

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIO-MEDICHE
SEZIONE DI ENDOCRINOLOGIA, ANDROLOGIA
E MEDICINA INTERNA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE ANDROLOGICHE, DELLA
RIPRODUZIONE UMANA E BIOTECNOLOGICHE
XXIII CICLO**

DOTT. SALVATORE LA ROSA

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE DELEZIONI
PARZIALI DEL GENE DAZ: COME E PERCHE'**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. R. D'Agata
Tutor: Chiar.mo Prof. S. Travali**

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 5
2. SPERMATOGENESI	Pag. 7
3. CAUSE GENETICHE DI INFERTILITÀ	
MASCHILE	Pag. 11
<i>3.1 Anomalie cromosomiche</i>	Pag. 12
<i>3.2 Mutazioni nel gene della fibrosi cistica</i>	Pag. 13
<i>3.3 Micro-delezioni del cromosoma Y</i>	Pag. 14
4. IL CROMOSOMA Y	Pag. 16
5. AZOOSPERMIA FACTOR (AZF)	Pag. 22
<i>5.1 Micro-delezioni della regione AZF</i>	Pag. 25
6. I GENI DELLA REGIONE AZF	Pag. 28
<i>6.1 La regione AZFa</i>	Pag. 28
<i>6.2 La regione AZFb</i>	Pag. 29
<i>6.3 La regione AZFc</i>	Pag. 31
7. IL GENE DELETED IN AZOOSPERMIA (DAZ)	Pag. 34
8. SCOPO DELLO STUDIO	Pag. 39
8.1 Real-Time PCR	Pag. 40
8.2 Analisi dei frammenti	Pag. 46
8.3 Sequenziamento enzimatico di Sanger	Pag. 47
9. MATERIALE E METODI	Pag. 49
<i>9.1 Estrazione di DNA genomico</i>	Pag. 49

9.2	<i>Analisi molecolare del locus “AZF” del cromosomaY mediante PCR</i>	Pag. 50
9.3	<i>Metodiche convenzionali di studio delle delezioni parziali del gene DAZ</i>	Pag. 53
9.3.1	<i>Caratterizzazione tramite Single Variant Nucleotide (SVN)</i>	Pag. 53
9.4	<i>Nuove metodiche biomolecolari per lo studio delle delezioni parziali</i>	Pag. 55
9.4.1	<i>Real time PCR</i>	Pag. 55
9.4.2	<i>Analisi dei frammenti</i>	Pag. 58
9.4.3	<i>Sequenziamento</i>	Pag. 60
9.4.4	<i>Clonaggio</i>	Pag. 61
10.	RISULTATI	Pag. 61
10.1	<i>Analisi genetiche con PCR</i>	Pag. 61
10.2	<i>Analisi molecolare tramite Real-Time PCR</i>	Pag. 61
10.3	<i>Analisi molecolare tramite PCR ed enzimi di restrizione</i>	Pag. 62
10.4	<i>Analisi dei frammenti</i>	Pag. 66
10.5	<i>Sequenziamento</i>	Pag. 69
11.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag. 78
12.	BIBLIOGRAFIA	Pag. 81

1. INTRODUZIONE

L'infertilità è considerata dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) una patologia. Per infertilità si intende l'assenza di concepimento dopo 12/24 mesi di rapporti mirati non protetti.

Il fenomeno dell'infertilità secondo le diverse stime disponibili riguarda circa il 15% delle coppie. Le cause dell'infertilità, sia femminile che maschile sono numerose e di diversa natura.

La letteratura medica sottolinea il ruolo significativo di fattori sociali dovuti a fenomeni complessi come lo stile di vita, la ricerca del primo figlio in età tardiva (molto importante l'età della donna), l'uso di droghe, l'abuso di alcool, il fumo, le condizioni lavorative, l'inquinamento.

In molti casi, come per esempio nell'obesità o nelle infezioni, l'informazione e la prevenzione possono fare molto. In altri casi, come nell'endometriosi, sono essenziali la diagnosi precoce e cure adeguate e tempestive. Se l'infertilità rimane anche dopo un iter diagnostico e terapeutico esauriente, è possibile rivolgersi alle tecniche di procreazione medicalmente assistita.

In Italia si può stimare che circa sessantamila coppie l'anno siano affette da infertilità e una grande percentuale di queste si sottopone a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA). Il ricorso a queste tecniche se da un lato ha permesso di superare problemi di infertilità non trattabile con terapia specifica, dall'altro ha sollevato una

certa preoccupazione tra gli specialisti del settore, per il rischio di trasmettere alterazioni genetiche alla prole. Infatti, numerose ricerche hanno evidenziato che in una rilevante percentuale di pazienti l'infertilità è dovuta a cause genetiche. Le anomalie genetiche sono più frequenti nei maschi nei quali la spermatogenesi è più gravemente compromessa.

Si ritiene che circa 20% dei maschi che si rivolgono a strutture sanitarie per la cura dell'infertilità presentano un quadro di oligozoospermia o azoospermia non ostruttiva. Una parte di questi problemi può essere fatta risalire ad alterazioni dei numerosi geni coinvolti nella spermatogenesi.

Il ricorso a metodi di PMA potrebbe quindi contribuire alla trasmissione del danno genetico alle generazioni future in quanto queste tecniche consentono a pazienti con oligozoospermia severa o con azoospermia, previo ritrovamento di spermatozoi nel testicolo o nell'epididimo, di procreare. A tal riguardo, alcuni studi sembrano proprio indicare un aumento delle alterazioni cromosomiche nei bambini nati dopo ICSI (Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo).

2. SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è l'insieme dei fenomeni differenziativi e maturativi della linea germinale, che avvengono all'interno dei tubuli seminiferi del testicolo, e che determina la formazione dello spermatozoo a partire dallo spermatogonio.

Esso inizia con la pubertà e continua per tutta la durata della vita dell'uomo.

Il ciclo spermatogenetico dura 70 giorni, e la maturazione finale degli spermatozoi, che avviene nell'epididimo, ha la durata di 12-21 giorni. Si calcola che un testicolo umano normale produca 123 ± 18 milioni di spermatozoi al giorno.

Il processo maturativo avviene all'interno dell'epitelio seminifero con il contributo delle cellule di Sertoli.

In ogni segmento di tubulo seminifero le cellule germinali sono presenti in varie fasi di maturazione, e si spostano gradualmente dalla regione basale verso il lume del tubulo, durante il processo di maturazione.

Classifichiamo due tipi di spermatogoni:

- spermatogoni A, a loro volta distinguibili in spermatogoni Ad, cellule staminali di riserva, e spermatogoni Ap, derivati dagli Ad.
- spermatogoni B, derivati dagli Ap, che iniziano la prima divisione meiotica.

Dalla prima divisione meiotica degli spermatogoni B, si formano gli spermatociti di primo ordine e gli spermatociti di secondo ordine, i quali hanno subito un rimescolamento genetico.

Lo spermatocita di secondo ordine, attraverso una seconda divisione meiotica, riduce il normale corredo cromosomico diploide (46 cromosomi per l'uomo) ad un corredo aploide (23 cromosomi).

Oltre a tale fenomeno di riduzione del patrimonio genetico cellulare, lo spermatocita va progressivamente incontro ad un processo di trasformazione della sua morfologia (Spermiogenesi) divenendo spermatide, che, infine, si differenzia in spermatozoo.

Una normale spermatogenesi richiede anche un'integrità ed un'interazione tra le varie componenti somatiche del parenchima testicolare, e cioè la microcircolazione arteriosa, venosa, e linfatica, le cellule di Leydig o cellule interstiziali, e l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (*Fig. 1*).

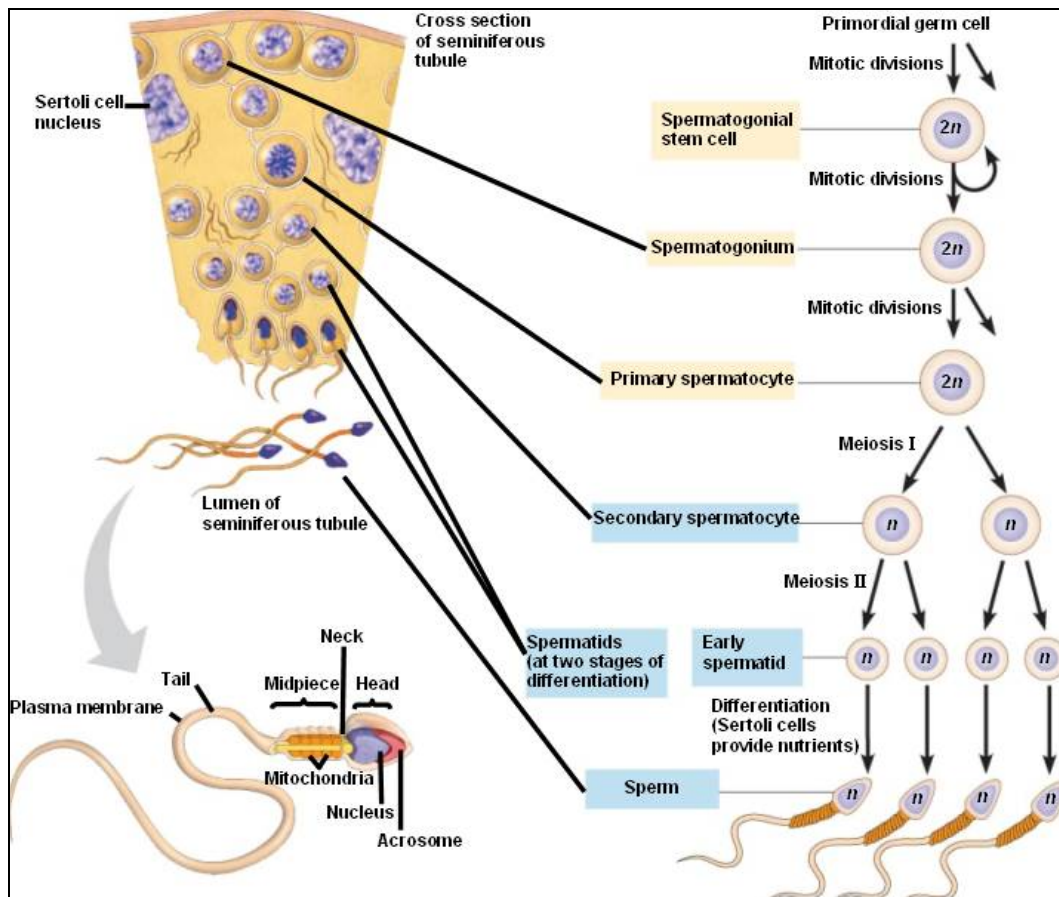


Fig. 1- Spermatogenesis

L'ormone luteinizzante (LH) ipofisario, trasportato dai numerosi vasi sanguigni, raggiunge il bersaglio testicolare, cioè la cellula di Leydig, stimola la produzione di testosterone in circolo, ed in parte diffonde dall'interstizio al tubulo seminifero, dove raggiunge il suo bersaglio tubulare, la cellula del Sertoli, trasportata dall'ABP (Androgen-Binding-Protein).

Il complesso ABP-androgeno, a contatto con la membrana della

cellula germinale, libera l'ormone che passa nel citoplasma della cellula, dove si lega ad un recettore specifico. Il complesso androgeno-recettore entra quindi nel nucleo, e si lega alla cromatina ad uno specifico sito accettore, per svolgere la sua azione modulatrice. L'ormone follicolo-stimolante (FSH) ipofisario, attraverso il sistema arterioso, raggiunge le zone interstiziali del testicolo, e si diffonde passivamente attraverso la membrana basale del tubulo seminifero, si lega ad un recettore specifico di membrana della cellula di Sertoli e, stimolando la produzione di AMP ciclico, promuove la sintesi di RNA, che sintetizza l'ABP.

La cellula del Sertoli, stimolata dal testosterone e dall'ormone follicolo-stimolante (FSH) ipofisario, assolve alla sua funzione trofica e di controllo della spermatogenesi. Queste, essendo provviste di microtubuli e filamenti, sono in grado di far progredire le cellule germinali dalla base verso il lume tubulare, e, contemporaneamente, la barriera emato-testicolare evita la formazione di anticorpi specifici nei confronti delle cellule germinali più mature.

Altre funzioni della cellula di Sertoli sono:

- nutrizionale nei confronti della linea germinale per il suo contenuto in glicogeno e per la produzione di lattato e piruvato;
- aromatizzazione degli androgeni in estrogeni;
- fagocitosi per le cellule germinali danneggiate;
- produzione di androgen-binding-protein (ABP) e inibina B,

proteine specifiche per il testicolo;

- produzione di somatomedina C e transferina, proteine non specifiche per il testicolo;
- produzione di fattori stimolanti la mitosi degli spermatogoni, quale l'SGF (Seminiferous Growth Factor);
- produzione di fattori di crescita, quali l'IGF-I utili nella spermatogenesi

3. CAUSE GENETICHE DI INFERTILITÀ MASCHILE

L'infertilità influenza circa il 15% delle coppie e anomalie genetiche contribuiscono per il 15-30% all'infertilità maschile.

Le anomalie a livello dei cromosomi sono molto comuni negli uomini oligo-azoospermici (ridotta o assente presenza di spermatozoi),

l'incidenza è del 2%, ma è circa cinque volte più alta di quella trovata nella popolazione maschile normale.

Le tre principali cause genetiche di infertilità sono:

- anomalie cromosomiche
- mutazioni nel gene della fibrosi cistica
- microdelezioni del cromosoma Y

3.1 Anomalie cromosomiche

Alterazioni cromosomiche possono essere autosomiche cioè interessare i cromosomi dall'1 al 22 oppure sessuali che sono a carico dell'X ed Y.

Gli uomini con un numero di spermatozoi al di sotto di 1 milione/ml hanno una percentuale di anomalie cromosomiche intorno al 5-7%, che aumenta intorno al 10-15% in pazienti azoospermici.

Negli uomini infertili le più comuni anomalie cromosomiche sono le aneuploidie ossia presenza di un incorretto numero di cromosomi.

La sindrome di Klinefelter è un'anomalia cromosomica causata da un'aneuploidia con una prevalenza del 5% in uomini con oligozoospermia severa e 10% in uomini con azoospermia.

È caratterizzata dalla presenza nell'uomo di tre cromosomi sessuali XXY anziché XY. La sindrome generalmente causa un arresto della spermatogenesi determinando sterilità.

Ci sono, però, due forme di sindrome di Klinefelter:

- non-mosaico 47, XXY
- mosaico 47, XXY

Circa il 25% dei pazienti con sindrome non -mosaico hanno spermatozoi nel loro eiaculato.

Gli uomini con la forma mosaico sono invece per il 74% azoospermici.

Un'altra fonte di anomalie cromosomiche sono le traslocazioni. Le

traslocazioni autosomiche sono trovate dalle 4-10 volte in più negli infertili rispetto agli uomini normali.

La traslocazione Robertsoniana è la più frequente nell'uomo ed influenza la fertilità di 1/1000 uomini.

Consiste nella fusione di due cromosomi comportando la riduzione del numero cromosomico da 46 a 45.

Può coinvolgere i cromosomi 13, 14, 15, 21 e 22, ma il tipo più comune coinvolge i cromosomi 13 e 14.

Anche se la prevalenza delle traslocazioni Robertsoniana è solo dell'0,8% negli uomini infertili comunque è nove volte più alta di quella della popolazione generale.

Le traslocazioni Robertsoniane sono più comuni negli oligozoospermici e azoospermici con frequenza 1.6% e 0.09% rispettivamente.

Inoltre, le traslocazioni robertsoniane hanno ruolo che hanno nella poliabortività

3.2 Mutazioni nel gene della fibrosi cistica

La fibrosi cistica è una malattia genetica, il cui difetto di base consiste nella produzione di una proteina alterata chiamata CFTR. La proteina prodotta da CFTR è un canale che normalmente trasporta il cloro e il sodio (e conseguentemente l'acqua) attraverso le membrane cellulari.

L'incidenza della malattia è di 1/2500 nati. I portatori sani nella

popolazione generale sono 1/25.

Questo difetto costituisce circa il 15% delle cause di sterilità maschile che nel 80% dei casi è riconducibile a mutazioni del gene CFTR

Il liquido seminale si presenta più denso e non permette agli spermatozoi di muoversi liberamente ed adempiere al proprio dovere fecondando l'ovocita poiché intrappolati dalla densità del liquido stesso, di conseguenza si ha infertilità.

Inoltre questa malattia è associabile ad agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD), che trasportano lo sperma dall'epididimo alle vescicole

seminali, perciò una loro anomalia provoca oligozoospermia e azoospermia.

3.3 Micro-delezioni del cromosoma Y

Microdelezioni del cromosoma Y sono cause di infertilità nell'uomo.

Una micro-delezione è definita come una perdita di una piccola parte del cromosoma che contiene geni.

La prevalenza delle microdelezioni in uomini azoospermici è tra il 10-15%.

Negli oligoozoospermici la prevalenza delle microdelezioni è del 5-10%.

Una particolare area di interesse del cromosoma Y è la regione del fattore azoospermico (AZF) che contiene diversi geni coinvolti nella

produzione e maturazione degli spermatozoi.

La regione AZF consiste di tre sottoregioni: AZFa, AZFb e AZFc, che possono determinare diversi quadri di infertilità (*Fig. 2*).

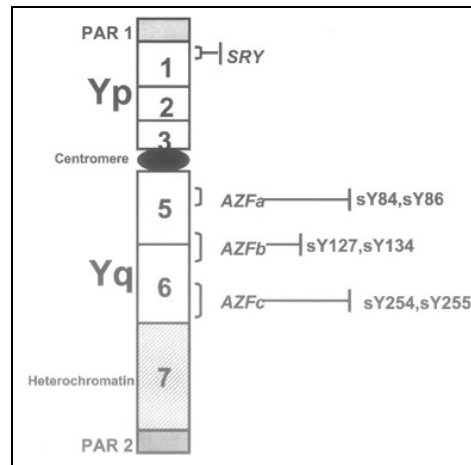


Fig.2 Mappa del cromosoma Y

Numerose ricerche hanno dimostrato che il 5-10% dei casi di oligo/azoospermia è dovuta a microdelezioni (Foresta et al., 2000; Ma et al.), a livello del braccio lungo del cromosoma Y (Yq), non evidenziabili con l'esame classico del cariotipo.

4. IL CROMOSOMA Y

Il cromosoma Y è uno dei due cromosomi umani determinanti il sesso (l'altro cromosoma sessuale è il cromosoma X). I cromosomi sessuali sono una delle 23 coppie di cromosomi omologhi umani. Ci si riferisce a X e Y come cromosomi sessuali, in contrapposizione agli altri 44, definiti autosomi, che sono presenti sia negli individui di sesso maschile che in quelli di sesso femminile. Numerose altre specie viventi (in particolare i mammiferi) presentano un sistema di cromosomi sessuali del tutto simile.

Il cromosoma Y conta oltre 57 milioni di paia di basi e rappresenta circa lo 0,38% del DNA nelle cellule del maschio, mentre è assente nelle cellule della femmina. Per dimensione, si tratta del ventunesimo (terzultimo) cromosoma umano. Vi sono stati individuati appena 140 geni e la stragrande maggioranza del suo DNA non sembra avere alcuna funzione. In molte altre specie, il cromosoma Y è quello più povero di geni.

Il cromosoma Y è un piccolo cromosoma acrocentrico, caratterizzato da una ridotta parte eucromatica che comprende il braccio corto del cromosoma Y (Yp) e la parte prossimale del braccio lungo (Yq), in cui si trovano i pochi geni deputati al differenziamento delle caratteristiche sessuali maschili ed al controllo della spermatogenesi, mentre il resto dell'Yq è costituito da un'ampia porzione eterocromatica. All'estremità dei bracci del cromosoma Y, si trovano le

regioni pseudoautosomiche indicate come PAR, in corrispondenza delle quali il cromosoma Y ricombina con il cromosoma X durante la meiosi. Tra le due regioni PAR, si trova la regione non ricombinante chiamata NRY. Il braccio corto (Yp) e la parte prossimale dell'Yq, sono costituiti da eucromatina, mentre il resto del braccio lungo, è formato da eterocromatina, dove si trovano sequenze non codificanti altamente ripetute. Il braccio corto Yp viene comunemente chiamato Yp11. La porzione eucromatica del Yq indicata Yq11, è suddivisa in Yq11.1, Yq 11.21, Yq 11.22, Yq 11.23, mentre la porzione eterocromatica è indicata come Yq12. Il cromosoma Y contiene geni e famiglie di geni che svolgono un ruolo critico nel determinismo del sesso, nel differenziamento del testicolo e nella produzione degli spermatozoi. Cinque Kb prossimalmente alla regione PAR dell'Yp è localizzato il gene SRY (sex-reversal-Y-"Regione determinante il Sesso sul cromosoma Y") che produce il "fattore di differenziazione testicolare (TDF)", in grado di guidare lo sviluppo della gonade maschile nell'embrione. L'SRY appartiene alla famiglia dei geni SOX (ha omologia con SOX3), molti dei quali sono coinvolti nei processi di sviluppo durante l'embriogenesi.

Nell'ultimo decennio, grazie allo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, che hanno permesso l'integrazione dei dati citogenetici, grazie ai dati delle mappe di delezione e ai dati del sequenziamento del DNA, la conoscenza della struttura del cromosoma Y si è evoluta rapidamente. L'eucromatina (localizzata negli intervalli di delezione

da 1 a 6) è stata stimata essere 59 Mb, mentre l'eterocromatina (localizzata nell'intervallo di delezione 7) risulta essere la parte preponderante di questo cromosoma. La parte eucromatica contiene almeno 30 geni diversi che possono essere suddivisi in due classi: quelli che sono specificatamente espressi nel testicolo e quelli che sono espressi ubiquitariamente e hanno degli omologhi sul cromosoma X. I geni testicolo specifici tendono essere presenti in copie multiple e sono organizzati in cluster e ristretti in una data regione oppure sono dispersi lungo il cromosoma.

Costruire la mappa cromosomica del cromosoma Y non è stato facile proprio per la mancanza della ricombinazione con altri cromosomi. Il primo Autore che ha proposto una mappa è stato Vergnaud che ha diviso il cromosoma Y in 7 intervalli; gli intervalli 1 a 4 vanno dalla regione telomerica del braccio corto al centromero; gli intervalli 5 e 6 si trovano nella parte eucromatica Yq, mentre l'intervallo 7 corrisponde alla regione eterocromatica. A livello dell'intervallo 5, si trovano le sub-regioni Yq11.21 e metà dell'Yq11.22, mentre l'intervallo 6 si trova a metà di Yq11.22-Yq11.23 (Ferlin et al., 1999). Successivamente, Vollrath et al., basandosi sugli studi fatti da Vergnaud hanno suddiviso l'intervallo 6, in 43 sotto-intervalli (*Fig. 3*).

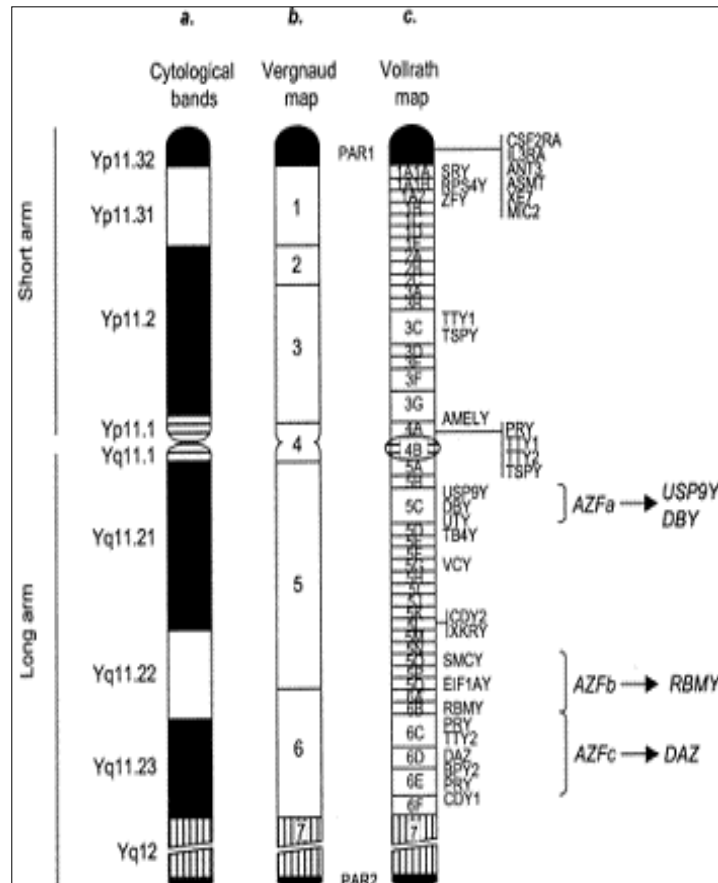


Fig.3- Mappe di delezione del cromosoma Y

Il cromosoma Y ha rivelato una struttura alquanto singolare e altamente complessa; in esso sono presenti parecchie sequenze ridondanti, palindromi e geni, di cui circa 27 finora caratterizzati, presenti in copia singola o multipla, variamente distribuiti tra il braccio corto ed il braccio lungo del cromosoma Y oppure raggruppati in cluster, ai quali viene attribuito un ruolo critico nel controllo della spermatogenesi.

Il cromosoma Y, come già detto, è costituito per il 95% dalla regione

NR_Y, nella quale non avvengono scambi con altri cromosomi durante la meiosi. Recenti studi hanno però dimostrato che questa regione è sede di un'intensa attività di ricombinazione intracromosomica tra sequenze altamente omologhe. Questa regione è stata rinominata "Male Specific Region" (MSY) e copre l'intero cromosoma Y ad eccezione delle regioni PAR; la porzione eucromatica della MSY si estende per circa 23 Mb, 8 Mb lungo il braccio corto del cromosoma Y e 14,5 Mb per il braccio lungo, mentre la regione eterocromatica di MSY si estende per circa 40 Mb ed è costituita dal blocco eterocromatico in Yq12, dal centromero e da una terza regione che interrompe la porzione eucromatica e mappa in Yq11.22, copre un'area di 400 Kb e comprende circa 3000 ripetizioni in tandem, ognuna delle quali 125 bp. Nella regione MSY possiamo distinguere tre tipi di sequenze in base alla derivazione: X-trasposte, X-degenerate, ed ampliconi, in ognuna delle quali troviamo elementi ripetuti di diversa natura.

Le sequenze ampliconiche provengono dalla trasposizione sul cromosoma Y di geni appartenenti ad autosomi che si sono, nel corso dell'evoluzione, duplicati e/o invertiti. Nel cromosoma Y vi sono circa 7 blocchi di sequenze ampliconiche organizzate in palindromi, distribuite sul braccio corto, nella regione adiacente al centromero, ma soprattutto sul braccio lungo di Y, prossimale a Yq12, e coprono un'area totale di 10,2 Mb. Quelli di quest'ultima regione sono suddivisi in sei famiglie, ognuna delle quali è composta da un numero

diverso di membri il cui orientamento può essere diretto o invertito. Alcune famiglie presentano un'omologia del 99,98%, cioè due o tre nucleotidi ogni 10 Kb sono diversi.

Negli ampliconi sono stati identificati 60 copie geniche raggruppate in 9 famiglie (TSPY, VCY, XKRY, CDY, HSFY, RBMY, PRY, BPY2, DAZ), tutti espressi soprattutto o esclusivamente nel testicolo, con omologhi su X o su cromosomi autosomici.

La composizione del cromosoma Y è il risultato di un percorso evolutivo; i cromosomi sessuali X e Y si sono evoluti a partire da un antenato comune seguendo percorsi diversi, a causa della prolungata assenza di ricombinazione. L'X ha mantenuto quasi tutti i geni dell'antenato, mentre l'Y li ha persi quasi del tutto ed ha subito nel corso dell'evoluzione una progressiva specializzazione, in modo tale da acquisire funzioni specifiche per lo sviluppo delle cellule germinali maschili. I geni presenti sul cromosoma Y sono un retaggio di geni appartenuti ad un cromosoma ancestrale, della trasposizione o retrotrasposizione e successiva amplificazione di geni localizzati sul cromosoma X o su autosomi. Questi geni giunti sul cromosoma Y hanno acquisito e quindi mantenuto una funzione spermatogenetica, diventando esclusivamente o prevalentemente testicolo-specifici; l'amplificazione cui sono andati incontro nel corso dell'evoluzione potrebbe essere interpretata come una soluzione che la natura ha adottato per aumentare i livelli di espressione dei geni testicolari e quindi la produzione di spermatozoi.

5. AZOOSPERMIA FACTOR (AZF)

L'azoospermia è la completa assenza di spermatozoi nel liquido seminale.

Nel 2% circa delle coppie infertili e nel 10% circa degli uomini infertili è presente questo tipo di patologia. L'azoospermia può essere **ostruttiva o secretoria**.

L'**azoospermia ostruttiva** può essere dovuta a vasectomia, assenza bilaterale dei vasi deferenti, interruzione dei vasi deferenti o dell'epididimo post-chirurgica o da infezioni epididimali. In tutti questi casi la spermatogenesi risulta essere normale e solitamente vi è una presenza abbondante di spermatozoi nell'epididimo e nei tubuli seminiferi testicolari. Il recupero di tali cellule risulta quindi semplice e viene effettuata mediante aspirazione percutanea degli spermatozoi dall'epididimo (PESA) o mediante prelievo microchirurgico degli spermatozoi epididimali (MESA).

L'**azoospermia secretoria** è dovuta invece a severi difetti nella produzione di spermatozoi che vengono comunemente definiti come: ipospermatogenesi, arresto maturativo o sindrome da sole cellule del Sertoli. L'epididimo di questi pazienti è generalmente privo di spermatozoi.

Gli spermatozoi devono essere in questi casi prelevati direttamente dal testicolo mediante biopsia testicolare (TESE) o estrazione percutanea di spermatozoi dal testicolo (FNA). Non sempre sono presenti

spermatozoi maturi in questi pazienti. La probabilità dipende principalmente dal quadro istologico presente nel testicolo. In molti casi è possibile che il numero di spermatozoi presenti sia estremamente basso e per il loro recupero può essere necessaria una ricerca al microscopio di alcune ore.

Studi molecolari condotti su pazienti azoospermici e oligozoospermici hanno permesso di identificare delle regioni del cromosoma Y, definite azoospermia factor, la cui integrità è fondamentale per la spermatogenesi in quanto contengono dei geni implicati nella maturazione degli spermatozoi. I primi studiosi che hanno correlato le delezioni sul cromosoma Y con l'azoospermia sono stati Tiepolo e Zuffardi (1976). I due Autori furono i primi a formulare l'ipotesi dell'esistenza di un fattore genetico essenziale per la spermatogenesi, da loro chiamato come "azoospermia factor" (AZF). Successivamente tramite STS-PCR o Southern Blot, è stato possibile individuare delezioni submicroscopiche di Yq, chiamate "microdelezioni" (Vogt et al., 1992). Queste sono state definite microdelezioni, perchè sono delezioni molto piccole, non evidenziabili con l'esame classico del cariotipo. La regione AZF è stata suddivisa in senso prossimo-distale in tre regioni non sovrapposte, indicate come AZFa, AZFb e AZFc (Vogt et al., 1996) (Fig. 4). Dopo poco tempo è stata proposta la presenza di un quarto locus localizzato tra AZFb e AZFc, ma resta ancora da confermare se tale regione esista effettivamente (Kent-First et al., 1999). Tali regioni contengono geni ed unità trascrizionali, la

maggioranza dei quali presenta un'espressione specifica testicolare. Le microdelezioni del cromosoma Y sono la causa genetica-molecolare più frequente dell'infertilità maschile (Krausz et al. 2003).

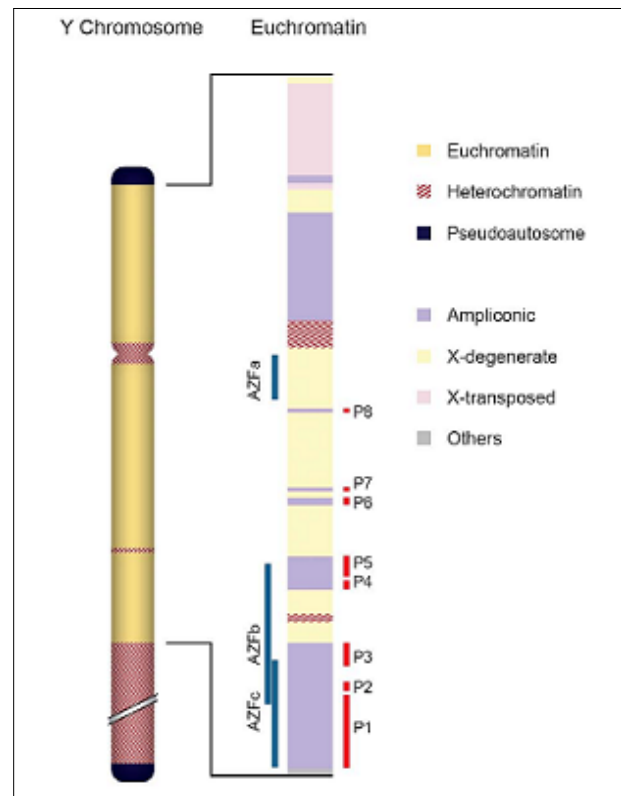


Fig. 4 Rappresentazione delle tre regioni AZF sull'euromatina del cromosoma Y. La regione AZFa è localizzata nella regione X-degenerata, tutti i geni dell'AZFc sono localizzati sulla regione ampliconica; i geni dell'AZFb sono localizzati sia sulla regione ampliconica che sulla regione X-degenerata

5.1 Microdelezioni della regione AZF

Le microdelezioni del cromosoma Y sono la causa genetica - molecolare più frequente dell'infertilità maschile (Krausz et al. 2003). Grazie all'identificazione di sequenze specifiche (STS) sul cromosoma Y, che ha permesso lo studio su larga scala del suo braccio lungo, sono state distinte tre regioni critiche per la spermatogenesi, chiamate Azoospermia Factor (AZFa, AZFb e AZFc) (Tiepoli e Zuffardi 1976; Vogt et al. 1996). Tali regioni contengono geni ed unità trascrizionali, la maggior parte dei quali presenta un'espressione specifica testicolare. Le microdelezioni dell'Yq determinano una grave testicolopatia che va dall'oligozoospermia severa all'azoospermia, e coinvolgono una o più regioni AZF; il 60% interessa la regione AZFc, il 16% la regione AZFb e il 5% la regione AZFa, mentre il 14% dei casi, la microdelezione è più ampia e comprende più regioni AZF contemporaneamente. Nel 5% dei casi la microdelezione è localizzata fuori dalle regioni AZF. (Fig. 5)

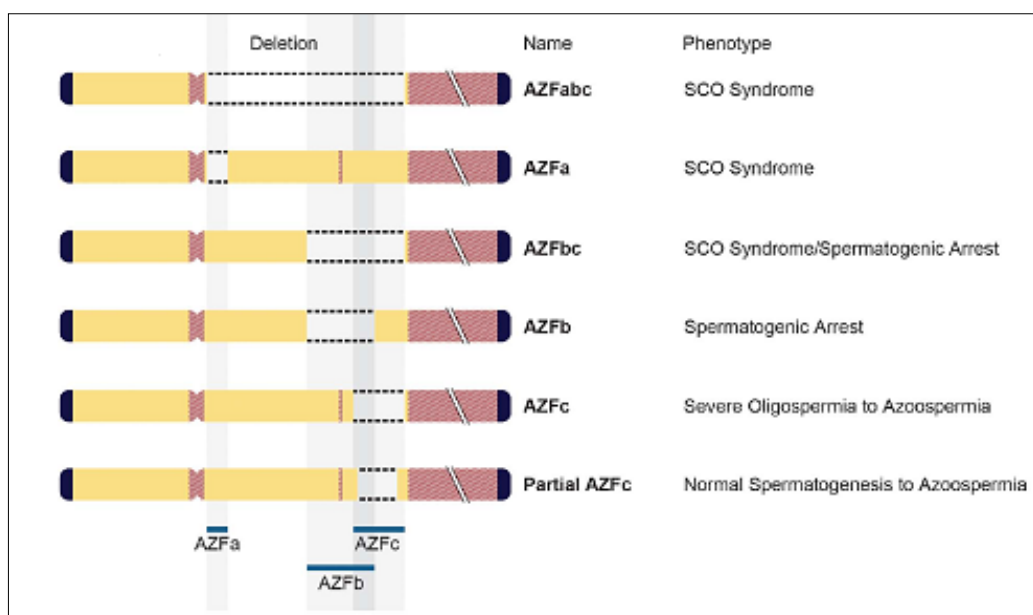


Fig. 5 Delezioni della regione AZF. Correlazioni Genotipo-Fenotipo

La prevalenza delle microdelezioni dell'Yq nei soggetti infertili è stimata attorno al 10% (Foresta et al., 2001). Questa percentuale aumenta al 15% nei pazienti con grave oligozoospermia idiopatica e al 20% in quelli con azoospermia non ostruttiva idiopatica. Microdelezioni si possono anche riscontrare nei soggetti con grave testiculopatia associata ad altre cause di danno testicolare come il varicocele o il criptorchidismo (Foresta et al., 1999; Krausz et al., 1999; Moro et al., 2000). La relazione genotipo-fenotipo è alquanto complessa. L'impressione generale che si ricava dalla letteratura è che le delezioni nell'AZFa e AZFb sembrano causare più frequentemente azoospermia. Va notato comunque che delezioni nell'AZFb possono essere associate, seppur raramente, anche a moderata oligozoospermia, soprattutto quando la delezione non coinvolge

l'intero intervallo AZFb (Pryor et al., 1997; Van der Ven et al., 1998; Krausz et al., 1999a). L'istologia testicolare dei pazienti deleti per l'AZFc varia dalla sindrome a sole cellule del Sertoli, agli arresti maturativi e alla ipospermatogenesi (Foresta et al., 2001). Pazienti con delezione dell'AZFb possono avere diversi difetti e spesso si riscontra un arresto maturativo (Elliott, 2000). Anche il fenotipo associato a delezione dell'AZFa può essere variabile (Foresta et al., 2000c). Due geni sono mappati nell'AZFa (Sargent et al., 1999; Sun et al., 1999; Foresta et al., 2000b) e in questo caso si può tentare di chiarire meglio la correlazione genotipo-fenotipo (Foresta et al., 2000c), poiché esistono delezioni gene-specifiche. Una stretta correlazione tra genotipo e fenotipo è invece abbastanza chiara quando la delezione coinvolge tutte e tre le regioni AZF (AZFa-c); in questi casi si osserva sempre una sindrome a sole cellule del Sertoli. La non chiara correlazione genotipo-fenotipo probabilmente riflette le nostre conoscenze attuali sulle regioni AZF. Infatti, la struttura di questi intervalli, il loro contenuto genico e dettagliate analisi di delezione non sono ancora disponibili.

6. I GENI DELLA REGIONE AZF

6.1 La regione AZFa

E' localizzata nelle vicinanze del centromero, misura da 1 a 3 Mb e contiene i geni DFFRY (*Drosophila development fat facetes*), DBY (*dead box Y*), UTY (*ubiquitous TPR motif Y*) e TB4Y (*Y isoform thymosin B4*).

- Il gene DFFRY adesso rinominato USP9Y, è un gene a singola copia, ha un omologo sul cromosoma X (DFFX) con un grado di omologia del 91%. Occupa meno della metà del subintervallo AZFa (Sargent et al., 1999). La sua lunghezza è di 149 kb, è costituito da 46 esoni che variano da 80 bp per l'esone 4, a 751 bp per l'esone 35 (Mazeyrat et al., 1998). Il DFFY codifica una proteina che esplica un'azione tipo un'idrolasi C-terminale dell'ubiquitina (Lahn e Page, 1997; Brown et al., 1998). Questo gene non è testicolo specifico, essendo espresso in diversi tessuti.
- Il gene DBY è formato da 17 esoni che si estendono per 15,5 kb. Codifica una proteina chiamata DDX1 che appartiene alle proteine DEAD box, che sono elicasi ATP-dipendenti dell'RNA (Linder et al., 1989; Chuang et al., 1997), con un sito caratteristico Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD box), che rappresenta

una delle otto sequenze “motif” più conservate. Si trova in singola copia sul cromosoma Y. Ha un omologo sul cromosoma X (DBX) con grado di omologia del 91%. Per questo gene sono stati evidenziati due trascritti uno dei quali è stato trovato nel testicolo (Lahn e Page, 1997). La funzione del trascritto nelle cellule germinali maschili, non è del tutto conosciuta, ma sembra che, il gene DBY svolga un ruolo importante nel controllo della spermatogenesi.

- Il gene UTY si trova in singola copia e si estende per 157 kb. Contiene 20 esoni e 10 ripetizioni disposti in tandem del motivo TPR implicato nelle interazioni proteina-proteina. Ha un omologo sul cromosoma X con un grado di omologia dell'85%.

6.2 La regione AZFb

Misura da 1 a 3 Mb e contiene: la famiglia di geni RBMY (RNA binding motif), i geni CDY (chromodomain Y), XKRA (XK-related Y), SMCY (selected mouse cDNA of the Y) e EIF1AY (eukaryotic translation initiation factor 1A).

- La famiglia genica RBMY è espressa esclusivamente nel testicolo e la proteina codificata è presente nei nuclei delle cellule germinali a partire dagli spermatogoni fino agli spermatidi e si pensa che sia coinvolta nei processi di splicing.

L'RBMV è presente in multicopie in tutti i mammiferi euteri (placentari) (Delbridge et al., 1997). Le proteine codificate dall'RBMV sono formate da un singolo dominio di legame all'RNA indicato come RRM (RNA Recognition Motif) situato all'estremità N-terminale, e un dominio C-terminale che comprende 4 ripetizioni in tandem di 37 aminoacidi chiamati SRGY box, perché formato da una sequenza serina-arginina-glicina-tirosina. L'RBMV per la sua natura multicopia è un gene difficile da studiare e quindi ancora oggi non è stato chiarito il suo ruolo nella spermatogenesi umana, comunque è considerato il gene maggiormente candidato per AZFb data la sua esclusiva espressione a livello testicolare.

- Il gene CDY si trova localizzato nel subintervallo 5L dell'Yq; è un gene multicopia che si esprime in maniera specifica nel testicolo. Il CDY codifica trascritti ubiquitari (Lahn & Page, 1999).
- Il gene XKRY è un gene multicopia che si esprime solo nel testicolo (Ho et al., 1994).
- Il gene SMCY occupa il subintervallo 5O dell'AZF, è un gene a singola copia, codifica per un antigene (H-Y) coinvolto nel complesso dell'istocompatibilità del maschio (Agulnik et al., 1994).

- Il gene EIF1AY è localizzato nel subintervallo 5Q della regione AZF. E' un gene a singola copia. Il suo trascritto un'isoforma Y della proteina eIF-1, è un fattore essenziale per l'inizio della traduzione (Dever, 1994).

6.3 La regione AZFc

E' localizzata nella parte distale dell'intervallo 6 ed ha una dimensioni di circa 4,94 Mb (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Si suddivide in sottointervalli di delezione: AZFc prossimale (AZFd), AZFc medio e AZFc distale. Essa è formata da molte sequenze ripetute, che la rendono particolarmente suscettibile a delezioni, per esempio, la delezione b2/b4 elimina interamente la regione AZFc ed è la principale causa genetica di fallimento spermatogenetico. Recentemente un altro tipo di delezione, chiamata "gr/gr" (g1/g2, r1/r3, r2/r2) è stata descritta (Repping et al., 2003). La regione AZFc sembra avere un ruolo patogenetico, essendo stata trovata nel 3.8% dei pazienti con oligozoospermia e in nessun caso di soggetti normozoospermici. L'intera regione AZFc contiene il cluster di geni DAZ, almeno due copie dei geni PRY (PTP-BL related Y), TTY2 (testis transcript Y2), BPY2 (basic protein Y2), e copie aggiuntive di RBM e CDY.

- Il PRY è un gene multicopia localizzato nel braccio corto (subintervallo 4A) e lungo (subintervallo 6B) del cromosoma Y.

Si esprime esclusivamente nel testicolo.

- Il TTY2 è localizzato nel subintervallo 6C del cromosoma Y. E' un gene multicopia che si esprime esclusivamente a livello testicolare.
- Il BPY2 è stato mappato nel subintervallo 6E (Stuppia et al., 2000). E' stato rinominato VCY (variable charge Y). VCY è espresso solo nel testicolo e codifica per una piccola proteina carica positivamente dalle funzioni sconosciute; copie di questo gene sono presenti sia sul cromosoma Y che sul cromosoma X, dove prende il nome di VCX.
- L'RBM. Vedi sopra.
- Il CDY. Vedi sopra.
- Il DAZ.

Sigla del gene	Nome del gene	Regione AZF
DDFRY/USP9Y	Drosophila Fat Facets Related Ubiquitin-specific protease 9Y	
DBY	Dead box Y	AZFa
UTY	Ubiquitous TPR motif Y	
Tβ4Y	Thymosin β4Y	
eIF-1AY	Eukariotic translation initiation 1A	
RBM1*	RNA binding motif Y	
PRY*	PTP-BL-related Y	AZFb
TTY2*	Test Transcript Y2	
DAZ°	Deleted in Azoospermia	
CDY°	Chromodomain Y	AZFc
PRY*	PTP-BL-related Y	

Elencazione dei principali geni della regione AZF

**Geni multicopia le cui copie si trovano in varie regioni del cromosoma Y*

°Geni multicopia le cui copie si trovano solo nella regione indicata

7. IL GENE DELETED IN AZOOSPERMIA (DAZ)

Il gene DAZ è localizzato nella parte distale dell'intervallo 6 di Yq (Lahn e Page, 1997; Yen et al., 1998; Mazeyrat, 1998), e per la sua alta percentuale di delezione nei pazienti infertili, è il gene principale candidato per l'AZFc. E' frequentemente deleta in maschi infertili con azoospermia non ostruttiva o con severa oligozoospermia (Foresta).

La sua struttura genomica è stata analizzata dettagliatamente, ma la sua funzione biologica rimane ancora oggi poco chiara. In un primo momento si pensava che il DAZ fosse in singola copia e che fosse il solo gene a funzionare nell'intervallo AZFc (Reijo et al., 1995). Successive analisi sul locus DAZ hanno in realtà dimostrato che non si trattava di un solo gene, ma di un membro di una famiglia multigenica, disposta a cluster e che ogni membro della famiglia presentava delle sequenze altamente ripetitive, e un certo grado di polimorfismo nella popolazione esaminata (Saxena et al., 1996, Yen et al., 1997). Mediante Southern blotting, sono state descritte prima tre copie (Saxena et al., 1995, Yen et al., 1997, Yen et al., 1998), poi sette utilizzando la fiber-FISH (Glaser et al., 1998). Gli ultimi lavori riportano che le copie di DAZ sono quattro (de Vries et al., 2002; Ferlin et al., 2002; Fernandes et al., 2002).

Le copie geniche, omologhe tra loro per il 99%, localizzate nella regione Yq11, sono organizzati in due cluster, che presentano un orientamento invertito (testa-testa). Queste sono state denominate

DAZ1 di 65 Kb, DAZ2 di 70Kb, DAZ3 di 50 Kb e DAZ4 di 55 Kb (Saxena et al., 2000). Le quattro copie differiscono per singoli varianti nucleotidici, e ciò potrebbe essere utile per discriminare le singole copie (Saxena et al., 1996). DAZ1 e DAZ2 formano il primo cluster, mentre DAZ3 e DAZ4 costituiscono il secondo. Rispetto al centromero il cluster 1 è in posizione prossimale e il cluster 2 in posizione distale. L'orientamento dei geni all'interno dei cluster, comunque rimane poco chiara (de Vries 2002). Nella regione AZFc la distanza molecolare tra i due clusters è stata stimata essere 1,47 Mb (Fig. 6).

La composizione nucleotidica dei geni DAZ è complessa, ogni gene mostra ripetizioni in tandem di un repeat di 2,4 Kb che codifica per 24 aminoacidi e ripetizioni in tandem di un repeat di 10,8 Kb che codifica un RNA-binding domain. Il repeat di 10,8 Kb si ripete tre volte nel DAZ1, una volta nel DAZ2, una volta nel DAZ3 e due volte nel DAZ4, esso si estende dall'esone 2 all'esone 6 (Saxena et al., 2000). Nel DAZ1 è stato identificato un repeat genomico che contiene un esone di 72-bp (esone 7).

Studi successivi con analisi di Southern blot hanno rivelato che tutte e quattro copie DAZ presentano molte copie dell'esone 7. In particolare il DAZ1, DAZ2 e DAZ4 presentano più copie dell'esone 7 rispetto al DAZ3, e quindi le prime codificano per proteine con più sequenze aminoacidiche. Il DAZ1 codifica per una proteina di 744 aminoacidi, il DAZ2 codifica per una proteina di 559 aminoacidi con peso

molecolare di 63K, il DAZ4 codifica per una proteina di 579 aminoacidi con peso molecolare di 65K, mentre il DAZ3 codifica una proteina di 487 aminoacidi con peso molecolare di 55K. Nell'esone 7 è contenuto il "repeat DAZ" variabile dalle 8 alle 24 copie a seconda dei geni e codifica per una proteina di 366 amminoacidi specifica per le cellule germinali; questa proteina contiene un sito di legame per l'RNA ed è in grado di legare e regolare le funzioni dell'RNA o del DNA a singolo filamento.

Il DAZ presenta un omologo autosomico detto DAZLA localizzato sul cromosoma 3p24. Si ritiene che il DAZ derivi dalla trasposizione del gene DAZLA dal cromosoma 3 al cromosoma Y, seguito da duplicazioni e inversioni, che hanno dato luogo ad una famiglia di geni multicopia (Saxena et al., 1996; Yen et al., 1997).

La famiglia genica DAZ codifica proteine espresse esclusivamente nel testicolo, nei diversi stadi della spermatogenesi, dagli spermatogoni agli spermatidi allungati e in ultimo anche nella coda degli spermatozoi (Lahn et al., 1997; Habermann et al., 1998).

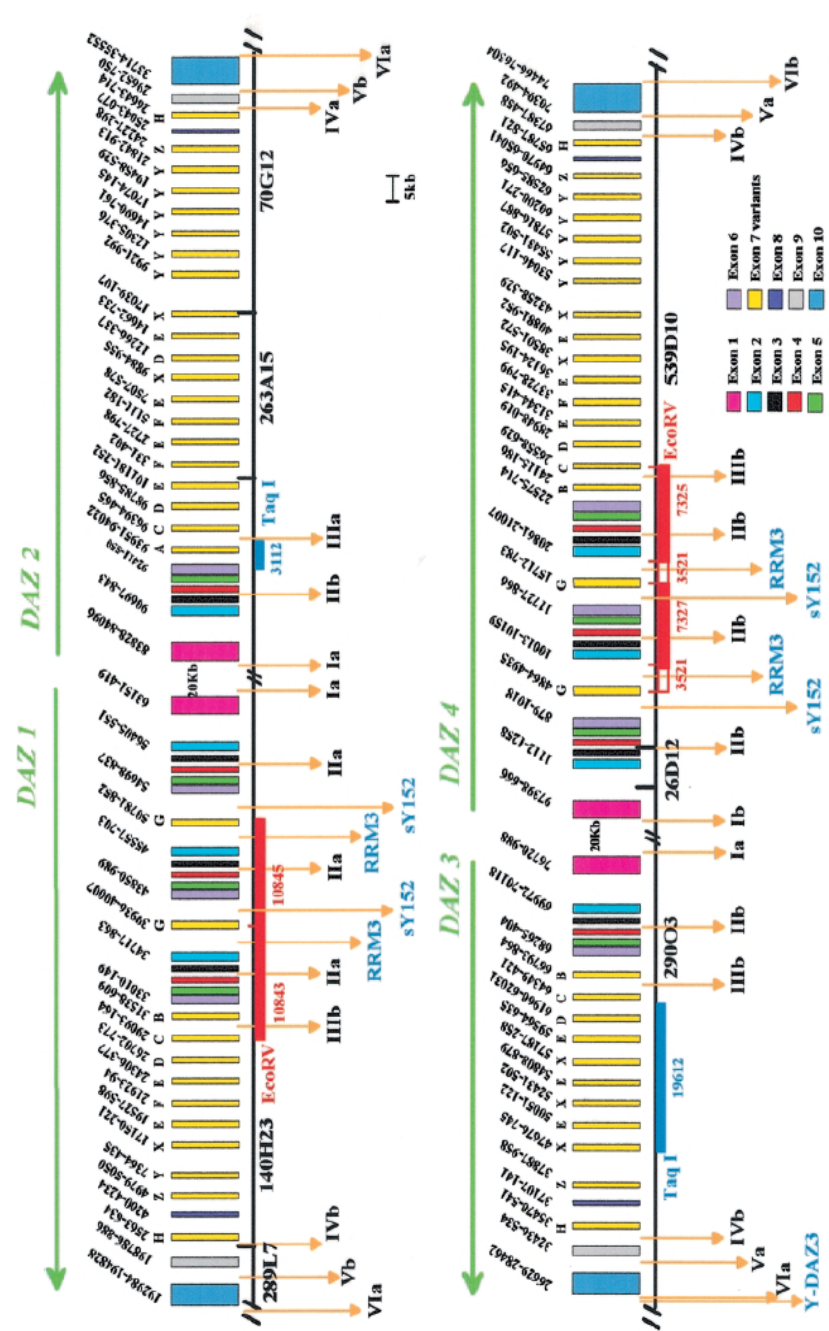
Il numero dei trascritti non è ancora chiaro, forse derivano tutti dallo stesso gene per splicing alternativo o dai differenti geni DAZ. Inoltre le proteine presentano un motivo RRM (RNA recognition motif) che fa presupporre ad una funzione di controllo post-trascrizionale.

Le copie del gene DAZ per essere identificate hanno bisogno di metodiche di screening particolari, infatti la PCR classica identifica una delezione solo quando tutte le copie del gene oggetto dello studio

siano mancanti, in quanto la presenza di anche una sola copia dà luogo ad una amplificazione regolare, e per tale ragione che molte delezioni parziali sono rimaste sottostimate. Inoltre non è ancora chiaro se tutte le copie sono necessarie per una normale spermatogenesi.

Recenti evidenze preliminari indicano che delezioni parziali dei geni DAZ possono essere responsabili di quadri di alterazione della spermatogenesi.

Fig. 6 Rappresentazione dei clusters della famiglia genica del DAZ



8. SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio delle cause genetiche di infertilità maschile, derivanti da alterazioni cromosomiche, geniche e microdelezioni è ben standardizzato e le metodiche classiche sono sufficienti ad individuarle e caratterizzarle. Per quanto riguarda, invece, le delezioni parziali dei geni multicopia, presenti sul cromosoma Y e potenziali causa di infertilità, non esiste a tutt'oggi un'unica tecnica semplice e univoca che ne permetta un'esatta quantizzazione.

Le comuni tecniche sia molecolari che citogenetiche come la PCR o la FISH non sono in grado di rilevare le delezioni intrageniche che coinvolgono geni multicopia. Infatti, la PCR permette di evidenziare la presenza o l'assenza di un locus, ma nel caso di una famiglia genica, con sequenze altamente omologhe, non permette di riconoscere la delezione di una o più copie, dal momento che quelle restanti danno comunque un amplificato. La FISH, d'altro canto è capace di evidenziare la perdita di regioni cromosomiche con un limite inferiore di risoluzione di circa 2 Mb, ma di certo non è in grado di rivelare piccole delezioni coinvolgenti una singola copia genica. La tecnica del Southern blotting risulta piuttosto lunga nei tempi di esecuzione per cui non è adatta per essere effettuata come routine e comunque spesso non è risolutiva nei casi di geni multicopia.

Pertanto, nel nostro laboratorio si è cercato di sviluppare e mettere a punto nuove metodologie di indagine molecolare in grado di

discriminare delezioni parziali di questi geni.

A tale scopo è stato preso in esame il gene DAZ, la cui discriminazione molecolare è stata finora condotta con l'analisi dei Single Variant Nucleotide (SVN) e quindi mediante PCR seguita da digestione enzimatica o con Southern Blotting. I campioni in esame partono dalla caratterizzazione tramite SVN per poi essere sottoposti a nuovi approcci biomolecolari:

- Real Time PCR
- Analisi dei frammenti
- Sequenziamento.

8.1 Real-Time PCR

L'introduzione della reazione di amplificazione degli acidi nucleici mediante reazione polimerasica a catena (PCR) nella diagnostica di laboratorio, ha indubbiamente portato dei vantaggi quali l'elevata sensibilità e la rapidità di esecuzione. Fin dai tempi immediatamente successivi alla scoperta nel 1984 della PCR si era capito che era importante che la tecnica diventasse quantitativa.

La Real-Time PCR è un metodo di rivelazione quantitativa del prodotto di amplificazione. Questa tecnica permette la determinazione dei livelli di specifiche sequenze di DNA e possono essere quantizzate

accuratamente da meno di 10 a oltre 10 milioni di copie di DNA dopo solo due ore di amplificazione.

I sistemi di Real-Time PCR si basano sulla rivelazione e la quantificazione di un reporter fluorescente, il cui segnale aumenta in maniera direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione. Nella forma più semplice, il reporter è un colorante intercalante (es. SYBR Green), che si lega in maniera aspecifica a tutto il DNA, oppure si possono utilizzare sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento amplificato del gene ricercato, marcate con molecole fluorescenti. Esistono diverse tipologie di sonde; ma in questo lavoro sono presentati i risultati della sperimentazione svolta mediante l'uso di sonde TaqMan (Heid et al., 1996).

La tecnologia TaqMan

La tecnologia TaqMan (5' exonuclease detection assay) consente la rilevazione dell'amplificato simultaneamente alla sua amplificazione. È un saggio in cui, grazie al particolare disegno delle sonde marcate con i fluorocromi e allo sfruttamento dell'attività 5'-3' esonucleasica di alcune polimerasi termostabili, è possibile produrre durante la PCR un segnale fluorescente con intensità direttamente proporzionale al target di reazione.

Più in dettaglio, il saggio TaqMan, oltre ai due primers, utilizza un terzo oligonucleotide complementare a uno dei due filamenti del

prodotto da amplificare, il cui scopo è quello di generare un segnale fluorescente ogni volta che viene prodotto un nuovo frammento.

Durante l'amplificazione, alla fase di "annealing", sia i primer che la sonda si ibridano al template, la sonda, essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi. Durante l'estensione del primer, la Taq incontra la sonda ibridata e la taglia utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica.

Ogni qualvolta una sonda viene tagliata dalla Taq polimerasi, si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rivelabile dal detector (Fig. 7).

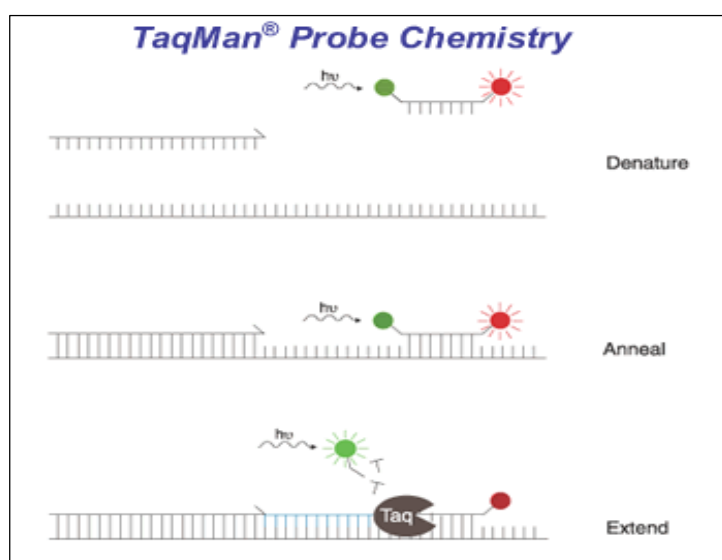


Fig. 7 Chimica TaqMan

Il segnale emesso è direttamente proporzionale al numero di molecole presenti alla fine del ciclo che precede o all'inizio del ciclo corrente.

La reazione di amplificazione viene eseguita in provette ottiche di una piastra a 96 pozzetti, che viene alloggiata in uno strumento combinato thermal-cycle/detector, ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems).

La fluorescenza del reporter aumenta come prodotto accumulato in ciascun ciclo successivo di amplificazione.

Nei primi cicli le variazioni di fluorescenza non sono significative, ma ad un certo momento, man mano che procede l'amplificazione, l'accumulo dei prodotti si traduce in una modificazione misurabile della fluorescenza totale nella miscela di reazione. Nello studio di un grafico di PCR vengono definiti tre parametri:

- La linea base (baseline) della fluorescenza, che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo significativo di un amplificato;
- La linea soglia, parallela alla linea base, scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale;
- Il ciclo soglia (C_t =Cycle Threshold), specifico per ogni campione, identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia; il ciclo soglia è un indice preciso in quanto esiste una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA (Fig. 8).

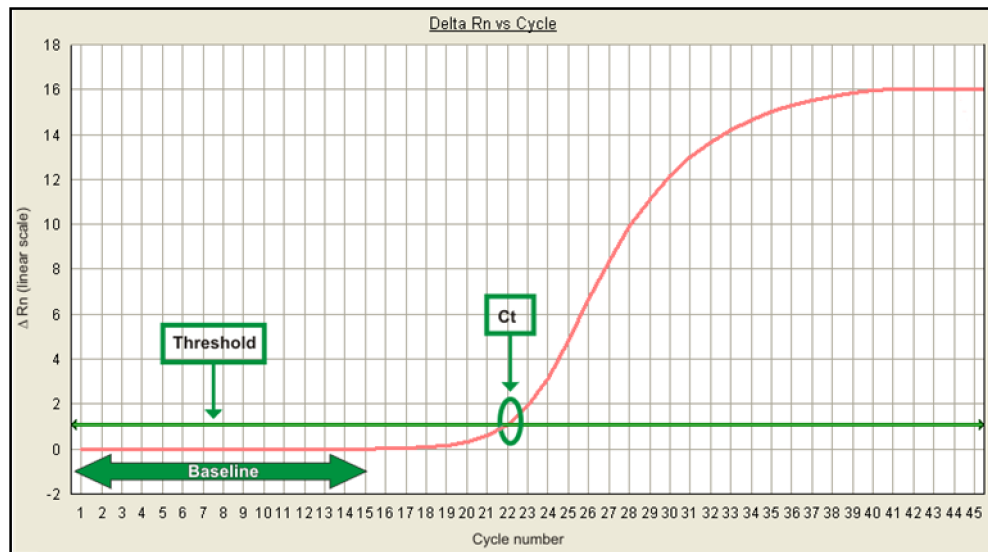


Fig. 8 Real-Time PCR

Il software analizza i dati calcolando inizialmente il contributo di ciascun reporter dello spettro sperimentale. Il segnale di ogni reporter viene poi diviso per il segnale di fluorescenza di un sistema di riferimento interno (ROX) che serve a normalizzare le fluttuazioni di fluorescenza non correlate alla PCR che potrebbero verificarsi in ogni pozzetto.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati Real-Time è possibile seguire due approcci differenti:

- il metodo comparativo *relativo*
- il metodo quantitativo *assoluto*

Metodo comparativo

Il metodo comparativo relativo, viene adottato per confrontare la quantità relativa di una sequenza target con i livelli di riferimento di un normalizzatore, cioè di un gene di riferimento di cui siano ben note il numero di copie presenti nel genoma.

I calcoli consistono nell'eseguire una differenza (ΔC_T) tra i valori del ciclo soglia (C_T) del target e del normalizzatore:

$$\Delta C_T = C_T (\text{target}) - C_T (\text{normalizzatore})$$

Questa differenza è calcolata per ogni campione in esame. Successivamente l'analisi matematica prevede che il ΔC_T di un campione controllo venga utilizzato come campione di riferimento, fungendo da calibratore. Quindi, viene calcolata la differenza tra il valore soglia del campione ed il valore soglia del calibratore

$$\Delta C_T = C_T (\text{target o calibratore}) - C_T (\text{normalizzatore})$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{target}) - \Delta C_T (\text{calibratore})$$

Infine per avere il numero di copie, si trasformano questi valori da relativi ad assoluti attraverso la seguente formula:

$$\text{Numero di copie} = 2^{-\Delta \Delta C_T} * 4$$

Metodo assoluto

Nella PCR quantitativa assoluta la determinazione del numero di copie del gene di interesse viene effettuata costruendo una curva standard di calibrazione.

Gli standard comunemente usati in PCR quantitativa assoluta sono il DNA genomico o plasmidico contenente le sequenze target clonate. In entrambi i casi è possibile risalire dalla massa del DNA genomico o plasmidico al numero corrispondente di copie delle sequenze target. La curva di riferimento costruita con i Ct dei campioni standard a contenuto di DNA noto consente di risalire per interpolazione al contenuto di DNA e quindi al numero di copie dei campioni sconosciuti.

8.2 Analisi dei frammenti

La metodica permette di discriminare amplificati di lunghezza e quantità differenti e consiste in una PCR eseguita con una coppia di primer, dei quali uno marcato con un fluoroforo, e con un numero limitato di cicli, per evitare che la reazione vada a plateau.

Gli amplificati ottenuti sono successivamente separati attraverso elettroforesi capillare sul sequenziatore ABI-310, e sono visualizzati in un elettroferogramma.

In ciascun picco, che corrisponde ad una sequenza amplificata, l'area sottostante è proporzionale alla quantità di amplificato e dovrebbe essere rappresentativa delle copie iniziali.

8.3 Sequenziamento enzimatico di Sanger

Il metodo di Sanger consiste nell'impiego di nucleotidi che modificati nella loro struttura chimica (ddNTPs) e marcati con fluorocromi differenti, vengono incorporati nella sintesi del nuovo filamento da una DNA polimerasi termoresistente, la TAQ. La sintesi del DNA si arresta al momento dell'incorporazione dell'analogo 2',3'-didesossinucleotide che mancando del gruppo 3'OH, non permette la formazione del legame fosfodiesterico 3'-5'

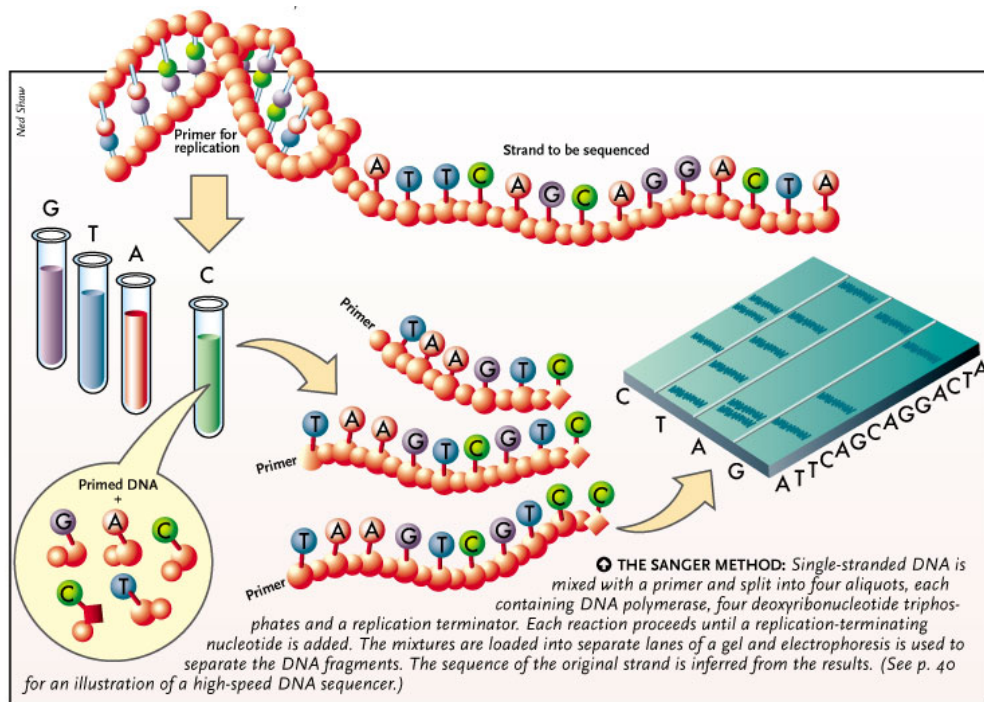


Fig. 9 – Sequenziamento enzimatico di Sanger

e quindi l'ulteriore sintesi del filamento di DNA (Fig. 9). In questo modo si ottengono filamenti complementari fluorescenti ognuno di lunghezza differente che terminano con 1 dei 4 ddNTP all'estremità 3' e che vengono separati per elettroforesi su capillare.

Durante l'elettroforesi, il campione viene colpito da una sorgente luminosa (laser) che eccita i fluorofori ed emette diverse fluorescenze che vengono rilevate da un sensore. Il segnale infine, viene elaborato da un opportuno software che mostra in forma grafica a 4 colori, la sequenza del DNA:

l'elettroferogramma. Le sequenze ottenute sono confrontate con quelle depositate in Gene Bank.

9. MATERIALE E METODI

Nel nostro studio sono stati utilizzati 80 campioni sequenziali, forniti dal centro trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera della città di Ragusa, di soggetti maschili dei quali non si conosceva il quadro clinico riguardante la condizione di fertilità.

9.1 Estrazione di DNA genomico

Il DNA genomico proveniente da leucociti di sangue periferico è stato estratto utilizzando il seguente protocollo:

- 5 ml di sangue sono stati uniti ad ugual volume di TKM1 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA), insieme a 125 µl di Nonidet, agitare energicamente;
- centrifugazione a 2200 rpm per 10 min, a temperatura ambiente;
- allontanamento del surnatante e risospensione del pellet in 5 ml di soluzione TKM1;
- centrifugazione a 2200 rpm per 10 min, a temperatura ambiente;

- allontanamento del surnatante e risospensione del pellet con 0,8 ml di TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,4 M NaCl; 2 mM EDTA), e 50 µl di SDS al 10%;
- incubazione in bagno termico a 55°C per 10 min;
- aggiunta di 0,3 ml di NaCl 5 M, centrifugazione a 1200 rpm per 5 min;
- raccolta del surnatante e aggiunta di due volumi di etanolo assoluto;
- agitazione delicata e prelievo della nuvoletta di DNA;
- risospensione del DNA in 500 µl di acqua distillata.

9.2 Analisi molecolare del locus “AZF” del cromosoma Y mediante PCR

I campioni da esaminare sono stati inizialmente sottoposti all'analisi molecolare della regione AZF del cromosoma Y mediante reazione polimerasica a catena (PCR) amplificando il pannello di STS riportato nella tabella (Tab. 1).

Tab. 1

STS	Regione cromosoma Y	Primer F	Primer R	Base Pair
sY 84	AZFa	AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT	GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC	326
sY 86	AZFa	GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC	ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT	320
sY 127	AZFb	GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA	CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA	274
sY 134	AZFb	GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG	ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA	301
sY 254	AZFc	GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA	GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C	400
sY 255	AZFc	GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT	CTC GTC ATG TGC AGC CAC	126
SRY	Controllo	GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA	GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG	472
ZFY	Controllo	ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C	GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T	495

La reazione di PCR è stata così allestita:

DNA	Buffer 10X	DNTPs 2,5 mM	Primer F/R 20 µM	Taq 2U/µl	H₂O	Volume finale
100 ng	2,5 µl	1µl	1µl	0,5 µl	q.b.	25µl

Profilo termico della PCR:

Denaturazione	94° C	1 min	1 ciclo
Denaturazione	92° C	1 min	
Annealing	61° C	1 min	35 cicli
Estensione	72° C	1 min	
Estensione finale	72° C	7 min	1 ciclo

I prodotti di PCR sono stati verificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in tampone TBE con Syber Safe e visualizzati agli UV.

Questi marker hanno permesso di valutare l'eventuale presenza di microdelezioni nelle tre regioni: AZFa, AZFb, AZFc; i campioni risultati negativi per le microdelezioni sono stati sottoposti ad analisi delle Sequence Family Variants (SFV) e successivamente analizzati con altre metodiche per individuare delezioni parziali del gene DAZ.

9.3 Metodiche convenzionali di studio delle delezioni parziali del gene DAZ

9.3.1 Caratterizzazione tramite Single Variant Nucleotide (SVN)

Questa metodica consiste nell'amplificazione di STS (Sequence Tagged Sites) specifici del cromosoma Y e successiva digestione con enzimi di restrizione che riconoscono variazioni nucleotidiche presenti nelle copie del gene DAZ.

Gli STS utilizzati nel nostro studio e il relativo pattern di digestione sono mostrati nella seguente tabella.

DAZ/SNV	n.accesso Gene Bank	Enzima di restrizione	Copie gene DAZ	alleli	Frammenti di restrizione(bp)
sY586	G63907	TaqI	2 1,3,4	A B	301 184+117
sY587	G63908	DraI	3,4 1,2	A B	195+49 122+73+49
VI	G73169	Afl III	1,2,3 4	A B	431 248+183
sY581	G63906	Sau 3A	2,4 1,3	A B	130+59+63 189+63
II	G73163	Sau 3A	1 2,3,4	A B	178 119+59
STS qualitativi	Gene Bank	Copie gene DAZ		Prodotto di PCR	
Y-DAZ3	G73170	3		260	
sY1291	G72340	+/-		527	
sY1191	G73839	+/-		385	

- La digestione di sY586 con Taq I produce due frammenti di 184 e 117 bp in DAZ 1,DAZ 3 e DAZ 4, mentre in DAZ 2 il frammento di amplificazione di 301 bp rimane indigerito.
- La digestione di sY587 con Dra I produce quattro frammenti di 122,73,49 e 26 bp in DAZ 1 e DAZ2 ,e tre frammenti di 195,49 e 26 bp in DAZ 3 e DAZ 4.
- La digestione di SNV-VI con Afl III produce due frammenti di 248 e 183 bp in DAZ4 mentre in DAZ1,DAZ2 e DAZ3 il frammento di 431 bp rimane non digerito.
- La digestione di sY581 con Sau 3A produce due frammenti di 189 bp e 63 bp in DAZ1 e DAZ3 e tre frammenti di 130 bp, 59 bp e 63 bp in DAZ 2 e DAZ 4.
- La digestione di SNV II con Sau 3A produce due frammenti di 119 e 59 bp in DAZ2,DAZ3,DAZ4 e un frammento di 178 bp in DAZ 1.

Gli STS descritti ricadono in regioni introniche e 3' UTR.

La reazione di PCR per l'amplificazione dei suddetti STS-DAZ è stata così allestita:

DNA (25 ng/ul)	Buffer 10x	dNTPs	Primer Fw e Rw	Taq 2U/μl	H2O	Volume finale
2μl	5μl	3 μl	2 μl	0,5μl	35,5 μl	50 μl

Il profilo termico della reazione di PCR è stato:

Denaturazione	94°C	1 min	1 ciclo
Denaturazione	92°C	1 min	
Annealing	61°C	1 min	35 cicli
Estensione	72°C	1 min	
Estensione finale	72°C	7 min	1 ciclo

Un' aliquota di ciascun amplificato è stata poi digerita con l'enzima specifico:

-le digestioni con Sau3A e DraI sono state effettuate mediante incubazione a 37°C per 2 h;

-le digestioni con TaqI e Afl III sono state effettuate overnight.

Le digestioni sono state poi verificate su gel di agarosio al 2% di TBE 1X, e visualizzati agli UV con Syber Safe.

9. 4 Nuove metodiche biomolecolari per lo studio delle delezioni parziali

9.4.1 Real time PCR

Questa metodica quantitativa è stata applicata come screening iniziale per individuare quei soggetti che presentavano un numero alterato di

copie DAZ, visto che in letteratura sono descritte sia possibili delezioni che duplicazioni nel gene.

Per la progettazione delle sonde e dei primers necessari per la valutazione in Real Time PCR delle copie DAZ è stato utilizzato il programma Primer Express (Applied Biosystems).

La sonda TaqMan e i primers specifici per le copie del DAZ, sono stati selezionati sull'esone 1, presente una sola volta per copia genica; il gene SRY è stato da noi scelto quale gene di riferimento per la normalizzazione, perchè presente in singola copia nel genoma.

Per essere sicuri che i primer e le sonde fossero specifiche solo dei geni in esame le loro sequenze sono state inserite in un programma, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) per la ricerca di eventuali omologie. L'analisi con BLAST ne ha confermato la specificità (Tab. 2).

Tab.2 Sequenze primer /probe del DAZ e dell'SRY.

Nome	Sequenza
Primer DAZ-F	5'-GCCCGCCCTTGGTTTT-3'
PrimerDAZ-R	5'-GGCTTCGAGTGGTCAAAGGA -3'
Probe DAZ	5'-(VIC)-CTTACACCTTAGCCTTTG -3'MGB
Primer SRY-F	5'-AAT TGG CGA TTA AGT CAA ATT CG-3'
Primer SRY-R	5'-TTG ACT ACT TGC CCT GCT GAT C-3'
Probe SRY	5'-(FAM) TTT TTC AGG ACA GCA GTA GA-MGB

Amplificato Esone 1 DAZ

GTTCTACCTCCGAGGGTTCGCCCCGCCCTTGGTTTTTCCTTACACCTTAGC
TTTGGCTCCTTTGACCACTCGAAGCCCCACAGCGTGTTCAGCGGACT

Amplificato SRY

TGACATAAAAGGTCAATGAAAAAATTGGCGATTAAGTCAAATTCGCA
TTTTTCAGGACAGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGATCAGCAGGGC
AAGTAGTCAACGTTACTGAATTACCATGTTTTGCTTGAGAATGAATAC

Le reazioni per quantizzare il gene DAZ di ogni soggetto in esame sono state preparate in singole provette come segue:

TaqMan Universal PCR μ l	DNA ng	Primer F nM SRY	Primer R nM SRY	Probe nM SRY	Acqu a a vol.
25	50	900	900	300	50

TaqMan Universal PCR μ l	DNA ng	Primer F nM SRY	Primer R nM SRY	Probe nM SRY	Acqu a a vol.
25	50	300	300	300	50

I campioni sono stati posizionati nel thermal cycle/detector ed

amplificati secondo il seguente profilo termico:
10' a 95°C per l'attivazione della Taq Polimerasi
Seguiti da 40 cicli di
15" a 95°C
1' min a 60°C per l'annealing e l'estensione.

Per confrontare la quantità relativa del DAZ con i livelli di riferimento del gene SRY è stato usato il metodo quantitativo relativo, mentre per l'analisi assoluta è stata utilizzato il metodo della curva standard, entrambi descritti in precedenza. Per ogni campione sono stati eseguiti tre esperimenti per verificare la riproducibilità del metodo.

9.4.2 Analisi dei frammenti

L'analisi dei frammenti è stata eseguita per meglio definire le copie DAZ presenti ed è stata ottimizzata sfruttando le differenze di lunghezza dell'STS SNV VI.

Per mettere a punto tale metodica è stata selezionata una coppia di primer sul gene DAZ modificati con l'aggiunta di un fluoroforo all'estremità 5'; le relative sequenze sono riportate in Tab. 3.

Tab. 3 Sequenze Primers per analisi dei frammenti

Nome primer	Sequenza
SNV VI FW	5' -VIC-GGGCCTAGTCTCTAGATCATT-3'
SNV VI RW	5' -GCTAGAACCAAATATTCTGGAT-3'

La reazione di amplificazione è stata così realizzata:

- 5 µl di Buffer 10X ,
- 3 µl di dNTPs (2,5 mM),
- 50 ng DNA,
- 1 µl di Primer (20 uM),
- 1 U Taq Polimerase.
-

L'amplificazione è avvenuta secondo il seguente profilo termico:

- 1 ciclo a 94°C per 3'
- 35 cicli a 94°C per 1'
64°C per 1'
72°C per 1'
- 1 ciclo a 72°C per 3'

Il prodotto di PCR è stato utilizzato per la successiva analisi ed è stata preparata la seguente reazione comprendente: 1 µl di amplificato, 12,5 µl di formammide e 0,5 µl di Liz Allele Marker. La reazione è stata quindi denaturata per 3' a 94°C e caricata sul sequenziatore a capillare Applied Biosystems ABI310 per effettuare l'analisi dei frammenti.

9.4.3 Sequenziamento

Il sequenziamento è stato effettuato mediante l'uso della sequenza STS SNV VI ed è servito a confermare i dati ottenuti con le metodiche precedentemente descritte.

I prodotti di PCR sono stati purificati su piastra (Millipore) e marcati utilizzando il primer Reverse, di ciascun STS o SNV, con il kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Italia) secondo il seguente protocollo: in un volume finale di 10 μ l, 1 μ l di Buffer Ready, 1,5 μ l di Ready reaction mix, 1 μ l di primer (5 μ M) e 5 ng/ μ l di template.

Dopo 1 minuto di denaturazione iniziale 94°C, sono stati eseguiti 25 cicli di amplificazione (94°C 10", 50 °C 5", 60 °C 4"). La reazione è stata condotta utilizzando il thermal cycler C1000 (Bio-Rad).

Il prodotto marcato è stato purificato, trasferito in provetta e denaturato in presenza di 10 μ l di formammide a 95°C per 5 minuti e successivamente caricato sul sequenziatore capillare ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

L'elettroforesi capillare delle sequenze è stata eseguita con polimero POP6 e con il tampone di corsa Run Buffer (Applied Biosystems). Nel sequenziamento il segnale di fluorescenza, emesso dai nucleotidi marcati, in seguito ad eccitazione con laser è raccolto dalla camera CCD e convertito da un software in elettroferogramma, nel quale ciascun picco rappresenta una precisa base la cui altezza è proporzionale all'intensità del segnale.

9.4.4 Clonaggio

Questa metodica è stata utilizzata per leggere in maniera chiara quelle sequenze che mostravano delle eterozigotità inattese. La tecnica serve a produrre copie identiche di singoli filamenti all'interno di un vettore, nello specifico il TA cloning. Le fasi caratteristiche sono state: l'amplificazione, la ligazione, la trasformazione, il piastramento e la selezione. Successivamente le singole colonie sono state sequenziate.

10. RISULTATI

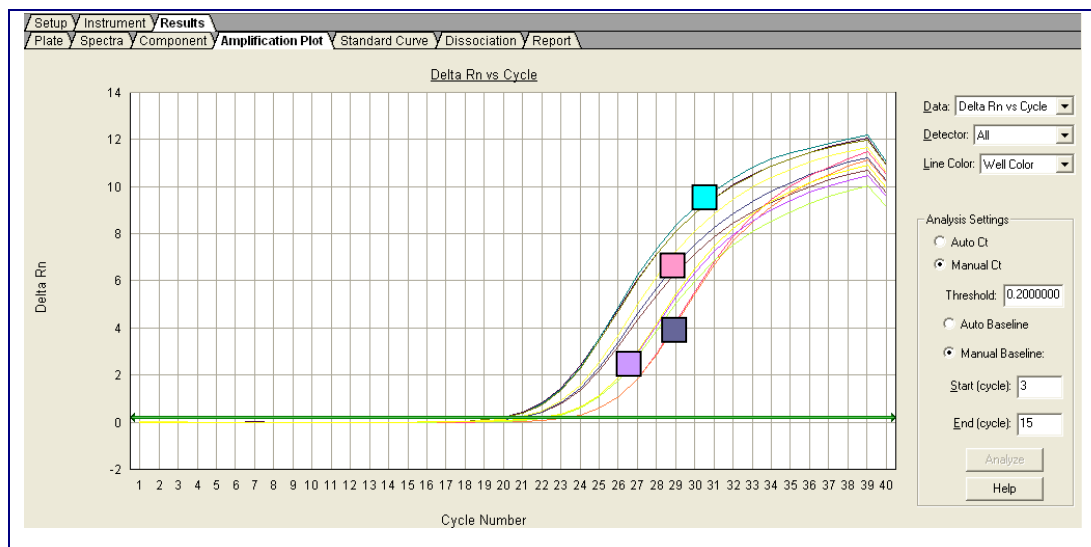
10.1 Analisi genetiche con PCR

Una prima analisi è stata condotta mediante amplificazione in PCR degli STS specifici per i locus AZFa, AZFb e AZFc, che ha evidenziato l'assenza di microdelezioni nel cromosoma Y.

10.2 Analisi molecolare tramite Real-Time PCR

La Real-Time PCR si è dimostrata una tecnica in grado di poter valutare la presenza di delezioni parziali del cluster genico.

I dati di Real-time PCR hanno evidenziato 61 campioni potenzialmente non deleti, 8 campioni con possibili duplicazioni e 11 soggetti con probabile delezione.



Es. di amplificazione di alcuni campioni:

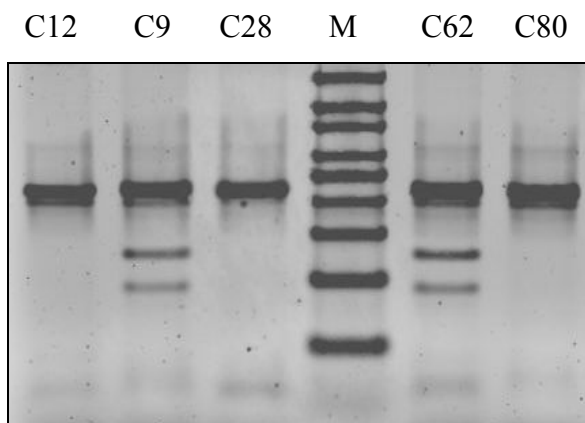
- Soggetti con duplicazioni DAZ
- Soggetti con delezioni DAZ
- Soggetti con 4 copie DAZ
- SRY

I campioni, ipoteticamente deleti, sono stati analizzati tramite amplificazione e digestione delle sequenze SNV.

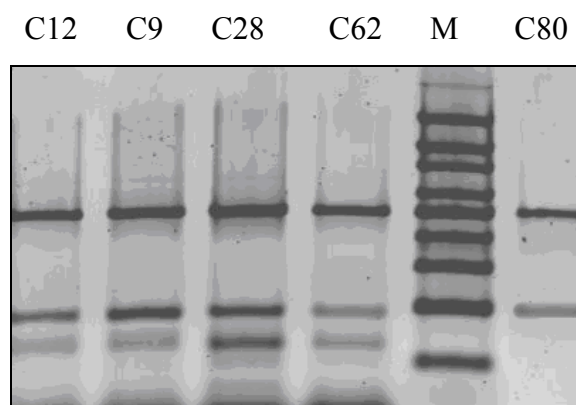
10.3 Analisi molecolare tramite PCR ed enzimi di restrizione

L'analisi molecolare condotta mediante SNV ci ha permesso di caratterizzare il numero di copie nei soggetti in studio. L'amplificazione di STS DAZ specifici e la successiva digestione con endonucleasi ha permesso di ottenere un pattern di frammenti di restrizione tipico per ogni copia di geni DAZ.

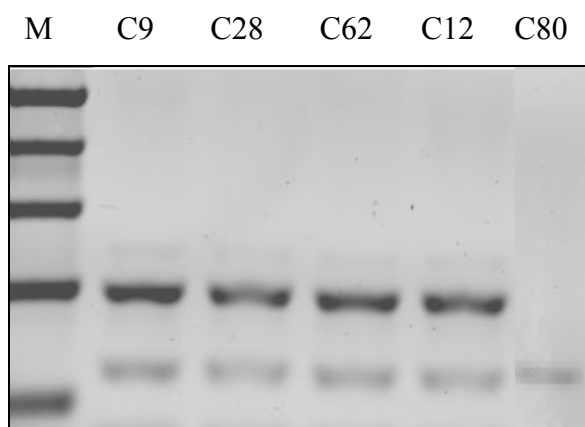
Qui di seguito sono mostrate le immagini relative alla digestione di alcuni campioni:



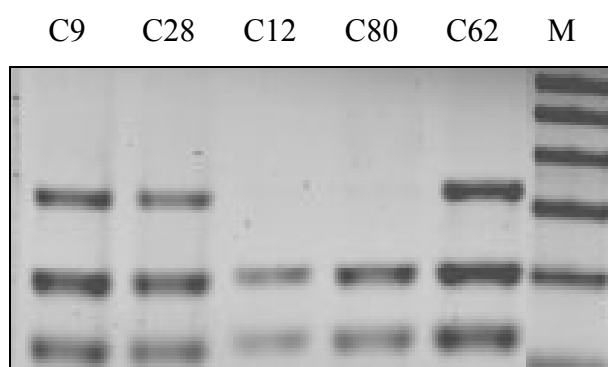
Corsa elettroforetica di alcuni amplificati SNV VI digeriti con AflIII (M=100 bp)



Corsa elettroforetica di alcuni amplificati SNV II digeriti con Sau3A (M= 100 bp)



Corsa elettroforetica di alcuni amplificati sY 587 digeriti con DraI (M= 100 bp)



Corsa elettroforetica di alcuni amplificati sY 586 digeriti con Taq I (M= 100bp)

I risultati delle digestioni effettuate sui campioni analizzati sono riportati nella seguente tabella:

Campione	sy581	sy587	sy586	SNV VI	SNV II	YDAZ 3	sy1291	sy1191	Aplotipo
9	1/3 - 2/4	1/2 - 3/4	1/3/4 - 2	1/2/3 - 4	1- 2/3/4	+	+	+	A
12	1/3 - 2/4	1/2 - 3/4	1/3/4	1/2/3	1- 2/3/4	+	+	+	B*
13	1/3 - 2/4	1/2 - 3/4	1/3/4	1/2/3	1- 2/3/4	+	+	+	B
28	1/3 - 2/4	1/2 - 3/4	1/3/4 - 2	1/2/3	1- 2/3/4	+	+	+	C
2B	1/3	1/2	1/3/4 - 2	1/2/3	1- 2/3/4	+	+	-	D
80	1/3	1/2	1/3/4	1/2/3	1	-	-	+	E

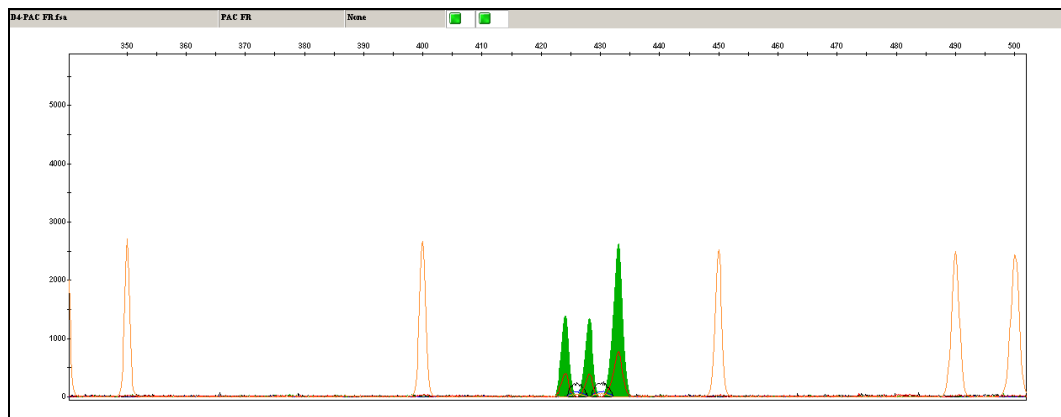
-Tabella con i risultati delle digestioni-

- C9 presenta una digestione completa ed è stato classificato come aplotipo A;
- C12*, C13 sono privi delle copie DAZ2 e DAZ4 e sono stati classificati come aplotipo B;
- C28 manca del DAZ4 ed è stato classificato come aplotipo C;
- C2B manca il DAZ4 e presenta incongruenze tra alcuni uniSTS e quindi è stato classificato come aplotipo D;
- C80 è mancante delle copie DAZ2, DAZ3, DAZ4 ed è stato classificato come aplotipo E.

10.4 Analisi dei frammenti

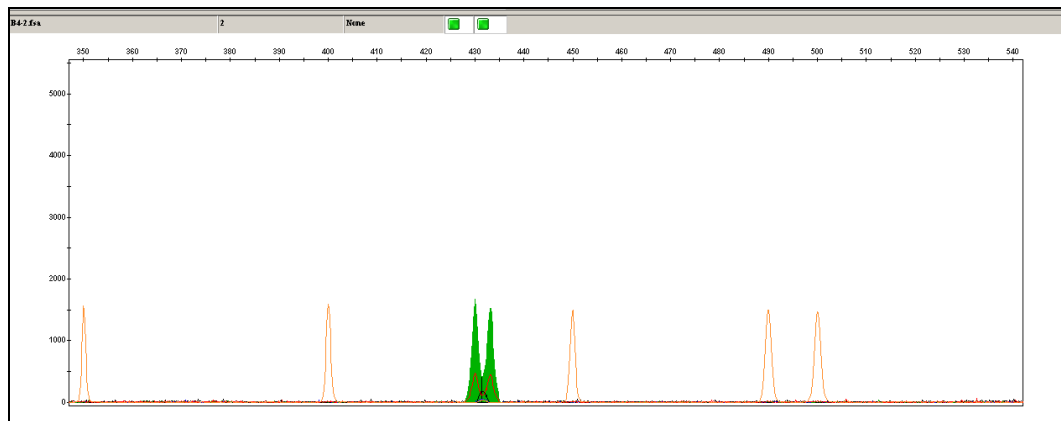
Lo studio delle copie del gene DAZ, tramite l'analisi dei frammenti, ci ha permesso di discriminare le diverse copie presenti nei vari pazienti. Qui di seguito si mostrano gli elettroferogramma di alcuni pazienti.

Campione 9:



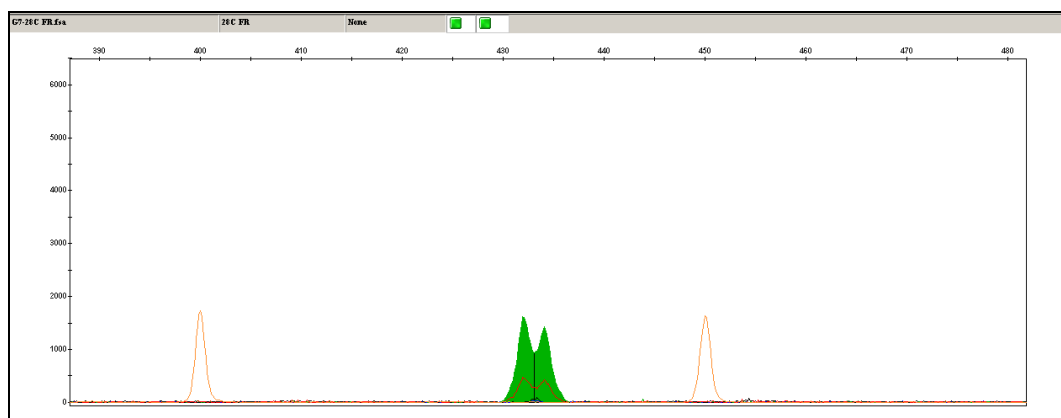
Sono presenti tre frammenti, di cui uno il doppio degli altri, corrispondenti rispettivamente a: DAZ3 (424 bp), DAZ4 (428 bp), DAZ1-2 (433 bp).

Campione 12:



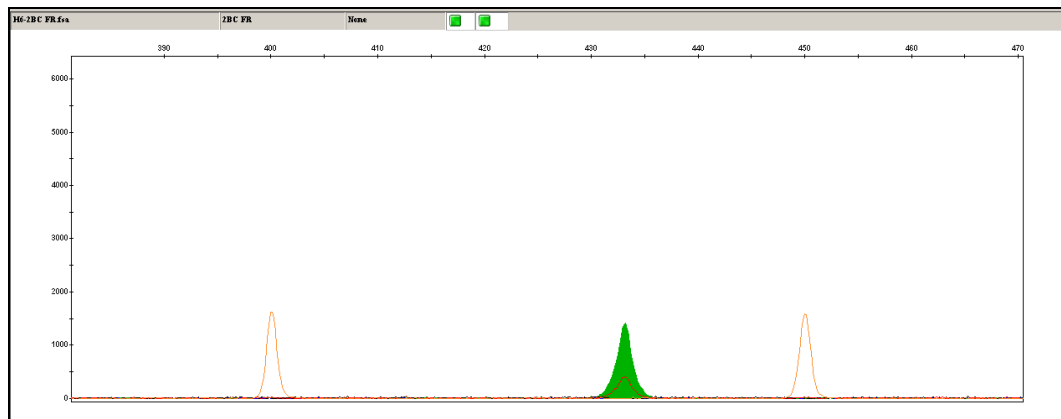
Due frammenti a 433 bp e a 430 rispettivamente DAZ1/2 e uno non compatibile con nessuna delle copie DAZ.

Campione 28:



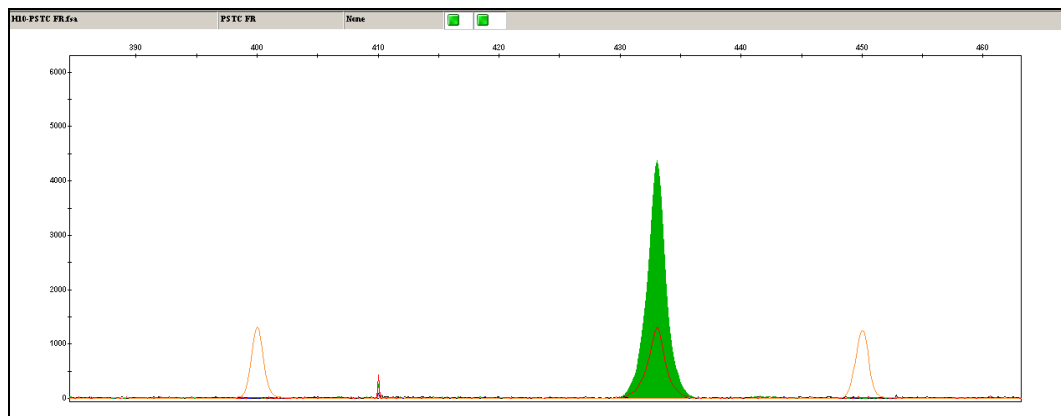
Nel campione si osservano due frammenti: uno a 432 bp (DAZ?) e uno a 434 bp (DAZ1e/o DAZ2).

Campione 2B:



In questo campione si nota un solo frammento a 433 bp (DAZ1/2)

Campione 80:



Un solo frammento a 433bp (DAZ1e/o DAZ2).

10.5 Sequenziamento

Per quanto riguarda il sequenziamento si è basato sul metodo di Sanger come descritto in precedenza e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate in Gene Bank.

Per la lettura delle sequenze si è tenuto conto che la sequenza dell'STS SNV VI (G73169) presenta delle differenze di lunghezza tra le varie copie del gene DAZ.

Sotto è riportato il blast nel quale in rosso è mostrato il sito di taglio Afl III che discrimina il DAZ4 dalle altre copie:

DAZ 4

Identities = 431/431 (100%), Gaps = 0/431 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT 60
              |||
Sbjct 3102058 GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT3102117

Query 61     TTTTATATTGCAGGTACTTCCTGTGGATACCATAAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTTC 120
              |||
Sbjct 3102118 TTTTATATTGCAGGTACTTCCTGTGGATACCATAAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTTC
3102177

Query 121    TAGCTTTAGTGTTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAACTCCTCAG 180
              |||
Sbjct 3102178 TAGCTTTAGTGTTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAACTCCTCAG
3102237

Query 181    ACACGTATTTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCCAAGGA 240
              |||
Sbjct 3102238 ACACGTATTTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCCAAGGA
3102297

Query 241    TACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTTTAGTG 300
              |||
Sbjct 3102298 TACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTTTAGTG
3102357

Query 301    TCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGTGTACA 360
              |||
Sbjct 3102358 TCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGTGTACA
3102417

Query 361    TATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAGAATAT 420
              |||
Sbjct 3102418 TATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAGAATAT
3102477

Query 421    TTGGTTCTAGC 431
              |||
Sbjct 3102478 TTGGTTCTAGC 3102488

```

DAZ 1

Identities = 431/436 (98%), Gaps = 5/436 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT 60
              |||
Sbjct 1323775 GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT
1323716

Query 61      TTTTATATTGCAGGTACTTCCTGTGGATACCAT-AAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTT 119
              |||
Sbjct 1323715 TTTTATATTGCAGGTACTTCCTGTGGATACCATAAAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTT
1323656

Query 120     CTAGCTTTAGTGTTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAACTCCTCA 179
              |||
Sbjct 1323655 CTAGCTTTAGTGTTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAACTCCTCA
1323596

Query 180     GACA---C-GTATTTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCC 235
              |||
Sbjct 1323595 GACACTCCCTGTATTTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCC
1323536

Query 236     AAGGATACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTT 295
              |||
Sbjct 1323535 AAGGATACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTT
1323476

Query 296     TAGTGTCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGT 355
              |||
Sbjct 1323475 TAGTGTCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGT
1323416

Query 356     GTACATATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAG 415
              |||
Sbjct 1323415 GTACATATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAG
1323356

Query 416     AATATTTGGTTCTAGC 431
              |||
Sbjct 1323355 AATATTTGGTTCTAGC 1323340

```

DAZ 2

Identities = 431/436 (98%), Gaps = 5/436 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query   1          GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT 60
          |||
Sbjct  1486374    GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT
1486433

Query   61          TTTTATATTGCAGGTACTTCCTGTGGATACCAT-AAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTT 119
          |||
Sbjct  1486434    TTTTATATTGCAGGTACTTCCTGTGGATACCATAAAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTT
1486493

Query   120         CTAGCTTTAGTGTTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAACTCCTCA 179
          |||
Sbjct  1486494    CTAGCTTTAGTGTTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAACTCCTCA
1486553

Query   180         GACA---C-GTATTTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCC 235
          |||
Sbjct  1486554    GACACTTCCTGTATTTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCC
1486613

Query   236         AAGGATACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTT 295
          |||
Sbjct  1486614    AAGGATACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTT
1486673

Query   296         TAGTGTCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGT 355
          |||
Sbjct  1486674    TAGTGTCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGT
1486733

Query   356         GTACATATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAG 415
          |||
Sbjct  1486734    GTACATATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAG
1486793

Query   416         AATATTTGGTTCTAGC 431
          |||
Sbjct  1486794    AATATTTGGTTCTAGC 1486809

```

DAZ 3

Identities = 426/431 (98%), Gaps = 4/431 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT 60
|||||
Sbjct 2957489 GGGCCTAGTCTCTAGATCATTTATTTTCGGGGTATTGCAGTTGCCTAAGGGAGCTTAATTT
2957430

Query 61 TTTTATATGTCAGGTACTTCCTGTGGATACCATAAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTTC 120
|||||
Sbjct 2957429 TTTTATATGTCAGGTACTTCCTGTGGATACCATAAAAAAAAAAATCAGTACCGCTTCTTC
2957370

Query 121 TAGCTTTAGTGTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAAACTCCTCAG 180
|||||
Sbjct 2957369 TAGCTTTAGTGTAGTACTCAGTTCTATAAGCTGAGTCCAGTGGAGAGGAAACTCCTCAG
2957310

Query 181 ACACGTATTTCATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCCAAGGA 240
|||||
Sbjct 2957309 ACAC---TCT-ATTAGTTAGTAAGCTTGCTGATTCATAACCAGAAAGTTGACTCCAAGGA
2957254

Query 241 TACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTTAGTG 300
|||||
Sbjct 2957253 TACGCAGGATAGCAAACAGTGCTTTCTGCATCACCAAAGATTAAATTGTGATGTTAGTG
2957194

Query 301 TCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGTGTACA 360
|||||
Sbjct 2957193 TCCAATAATAGGCAAAAAATTAGTAATTCCTTTTATGTGCCTATGTGTATATATGTGTACA
2957134

Query 361 TATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAGAATAT 420
|||||
Sbjct 2957133 TATGTGTCTATATATGCATATATTTATGGTTATGTACATACTAACGATTATCCAGAATAT
2957074

Query 421 TTGGTTCTAGC 431
|||||
Sbjct 2957073 TTGGTTCTAGC 2957063

```

Per quanto riguarda la lettura delle sequenze si è tenuto conto che l'elettroferogramma dei soggetti con tutte le copie del DAZ è leggibile laddove le sequenze sono perfettamente sovrapponibili, mentre la restante parte presenta numerose eterozigotità dovute alle differenze di sequenza tra le copie del gene. Un'accurata lettura delle

eterozigosità ha confermato la presenza di tutte le copie (Fig. A).

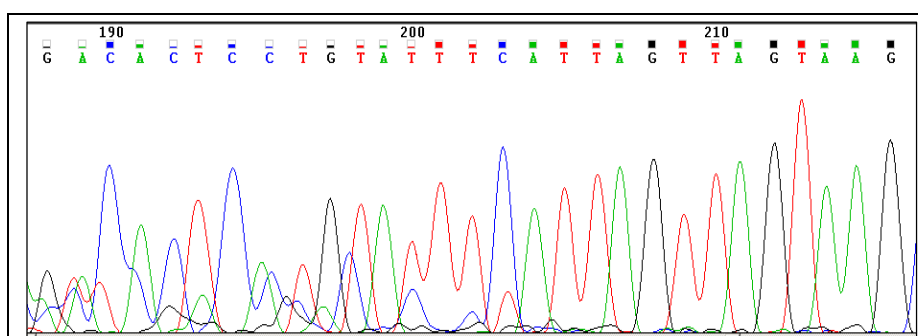


Fig A- Elettroferogramma C9

Nel sottostante elettroferogramma del C80 la mancanza delle eterozigosità mostra l'assenza certa delle copie 3 e 4, ma non è informativo sulle copie 1 e 2 perché aventi la stessa sequenza (Fig. B)

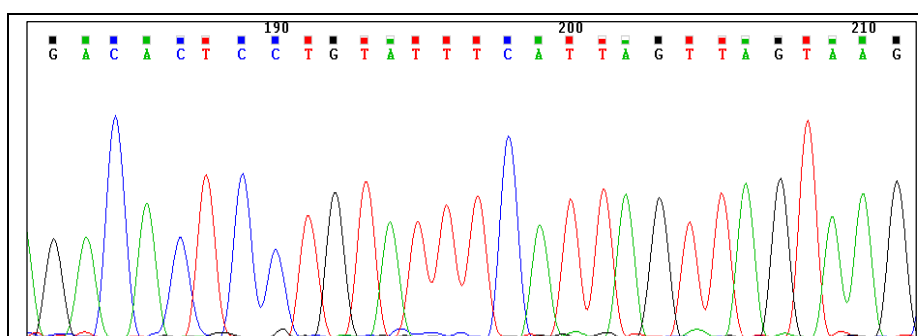


Fig B-Elettroferogramma C80

- L'elettroferogramma del C13 mostra l'assenza del DAZ4 (Fig. C), mentre leggibili sono il DAZ1/2 e il DAZ3

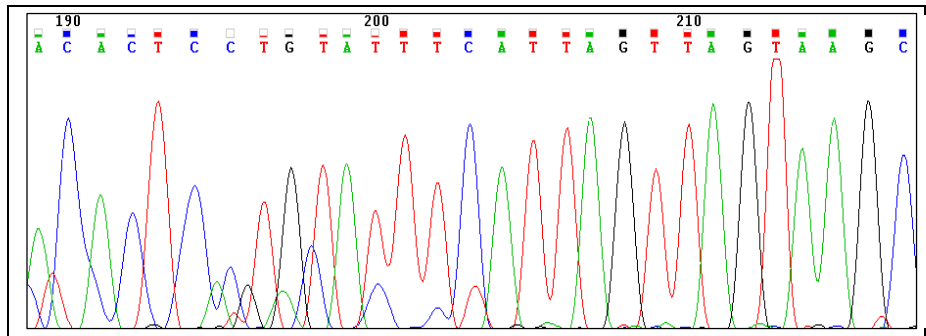


Fig C-Elettroferogramma C13

- Nell' elettroferogramma relativo al C12, si può osservare oltre la copia DAZ1, una sequenza non riportata in banca dati (Fig. E)

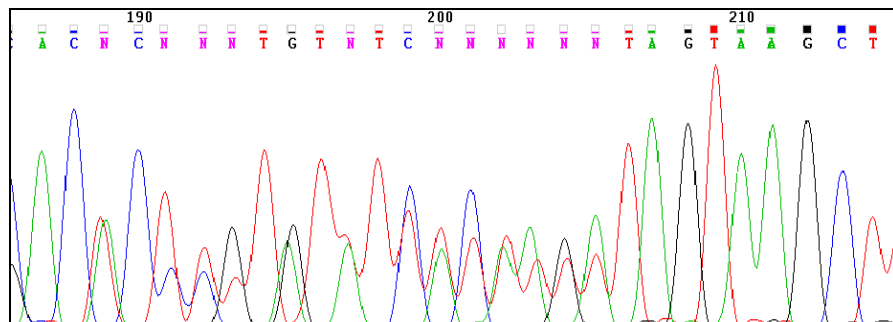


Fig E-Elettroferogramma C12

- L'elettroferogramma del C28 mostra la presenza del DAZ1 e/o DAZ2 e una eterozigosità in posizione 192 (Fig. D)

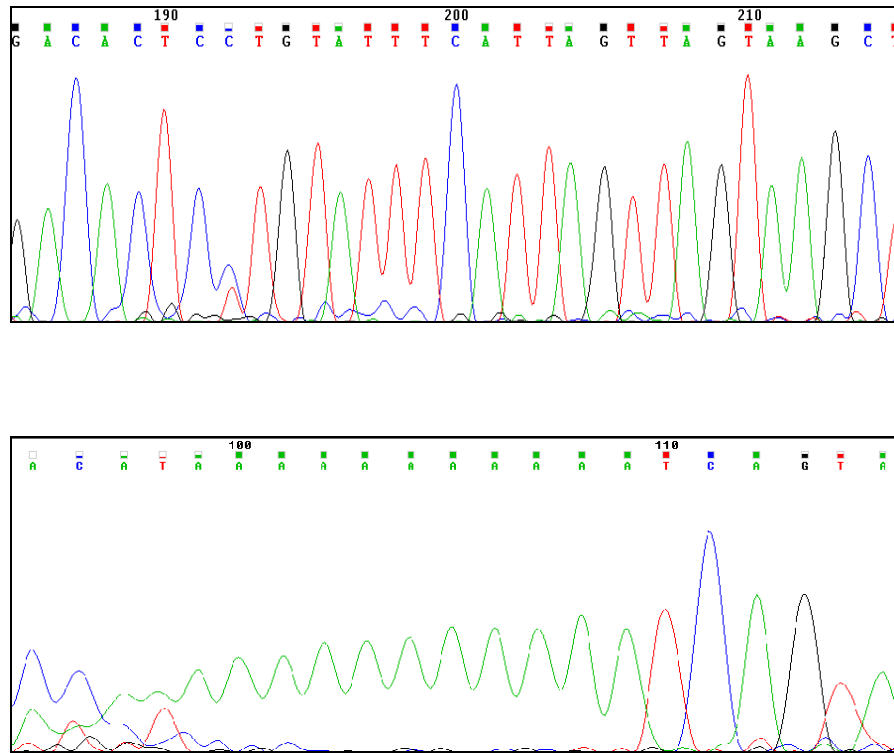


Fig D-Elettroferogramma C28

Sotto (Fig. E) riportiamo le stesse regioni ottenute dal sequenziamento dell' uniSTS SNV VI clonato:

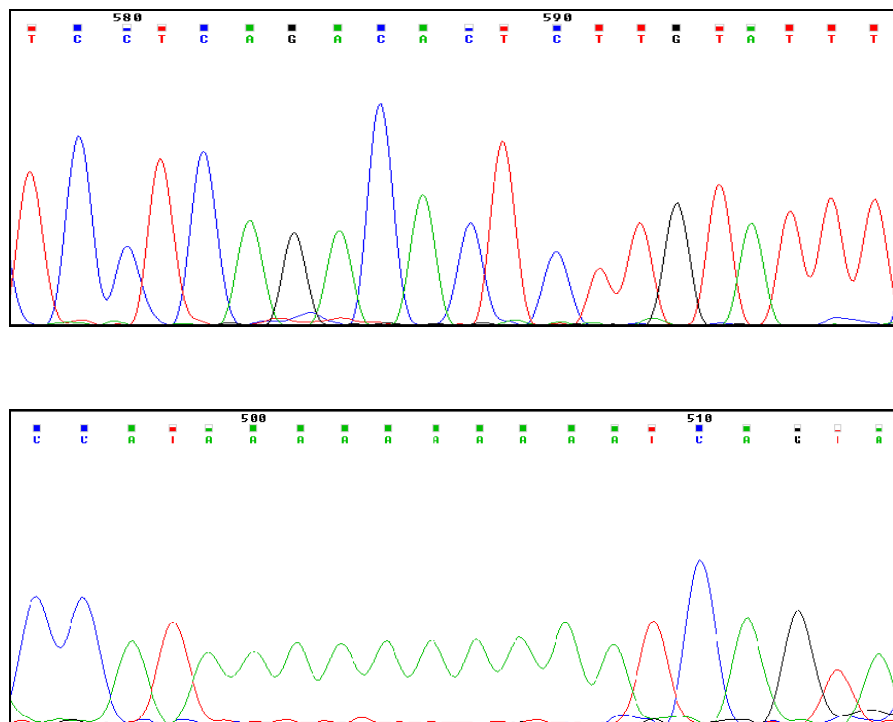


Fig.E- Elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento del campione 28 dopo clonaggio

11. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il ruolo del cromosoma Y nell'infertilità maschile è ormai accertato e le microdelezioni della regione AZF rappresentano la causa genetica più frequente di oligo/azoospermia. Grazie all'identificazione di sequenze specifiche (STS) del cromosoma Y, sono state distinte tre regioni critiche per la spermatogenesi, chiamate Azoospermia Factor che contengono geni che vengono espressi specificatamente nel testicolo.

Lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare hanno permesso di accertare che una certa percentuale di pazienti con oligozoospermia severa e azoospermia, una volta classificati come idiopatici, sono in realtà affetti da una microdelezione della regione AZF. Pertanto il loro disturbo spermatogenetico è dovuto ad una causa genetica. Circa i due terzi di queste delezioni riguardano la regione AZFc dove risiede il gene DAZ. Le delezioni parziali di AZFc rappresentano un fattore di rischio per le alterazioni della spermatogenesi; tuttavia l'impatto di queste delezioni sull'infertilità maschile non è ancora chiaro anche se diversi studi sono stati pubblicati. Rimangono ancora da chiarire i meccanismi molecolari secondari alla delezione e che portano al danno spermatogenico. I livelli di espressione di DAZ non sono noti e i metodi proposti per identificare le delezioni parziali di AZFc non sono ancora ben definiti. E' accertato che la presenza di delezioni della regione AZFc potrebbe essere sottostimata in quanto la PCR

classica identifica una delezione solo quando tutte le copie del gene siano mancanti, in quanto la presenza anche di una sola copia dà luogo ad un'amplificazione. In considerazione del fatto che alcuni geni della regione AZF sono multicopia, è necessario mettere a punto metodologie diverse che consentano di valutare la presenza di delezioni parziali di questi cluster genici.

Il nostro lavoro di ricerca si è incentrato sul cluster DAZ poichè oltre ad essere un gene multicopia, è attualmente uno dei maggiori geni candidati per il fenotipo AZF.

Nello studio intrapreso nel tentativo di trovare una metodica capace di discriminare e caratterizzare le copie del gene DAZ non sono state poche le difficoltà e i risultati inaspettati. Ciascuna delle nuove metodiche ci ha mostrato la variabilità di tale regione, dimostrandoci che non esiste una tecnica univoca sufficiente a chiarire e a definire le delezioni parziali di questo gene. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la Real Time PCR può essere applicata per fare una prima selezione dei campioni presunti deleti ma non fornisce alcuna informazione su quali copie sono mancanti; del resto l'analisi SNV tramite enzimi di restrizione, pur essendo la metodica finora utilizzata per valutare le delezioni parziali, ha mostrato dei limiti, dando nel nostro studio, risultati discordanti tra di loro tanto da spingerci a cercare metodiche alternative per meglio caratterizzare le copie DAZ. Un'altra metodica usata per avere un quadro più chiaro è stata l'analisi dei frammenti che in parte ha confermato i risultati ottenuti con le

precedenti metodiche ed in parte ha messo in evidenza delle nuove situazioni che sono state confermate e chiarite meglio con il clonaggio e il sequenziamento. Questo, effettuato sulla sequenza dell'SNV VI, pur non permettendoci di discriminare DAZ1 da DAZ2 ci ha portato ad individuare in alcuni soggetti la presenza di varianti “alleliche” finora non descritte in letteratura e non presenti in Banca dati, rivelandosi così la metodica più affidabile nel nostro studio.

12. BIBLIOGRAFIA

- Agulnik AI, Mitchell MJ, Lerner JL, Woods DR, Bishop CE (1994) A mouse Y chromosome gene encoded by a region essential for spermatogenesis and expression of male-specific minor Histocompatibility antigens. *Hum Mol Genet* 3:873-878.
- Behre HM, Nieschlag E, Meschede D et al. (1997) Diseases of the hypothalamus and the pituitary gland. In Nieschlag E and Behre H (eds). *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag, Berlin, 115-129.
- Bhasin S, De Krestser DM, Baker HWG (1994) Clinical review 64. Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1525-1529.
- Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA (1998) 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. *Hum Mol Genet* 7:97-107.
- Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, De Palma A, Vicari E, Romeo R, Tumino S, D'Agata R (2001) Spontaneous regression over time of the

germinal epithelium in a Y chromosome microdeleted patient. *Hum Reprod* 16:1845-1848.

- Chuang RY, Weaver PL, Liu Z, Chang TH (1997) Requirement of the DEAD box protein Ded 1p for messenger RNA translation. *Science* 275:1468-1471.
- Delbridge ML, Harry JL, Toder R, O'Neill RJ, Ma K, Chandley AC, Graves JA (1997) A human candidate spermatogenesis gene, RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nat Genet* 15:131-136.
- Dever TE (1994) Determination of the amino acid sequence of rabbit, human, and wheat germ protein synthesis factor eIF-4C by cloning and chemical sequencing. *J Biol Chem* 269:3212-3218.
- De Vries JWA, Hoffer MJV, Repping S, Hoovers JMN, Leschot N, van der Veen F (2002) Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men. *Fertil Steril* 77:68-75.
- Diemer T, Desjardins C (1999) Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 5:120-140.
- Elliott DJ (2000) RBMY genes and AZFb deletions. *J Endocrinol Invest* 23:652-658.

- Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C (1999) Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 14:1710-1716.
- Ferlin A, Moro E, Rossi A and Foresta C (2002) A novel approach for the analysis of DAZ gene copy number in severely idiopathic infertile men. *J Endocrinol Invest* 25:RC1-RC3.
- Ferlin A, Bettella A, Tessari A, Salata E, Dallapiccola B and Foresta C (2004) Analysis of the DAZ gene family in cryptorchidism and idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 81:1013-1018.
- Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH (2002) High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 8:286-298.
- Fernandes S, Parrachini S, Meyer LH, Floridia G, Tyler-Smith C and Vogt PH (2004) A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet* 74:180-187.
- Ferras C, Fernandes S, Marques C.J, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M (2004) AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* 10:755-761.

- Foresta C, Ferlin A, Moro E, Garolla A, Rossato M, Scandellari C. (1995). Microdeletion of the Y chromosome in cryptorchidism and in idiopathic male infertility. *Ann Ital Med Int* 14:151-158.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E (2000b) Deletion and expression analysis of AZFa-genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 9:1161-1169.
- Foresta C, Moro E, Rossi A, Rossato M, Garolla A, Ferlin A (2000c) Role of AZFa candidate genes in male infertility. *J Endocrinol Invest* 23:646-651.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletion and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:226-239.
- Glaser B, Yen PH, Schempp W (1998) Fibre fluorescence in situ hybridization unravels apparently seven DAZ genes or pseudogenes clustered within a Y-chromosome region frequently deleted in azoospermic males. *Chrom Res* 6:481-486.
- Gianotten J, Hoffer MJ, de Vries JW, Leschot NJ, Gerris J, van der Veen F (2003) Partial DAZ deletions in a family with five infertile brothers. *Fertil Steril* 79:1652-1655.
- Habermann B, Mi HF, Edelmann A, Bohring C, Backert IT, Kiesewtetter F, Aumuller G, Vogt PH (1998) Deleted in Azoospermia (DAZ) genes

encode proteins located in human late spermatidi and sperm tails. Hum Reprod 13:363-369.

- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. Genome Res 6:986-994.
- Ho M, Chelly J, Cater N, Danek A, Crocker P, Monaco AP (1994) Isolation of the gene for MacLeod syndrome that encodes a novel membrane transport protein. Cell 77:869-880.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 88:7276-7280.
- Krausz C, Quintana-Murci L, Barbaux S, Siffroi JP, Rouba H, Delafontaine D, Souleyreau-Therville N, Arvis G, Antoine JM, Erdei E, Taar JP, Tar A, Jeandidier E, Plessis G, Bourgeron T, Dadoune JP, Fellous M, McElreavey K (1999) A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. J Clin Endocrinol Metab 84:3606-3612.
- Kent-First MG, Kol S, Muallem A, Ofir R, Manor D, Blazer S, First N, Itskovitz-Eldor J (1996) The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and after infertile fathers. Mol Hum Reprod 2:943-950.

- Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havighurst T, Grosch J (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion. *Mol Reprod Dev* 53:27-41.
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes uniform recurrent deletions on infertile men. *Nat Genet* 29:279-286.
- Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-680.
- Linder P, Lasko PF, Fellous M, Bishop CE (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337:121-122.
- Mazeyrat S, Saut N, Sargent CA, Grimmond S, Longepied G, Ehrmann IE, Ellis PS, Greenfield A, Affara NA, Mitchell MJ (1998) The mouse Y chromosome interval necessary for spermatogonial proliferation is gene dense with syntenic homology to the human AZFa region. *Hum Mol Genet* 7:1713-1724.
- Meschede D, Froster UG, Bergmann M, Nieschlag E (1994) Familial pericentric inversion of chromosome 1 (p34q23) and male infertility with stage specific spermatogenic arrest. *J. Med Genet* 31:573-575.

- Moro E, Ferlin A, Yen PH, Franchi PG, Palka G, Foresta C (2000) Male infertility caused by a de novo partial deletion of the DAZ cluster on the Y chromosome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4069-4073.
- Narayan D, Krishnan SN, Upender M, Ravikumar TS, Mahoney Mj, Dolan TF Jr, Teebi AS, Haddad G (1994) Unusual inheritance of primary ciliary dyskinesia (Kartagener's syndrome). *J Med Genet* 31:493-496.
- Nieschlag E, Behre HM, Meschede D et al. (1997) Disorders at the testicular level. In Nieschlag E, and Behre H (eds). *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag, Berlin, 313-319.
- Pringle MJ, Page DC, (1997) Somatic and germ cell sex determination in the developing gonad. In Lipshultz. L.I. and Howards. S.S. (eds), *Infertility in Male*. 3rd edn. Mosby-Year Book. St Louis, 3-22.
- Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Noltan WE, Meisner L, Roberts KP (1997) Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 336:534-539.
- Quareshi SJ, Ross AR, Ma K, Cooke HJ, Intere MAM, Chandley AC, Hargreave TB (1996) Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 2:775-779.

- Quinzii C, Castellani C (2000) The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol Invest* 23:684-689.
- Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC (1996) Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347:1290-1293.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O et al. (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10:383-392.
- Repping S, de Vries JWA, van Daalen SKM, Korver CM, Leschot NJ, van der Veen F (2003) The use of spermHALO-FISH to determine DAZ gene copy number. *Mol Hum Reprod* 9:183-188.
- Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, Burgoyne P, Saut N, Durand C, Levy N, Terriou P, Hargreave T, Cooke H, Mitchell M, Rappold GA, Affara NA (1999) The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *J Med Genet* 36:670-677.
- Saxena R, de Vries J WA, Repping S, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC (1996) The DAZ gene cluster on the human Y chromosome

arose from an autosomal gene that was trasposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 14:292-299.

- Saxena R, de Vries JW, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, Ma P, Chen E, Hoovers JMN, Page DC (2000) Four DAZ gene in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics* 67:256-267.
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrengements and genomic disorders. *Trends Genet* 18:74-82.
- Stuppia L, Gatta V, Fogh I, Gaspari AR, Grande R, Morizio E, Fantasia D, Pizzati A, Calabrese G, Palka G (2000) Characterization of novel genes in AZF regions. *J Endocrinol Invest* 23:659-663.
- Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC (1999) An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet* 23:429-432.
- Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portino of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 38:119-124.
- Uccellatore F, Padova G, Squatrito S (1983) Reproductive hormone studies in three subjects with a Robertsonian translocation. *J Endocrinol Invest* 6:479-484.

- van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, Krebs D, van der Ven H (1997) Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 3:699-704.
- Vogt PH, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A (1992) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 89:491-496.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kieseewetter F, Kohn FM, Shill WB, Farah S, Ramos C et al. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933-943.
- Vogt PH and Fernandes S (2003) Polymorphic DAZ gene family in polymorphic structure of AZFc locus: artwork or functional for human spermatogenesis? *APMIS*, 111:115-127.
- Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC (1992) The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletion. *Science* 258:52-59.
- Yang Y, Xiao C, Zhang S, Zhang S, Huang M, Lin L (2004) High risk genetic factor in chinese patients with idiopathic male infertility: deletion of DAZ gene copy on Y chromosome *Chin Med J* 117:1092-1094

- Yen PH, Chai NN, Salido E (1997) The human DAZ genes, a putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions. *Mann Genome* 8:756-759.
- Yen PH (1998) A long-range restriction map of deletion interval 6 of the human Y chromosome: a region frequently deleted in azoospermic males. *Genomic* 54:5-12.
- Yen PH (1999) Advances in Y chromosome mapping. *Curr Opin Obstet Gynecol* 11:275-281.
- Zunkle C, Thies U, Braukle I, Reis A, Schirren C (1994) Down's syndrome and male infertility: PCR derived fingerprinting, serological and andrological investigations. *Clin Genet* 46:324-326.