

Reproduktion er en af de mest basale mekanismer for vores eksistens – uden den ville vi uddø. Derfor er barnløshed et stort samfundsmæssigt problem, og for det enkelte par kan det være forbundet med store psykiske problemer. Der er forsket meget i barnløshed, og vi ved, at arv og miljø har begge en indvirkning på barnløshed, og barnløshed kan både skyldes nedsat fertilitet hos kvinden eller manden. Selvom der er forsket meget i mandlig infertilitet, så kender vi fortsat meget lidt til de underliggende årsager, men vi ved dog, at det er en kompleks lidelse, som kan være forårsaget af mange forskellige ting. Infertile mænd repræsenterer derfor en meget forskelligartet gruppe, hvilket giver udfordringer, når vi gerne vil forske i mandlig infertilitet.

I dette ph.d.-projekt valgte vi at fokusere på en gruppe af infertile mænd, hvor vi helt præcist kender den genetiske årsag til deres infertilitet, nemlig mænd med Klinefelter syndrom, som har et ekstra X-kromosom og derfor er infertile. Hos disse mænd sker der allerede inden puberteten et næsten fuldstændigt tab af de germinale stamceller, der efter puberteten skal dele sig og give ophav til sædcellerne i testiklerne. Der vil derfor typisk kun være en meget lille eller slet ingen produktion af sædceller hos den voksne mand med Klinefelter syndrom.

Klinefelter syndrom estimeres til at forekomme hos 1 ud af 700 nyfødte drengebørn og er dermed ret hyppigt forekommende. Syndromet blev første gang beskrevet af Harry Klinefelter tilbage i 1942, hvor han beskrev en gruppe af voksne mænd med brystvækst, ingen sædceller i deres sædvæske og øget niveau af hormonet FSH, der udskilles fra hypofysen i hjernen og stimulerer til dannelse af sædceller. I 1959 blev den genetiske årsag til syndromet identificeret, man fandt ud af, at årsagen er tilstedeværelsen af et ekstra X-kromosom hos disse mænd. Symptomerne på Klinefelter syndrom er meget varierede, så man opdager ikke altid, at man står over for et tilfælde. Det estimeres, at kun 25% af de forventede tilfælde af Klinefelter syndrom bliver diagnosticerede, og diagnosen finder i de fleste af tilfældene først sted, når patienterne når den reproduktive alder og bliver udredt for årsagerne til deres infertilitet. Symptomerne på Klinefelter syndrom hos den voksne mand kan omfatte øget højde, lange arme og ben, brystvækst, overvægt, nedsat muskelmasse, små testikler og infertilitet.

Vores arvemasse består af 46 kromosomer, som er 23 par i alt. De 22 af parrene er de såkaldte autosomer, og de findes både hos mænd og kvinder. Det sidste par er kønskromosomerne, som hos kvinder udgøres af to X-kromosomer, og hos mænd af et X-kromosom og et Y-kromosom. Mænd med Klinefelter syndrom har derimod to X-kromosomer og et Y-kromosom (47,XXY). X-kromosomet er meget større end Y-kromosomet og indeholder mange flere gener. For at kompensere for den øgede mængde af gener hos kvinder bliver det ene X-kromosom inaktiveret. Dette sker tilfældigt, således at det i cirka halvdelen af kroppens celler er X-kromosomet fra moderen, som er aktivt, og i den anden halvdel X-kromosomet fra faderen, som er aktivt. Da mænd kun har ét X-kromosom, bliver dette normalt ikke inaktiveret, men hos mænd med Klinefelter syndrom sker der, ligesom hos kvinder, en inaktivering af det ene X-kromosom. Inaktiveringen af X-kromosomet er dog ikke fuldstændig, idet der er en lille gruppe af gener, der undslipper inaktivering. Dermed har mænd med Klinefelter syndrom i deres celler dobbeltdosis af den gruppe af gener, der undslipper inaktivering. Det er nærliggende at antage, at det er disse gener, der forårsager de symptomer, vi ser hos patienter med Klinefelter syndrom, herunder deres infertilitet.

For at undersøge de forandringer, der leder til infertiliteten hos mænd med Klinefelter syndrom, anvendte vi testikelvæv fra patienter med Klinefelter syndrom på tre forskellige udviklingsstadier: fostertilværelsen, barndommen inden puberteten, og voksenlivet. Det er ikke etisk forsvarligt at tage testikelbiopsier kun til

forskningsbrug, og derfor brugte vi testikelvæv fra vores arkiv af materiale, der tidligere er blevet taget i forbindelse med udredning for infertilitet. Disse patienter var alle færdigdiagnosticerede. Materialet fra fostre stammer fra obduktioner taget i forbindelse med spontan abort af fostre i andet trimester af graviditeten.

Da vi mangler viden om, hvornår tabet af de germinale stamceller finder sted hos patienter med Klinefelter syndrom, satte vi os i første omgang for at undersøge, hvornår dette tab sker. I testikelvævet fra børn med Klinefelter syndrom var der allerede ingen eller næsten ingen germinale stamceller tilbage, og det egentlige tab måtte være igangsat på et tidligere tidspunkt i udviklingen, og vi undersøgte derfor fostrene. I testiklen hos normale fostre udvikler "gonocytterne" sig til at være "præ-spermatogonier" i løbet af andet trimester. Efter puberteten betegnes præ-spermatogonierne som spermatogonier og er altså de celler, der i sidste ende deler sig og giver ophav til sædcellerne i puberteten og fremefter.

Gonocytterne danner et protein, der hedder OCT4, hvorimod præ-spermatogonierne danner et protein, der hedder MAGE-A4. Ved at undersøge tilstedeværelsen af disse to proteiner i cellerne i testiklen vil man kunne afgøre, om cellerne er gonocytter eller præ-spermatogonier. Vi så, at hvor antallet af OCT-4-positive celler faldt i løbet af andet trimester, var der en tilsvarende stigning i antallet af MAGE-A4-positive celler hos fostrene i kontrolgruppen, hvilket er i overensstemmelse med, at gonocytterne i andet trimester udvikler sig til præ-spermatogonier. Hos fostrene med Klinefelter syndrom så vi også et fald i antallet af gonocytter, men det interessante er, at vi ikke så en tilsvarende stigning i antallet af præ-spermatogonier, hvilket indikerer, at hovedparten af gonocytterne går til grunde uden at udvikle sig til præ-spermatogonier. På baggrund af den gruppe fostre, vi undersøgte, kan vi dermed konkludere, at tabet af de germinale stamceller hos patienter med Klinefelter syndrom allerede skete i fostertilværelsen.

For at undersøge de potentielle mekanismer, der forårsager dette tab af de germinale stamceller, rettede vi vores søgelys på sammensætningen af RNA'et i testikelvævet. I de enkelte celler i kroppen bliver vores DNA kopieret til RNA ved en proces, der hedder transskription. RNA'et har flere funktioner i cellerne, den bedst beskrevne er, at de bliver oversat til proteiner ved en proces, der meget betegnende kaldes translation. Proteiner er små maskiner inde i cellerne, der udfører en lang række funktioner, blandt andet nedbryder de den mad, vi spiser, de sørger for, at vores celler kan kommunikere med hinanden, og de fungerer også som antenner for forandringer uden for cellen selv. Men faktisk bliver størstedelen af RNA'et i cellerne ikke translateret til proteiner, de fungerer på andre måder uden at blive oversat. Vores viden om disse ikke-proteinkodende RNA'er er begrænset, men vi ved, at de for eksempel kan regulere transskriptionen selv og være med til at danne nye proteiner. Mens mængden af DNA er konstant i vores celler, er mængden og kompositionen af RNA'et dynamisk, den ændrer sig konstant for at tilpasse de behov cellen har.

Ved at undersøge RNA'et i cellerne håbede vi altså at kunne påvise en sammenhæng med tabet af de germinale stamceller. Vi brugte teknikken RNA-sekventering til at fastlægge mængden og sammensætningen af RNA.

Og det viste sig at holde stik: Når vi sammenlignede RNA-sammensætningen i testiklerne fra fostre med Klinefelter syndrom med kontrolfostre, så vi betydelige forskelle. Vi så blandt andet, at der var en forstyrrelse i sammensætningen af ikke-proteinkodende RNA'er, hvilket indikerer, at disse kan have en afgørende betydning for testikeludviklingen og tabet af præ-spermatogonierne hos Klinefelter syndrom.

Hos den voksne mand med normal sædcelledannelse, består testiklen af en masse små rør, hvor sædcelledannelsen finder sted. Udover spermatogonierne, der deler sig og er ophav til sædcellerne, så findes der i disse rør også Sertoliceller, som er en slags hjælpeceller, der giver næring og signaler til spermatogonierne, så sædcelledannelsen sker korrekt. En anden vigtig celletype er Leydigcellerne, som befinder sig uden for de små rør, og som producerer det mandlige kønshormon testosteron.

På trods af at der er ingen eller meget få præ-spermatogonier i testiklen tidligt i udviklingen i testiklen hos patienter med Klinefelter syndrom, så lader det ikke til at påvirke Sertolicellerne og Leydigcellerne før puberteten, idet sammensætningen og antallet af disse er sammenlignelige hos drenge med Klinefelter syndrom og i kontrolgruppen.

Ved starten af en normal pubertet fører de hormonelle forandringer, der sker i kroppen, til radikale ændringer i testiklen, idet sædcelledannelsen igangsættes. For at dette kan ske modnes Sertolicellerne og Leydigcellerne også, så de kan stimulere sædcelledannelsen. Derimod har de hormonelle forandringer andre effekter i testiklen hos drenge med Klinefelter syndrom, idet der i stedet sker et nedbrud af hovedparten af de små rør og en markant øgning i antallet af Leydigceller. Dette medfører dog ikke, at mænd med Klinefelter syndrom har et øget niveau af testosteron, idet en stor del af disse Leydigceller er umodne og dermed slet ikke i stand til at producere testosteron. Fordi de fleste af de små rør går til grunde, er der også en reduceret mængde af Sertoliceller, men der findes dog rør, der kun indeholder Sertoliceller.

I testikelvævsmaterialet fra børn fandt vi også forskelle i RNA-sammensætningen. Vi fandt, at en del protein-kodende RNA'er var til stede i øget mængde sammenlignet med kontrolgruppen, og disse kan potentielt spille en rolle i de forandringer, der sker ved puberteten i testiklen hos drenge med Klinefelter syndrom.

Hos voksne mænd med Klinefelter syndrom identificerede vi adskillige RNA'er, der var til stede i afvigende mængde end hos kontrolgruppen. Da vi undersøgte et lille udvalg af disse, kunne vi se, at denne forstyrrelse i disse RNA'ers mængde formentlig skyldtes, at Sertolicellerne og Leydigcellerne i testiklen hos mænd med Klinefelter syndrom ikke var udviklet korrekt, og at disse celler snarere lignede de umodne celler, der er til stede i testiklen før puberteten.

Dermed kan vi konkludere, at der tidligt i fostertilværelsen sker et tab af præ-spermatogonierne, og at mangel på disse ved pubertetens start medfører, at Sertolicellerne og Leydigcellerne ikke udvikles korrekt.

Vi var også interesserede i at undersøge, om der var enkelte RNA'er, der var forskellige fra kontrolgrupperne gennem testikeludviklingen, og vi sammenlignede derfor RNA-sammensætningen i de tre forskellige aldre. Her fandt vi et meget lille overlap, hvilket antyder, at det er forskellige mekanismer, der forårsager de forandringer, der sker i testiklen hos patienter med Klinefelter syndrom på de forskellige udviklingstrin.

Jeg har med dette ph.d.-projekt identificeret adskillige RNA'er, hvis forstyrrede regulering potentielt kan medvirke til udviklingen af Klinefelter syndrom. Da funktionen af hovedparten af de identificerede RNA'er ikke tidligere er beskrevet, er fremtidige studier nødvendige for at klarlægge funktionen af disse RNA'er og årsagerne til, at deres forstyrrede regulering fører til tab af de germinale stamceller. Med denne viden kan vi ikke blot bedre forstå mekanismerne bag tabet af de germinale stamceller hos patienter med Klinefelter syndrom, men også lære mere om regulering af overlevelsen af de germinale stamceller generelt, hvilket må åbne nye veje til at hjælpe andre infertile mænd.