

Testiküler Azospermili Erkeklerde Y Kromozomunda Azospermi Faktör Mikrodelesyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Belirlenmesi

Murat ULUĞ¹, Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN², Ayşe ARVAS ULUĞ³, Teksen ÇAMLİBEL¹

¹ Jinemed, İstanbul

² İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul

³ Kalamış Tıp Merkezi IVF Ünitesi, İstanbul

Özet

Y kromozomu delesyonları, ağır erkek infertilitesi ile ilişkilidir. Karyotip analizi ve sitogenetik yöntemlerle yapılan çalışmalarda, Y kromozomunun spermatogenezdeki önemi anlaşılmıştır. Y kromozomunun uzun kolunun distal bölgesindeki azospermi faktörü (AZF) bölgesi mikrodelesyonlarının, spermatogenez engellediği ortaya konmuştur. Bu çalışmada, Y kromozomunda AZF mikrodelesyonlarının varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Azospermili, oligozoospermili ve normozoospermili 45 erkeğe ait AZF mikrodelesyonları polimeraz zincir reaksiyonu metodu ile saptandı. Y kromozomu mikrodelesyonlarını tespit etmek için AZFa AZFb ve AZFc bölgelerine ait 2'şer adet sequence tagged sites (STS) bölgesi kullanıldı. Kullanılan STS bölgeleri: AZFa için, sY84 ve sY86; AZFb için, sY127 ve sY134; AZFc için ise, sY254 ve sY255'dir. Çalışmamızda azospermi grubundaki erkeklerden birinde 400 bç'lik sY254 (AZFc) ve 2 erkekte 126 bç'lik sY255 (AZFc) mikrodelesyonu bulundu. Oligozoospermi ve normozoospermi grubundaki erkeklerde araştırılan STS bölgelerine ait herhangi bir mikrodelesyon tespit edilmedi. Elde edilen sonuçlar, genetik faktörlerin infertil erkeklerde sperm üretimini etkileyebileceğini ve azospermili erkeklerde Y kromozomu mikrodelesyonlarının infertilite sebebi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Azospermi, kısırlık-erkek genetik faktörler, polimeraz zincir reaksiyonu

Cerrahpaşa Tıp Derg 2006; 37: 126 - 130

Detection of Y Chromosome Azospermia Factor Microdeletions with Polymerase Chain Reaction in Testicular Azospermic Men

Abstract

Y chromosome deletions are associated with severe male factor infertility. A significant role of the Y chromosome in spermatogenesis was established with karyotype and cytogenetic analysis. Deletions in the long arm distal region of the Y chromosome are known to prevent spermatogenesis. This region has been found to be effective in the regulation of spermatogenesis and named as azospermia factor (AZF). This study has investigated the presence of AZF microdeletions of Y chromosome in 45 men with azospermia, oligozoospermia and normozoospermia by using polymerase chain reaction method. In order to search Y chromosome microdeletions, 2 specific sequence tagged sites (STS) were studied from AZFa, AZFb and AZFc regions. The analyzed STS regions were sY84 and sY86 for AZFa, sY127 and sY134 for AZFb and sY254 and sY255 for AZFc. Results. In the azospermic group one man was found to have 400 bp sY254 (AZFc), whereas two were found to have 126 bp sY255 (AZFc) microdeletions. In men with oligozoospermia and normozoospermia none of the STS region microdeletions was detected. Conclusion. Our results demonstrate that genetic factors may influence sperm production in infertile men and Y chromosome microdeletions may cause infertility in men with azospermia.

KeyWords: Azospermia, infertility-male genetic factors, polymerase chain reaction

Cerrahpaşa J Med 2006; 37: 126 - 130

infertilite, çiftlerin bir yıl boyunca korunmadan düzenli ilişkilerine rağmen çocuk sahibi olamamasıdır. İnfertilite toplumlarda yaklaşık olarak % 15 sıklıkta görülür. İnfertil olguların % 20'sinde sadece erkek faktörü bulunurken, % 40'ında erkek faktörü diğer bir faktörle birlikte görülmektedir [1]. Non-obstrüktif azospermiye sahip erkeklerin yaklaşık % 12'sinde karyotip anomalisinin bulunması, ge-

netik etyolojinin erkek infertilitesinde belirgin bir rol oynadığını göstermektedir [2]. Aynı zamanda non-obstrüktif azospermi veya oligozoospermili erkeklerin % 6-18'inde Y kromozomunda mikrodelesyonlar saptanmıştır [3-6].

Tiepolo ve Zufardi [7] 1976 yılında karyotip analiz çalışmaları sırasında Y kromozomunun sperm üretiminde belirgin bir rol oynadığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, karyotip analizi ile azospermili 6 hastada Y kromozomunun uzun kolunda geniş bir terminal delesyon bulmuş ve bu bölgenin spermatogenez için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Tespit edilen bu bölge "Azospermi Faktör" (AZF) bölgesidir. Bu bölge spermatogenez için gerekli olan genleri taşımaktadır. Normal fenotipik görünüme sahip olduğu

Alındığı Tarih: 4 Aralık 2006

Yazışma Adresi (Address): Doç. Dr. Belgin Süsleyici Duman
İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Esentepe - İstanbul
E-posta: belgin.susleyici@bilim.edu.tr

halde idiyopatik infertiliteli erkeklerin % 10-20'sinde Y kromozomunun uzun kolunda bulunan ve fertilité için gerekli olan AZF bölgelerinden bazıları bulunmamaktadır. Sitogenetik olarak teşhis edilemeyen bu bölgeler AZFa, AZFb ve AZFc olarak adlandırılır. AZF bölgesi, Y kromozomunun uzun kolunun 11.23 bölgesinde bulunur. Sitogenetik ve moleküler çalışmalar, Y kromozomundaki delesyonların anormal spermatogenez ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [8-12].

AZF bölgeleri içinde çok sayıda STS bölgesi bulunmakla birlikte, çalıştığımız AZFa bölgesine ait sY84, sY86, AZFb bölgesine ait sY127, sY134 ve AZFc bölgesine ait sY254, sY255 bölgeleriyle yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, azospermili ve oligozoospermili infertil erkeklerde Y kromozomu üzerinde yer alan AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerindeki olası mikrodelesyonların bulunma sıklıklarının belirlenmesi ile birlikte, bu bölgenin DNA analizinin azospermili erkeklerde testis biyopsisi ile sperm varlığının tespiti için diyagnostik bir yöntem olup olmadığını araştırılmasıdır.

YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışma Grubu

Çalışma için 2003 ve 2004 yılları arasında Kalamış Tıp Merkezi İnfertilite Tedavi Merkezi'ne infertilite tedavisi amacıyla başvuran azospermili 32, oligozoospermili 6 ve normozoospermili 7 olmak üzere toplam 45 erkek seçildi. AZF mikrodelesyonlarının azospermiye, dolayısıyla infertiliteye sebep olduğunu göstermek amacıyla ile çalışmaya dahil edilen 45 erkeğin büyük bir kısmı azospermili erkeklerden seçildi. Kontrol grubu olarak, semen analizleri normal sınırlar içerisinde olan ve son iki yıl içerisinde doğal yollardan çocuk sahibi olmuş normal karyotipli 45 erkek çalışmaya dahil edildi. Negatif kontrol olarak, daha önceden yapılmış olan testlerde 46XX karyotipine sahip olduğu bilinen bir kadına ait kan örneği kullanıldı.

Uygulanan Klinik Testler

Çalışma için seçilen 45 erkekte alınan semen örnekleri, WHO kriterlerine göre değerlendirildi [13]. Azospermili erkeklerde sperm bulunmadığı, 3 hafta arayla alınan en az iki semen analizi ile doğrulandı. Aynı şekilde oligozoospermisi olan olgulardan da 3'er hafta arayla alınan iki semen örneği ile oligozoospermi varlığı doğrulandı. Çalışma grubumuzda bulunan tüm erkeklerin karyotip analizi özel genetik tanı merkezinde sitogenetik yöntemlerle yapıldı ve tümünün 46 XY karyotipine sahip olduğu bulundu.

Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları

Y kromozomu AZFa, AZFb ve AZFc mikrodelesyonlarını saptamak amacıyla çalışma grubumuzdaki 45 erkek

ve 1 kadından K3-EDTA'lı steril vakutainer tüpe 2 ml periferik kan alındı. Kanlar alındıktan sonra DNA'ları 2 hafta içerisinde izole edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

Uygulanan Laboratuvar Analizleri

Çalışmaya dahil edilen tüm erkeklerden alınan semen örnekleri WHO kriterlerine göre değerlendirildi. 3-5 günlük cinsel perhize maruz kalan erkeklerden alınan ejakülatlar, Makler sperm sayma cihazında sayıldı. Sperm olmayan erkeklerde ise, ejakülat 2500 g'da santrifüj edilip inverted mikroskopta değerlendirilen pellet içerisinde sperm olmadığı gözlemlendi. Semen analizinde azospermili olduğu sonucuna varılan 32 erkeğe, infertilite tedavisi için sperm varlığının araştırılması amacıyla Kalamış Tıp Merkezi'nde "Testicular Sperm Extraction" = Azospermili erkeğe testis biyopsisi (TESE) uygulandı. Lokal anestezi altında yapılan TESE işlemi ile testiküler dokudan insizyonla alınan tübüller, stereomikroskop altında parçalanıp, inverted mikroskopta sperm varlığı yönünden incelendi.

Y Kromozomu Mikrodelesyonu Tespiti ile İlgili Yöntemler

Çalışmaya katılan deneklerden deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonu için 2 ml venöz kan örnekleri alınarak K3-EDTA içeren vacutainer tüplere alındı. DNA izolasyonuna kadar -200C' de saklanan bu kanlardan tuz çöktürme yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı [15].

Y kromozomu mikrodelesyon analizi için hangi AZF bölgesinin çalışılacağı konusunda henüz belirlenmiş standart bir prosedür olmaması nedeniyle, European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) ve Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) tarafından bir komisyon oluşturularak Y kromozomu üzerinde bulunan AZF bölgelerine ait mikrodelesyonların analizi için çalışılması gereken minimum sayıdaki AZF bölgeleri belirlenmiş olduğundan (Y-Chromosome Microdeletions European Guidelines), biz de çalışmamızda yukarıda adı geçen komisyonların önermiş olduğu AZF bölgeleri arasından AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerinin her biri için 2'şer adet olmak üzere toplam 6 adet AZF bölgesini çalışmamıza dahil ettik [16]. Çalışmamızda kullandığımız AZF bölgeleri, AZFa için: sY84, sY86; AZFb için: sY127, sY134; AZFc için: sY254, sY255'dir. Kontrol primerleri olarak, SRY (Sex determining region of the Y chromosome) ve ZFY (Zinc finger gene protein on the Y chromosome) kullanıldı.

AZF bölgelerine ait Y kromozomu mikrodelesyonlarını tespit etmek amacıyla "Polimeraz zincir reaksiyonu" (PZR)'da ileri ve geri primerler ZFY-F : 5'- ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C - 3', ZFY-R : 5'- GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T - 3', SRY-F : 5'- GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA - 3', SRY-R : 5'- GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG - 3', sY84-F : 5' - AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT - 3', sY84-R : 5' - GCC TAC

TAC CTG GAG GCT TC - 3', sY86-F : 5' - GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC - 3', sY86-R: 5' - ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT - 3', sY127-F: 5' - GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA - 3', sY127-R: 5' - CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA - 3', sY134-F: 5' - GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG - 3', sY134-R: 5' - ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA - 3', sY254-F: 5' - GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA - 3', sY254-R: 5' - GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C - 3', sY255-F: 5' - GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT - 3', sY255-R: 5' - CTC GTC ATG TGC AGC CAC- 3' kullanıldı [16].

Y kromozomu üzerinde bulunan AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerine ait mikrodelesyonların analizi için yapılan Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda elde edilen "Polimeraz zincir reaksiyon (PZR)" ürünleri, % 4'lük agaroz jelde ayrıştırılarak ultraviyole ışık altında incelendi. AZF bölgelerine ait Y kromozomu mikrodelesyonlarının PZR ürünlerinin uzunlukları: SRY: 472 bç, ZFY: 495 bç, sY84: 320 bç (AZFa), sY86: 326 bç (AZFa), sY127: 274 bç (AZFb), sY134: 301 bç (AZFb), sY254: 400 bç (AZFc), sY255: 126 bç (AZFc)' dir. PZR ürünlerinin büyüklükleri GeneRuler™ 50 bç DNA Ladder molekül ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlendi.

BULGULAR

Bu çalışmada, azospermili, oligozoospermili ve normozoospermili 45 erkek, Y kromozomu mikrodelesyonlarının varlığı açısından incelendi. Çalışmaya alınan 32 "Azospermili erkeğe testis biyopsisi (TESE)" yapıldı. Çalışma grubuna dahil edilen erkeklerin semen özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. TESE uygulanan 32 erkeğin 15'inde sperm olmadığı, geri kalan 17'sinde ise sperm varlığı görülmüştür. Ejakülatta spermi olan 13 erkeğin 6'sı oligozoospermili 7'si ise normozoospermiliydi.

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen erkeklerin semen özellikleri.

Grup	Semen özelliği	Örnek Sayısı
Azospermili	Testis biyopsisinde spermi olmayanlar	15
	Testis biyopsisinde spermi olanlar	17
Oligozoospermili	Sperm sayısı < 20 milyon/ml	6
Normozoospermili	Sperm sayısı > 20 milyon/ml	7

Çalışma grubumuzdaki erkeklere ait sperm sayıları Tablo 2'de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplam 45 erkekten semen örneklerinin alınmasını takiben sperm sayımı Makler sperm sayma cihazında yapıldı. Buna göre, tüm çalışma grubunun % 70'i azospermili, % 11'i sperm sayısı 1 milyon/ml'nin altında olan ağır oligozoospermili, % 2'si sperm sayısı 5-10 milyon/ml arasında olan hafif oligozoospermili, % 2'si sperm sayısı 10-20 milyon/ml arasında olan sınırda oligozoospermili ve % 15'i ise sperm sayısı 20 milyon/ml'nin üzerinde olan normozoospermili olduğu belirlendi.

Y kromozomunda AZF mikrodelesyonlarının varlığı PCR ile araştırılmıştır. Bu amaçla AZFa AZFb ve AZFc bölgelerine ait 2'şer adet sequence-tagged sites (STS) bölgesi kullanıldı. Kullanılan STS bölgeleri AZFa için, sY84 ve sY86; AZFb için, sY127 ve sY134; AZFc için ise, sY254 ve sY255'dir. Yukarıda adları belirtilen aday STS bölgelerinin taranması için ayrı ayrı PCR reaksiyonları yapıldı. Y kromozomunun sY84 (AZFa), sY86 (AZFa), sY127 (AZFb), sY134 (AZFb) STS bölgelerindeki incelemelerde mikrodelesyon saptanmadı. Çalışmamızda 1 erkekte 400 bç'lik PCR ürününe sahip olan sY254 (AZFc) ve 2 erkekte 126 bç'lik PCR ürününe sahip olan sY255 (AZFc) mikrodelesyonu bulundu. Y kromozomunun AZFc bölgesinde tespit edilen sY254 ve sY255 mikrodelesyonlarının, çalışma grubumuzdaki azospermili erkeklere ait olduğu belirlendi (Tablo 3).

Tablo 4'de azospermili erkeklere ait Y kromozomu AZF mikrodelesyonlarının görülme sıklıkları verilmiştir. Azospermili erkekler, TESE sonucunda spermi bulunanlar ve bulunmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. TESE' de spermi olmayan 15 erkek ile yapılan incelemede, 3 erkekte AZFc delesyonlarının varlığı tespit edildi. Spermi olmayan azospermi grubunda, Y kromozomunda AZF bölgesi mikrodelesyonlarının sıklığı % 20 olarak hesaplan-

Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen erkeklerdeki sperm sayılar.

Semen özelliği	Sperm sayısı	Erkek sayısı (%)
Azospermili	0	32 (70)
Ağır oligozoospermili	< 1 milyon/ml	4 (11)
Hafif oligozoospermili	5-10 milyon/ml	1 (2)
Sınırda oligozoospermili	10-20 milyon/ml	1 (2)
Normozoospermili	> 20 milyon/ml	7 (15)

Tablo 3. Farklı semen özelliklerine göre AZF mikrodelesyonlarının dağılımı.

Delesyon tipi	Delesyonlu erkek (%)	Azospermi (%)	Oligozoospermi (%)	Normozoospermi (%)
sY84 (AZFa)	0	0	0	0
sY86 (AZFa)	0	0	0	0
sY127 (AZFb)	0	0	0	0
sY134 (AZFb)	0	0	0	0
sY254 (AZFc)	1	1 (2.2)	0	0
sY255 (AZFc)	2	2 (4.4)	0	0

di. TESE'de sperm bulunan erkeklerde ise mikrodelesyona rastlanmadı. Yapılan çalışmada tüm azospermili erkeklerdeki Y kromozomu AZF bölgesi mikrodelesyonlarının sıklığı ise % 9 olarak saptandı.

Tablo 4. Azospermili erkeklerde Y kromozomu AZF bölgesi mikrodelesyonlarının bulunma sıklığı.

Azospermili erkekler	Erkek sayısı	Mikrodelesyon (%)
TESE'de spermi olmayanlar	15	3 (20)
TESE'de spermi olanlar	17	0 (0)
TOPLAM	32	3 (9)

TARTIŞMA

Çalışmamızda, azospermi sebebiyle infertil olan erkeklerde, Y kromozomu üzerinde spermatogenez kontrol eden AZFc bölgesine ait mikrodelesyonların varlığı saptanmıştır.

Genetik nedenlere dayalı spermatogenez yetersizlikleri ilk kez 1976 yılında Tiepolo ve Zufardi [7] adlı araştırmacılar tarafından açıklanmış ve Y kromozomunun distal bölgesinde (Yq) mikrodelesyona sahip 6 hasta rapor edilmiştir. Aynı araştırmacılar Vogt ve ark. [5] tarafından Yq distal bölgesinde spermatogenez kontrol eden azospermi faktörü (AZF) bildirilmiştir.

Spermatogenez, Y kromozomu üzerindeki AZF bölgesi genleri tarafından düzenlenmektedir. AZF bölgesi mikrodelesyonları, azospermiye veya şiddetli oligozoospermiye sebep olmaktadır [12,14,15,16]. Genel olarak, AZFa ve b bölgesindeki komple delesyonlar, "Sertoli Cell Only (SCO)" Sendromu adı verilen germ hücrelerinin komple yokluğuna, AZFa veya b'deki kısmi delesyonlar veya AZFc delesyonları testiküler fenotipte SCO sendromuna veya spermatogenetik duraklamadan hipospermatogeneze kadar değişebilen sonuçlar oluşturmaktadır [6,16,17].

Y kromozomu mikrodelesyonlarının varlığını araştıran ve yaklaşık 3000 erkeği kapsayan çalışmaların sonucuna göre infertil erkeklerin % 7.3'ünde Y delesyonu bulunmuş olup delesyonların çoğunun azospermili erkeklerde olduğu görülmüştür [15]. 1995-1998 yılları arasında Y kromozomunun farklı bölgelerine ait delesyonlarla ilgili olarak azospermili ve oligozoospermili erkeklerde yapılan çalışmalara ait sonuçlar Y kromozomu mikrodelesyonlarının hem azospermili [3,18-29], hemde oligozoospermili erkeklerde varolabileceğini göstermiştir [3,5,28]. Biz de çalışmamızda, AZFc bölgesine ait sY254 ve sY255 mikrodelesyonlarını azospermili erkeklerde % 9 oranında saptarken, oligozoospermili erkeklerde herhangi bir mikrodelesyon varlığına rastlamadık.

Azospermili, oligozoospermili ve normozoospermili erkeklerde Y kromozomunda yapılan mikrodelesyon taramalarında, mikrodelesyon bulunma sıklığı % 1'den %

35'e kadar farklılık göstermektedir [27,30]. Azospermili, oligozoospermili ve normozoospermili erkekleri kapsayan çalışmamızda, mikrodelesyon görülme sıklığı % 6.6 idi. Oranlardaki bu farklılığın, mikrodelesyon analizi için henüz ortak bir protokolün olmaması ve farklı hasta seçim kriterlerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

İnfertilite tedavisinde uygulanan intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) tedavisi ile Y kromozomu mikrodelesyonları, doğacak olan erkek çocuklara da geçirilmektedir [16]. Yapılan çalışmalarda Y kromozomu mikrodelesyonuna sahip erkeklerin, erkek çocuklarına da geçişi çalışmalarda araştırılmış, bu erkeklerin çocuklarına puberteden itibaren androlojik incelemelerin gerektiği ve bu çocukların spermlerinin, ileri yaşlarda delesyona bağlı sperm üretiminin durması ihtimaline karşı dondurularak saklanması gerektiği vurgulanmıştır [5,22,25,26,28,31].

Çalışmamızda azospermili, oligozoospermili ve normozoospermili erkeklerde AZFa bölgesine ait sY84, sY86, AZFb bölgesine ait sY127, sY134 ve AZFc bölgesine ait sY254, sY255 bölgelerindeki AZF mikrodelesyonları ile ilgili olarak benzer çalışma grubu ve primerler seçilerek yayımlanmış herhangi bir çalışmaya rastlayamadığımız için elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda, TESE incelemesinde spermi bulunmayan 3 erkeğin birinin AZFc bölgesinde sY254, ikisinin AZFc bölgesinde ise sY255 mikrodelesyonu bulunmuştur.

Çalışma grubumuzdaki oligozoospermili ve normozoospermili erkeklerin AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerinde mikrodelesyon saptanmamıştır.

Sonuç olarak Y kromozomuna ait mikrodelesyonların tanımlanmasının prognostik önemi bulunmaktadır. Y kromozomu mikrodelesyonu olan erkeklerde testis biyopsisi alınsa bile sperm üretiminin olmama oranı yüksek olduğundan, sperm bulma amacı ile TESE yapılacak olan azospermili erkeklere, TESE öncesi AZFa, AZFb ve AZFc bölgelerine ait mikrodelesyon varlığının araştırılmasının uygun olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1.850.000) of three French region. Hum Rep 1991; 6: 811-816.
2. DeBraekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. Hum Rep 1991; 6: 245-250.
3. Reijo R, Lee TY, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 1995; 10: 383-393.
4. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, et al. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996; 347: 1290-1293.

5. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-943.
6. Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Rep* 1998; 13: 2812-2815.
7. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119-124.
8. Chandley AC, Gosden JR, Hargreave TB, et al. Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome. *J Med Genet* 1989; 26: 145-153.
9. Hartung M, Devictor M, Codaccioni JL, et al. Yq deletion and failure of spermatogenesis. *Ann Genet* 1988; 31: 21-26.
10. Andersson M, Page DC, Pettay D, et al. Autosomal translocations and mosaicism in the aetiology of 45 X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 1988; 79: 2-7.
11. Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, et al. A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 1991; 11: 443-451.
12. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, et al. Towards the molecular localization of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 29-33.
13. WHO Manuel: Sperm Cervical Mucus Interaction. 1999.
14. Vogt PH, Affara N, Davey P, et al. Report on the third international workshop on Y chromosome mapping. *Cyto Cell Genet* 1997; 79: 1-20.
15. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, Vogt PH. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl* 1999; 22: 292-299.
16. Krausz C, Quintana L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis. *Hum Rep* 2000; 15: 1431-1434.
17. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Rep* 1998; 4: 739-744.
18. Najmabadi H, Huang V, Yen P, et al. Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1347-1352.
19. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, et al. Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 82: 1075-1080.
20. Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male. *Hum Rep* 1991; 8: 1768-1770.
21. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel P. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Rep* 1997; 12: 1635-1641.
22. Kent MG, Kol S, Muallem A, et al. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol Hum Rep* 1996; 2:943-959.
23. Kremer J, Tuerlings J, Meuleman E, et al. Microdeletions of the Y-chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Rep* 1997; 12: 687-691.
24. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K, et al. Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Rep* 1996; 2,;775-779.
25. Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G, et al. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. *Cyto Cell Genet* 1996; 72: 155-158.
26. Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, et al. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 965-1967.
27. Van der Ven K, Montag M, Peschka B, et al. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing ICSI. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 699-704.
28. Pryor JL, Kent M, Muallem A, et al. Microdeletion of the Y chromosome of infertile men. *N Eng J Med* 1997; 336: 534-539.
29. Vereb M, Agulnik AI, Houston JT, et al. Absence of DAZ gene mutations in cases of non-obstructed azoospermia. *Mol Hum Rep* 1997; 3: 55-59.
30. Ferlin A, Moro E, Garolla, A. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Rep* 1999; 14: 1710-1716.
31. Kamischke A, Gromoll J, Simoni M, et al. Transmission of a Y-chromosomal deletion involving the DAZ and CDY genes from father to son though ICSI. *Hum Rep* 1999; 14: 2635-2639.