도의 미세결실이 보고되는 AZFc region에 존재하므로 가장 확실한 AZF 후보 유전자로 여겨지고 있다. 그러나 아직 유전자내의 mutation이 보고된 바 없어 DAZ 유전자의 변이가 정자형성에 직접적인 영향을 미친다는 증거를 찾으려는 노력들이 계속되고 있으며 (Vereb *et al.*, 1998; Song, 2001), 앞으로 DAZ 유전자의 고환 특이적인 기능 및 binding 되는 RNA를 찾는 연구들이 수행되어야 할 것이다.

1998년 Brown 등에 의해 새롭게 제시된 AZFa region의 후보 유전자인 **DFFRY** (Drosophila fat-facets related X gene)는 ubiquitinating enzyme으로 X-linked DFFRX 유전자와 89% 상동성을 갖는 유전자이다. 앞의 두 YRRM과 DAZ 유전자와는 달리 조직 특이적인 발현 양상을 보이지 않고 거의 모든 조직에서 발현된다. 최근, 남성 불임 환자에서 DFFRY 유전자내의 4 bp deletion이 보고되어 정자형성과정과 DFFRY 유전자의 관련성을 증명하였다 (Sun *et al.*, 2000).

실제로 AZFa region에서 관찰되는 deletion은 대부분 DFFRY gene 뿐만 아니라 주변의 region을 포함하는 경우였으며, 약 1 Mb 정도 크기의 AZFa region에서 DFFRY 외에도 **DBY** 유전자가 존재하는 것을 확인하였다 (Foresta *et al.*, 2000). AZFa region의 22개의 STS marker를 이용하여 미세

결실 부위의 break point를 조사해 본 결과, DBY 결실의 빈도가 DFFRY 결실의 빈도보다 높으며 DBY의 발현 양상이 고환 특이적인 것을 확인되었다. 그러므로 Foresta 등은 DBY 유전자가 AZFa를 대표하는 보다 확실한 AZF 후보 유전자임을 주장하고 있다 (Foresta *et al.*, 2000). DBY 단백질은 DEAD box protein으로 DEAD box (Asp-Glu-Ala-Hsp)를 갖는 putative ATP-dependent RNA helicase이다.

#### IV. Other genes in infertile men

Y 염색체내 AZF region의 미세결실 외에 남성 불임을 일으키는 유전자 돌연변이로는 그 빈도는 작지만 androgen receptor, FSH receptor genes 돌연변이들이 있다.

Androgen receptor 유전자의 이상은 androgen insensitivity (AIS)를 나타내는데, 그 증상은 여성화된 남성 (46,XY), 약간 적게 남성화된 (undervirilization) 정상 남성 또는 불임 남성 등 그 정도에 따라 다양하게 나타난다. 심한 AIS를 보이는 여성화된 남성 환자에서 발견된 Androgen receptor 돌연변이 분석에 관한 연구는 많이 수행되어 오고 있으며 수십 종류가 밝혀져 있지만 불임 남성을 대상으로 수행된 연구 결과는 그리 많지 않다. Hiort 등은 180명의 특발성 불임 남성을 대상으로 androgen receptor mutation screening을 수행한 결과 2종류의 돌연변이 (Pro390Ser과 Gln798Glu)를 보고하였다 (Hiort *et al.*, 1999). 반면, Wang 등은 150명의 환자와 100명의 control을 대상으로 돌연변이 분석을 수행한 연구 결과에 의하면, 세 종류의 polymorphism만이 관찰되었고 pathogenic mutation은 발견되지 않았다 (1997).

Androgen receptor 유전자의 exon 1에 존재하는 CAG repeat 수와 남성 불임과의 관련성이 1997년 Tut 등과 Yong 등에 의해 보고된 이후, 여러 연구자들에 의해 비슷한 연구가 수행되어졌다. 스위스와 독일집단을 대상으로 수행한 결과는 아무런 연관성도 보이지 않았으며 중국 및 일본 집단에서는 연관성을 보였다 (Giwerzman *et al.*, 1998; Dadze *et al.*, 2000).

FSH receptor의 돌연변이는 Aittomaki 등에 의해 가족력 있는 premature ovarian failure (POF) 환자에서 처음으로 보고되었고 (1995), 그 가계에서 homozygote 남자의 경우는 subfertile 하거나 fertile 하다는 것이 Tapanian 등에 의해 보고되었다 (1997). 그 후 Tuerling과 Simoni 등은 불임 남성을 대상으로 FSH receptor 유전자의 돌연변이 분석을 수행하였으나 polymorphism을 제외한 pathological mutation은 관찰할 수 없었다 (Tuerling *et al.*, 1998; Simoni *et al.*, 1999). FSH는 정자형성 과정을 조절하는 주요한 호르몬이며 비정상적인 정자형성과정을 보이는 환자의 경우 혈중 FSH 농도가 정상인의 2~3배 증가되는 것으로 보아, 불임 환자에서 FSH receptor 유전자 이상을 예상해 볼 수 있었으나 아직 그 실험적 증거는 매우 적었다. 앞으로 FSH 유전자나 FSH receptor 유전자의 유전자 발현 조절수준에서의 연구도 수행되어야 할 것으로 사료된다.

#### V. Novel gene hunting

남성 불임 환자의 많은 부분이 그 발병 원인을 알지 못하는 idiopathic patient이다. 현재, 이들 중의 일부만이 Y 염색체의 미세결실 및 유전자 돌연변이로 그 발병 원인을 설명할 수 있다. 따라서 더 많은 정자형성과정 관련 유전자에 대한 연구와 이를 응용한 불임 환자의 치료가 절실한

실정이다. 정자형성과정은 많은 유전자들의 발현이 관련되어 있는데, 이러한 연구는 현재까지 실험 동물인 mouse나 초파리를 대상으로 수행되어 오고 있다. Human을 대상으로는 Y 염색체 장완(Yq11) 부위의 미세결실을 기초로 한 physical mapping으로 새로운 유전자를 찾는 연구를 수행하는 실정이다.

불임 남성을 대상으로 정상 정자형성을 보이는 조직과 비정상 정자형성을 보이는 환자의 조직의 RNA를 이용하여 Differential display RT-PCR 및 PCR-select cDNA subtraction kit를 수행하여 환자 특이적으로 발현되는 유전자들을 찾는 연구를 수행할 수 있을 것이다 (Song *et al.*, 1999). 최근 DNA microchip 기술의 개발로 microarray를 이용하여 새로운 유전자를 찾는 연구들이 발생생물학 및 Oncology 등 여러 분야에서 이루어지고 있다. 불임 남성을 대상으로 이를 응용한 연구도 가능하리라 사료된다.

## VI. 결 론

시험관아기 및 ICSI의 성공이 불임치료영역에 있어서 새로운 장을 열었다고 볼 수 있지만 과거에는 자연 도태되었을 불임유전자가 집단 내에 남게 되어 더 많은 불임 환자가 생길 수 있을 것이다. 그러므로 불임의 원인 규명과 극복을 위한 분자 생물학적 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

- Aittomaki K, Dieguez-Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen JS, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Levaslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huntaniemi IT, de la Chapell A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82: 959-68.
- Brown GM, Furlong RZ, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Human Molecular Genetics* 1998; 7: 97-107.
- Dadze S, Wieland C, Jakebiczk S, Funke K, Royer-Pokora B, Willers R, Wieacker PF. The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucosoid sample of German origin. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 207-14.
- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barbaux S, De Bortoli A. Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1075-80.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1161-9.
- Gilray J, Kastrop P, Tuerlings J, Kremer J, Tiemessen C, Gerssen-Schoorl K, Van der Ven F, deVries J. Subfertile men with constitutive chromosome abnormalities do not necessarily refrain from ICSI treatment: a follow-up study on 75 Dutch patients. *Hum Reprod* 1999; 14: 318-20.

- Giwerzman YL, Xu C, Arver S. No association between the androgen receptor gene CAG repeat and impaired sperm production in Swedish men. *Clin Genet* 1998; 54: 435-6.
- Hiort O, Holterhus PM, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinnecker GHG, Kruse K. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *JCEM* 2000; 85: 2810-5.
- Johnson M. Genetic risks of ICSI in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70: 1029-32.
- Kent-First MG, Kol S, Muallem A, Ofir R, Manor D, Blazer S, First N and Itskovitz-Eldor J. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Molecular Human Reproduction* 1996; 2: 943-50.
- Kim SW, Kim KD, Paick JS. Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia. *Fert & Steril* 1999; 72: 349-53.
- Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson E, Jobling M, Taylor K, Wolfe J, Cooke HJ, Hargreave TB and Chandley AC. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: Candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; 75: 1287-95.
- Ma K, Sharkey A and Kirsch S. Towards the molecular localization of the AZF locus: mapping of the microdeletions in azoospermic men within 14 subinterval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 29-33.
- Reijo R, Lee T-Y, Salo P, Alagappan R, Broun LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, Chapeele A, Silber S and Page DC. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics* 1995; 10: 165-75.
- Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P and Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *LANCET* 1996; 347: 1290-3.
- Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Ktaff T, Stahle D and Niesclag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating Hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 751-6.
- Song GJ, Lee HS, Park YS, Lee HJ, Lee YS, Seo JT and Kang IS. Screening of the differential expressed genes in testes with normal and spermatogenic defect patients. Annual meeting for ASRM 1999; S54.
- Song GJ. Molecular genetic studies on the FSH receptor gene and azoospermic factor region in Y chromosome in infertile men with spermatogenic defects. PhD thesis 2001; 72-97.
- Sun C, Skalesty H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature Genet* 1999; 23: 429-32.
- Tapanainen JS, Aottomake K, Kin J, Vaskiwuo T and Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the FSH receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet* 1997; 15: 205-6.
- Tiepolo L and Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion

- of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119-24.
- Tuerlings JHAM, Ligtenberg ML, Kremer JAM, Sieres M, Meuleman EJH, Braat DDHM, Hoefslott LH, Merkus MWM and Brunner HG. Screening male intracytoplasmic sperm injection candidates for mutations of the follicle stimulating hormone receptor gene. *Human Reproduction* 1998; 13: 2098-101.
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *JCEM* 1997; 82: 3777-82.
- Vereb M, Agulnik AI, Houston JT, Lipschultz LI, Lamb DJ, Bishop CE. Absence of DAZ gene mutations in cases of non-obstructed azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 55-9.
- Vogt PH, Edelmann A and Kirsch S. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in YQ11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-43.
- Wang Q, Ghadessy FJ, Yong EL. Analysis of the transactivation domain of the androgen receptor in patients with male infertility. *Clin Genet* 1998; 54: 185-92.
- Yong EL, Ghadessy F, Wang Q. Androgen receptor transactivation domain and control of spermatogenesis. *Rev Reprod* 1998; 3: 141-4.
-