

网络出版时间:2024-06-13 19:21:03 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240612.1135.003

论 著

SEPT12 基因突变导致弱畸精子症引起男性不育

郭森朝^{1,2}, 于 慧^{1,2}, 顾 梦^{1,2}, 吴宝燕^{1,2}, 李阔阔^{1,2}, 汤冬冬^{1,2}, 贺小进^{1,2}, 曹云霞^{1,2}, 吕明荣^{1,2}

摘要 目的 研究 septins 基因家族成员 SEPT12 在人类精子发生过程的作用及其对精子运动力和精子超微结构的影响。方法 对收集的 375 例弱畸精子症患者外周血提取 DNA 进行全外显子测序(WES),筛选出一例携带 SEPT12 复合杂合突变的特发性不育患者,行 Sanger 测序验证,家系共分离分析。用苏木精-伊红染色(HE)及扫描电镜(SEM)分析患者精子形态畸形,透射电镜(TEM)分析精子超微结构缺陷。然后,通过 Western blot 及免疫荧光(IF)分析突变对其蛋白水平及位置的影响及缺陷结构标志物位置及水平的变化情况。结果 在 1 例弱畸精子症患者中筛选并鉴定 SEPT12 基因复合杂合突变 c. C332A(p. T111K) 和 c. 406_416 del TGCTCGTATTG(p. q 136 VFS * 39)。Sanger 测序验证,符合家系共分离遗传模式。突变导致其蛋白表达缺失、精子活力降低和精子形态畸形,主要包括短尾、卷尾、精子头部不规则。精子超微结构显示精子鞭毛中段与主段连接处的环缺失、精子头部顶体膜脱落、核空泡。精子鞭毛中段线粒体鞘排列紊乱、中央二联管缺失、微管双联体缺失及部分放射轴辐缺失。Western blot 及 IF 结果显示 SEPT 家族相关蛋白 SEPT4 蛋白水平降低,SEPT6 蛋白不变,顶体相关蛋白 ACTL7A 和 ACROSIN 蛋白缺失,线粒体及轴丝相关蛋白 TOMM20, SPAG6 和 RSPH3 蛋白水平显著降低。结论 SEPT12 基因突变引起 SEPT12 蛋白缺失,导致精子鞭毛中段与主段连接处环缺失,引起精子顶体、线粒体鞘及鞭毛组装异常。

关键词 男性不育;弱畸精子症;SEPT12;全外显子测序

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)06-0939-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.003

精子发生过程异常容易导致男性不育,弱畸精子症是不育的原因之一,与精子顶体及鞭毛的形态异常有关^[1]。正常精子细胞包含头和尾,顶体覆盖

在精子头部前三分之二;尾部核心骨架是典型的“9+2”微管结构,即 9 个外周微管双联体围绕一对中央二联管;此外,精子鞭毛中还含有若干外部亚结构,包括纤维鞘、线粒体鞘和放射轴辐复合体等^[2]。精子顶体的缺陷及鞭毛轴丝组装错误,可导致顶体缺陷、无定形头、短卷尾及尾部缺失等各种精子畸形,进而精子运动能力下降并影响精子的受精能力^[3]。

男性不育的病因包括多种因素,遗传是重要因素之一^[4]。Septins (SEPT) 基因编码一类 GTP 结合蛋白,它们在真核生物中广泛存在,从酵母到哺乳动物高度保守,参与了多种细胞过程,包括有丝分裂、细胞骨架重塑、细胞极化、膜动力学和囊泡运输等^[5]。在 Septins 家族成员中,SEPT12 在睾丸表达较高,据研究,SEPT12 与精子环缺失、顶体缺陷、线粒体紊乱及微管形成障碍有关^[6]。因此,SEPT12 在哺乳动物精子发生过程中起着关键作用,其表达水平对于精子的形成至关重要^[7]。该研究通过 WES 筛选发现 1 例 SEPT12 基因复合杂合新发突变患者,并介绍该患者的临床表现和遗传学研究,从临床出发,证实了 SEPT12 在精子形成中的重要作用并在该患者精子中揭示了新的结构缺陷。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集安徽医科大学第一附属医院生殖中心弱畸精子症患者 375 例,根据世界卫生组织人类精液检查和处理实验室手册进行精液分析,所有患者至少两次诊断出精子表型异常,并接受全面检查,排除梗阻性无精子症、内分泌异常(性腺功能减退、糖尿病、甲状腺功能减退)、隐睾症、核型异常和 Y 染色体微缺失的患者。采集先证者及其父母的外周血样本进行样本测序和遗传分析。本研究经安徽医科大学第一附属医院伦理审查委员会审查和批准(审批号:20200048)。所有患者标本均获得了书面知情同意书。

1.1.2 试剂与仪器 全细胞裂解液 RIPA(货号:

2024-03-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82071705)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230032

²国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:郭森朝,男,硕士研究生;

吕明荣,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

lvmingrong2016@163.com

P0013J)、山羊抗兔二抗(货号:A0279)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(货号:P0018S)、一抗稀释液(货号:P0256)均购自上海碧云天生物技术有限公司; β -actin 抗体(货号:AC026)购自武汉 ABclonal 公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号:BL735A)、4%多聚甲醛细胞固定液(货号:BL539A)购自中国 BioSharp 公司;SEPT4 抗体(货号:DF13393)、SEPT6 抗体(货号:DF4459)购自江苏 Affinity 公司;RSPH3 抗体(货号:17603-1-AP)、TOMM20 抗体(货号:11802-1-AP)抗体购自美国 Proteintech 公司;ACROSIN 抗体(货号:NBP2-14260)购自美国 Novus Biologicals 公司;戊二醛固定液(货号:G5882)、 α -tubulin 抗体(T6793)、SPAG6 抗体(货号:HPA038440)、ACTL7A(货号:HPA021624)SEPT12 抗体(货号:SAB1400789)购自美国 Sigma 公司;预染蛋白 Marker(货号:26616)、Hoechst 染液(货号:62,249)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。显影成像系统(型号:Tanon5200)购自上海天能公司;激光共聚焦显微镜(型号:LSM880)、场发射扫描电子显微镜(型号:GeminiSEM 300)购自德国 ZEISS 公司;离子溅射仪(型号:Cressington 108)购自英国 Cressington 公司;临界点干燥仪(型号:K850)购自英国 Quorum 公司;透射电子显微镜(型号:Talos L120C G2 TEM)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 全外显子测序(whole exome sequencing, WES)与 Sanger 测序 从患者外周血中抽提基因组 DNA。送至测序公司测序。基因组突变,包括剪接位点突变、移码插入/缺失和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)突变等,在去除低质量的 reads 和 PCR 重复后进行注释和过滤。在 1000 Genomes Project 等数据库中检测等位基因突变频率 $\leq 0.5\%$ 、睾丸特异表达或高表达的基因,然后利用 SIFT、PolyPhen-2 和 M-CAP 等生物信息学软件进行功能预测和致病性预测,进一步通过 Sanger 测序验证。

1.2.2 精液分析与 HE 先证者禁欲 3~7 d 后,通过手淫获得新鲜精液样本。在 37 °C 下孵育 30~60 min 进行液化后,评估精液体积、pH 值、精子浓度和活力。患者至少重复两次常规精液分析。精液标本采用 PBS 洗 3 次,4% PFA 固定,涂片,自来水冲洗,将玻片浸泡在一系列梯度乙醇(70%、80%、90%)中,HE 染色,滴中性树脂盖上盖玻片,并在光镜下

观察,计数 200 个精子统计精子畸形率。

1.2.3 精子蛋白提取及 Western blot 使用蛋白提取缓冲液 RIPA 提取精子蛋白,95 °C 变性 5 min,冻存或用于后续实验。配制聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶,甘氨酸电泳溶液,转膜溶液(4 °C 冷藏),TBST 洗膜缓冲液以及 5% 的脱脂牛奶封闭液。将 SDS-PAGE 凝胶放入电泳仪器内,加入蛋白 Marker 以及蛋白样品,开始电泳,90 min 后关闭电泳,甲醇激活聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。将 SDS-PAGE 胶移到 PVDF 膜上,转膜 90 min。用 TBST 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L 氯化钠,0.1% 吐温 20)配制 5% 脱脂奶封闭,孵育一抗 4 °C 过夜。第 2 天,用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,孵育二抗室温 2 h,使用蛋白显影液和快速蛋白印迹系统进行免疫印迹分析。

1.2.4 精子免疫荧光 新鲜精液用 4% 多聚甲醛固定,固定后对精子进行免疫荧光检测。将精子 PFA 固定样本混匀后滴加在黏附载玻片上,PBS 磷酸盐缓冲液洗涤玻片 3 次,每次 5 min,清洗后使用 0.2% 的 TritonX-100 溶液室温下透化 30 min;透化结束后,PBS 缓冲溶液漂洗 3 次,随后滴加 10% 的驴血清,室温孵育封闭 2 h;使用 3% 的牛血清白蛋白溶液配制一抗,在 4 °C 下与一抗孵育过夜;接下来用 1 × PBS 洗涤 3 次,避光配制荧光二抗以及 Hoechst 抗体,在室温下与二抗孵育 2 h;PBS 溶液避光清洗玻片 3 次,滴加抗淬灭剂,将盖玻片轻轻盖在玻片上。最后,使用共焦显微镜拍摄图像。

1.2.5 精子透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)和扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)实验 收集患者和对照者的新鲜精液样本,用 PBS 洗 2 次,缓慢滴加 1.0 ml 2.5% 的戊二醛溶液,保留沉淀,4 °C 冰箱放置 24 h。TEM 标本,将样本使用磷酸盐缓冲液漂洗 4 次,每次 1 h,随后使用 1% 的锇酸 4 °C 固定;ddH₂O 漂洗 3 次,每次 10 min,并使用 2% 醋酸铀水溶液染色 2 h;通过梯度乙醇(50%、70%、90% 和 100%)脱水,每次 15 min,100% 丙酮脱水 2 次,每次 20 min;将样品包埋在 Epon 812 中,室温放置过夜并制成超薄切片。收集超薄切片,用柠檬酸铅和乙酸铀酰双重染色,并用 TEM 观察并拍摄分析。SEM 标本,将固定标本室温下 2 500 r/min 离心 5 min,去除戊二醛固定液并用 PBS 洗 3 次,用 30%、50%、75%、95% 和 100% 乙醇梯度脱水,用移液枪重悬后将样本滴加在单晶硅片上,于通风橱内过夜;随后,用 CO₂ 临界点干燥器干

燥载玻片。最后,用自动溅射碳涂布机涂布所有样品,并上机通过扫描电子显微镜进行观察分析及拍摄。

2 结果

2.1 SEPT12 基因复合杂合新突变的筛选与鉴定

本研究对 375 例弱畸精子症患者外周血进行 WES 和生物信息学分析,一例先证者中出现 2 个 SEPT12 复合杂合新发突变:c. C332A (p. T111K) 和 c. 406_416 del TGCTCGTATTG (p. q136 Vfs *)

39)。该突变位点在正常人群中突变频率非常低,生物信息学软件预测该突变为有害突变。Sanger 测序显示这两个位点突变分别来自其杂合携带者父母,符合孟德尔隐性遗传模式(图 1)。SEPT12 基因位于第 16 号染色体上,包含 10 个外显子,编码一种由 358 个氨基酸组成的蛋白质,其在睾丸中高表达。变异影响的氨基酸在不同物种之间进化上高度保守。因此推测 SEPT12 突变可能是导致弱畸精子症引起男性不育的原因。

2.2 SEPT12 基因突变导致精子形态畸形及超微

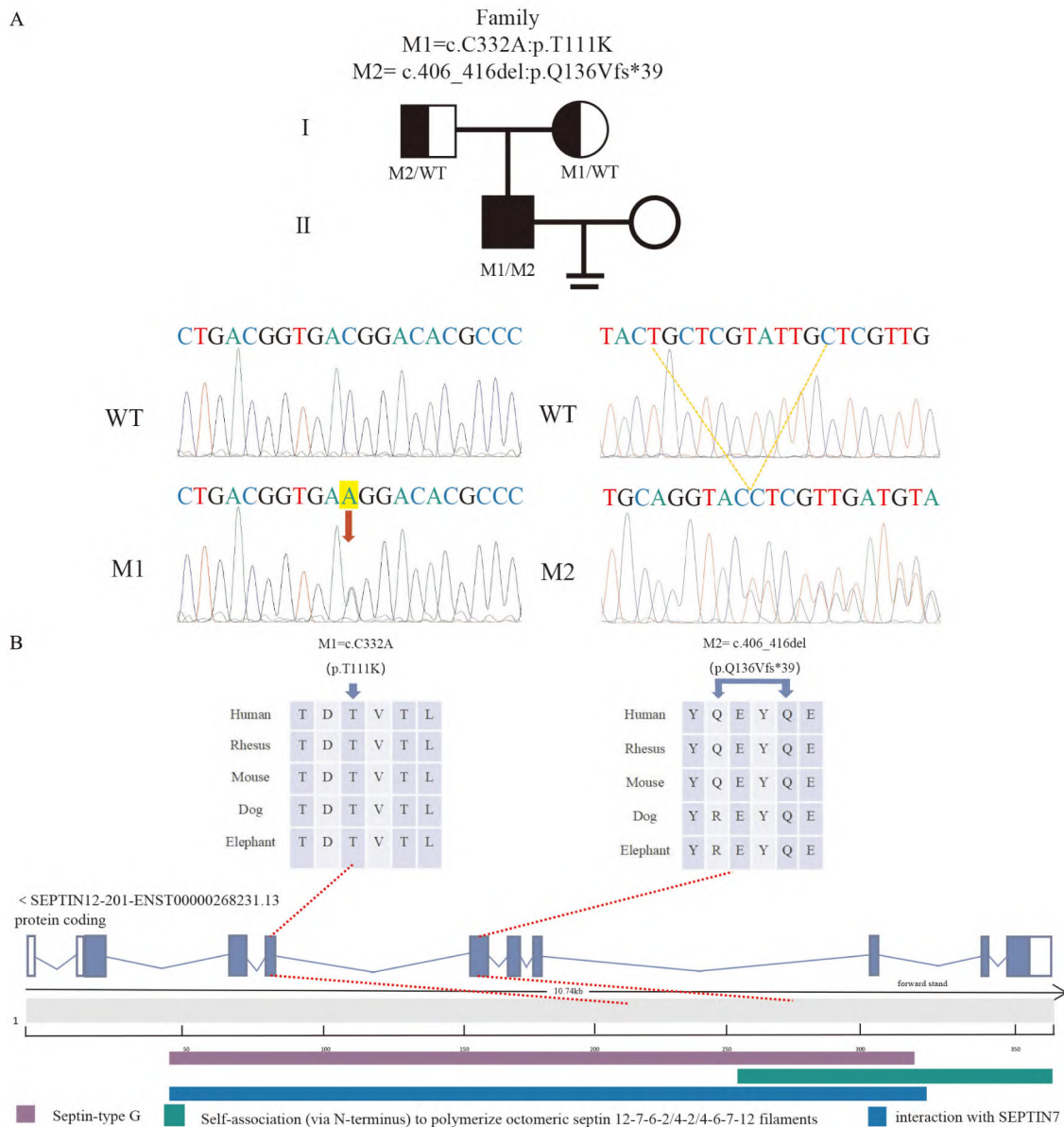


图 1 SEPT12 突变的鉴定和生物信息分析

A: SEPT12 基因突变患者的家系图及 Sanger 验证结果; B: SEPT12 蛋白变异氨基酸保守性分析; WT: 野生型, M: 突变型; 黄色框, 红色箭头及黄色虚线: 突变位点碱基及缺失碱基; 紫色方块: Septin-type G 结构域; 绿色方块: 典型的与其他家族成员聚合结构域; 蓝色方块: SEPTIN7 蛋白相互作用结构域

结构改变 根据世界卫生组织 (WHO) 的指南, *SEPT12* 基因突变患者精液常规分析结果显示精液体积和浓度正常。精子活力和前向运动活力显著降低(表 1)。精子 HE 染色和扫描电镜结果显示, 患者的精子形态异常, 超过 69% 的精子头部出现小顶体或顶体缺失(表 1)。精子颈部结构异常(红色箭头), 锥形头(绿色箭头)及尾部畸形表现为卷尾和尾部缺失(蓝色箭头)(图 2A~C)。

为了进一步检测 *SEPT12* 基因突变对精子结构的影响, 课题组利用 TEM 对患者精子超微结构进行检测。如图 2C 所示, 在正常精子中, 精子头部覆盖的顶体具有完整的顶体外膜, 线粒体沿着轴丝中段高度有序排列, 而患者精子顶体膜脱落, 大多数顶体受损, 细胞核表面有一个深凹陷, 大部分中段多线粒体排列明显异常。精子鞭毛轴丝“9+2”微管结构

表 1 携带双等位基因 *SEPT12* 突变患者的精液常规和畸形率统计

项目	AY0612	参考值
精液常规		
精液量 (ml)	2.5	>1.5
精子浓度 ($\times 10^6/ml$)	53.6	>15.0
活动率 (%)	8.9	>40.0
前向运动力 (%)	2.7	>32.0
精子尾部形态 [% (n/n)]		
正常尾部	16.83 (34/202)	>23.0
无尾	13.86 (28/202)	<5.0
短尾	6.44 (13/202)	<1.0
卷尾	62.37 (126/202)	<17.0
折角	0.49 (1/202)	<13.0
精子头部形态 [% (n/n)]		
正常头	12.5 (25/200)	
小或无顶体	69.5 (139/200)	
无定型头	86 (172/200)	
顶体空泡	9.5 (19/200)	
锥形头	5 (1/200)	

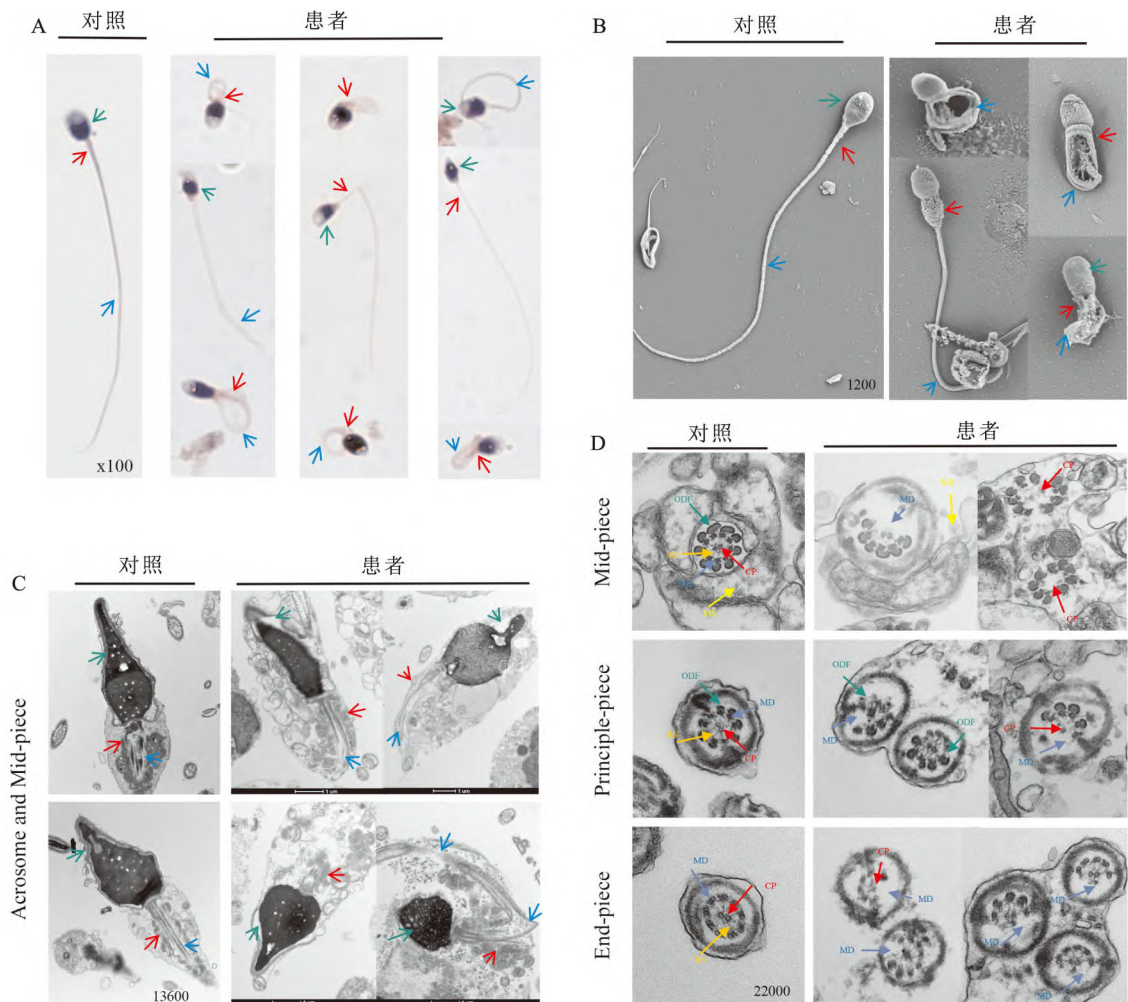


图 2 *SEPT12* 突变患者精子的形态学及超微结构分析

A、B: 对照者和 *SEPT12* 突变患者精子的 HE 染色和扫描电镜结果 $\times 100$ 、 $1\ 200$; 绿色箭头: 无定型头、锥形头和异常顶体; 蓝色箭头: 短尾及卷尾; C: 精子头部顶体及线粒体鞘超微结构分析 $\times 13\ 600$; D: 精子鞭毛轴丝“9+2”超微结构分析 $\times 22\ 000$; CP: 中央二联管; MD: 微管双联体; RS: 径向基轴; ODF: 外层致密纤维; MS: 线粒体鞘; FS: 纤维鞘; Mid-piece: 中段; Principle-piece: 主段; End-piece: 尾段

异常,包括大部分中央二联管缺失,微管双联体缺失或排列紊乱,放射轴辐缺失等(图 2D)。以上结果提示,*SEPT12* 基因突变导致精子顶体,线粒体鞘及精子鞭毛超微结构缺陷。

2.3 *SEPT12* 基因突变患者精子成分缺陷 为了进一步探索 *SEPT12* 突变患者精子超微结构缺陷的分子原因,Western blot 和免疫荧光分析 *SEPT12* 突变影响的患者和正常对照精子中 *SEPT12* 蛋白和相关蛋白的水平 and 定位。与可生育对照组相比,*SEPT12* 突变患者精子中 *SEPT4* 和 *SEPT12* 蛋白水平显著降低,*SEPT6* 变化不明显(图 3D)。免疫荧光分析显示,在可生育对照组的精子环上有明显的 *SEPT4*、*SEPT6* 和 *SEPT12* 信号,相比之下,在患者和另一个携带 *SEPT12* 基因突变患者的精子环上未检测到 *SEPT4*、*SEPT6* 或 *SEPT12*(图 3A~C)。

另外,在正常精子中,顶体相关蛋白 *ACTL7A* 和 *ACROSIN* 定位在精子顶体,患者精子中其免疫信号几乎完全缺失,但在 *SEPT4*^{-/-} 突变患者精子中没有显著变化(图 4A、B)。Western blot 结果显示,与正常对照组相比,*SEPT12* 基因突变患者精子中 *ACTL7A* 和 *ACROSIN* 蛋白几乎完全缺失(图 4C)。

同时检测精子线粒体鞘标志蛋白 TOMM20 和鞭毛轴丝结构蛋白,包括放射轴辐复合物标志物 *RSPH3* 和中央二联管组分 *SPAG6*。如图 5 所示,在

正常精子中,*TOMM20* 蛋白定位在精子鞭毛中段的线粒体鞘,在 *SEPT12* 基因突变患者精子中,其蛋白信号几乎完全缺失,而在 *SEPT4* 基因突变患者精子中,*TOMM20* 免疫荧光信号改变不大;*RSPH3* 和 *SPAG6* 蛋白定位于正常精子鞭毛全长,同样,在 *SEPT12* 基因突变患者精子中,*RSPH3* 和 *SPAG6* 蛋白信号几乎完全缺失,而在 *SEPT4* 基因突变患者精子中,其免疫荧光信号几乎不变。Western blot 与免疫荧光结果一致,*TOMM20*、*RSPH3* 和 *SPAG6* 蛋白水平在 *SEPT12* 突变患者精子中显著降低。

3 讨论

根据世界卫生组织(WHO)的最新版本,当每次射精中具有正常形态的精子少于 4%,精子活力少于 40% 时可诊断为弱畸精子症,异常精子形态单独或同时发生在头、中段和主尾段^[8]。回顾研究,*SEPTs* 在发育和生长中起重要作用^[9],在成熟停滞、少弱精子症和弱畸精子症中都报告了 *SEPT12* 突变,表明 *SEPT12* 与特发性男性不育有关^[10]。迄今为止,几种 *SEPT* 蛋白已被确定为人类精子环的必要组成部分,例如,*SEPT4* 对维持精子环的结构完整性至关重要^[11]; *SEPT12* 可能在精子环处与 *SEPT2*、*SEPT4*、*SEPT6* 和 *SEPT7* 组装成八聚体细丝状体,并与 *SEPT2/4/6/7* 复合物相互作用以协调精子环的

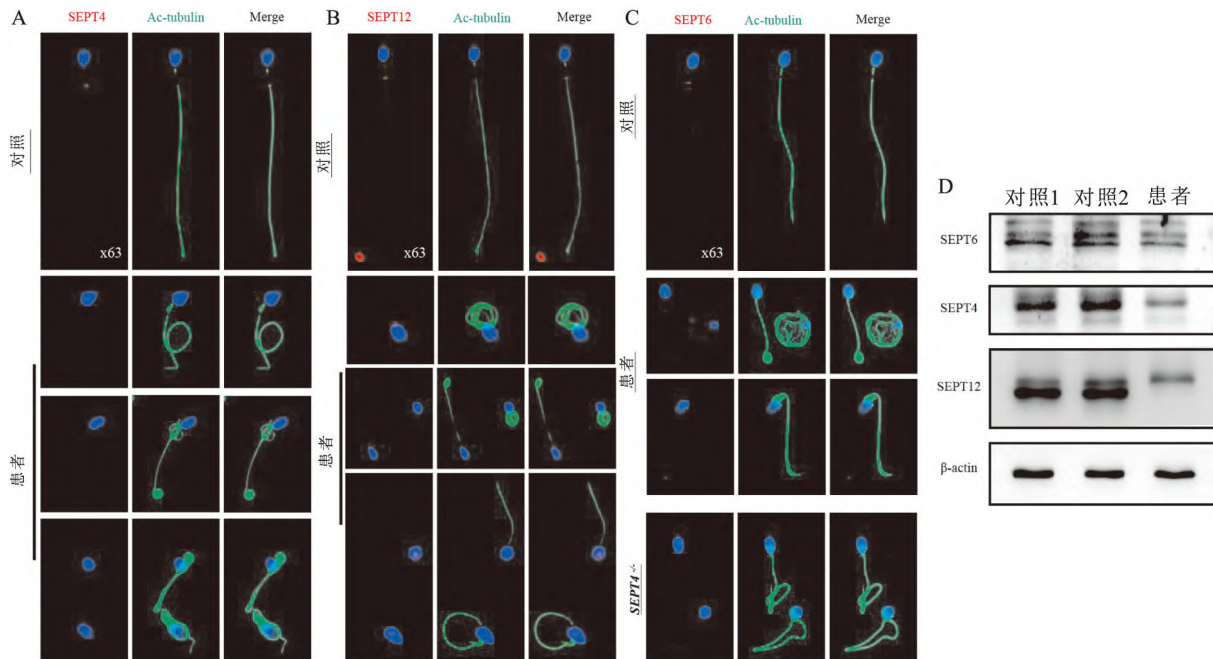


图 3 患者精子中 *SEPTs* 的水平及定位分析 ×63

A、B、C: Septin 家族中 *SEPT4*、*SEPT6* 和 *SEPT12* 的免疫荧光分析;D: Western blot 分析正常和 *SEPT12* 缺陷患者精子中 *SEPT4*、*SEPT6* 和 *SEPT12* 蛋白水平

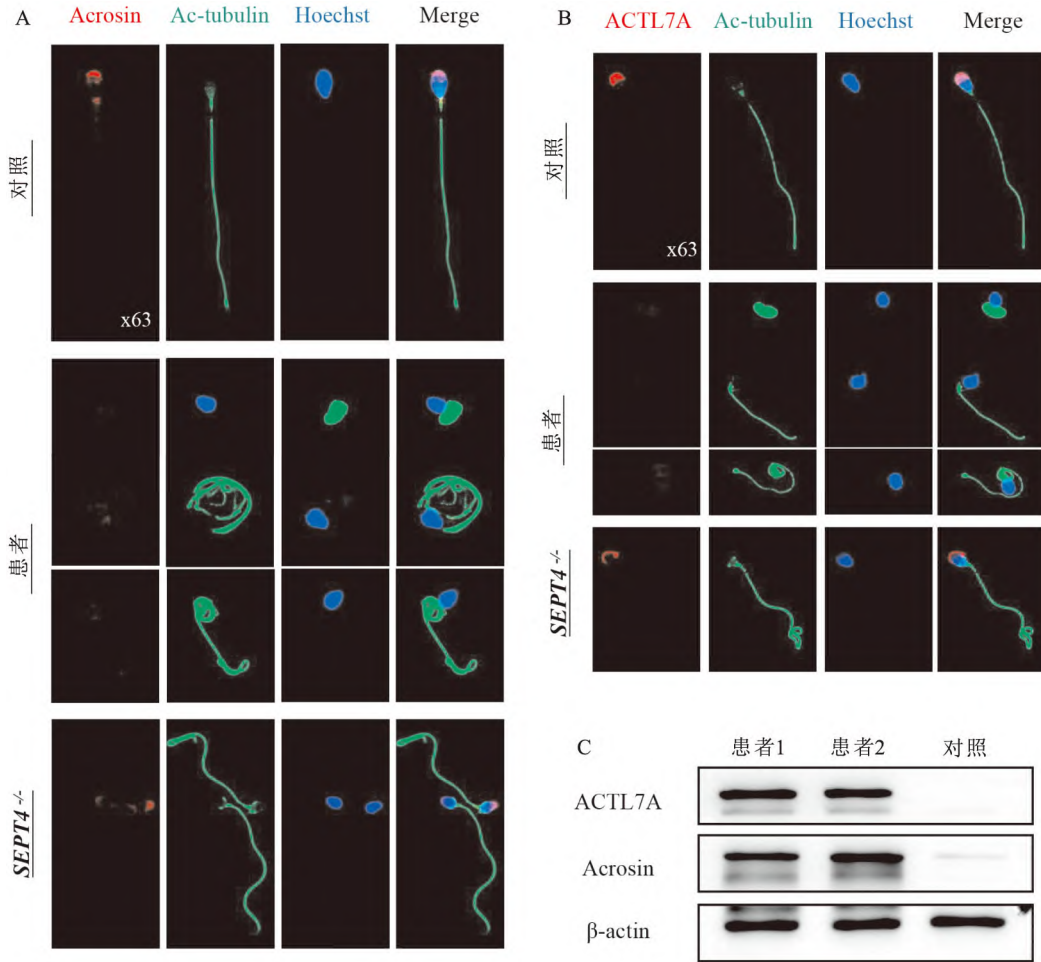


图4 精子顶体相关蛋白 ACTL7A 和 ACROSIN 蛋白定位及水平检测 ×63

A、B:正常精子、SEPT12 基因突变患者精子及 SEPT4 基因突变患者精子中顶体相关蛋白 ACTL7A 和 ACROSIN 蛋白定位;C:Western blot 分析患者和正常对照精子中 ACTL7A 和 Acrosin 蛋白水平

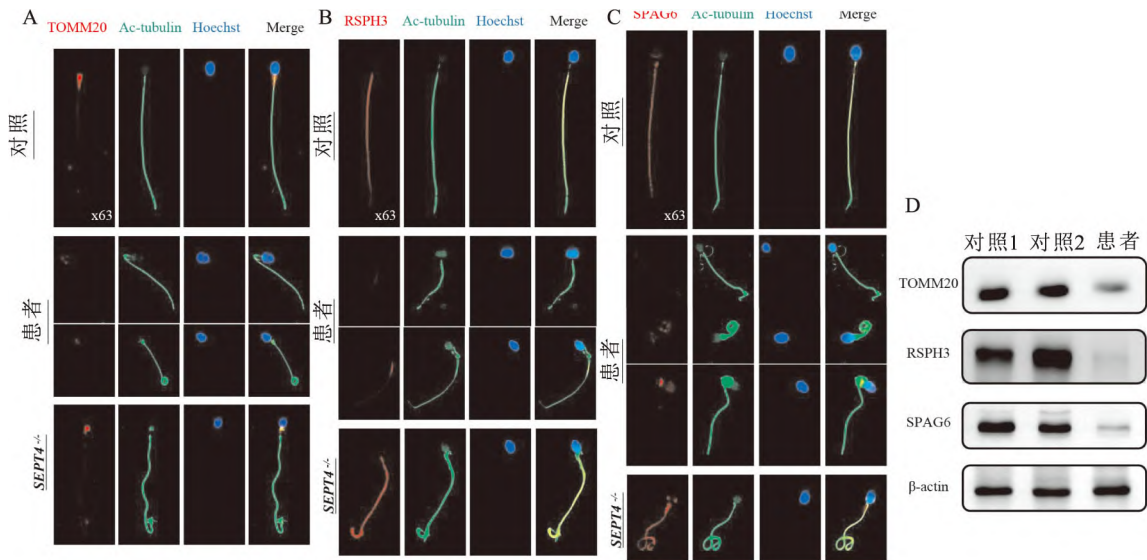


图5 线粒体鞘膜蛋白 TOMM20,放射轴辐蛋白 RSPH3 和中央二联管蛋白 SPAG6 位置及表达水平 ×63

A、B、C:TOMM20、RSPH3 和 SPAG6 在正常、SEPT12 基因突变患者和 SEPT4 基因突变患者精子中的定位检测;D:Western blot 分析患者和正常对照组精子中 TOMM20、RSPH3 和 SPAG6 的表达水平

形成^[12]。

SEPT12 在人类成熟精子的环部中观察到表达^[13]。本研究检测了精子环中的关键蛋白 SEPT4、SEPT6 和 SEPT12。这些蛋白共定位于正常成熟精子环中,但在患者中,这 3 种抗体的免疫荧光信号在精子环处完全缺失,并且透射电镜观察证实了这一发现。这进一步证明了精子环中存在 SEPT4/6/12 复合物,并且 SEPT12 基因突变会破坏该复合物形成,改变其他 SEPTs 的表达,这将导致精子环的缺失。

SEPT12 在精子发生过程中从顶体迁移到颈部和环^[14],其功能障碍将影响精子头部成型和尾部伸长^[6],这反映了 SEPT12 在精确建立精子结构完整性和精子活力方面的功能。在本研究中,患者精子活力明显减弱,精子表现出明显的形态缺陷,包括头部形状异常、微小或缺失的顶体、有缺陷的精子环、卷尾和短尾精子。随后,进一步研究患者精子中的这些缺陷。

SEPT12 的缺失将导致精子尾部结构的形态异常^[15]。对该患者精子尾部相关成分进行 Western blot 和 IF 检测,包括中央二联管组分 SPAG6 和放射轴辐复合物 RSPH3,显示精子中的 SPAG6 和 RSPH3 蛋白明显减少或缺失。这些发现表明 SEPT12 突变会导致 SPAG6 和 RSPH3 分布的减少或改变,这可能是 H&E、SEM 和 TEM 观察到的精子尾部畸形的原因。

Wang et al^[11]报道 SEPT4 突变患者大多数精子的线粒体在中段分布不均匀,并在颈部聚集,本研究中 SEPT4 突变患者的 TOMM20 免疫荧光结果也证明了这一点;与此同时,在 SEPT12 突变的患者中, TOMM20 的免疫荧光信号缺失,电镜显示大多数精子中存在严重的线粒体紊乱和缺失,Western blot 显示精子中的 TOMM20 明显下调。因此,与 SEPT4 突变导致线粒体在中段分布不均匀相比,SEPT12 突变将进一步影响线粒体的正确组装并导致其在精子中段的分布丢失。这可能是 SEPT12 突变导致精子活力严重下降的潜在机制。

研究^[6, 16]表明,SEPT12 突变患者表现出 PLC ζ 1 分布异常和顶体形成缺陷,SEPT12 的功能丧失构成了顶体发育异常的新遗传原因。与先前的研究一致,通过 TEM 观察到该患者精子头部超微结构中的顶体缺陷。进一步 Western blot 和 IF 分析,患者精子中的 ACTL7A 和 ACROSIN 显著减少或缺失。这提示了 SEPT12 突变会引起顶体重要成分 ACRO-

SIN 和 ACTL7A 分布减少或改变,进而引起精子顶体缺陷。

既往研究显示,SEPT6KO 小鼠基本正常,没有表现出任何 Septins 的定量变化^[17],SEPT3 和 SEPT5 KO 小鼠没有表现出明显的不育表型^[18]。在小鼠中,SEPT4 已被证明参与各种细胞功能^[16],然而,SEPT4 突变患者除弱畸精子症外无其他明显不适症状^[11]。这意味着 septin 系统具有高度的冗余性。在本研究中,IF 分析 SEPT4^{-/-} 突变患者精子中的 ACROSIN、ACTL7A、RSPH3 和 SPAG6 蛋白,表明 SEPT4 突变不会导致精子显著的顶体缺陷和鞭毛中微管结构的损伤;与之对比的是,SEPT12 突变会导致这些蛋白的改变或减少。这间接证明 SEPT12 对精子形成的影响比 SEPT4 更大,且其参与精子形成的分子机制更复杂,在男性不育中的作用可能更重要。

总之,SEPT12 基因 2 种复合杂合突变特异性地诱导了多种精子病变,进而导致人类弱畸精子症;在该 SEPT12 突变患者中出现了新的精子成分缺失及结构缺陷,可能是 SEPT12 突变在男性不育中的潜在分子机制。

参考文献

- [1] Ye Y, Wei X, Sha Y, et al. Loss-of-function mutation in TSGA10 causes acephalic spermatozoa phenotype in human [J]. Mol Genet Genomic Med, 2020, 8(7): e1284.
- [2] Ishikawa T. Axoneme structure from motile cilia [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(1): a028076.
- [3] Tourmaye H, Krausz C, Oates R D. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017, 5(7): 544-53.
- [4] Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility [J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(6): 369-84.
- [5] Farkasovsky M. Septin architecture and function in budding yeast [J]. Biol Chem, 2020, 401(8): 903-19.
- [6] Chen H, Li P, Du X, et al. Homozygous loss of septin12, but not its haploinsufficiency, leads to male infertility and fertilization failure [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 850052.
- [7] Lin C H, Shen Y R, Wang H Y, et al. Regulation of septin phosphorylation: SEPT12 phosphorylation in sperm septin assembly [J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2019, 76(1): 137-42.
- [8] Tan C, Meng L, Lv M, et al. Bi-allelic variants in DNHD1 cause flagellar axoneme defects and asthenoteratozoospermia in humans and mice [J]. Am J Hum Genet, 2022, 109(1): 157-71.
- [9] Toure A, Rode B, Hunnicutt G R, et al. Septins at the annulus of mammalian sperm [J]. Biol Chem, 2011, 392(8-9): 799-803.
- [10] Ozkara G, Ersoy Tunali N. SEPTIN12 c.474 G > A polymorphism as a risk factor in teratozoospermic patients [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(5): 4073-81.

- [11] Wang G, Zhu X, Gao Y, et al. Biallelic loss-of-function mutations in SEPTIN4 (C17ORF47), encoding a conserved annulus protein, cause thin midpiece spermatozoa and male infertility in humans [J]. *Hum Mutat*, 2022, 43(12): 2079–90.
- [12] Kuo Y C, Shen Y R, Chen H I, et al. *SEPT12* orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(5): 923–34.
- [13] Lin Y H, Lin Y M, Wang Y Y, et al. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(5): 1857–68.
- [14] Kuo Y C, Lin Y H, Chen H I, et al. *SEPT12* mutations cause male infertility with defective sperm annulus [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(4): 710–9.
- [15] Kuo P L, Chiang H S, Wang Y Y, et al. *SEPT12*-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 22102–16.
- [16] Shen Y R, Wang H Y, Tsai Y C, et al. The *SEPT12* complex is required for the establishment of a functional sperm head-tail junction [J]. *Mol Hum Reprod*, 2020, 26(6): 402–12.
- [17] Ono R, Ihara M, Nakajima H, et al. Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4 [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24): 10965–78.
- [18] Tsang C W, Fedchyshyn M, Harrison J, et al. Superfluous role of mammalian septins 3 and 5 in neuronal development and synaptic transmission [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(23): 7012–29.

***SEPT12* gene mutation leads to asthenospermia and male infertility**

Guo Senzhao^{1,2}, Yu Hui^{1,2}, Gu Meng^{1,2}, Wu Baoyan^{1,2}, Li Kuokuo^{1,2},

Tang Dongdong^{1,2}, He Xiaojin^{1,2}, Cao Yunxia^{1,2}, Lv Mingrong^{1,2}

(¹*Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032*; ²*National Health and Wellness Commission Key Laboratory of Gametes and Genital Tract Anomalies Research, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the role of member septin family (*SEPT12*) in human spermatogenesis and its influence on sperm motility and sperm ultrastructure. **Methods** Whole exome sequencing (WES) was performed on peripheral blood DNA extracted from 375 patients with asthenoteratozoospermia, and a patient with idiopathic infertility carrying compound heterozygous mutation of *SEPT12* was screened out. Sanger sequencing was performed to verify the mutation, and co-segregation analysis was performed in the family. The morphological abnormalities of sperm were analyzed by hematoxylin-eosin (HE) staining and scanning electron microscopy (SEM), and the ultrastructural defects of sperm were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Then the effects of the mutation on the level and position of the protein and the changes of the location and level of the defect structure markers were analyzed by Western blot and immune-fluorescence (IF). **Results** The compound heterozygous mutations c. C332A (p. T111K) and c. 406_416 del TGCTCGTATTG (p. q136 VFS * 39) in the *SEPT12* gene were screened and identified in a patient with asthenoteratozoospermia. The mutations were verified by Sanger sequencing, which was consistent with the co-segregation genetic pattern of the family. The mutations resulted in loss of protein expression, decreased sperm motility and sperm morphological deformities, mainly including short tail, curly tail and irregular sperm head. The ultrastructure of sperm showed that the annulus between the mid-piece and the principle-piece was missing, the acrosome membrane of sperm head fell off and the nucleus contained vacuoles. In the mid-piece of sperm flagella, the arrangement of mitochondrial sheath was disordered, most of flagella axoneme central pair was absent, microtubules doublet was missing or disordered, and some radical spoke was absent. By Western blot and IF, the marker proteins of related structural components were detected, and the results showed that the level of SEPT4 protein decreased, SEPT6 protein unchanged, acrosomal related proteins ACTL7A and ACROSIN protein missing, and the expression levels of mitochondrial and axoneme related proteins TOMM20, SPAG6 and RSPH3 protein significantly decreased. **Conclusion** The deletion of *SEPT12* protein caused by *SEPT12* gene mutation leads to the deletion of the annulus between the mid-piece and the principle-piece, and the abnormal assembly of sperm acrosome, mitochondrial sheath and flagella.

Key words male infertility; asthenoteratozoospermia; *SEPT12*; whole exome sequencing