

Y kromozomu: Azospermia Factor (AZF) bölgesi, genler ve infertilite

Ayşe Gül ZAMANI, H.Gül DURAKBAŞI DURSUN

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Amaç: Erkek infertilitesinin genetik temelini yeni gelişmeler ışığında gözden geçirmek. Azospermia factor (AZF) bölgesi genleri ve erkek infertilitesinin patogenezi hakkında bildiklerimiz yeni yapılmış çalışmalara göre özetlendi. **Ana bulgular:** İnfertilite, üreme problemi olan çiftlerin yaklaşık %13-18'ini etkileyen bir sağlık sorunudur ve bu çiftlerin yarısında sebep erkek infertilitesidir. Erkek infertilitesinin en sık görülen sebeplerinden biri ise AZF bölgesindeki spesifik DNA segmentlerinin dolayısıyla sperm üretimi için temel oluşturan genlerin kaybına yol açan Y-kromozomal mikro delesyonlardır (%8-15). **Sonuç:** Y kromozomuna bağlı infertilitenin moleküler temeliyle ilgili bilgiler hızla artmaktadır ve yeni genler tesbit edilmekte, yeni moleküler tanısal yaklaşımlar geliştirilmektedir.

Anahtar kelimeler: Y kromozomu, AZF, genler, spermatogenez, mikrodelesyonlar, erkek infertilitesi
Selçuk Tıp Derg 2006; 22: 81-87

SUMMARY

Chromosome Y: AZF region, genes and infertility

Aim: To provide an overview of the molecular genetic basis of male infertility. We summarize our understanding of AZF located genes and pathogenesis of male infertility according to the current reports. **Main findings:** Infertility is a reproductive health problem that effects about 13-18% of couples suffers from it, and in approximately one-half of all cases the reason is male infertility. The most frequent pathogenic causes of male infertility are Y-chromosomal microdeletions (8-15%) in AZF (azospermiafactor) region, which, by loss of specific DNA segments, leads to loss of vital genes for sperm production. **Conclusion:** The knowledge of the molecular basis of Y-chromosomal infertility is increasing rapidly, new spermatogenic genes are being discovered and molecular diagnostic approaches established.

Key words : Y chromosome, AZF, gene, spermatogenesis, microdeletions, male infertility.

Uzun yıllar boyunca Y kromozomu ile ilişkilendirilen tek fonksiyon SRY (sex determining region of Y) geni tarafından kontrol edilen cinsiyet belirleme idi. Son yıllarda spermatogenez kontrolünün Y kromozomu tarafından gerçekleştirildiği gösterildi (1,2). Bu fonksiyonla ilgili bir çok gen haritalandı (3).

Spermatogenez yaklaşık yetmiş günlük kompleks bir süreçtir. Başlangıç aşamasında spermatogonia mitozla bölünerek primer spermatositleri oluşturur

(3,4). Primer spermatositlerin birinci mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla sekonder spermatositler, ikinci mayoz bölünmeyle de haploid yuvarlak spermatidler meydana gelir. Spermiyogenesisle bu hücreler olgun spermatozoayı oluşturmak üzere farklılaşırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar spermatogenezin regülasyonu ile ilgili özel genleri tanımlamak üzerinde yoğunlaştı. Spermatogenez ile Y kromozomu delesyonları arasındaki bağlantıyı ilk defa Tiepolo ve Zuffardi gösterdi (5).

Haberleşme Adresi: **Dr. Ayşe Gül ZAMANI**
S. Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, KONYA
e-posta: agzamani@yahoo.com

Geliş Tarihi : 16.11.2005 Yayına Kabul Tarihi : 18.01.2006

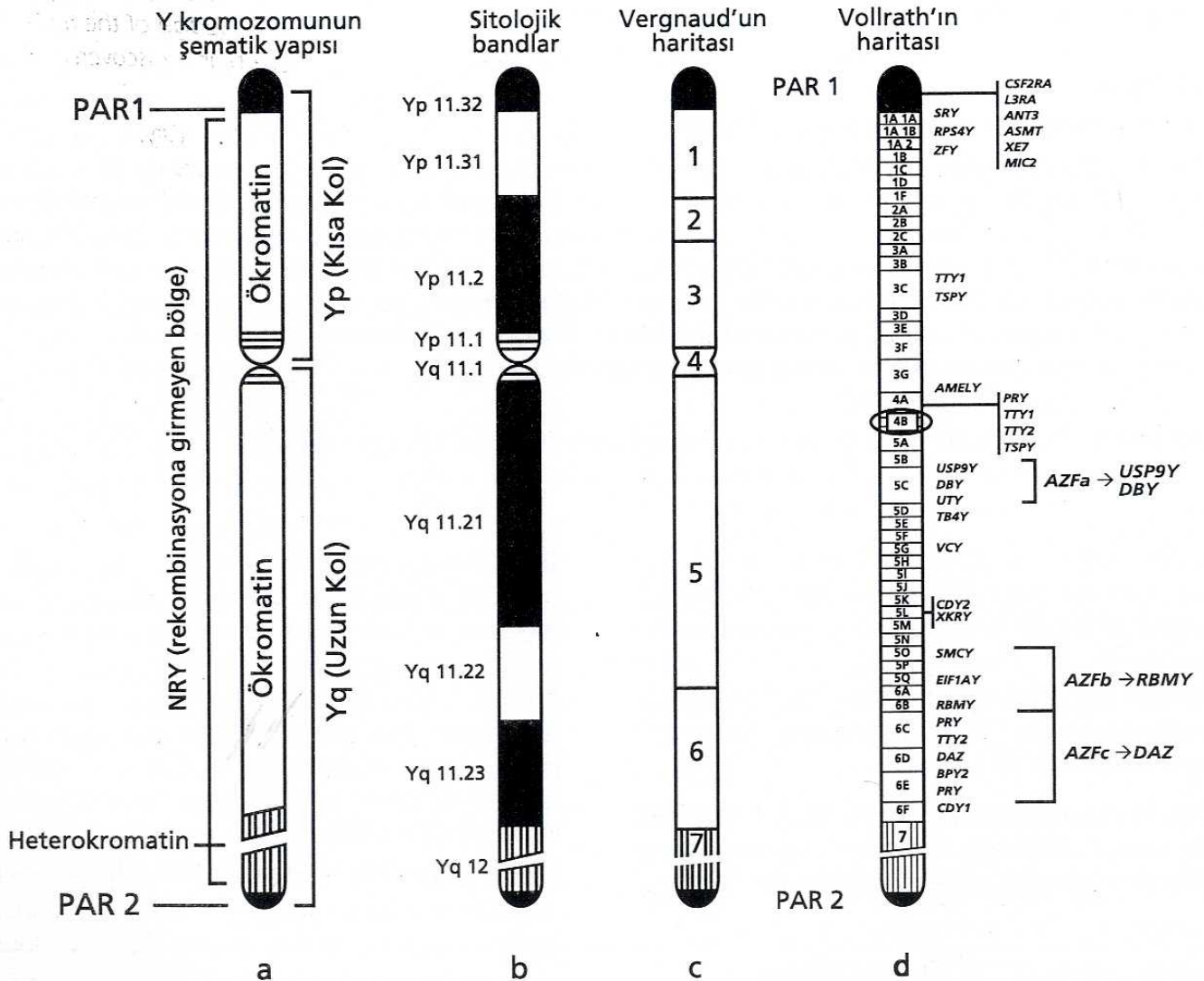
Çalışmalarında 1170 erkeği sitogenetik olarak değerlendirdiler ve altı azospermik erkekte heterokromatin bölgenin tümünün (Yq12) ve Yq11 bölgesinde yer alan ökromatik bölgenin tanımlanamayan bir miktarının kayıp olduğunu tesbit ettiler. Altı vakanın ikisinin babası normal Y kromozomuna sahipti yani hadise de novo idi. Bu da delesyonların azosperminin nedeni olduğunu ve Yq11'de erkek germ hücre gelişimi için önemli bir genetik faktörün yer aldığını gösteriyordu. Bu gen ya da gen bölgesi Azospermia factor (AZF) olarak adlandırıldı (5).

AZF lokusunun kompleks yapısı ise STS (small squence tagged sites) markerler kullanılarak tanımlandı. Sitogenetik düzeyde tanımlanamayan şübmikroskopik interstisiyel delesyonlar STS-PCR ve southern hibridizasyonla tesbit edildi. Tesbit edilen

delesyonlar Y mikrodèlesyonları olarak tanımlandı.

Y KROMOZOMU VE AZF BÖLGESİNİN YAPISI

Y kromozomu insan kromozomlarının en küçüğüdür. Kısa bir p kolu, uzun bir q kolu vardır. Mayoz esnasında her iki ucunda yer alan psö-dootozomal bölgeleriyle (PARs) X kromozomu ile eşleşir. Diğer bölgeleri ise Y kromozomunun rekombinasyona girmeyen (NRY) bölgeleridir. Yp ve Yq'nun proksimal kısımlarında ökromatin içeren bölgeler bulunurken heterokromatin bölge Yq'nun distalinde yer alır (Şekil 1a). Heterokromatin bölgenin uzunluğu değişkenlik gösterir ve Yq'nun 1/3-1/2'lik kısmını oluşturur. Sitogenetik olarak Yp'deki ökromatik bölge Yp11, Yq'nun ökromatik proksimal bölgesi Yq11 (Yq11.1, Yq11.21, Yq11.22 ve Yq11.23) ve heterokromatik distal bölgesi Yq12 olarak ayrılır (Şekil 1b).



Şekil 1. a, Y kromozomunun şematik yapısı.
c, Vergnaud'un haritası (7).

b, Y kromozomunun sitolojik bandları.
d, Vollrath'ın haritası (8).

Yoğun çalışmalar sonucunda, ilk defa Tiepolo ve Zuffardi tarafından tanımlanan ve Y kromozomunun uzun kolunda yer alan AZF bölgesinin en az üç ayrı delesyon intervaline sahip olduğu anlaşıldı ve bu intervaller sırasıyla AZFa, AZFb, AZFc olarak isimlendirildi (5-10). Vergnaud 1986 yılında ilk Y kromozomu interval haritasını hazırladı ve Y kromozomu üzerinde 6 adet interval belirledi (7). Haritaya göre AZFa, AZFb ve AZFc proksimalden distale doğru 5. ve 6. intervallere yerleşim gösterir (Şekil 2c). Intervaller daha sonraları Vollrath'ın haritasına göre 43 subintervale ayrılmıştır: 1A1A-6F. AZFa interval 5'in proksimal kısmında yer alır (subinterval 5C). AZFb interval 5'in distal kısmından interval 6'nın proksimal ucuna kadar uzanır (subinterval 5O-6B). AZFc ise interval 6'nın distal kısmına yerleşmiştir (Subinterval 6C-6E) (Şekil 1d) (8). Bunlara sonradan eklenen AZFd, AZFb ve AZFc bölgeleri arasında yer almaktadır (9). Vogt (10) ve ark. ise bir başka haritada Yq11 bölgesini 25 intervale bölmüşlerdir: D1-D25. Bir çok Yq mikrodelesyon çalışması bu haritaları temel olarak gerçekleştirilmiştir .

AZF BÖLGESİNDE YER ALAN GENLER

AZFa BÖLGESİ VE GENLERİ

AZFa bölgesi 800 kb (kilobase)'lık bir bölgedir ve subinterval 5B-5O arasında yer almaktadır. İçerdiği genler tek kopyalı korunmuş genlerdir. AZFb ve AZFc bölgelerinden tekrarlayan diziler içermemesi ve düşük delesyon sıklığı ile farklılık gösterir. AZFa delesyonları az sayıda hastada rapor edilmiştir (10-16). Bununla birlikte, bu bölgedeki çalışmalar erkek infertilitesinin genetik temelini anlamada gereklidir. Y kromozomunun bu bölgesinde yer alan genlerin tek kopyalı olması ,bu genlere ait nokta mutasyonlarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Ayrıca, AZFb ve AZFc bölgelerinde yer alan çok kopyalı genler için de şu düşüncüyü gündeme getirmektedir: acaba tek bir kopyada ortaya çıkan nokta mutasyonlarının etkisi diğer kopyaların devreye girmesi ile kompanse mi edilmektedir (16). AZFa bölgesinde USP9Y, DBY, UTY, TB4Y genleri yer almaktadır.

USP9Y (ubiquitine specific protease 9, Y chromosome): AZFa bölgesinde yer alan genlerden ilk tanımlanan genidir (13). Tek kopyalıdır ve 46 ekzonludur. İnfertil erkeklerde kayıp olduğunun tesbit edilmesinin ardından 'drosophila developmental gene fat facets' ile homoloji gösterdiği

anlaşıldığı için ilk zamanlarda DFFRY (drosophila fat facets related Y) olarak adlandırılmıştır (17). X kromozomu üzerinde yer alan bir homologu bulunmaktadır ve bu homolog X'in inaktivasyonundan etkilenmemektedir. C terminal ubiquitin hidrolaz olarak fonksiyon göstermektedir. Çok çeşitli dokularda okunan bir genidir (13,18,19). Bu genin fonksiyonunda ortaya çıkan herhangi bir kayıp spermatojenik gelişim bozukluğuna yol açmaktadır (15). USP9Y ile birlikte DBY genlerinin her ikisini birden kapsayan delesyonlarda bu tablo ağırlaşmakta ve hastalarda azospermi bulunmaktadır (20)

DBY (dead/ H box 3,Y-linked): Subinterval 5C'de yer alan 17 ekzonlu, tek kopyalı bir housekeeping genidir. X kromozomu üzerinde yer alan X'in inaktivasyonundan etkilenmeyen bir homologu mevcuttur (20). Tüm dokularda tek bir transkript olarak okunurken, testiste ifade bulan kısa, farklı bir DBY transkripti daha vardır (18). Farelerdeki testise özel ve sadece germ hücrelerinde sentezlenen PL10 proteini ile önemli derecede homoloji göstermektedir (20). Bu nedenle, Foresta ve ark. DBY'nin spermatojenik süreçte anahtar role sahip olduğunu ileri sürmektedir (20). Genin ürünü ATP bağımlı RNA helikaz'dır ve bu bir dead-box proteindir (19,21,22). DBY delesyonlarında hastalarda sertoli-hücre sendromu veya ağır hipospermatogenez izlenmektedir (20).

UTY (ubiquitous TPR motif on Y): Subinterval 5C'de yer alan 20 ekzonlu bir genidir (23,24). TPR (tetratricopeptide repeat) motif bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin protein-protein etkileşimlerini düzenlediği düşünülmektedir (23).

TB4Y (thymosin, beta-4, Y chromosome): İnsan Y kromozomunun subinterval 5D bölgesinde yer almaktadır. X üzerinde yer alan ve X'in inaktivasyonundan etkilenmeyen bir homologu (TB4X) mevcuttur. Testise spesifik transkriptleri bulunmaktadır. Timozin beta-4, aktini ayırmada görev yapmaktadır (18).

AZFb BÖLGESİ VE GENLERİ

Subinterval 5O-6B arasında kalan bölgedir. AZFb mikrodelesyonlarına sahip tüm erkekler azospermiktir ve testiste spermatozoanın toptan yokluğu söz konusudur (10,16,25). Bununla birlikte delesyonların ISCI (intracytoplasmic sperm injection) döllere aktarımı ile ilgili herhangi bir rapor yoktur.

AZFb bölgesinde yer alan ve üzerinde en fazla çalışılan genler RBMY gen ailesidir. Bunun dışında; EIF1AY, SMCY, TTTY2 genleri de bu bölgede yer almaktadır.

RBMY (RNA-binding motif, Y chromosome) gen ailesi: RBMY gen ailesi Yq11.23de, AZFb bölgesinde interval 6 (subinterval XII-XIV)'da yerleşim gösteren kümelenmiş 15 kopyadan oluşur (26). Yaklaşık 200 kb'lık bir bölgeye yayılan bu genler delesyona uğradığında azospermiye yol açarlar (19,26). Bunlardan sadece iki tanesi aktif olarak okunurlar: RBMY 1 (RNA binding motif-1) ve RBMY 2 (RNA binding motif-2). RBMY 1 ve RBMY 2 ilk defa 1993 yılında tanımlanmışlardır (26). Sadece testiste okunan genlerdir ve yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda insan erkek germ hücrelerinin nükleuslarında saptanmışlardır (27). Genler 12 eksona sahiptir ve ekson 7'den ekson 11'e kadar olan her ekson 37 aa'lık bir tekrar kodlamaktadır. Bu tekrarların nükleotid dizilimi birbiriyle %85 homoloji gösterir (28). RBMY genlerinin ürünü RNA'ya bağlanan proteinlerdir. Proteinler RNA bağlanma motifine sahip bir N terminaline ve 37 aa'lık 4 adet glisin, serin, arginin rezidüleri içeren tekrarlayan segmenti olan bir C terminaline sahiptir (26,29). Bu proteinler heterojenöz nükleer ribonükleoprotein G (hnRNPG) ailesindedir. Nükleer poliadenile RNA'lar ile birleşerek RNA paketlenmesinde, mRNA'nın sitoplazmaya geçişinde ve alternatifli eklemede (alternative splicing) rol oynadıklarına inanılmaktadır (30,31). Venables ve ark. RBMY proteinlerinin spermatozoidlerde Tra2-beta-bağımlı alternatifli eklemede rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir (32).

EIF1AY (translation initiation factor 1A, Y isoform): Homologu X kromozomu üzerinde yer alan eIF-1A'nın Y isoformunu kodlar (19). Henüz spermatogenezdeki rolü belirlenmemiştir. EIF1AY geninin her dokuda yer alan transkriptlerine ek olarak testise özgü transkriptlerinin tesbit edilmiş olması, AZFb fenotipinin oluşumunda önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Tek başına bu gene ait bir delesyon tesbit edilememiştir (19).

AZFc BÖLGESİ VE GENLERİ

AZFc bölgesi 3 Mb(megabase)lık bir alana yayılım gösterir. En sık delesyona uğrayan ve üzerinde en çok çalışılan bölgedir. Azospermik erkeklerin

%12'sinde ve ağır oligospermili erkeklerin %6'sında AZFc delesyonu mevcuttur (33-36). AZFc bölgesinin nükleotid dizilimi ve genetik kompozisyonu yakın zamanda gösterilmiştir. Bu bölge dizilim benzerliği gösteren palindromik dizilimlere (ters dönmüş tekrarlayan dizilimler) ve amplikon adı verilen direkt tekrarlayan dizilimlere sahip geniş alanlardan oluşmaktadır (36). Bu bölgede, tümü testis dokusuna spesifik 19 transkripsiyon ünitesine sahip 7 ayrı gen ailesi bulunmaktadır (36). Bunlar; DAZ, CDY1, PRY, BPY2, CSPG4LY, GOLGAZLY, TTTY3 ve TTTY4'dür.

DAZ (Deleted in azoospermia) gen ailesi: DAZ gen ailesi Y kromozomunun uzun kolunun AZFc bölgesinde yer alan interval 6'nın distal kısmında lokalizedir (10). İlk defa Reijo ve ark. tarafından klonlandı ve azospermik erkeklerde kayıp olduğu gösterildi ve tek kopyalı bir gen olduğu düşünülerek DAZ (deleted in azoospermia) geni olarak adlandırıldı (33). Daha sonraları bu genin çok kopyalı bir gen ailesine ait olduğu anlaşıldı. Kopya sayısı kesin olarak bilinmese de southern blotting yöntemi ile üç adet ve fiber fluoresans in situ hibridizasyon yöntemi ile de 7 adet (aktif veya pseudogen olarak) DAZ gen kopyası saptandı (37-40). Bu kopyalardan biri DAZ2 Y üzerindeki spermatogenez geni (SPYG) olarak bilinmektedir ve kendisinin 3 nolu kromozomun p kolunda yer alan otozomal bir homologu mevcuttur (DAZL1) (12).

DAZ genleri 42 kb'lık bir bölgeye yayılan 12 ekzonlu genlerdir. Ekzon 2 ekzon 5 RNA'ya bağlanma bölgesini kodlarken, ekzon 7a'dan ekzon 7g'ye kadar eksonlardan her biri bir DAZ tekrarını kodlar. Genin ürünü karbon ve azot terminallerinde bu 24 amino asitlik tekrarlara (DAZ tekrarları) sahiptir (12). DNA transkriptlerinin sayısı bilinmemektedir. Transkriptler arasında DAZ tekrarlarının sayısı ve sırası yönünden farklılık bulunmaktadır. Bu farklılıklar alternatifli ekleme veya farklı DAZ genlerinin varlığı ile açıklanabilir (19,40-44).

DAZ genlerinin ürünü olan DAZ proteinleri sitoplazmik proteinlerdir. DAZ proteinlerinin germ hücre epitelinde geç spermatid döneminde testise özgü mesenger RNA'ların depolanması ve taşınmasını kontrol eden bir role sahip oldukları ileri sürülmektedir (16,42,45). DAZ genleri fare Dazla geni ve drazofila Boule geni ile yüksek derecede dizilim homolojisine sahiptir. DAZ geninin

evrim boyunca korunduğu ve mayotik hücre siklusunun regülasyonunda rolü olduğu ileri sürülmektedir (45-47). Bu da DAZ delesyonlarına sahip tüm erkeklerin olgun sperm oluşturma yeteneğini kaybettiğine işaret etmektedir. Bununla birlikte oligospermili bazı erkek hastalarda DAZ delesyonu tesbit edilememiştir (9,45,46).

Saxena ve ark.ları (48) DAZ gen ailesinin 3 nolu kromozomun kısa kolunda yer alan otozomal homologundan (DAZL1) orijin alarak primat evrimi esnasında Y kromozomu üzerine aktarıldığını göstermişlerdir. DAZ genlerinin sekans analizleri sonucunda genin egzonlarının kısıp amplifikasyona uğradığını, ayrıca ortaya çıkan bu modifiye genin de amplifiye olarak Y kromozomunun üzerine aktarıldığını tespit etmişlerdir (48). DAZL1 sadece farede erkek ve dişi germ hücrelerinde ve spermatogenesis ile ilgili olarak insanda okunmaktadır (46). Dişi farelerde DAZL1 geninin okunmaması dişi genital sisteminin gelişim bozukluklarına yol açmaktadır (49).

CDY1 (Chromodomain protein, Y Chromosome, 1):

Lahn ve Page testis dokusundan elde ettikleri cDNA'lardan iki farklı CDY proteini izole ettiler: CDY1 ve CDY2 (18,50). Bunlardan CDY1 geni 6F ve CDY2 geni 5L bölgesinde haritalandı (51). CDY1, CDY2 proteinlerinin %98 identik olduğu gösterildi (18). CDY1 geninin major transkripti intron içermemektedir. Bununla birlikte alternatif eklemeye ile CDY1 proteininin bir isoformunun ortaya çıktığı bilinmektedir. Genin ürünü 554 aminoasitlik bir proteindir ve bir kromodomain ile katalitik bir domaine sahiptir (18,51).

PRY2 (PTPBL-Related gene on Y, 2): PRY genleri sadece testiste ifade bulmaktadır. PRY1 geni subinterval 6E ve PRY2 geni 6C bölgesinde haritalandı (18). Yen ve ark. çalışmalarında üç ayrı PRY geninin TTY2 genine oldukça yakın bir bölgede interval 6'nın proksimal kısmında yerleştiğini gösterdi (51). PRY1 ve PRY2 genlerinin yer aldığı Yq bölgesinin palindromik bir yapıya sahiptir (52). Fare tirozin fosfataz proteini (PTPBL) ile oldukça benzer bir proteini kodlamaktadır (52).

BPY2 (Basic protein on Y Chromosome, 2): AZFc subinterval 6E bölgesinde haritalanmıştır (18). Y kromozomu üzerinde yer alan çok kopyalı bir gen olduğu düşünülmektedir. Testis dokusuna özgü 106 aminoasitlik bir protein ürününe sahiptir (18).

CSPG4LY (Chondroitin sulfate proteoglycan 4-like, Y-linked): İki farklı kopyası Y kromozomu erkek spesifik bölgede (MSY) tanımlanmıştır (52).

GOLGA2LY (Golgi autoantigen, golgin subfamily A,2-like, Y linked): Yq üzerindeki Y kromozomu erkek spesifik bölgede (MSY) iki farklı kopyası tanımlanmıştır (52).

AZF delesyonları kromozomiçi yeniden düzenlenmeler ile oluşur: Bugün artık AZFa, AZFb ve AZFc delesyonlarının Yq11'de yer alan geniş homolog tekrarlayan dizilim blokları arasındaki yeniden düzenlenmeler ile oluştuğu bilinmektedir (36,53,54). Yeniden düzenlenmeler sadece Y kromozomu ile ilgilidir ve diğer kromozomlarla herhangi bir ilişkisi yoktur. Artık delesyonlar açısından, AZFa bölgesi için HERV15yq1/yq2, AZFb bölgesi için P5/proksimal P1 ve AZFc bölgesi için b2b4 tekrar bloklarındaki yeniden düzenlenme füzyonları değerlendirilmektedir (36,53,54). Komplet AZF delesyonları hastanın infertilitesinin gerçek sebebi olabilmektedir. Bu nedenle artık Yq11'de yer alan kırık-füzyon bölgelerinin tesbit edilmesiyle polimorfik ve parsiyel AZF delesyonlarının, komplet delesyonlardan ayırd edilmesi gerekmektedir. Farklı AZF kırık-füzyon bölgelerinin etrafında yer alan yeni bir STS loküs seti geliştirilmiştir (55-59). Böylece AZF delesyonlarının komplet olup olmadıkları basit bir delesyon paterni ile tanımlanabilmektedir. AZFa, AZFb ve AZFc için parsiyel ve polimorfik delesyonlar rapor edilmeye başlanmıştır (55-59).

AZF BÖLGESİ MİKRODELESYONLARI VE GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ

Erken dönem çalışmaları her AZF bölgesine ait özel infertilite fenotiplerinin mevcudiyetine işaret etmiştir. Örneğin AZFa delesyonları sertoli-hücre sendromu ile sonuçlanmaktadır. AZFb delesyonlarında sperma üretiminde bozukluk görülmekte, AZFc delesyonlarında ise bazı spermatogonia mevcudiyetini korumaktadır (10). Pryor ve ark. normal sperm sayısına sahip hafif oligospermili ama aynı zamanda anormal sperm morfolojisine sahip erkeklerin hem AZFa, hem de AZFb ve AZFc lokuslarında mikrodelesyonların olabileceğini göstermişlerdir (12). Yq mikrodelesyonlarında belli bir genotip fenotip ilişkisinin tesbit edilmemiş olmasına rağmen komplet delesyonlarda belli bir fenotip genotip ilişkisi söz konusudur. AZFa'yı içeren komplet delesyonlarda genellikle sertoli-hücre sendromu veya ciddi oligospermi beklenir

(9). Komplet AZFb delesyonlarında ise mayotik durma gözlenmektedir. Komplet AZFc delesyonlarında hipospermatogenez ve seminifer tubuluslardaki germ hücrelerinde miks atrofi izlenir

(36,53,60). AZFd bölgesinde yer alan mikrodelesyonlar ise hafif oligospermi veya normal sperm sayısı ile birlikte anormal sperm morfolojisiyle sonuçlanır (9).

KAYNAKLAR

1. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240-4.
2. Burgoyne PS. The mammalian Y chromosome: a new perspective. *Bioassays* 1998;20:363-6.
3. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat* 1966;118:509-24.
4. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11287-9.
5. Tiepolo L and Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119-24.
6. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch. Human Y chromosome azospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996;5:933-43.
7. Vergnaud G, Page DC, Simler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, et al. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986;38:109-204.
8. Vollrath D, Foote S, Hilton A, et al. The human Y chromosome: a 43 interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992;258:52-9.
9. Kent-First M, Muallem A, Shultz J. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 1999;53:27-41.
10. Vogt, PH, Edelman A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Keisewetter F, et al. Human Y chromosome azospermic factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996;5:933-45.
11. Oureshi SJ, Ross AR, Ma K, Cooke HJ, Intyre MA, Chandley AC, et al. PCR screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 1996;2:775-9.
12. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997;336:534-9.
13. Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, et al. Characterisation of Y 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. *1998;7:97-107.*
14. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Erickson RP, Lonspied G, Mitchell M, et al. The critical region of overlap defining the AZF a male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *J Med Genet* 1999;36:670-7.
15. Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, et al. An azospermic man with *ade novo* point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature Genet* 1999;23:429-2.
16. Silber SJ, Sjoerd R. Transmission of male infertility to the future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod* 2002;8:217-29.
17. Jones M, Furlong H, Burkin RA, Chalmers U, Brown GM, Khwaja O, et al. The Drosophila developmental gene fat facets has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Hum Molec Gene* 1996;5:1695-701.
18. Lahn, B T, Page D C. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997;278:675-80.
19. Foresta C, Moro E and Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endoc Reviews* 2001;22:226-9.
20. Foresta, C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Molec Genet* 2000;9:1161-9.
21. Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Niski K, et al. Birth of the D-E-A-D Box (letter) *Nature* 1989;337:121-2.
22. Chuang RY, Weaver PL, Liu Z, Chang TH. Requirement of the DEAD box protein Ded1p for Messenger RNA translation. *Science* 1997;275:1468-71.
23. Greenfield, A, Carrel, L, Pennisi, D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, et al. The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Molec Genet* 1998 ;7:737-42.
24. Shen P, Wang F, Underhill P A, Franco C, Yang W-H, Roxas A, et al. Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. *Pro Nat Acad Sci* 2000;97:7354-9.
25. Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, Ye Z, Veeck LL, Palermo GD, et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetics test. *Hum Reprod* 1998;13:2812-5.
26. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargreave TB, et al. Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet.* 1992;1:29-33.
27. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Keisewetter F, Pryor J, et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3848-53.
28. Najmabadi H, Chai N, Kapali A, Subbarao MN, Bhasin D, Woodhouse E, et al. Genomic structure of a Y-specific ribonucleic acid binding motif-containing gene: a putative candidate for a subset of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2159-64.
29. Delbridge ML, Harry JI, Toder RA. Human candidate spermatogenesis gene, RBM1 is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nat Genet* 1997;15:131-6.
30. Weighardt F, Biamonti G, Riva S. The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins(hnRNP) in RNA metabolism. *Bioassays* 1996;18:747-56.
31. Elliott DJ, Oghene K, Makarov G, Makarov O, Hargreave TB, Chandley AC, et al. Dynamic changes in the subnuclear organisation of pre-mRNA splicing proteins and RBM during human germ cell development. *J Cell Sci* 1998;111:1255-65.

32. Venables JP, Elliott DJ, Makarova OV, Makarov EM, Cooke HJ, Eperon IC. RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2-beta and affect splicing. *Hum Molec Genet* 2000;9:685-94.
33. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet* 1995;10:383-93.
34. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996;347:1290-3.
35. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1998;13:3327-33.
36. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001;29:279-86.
37. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, et al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genet* 1996;14:292-9.
38. Glaser B, Yen PH, Schempp W. Fibre fluorescence in situ hybridisation unveils apparently seven DAZ gene or pseudogenes clustered within a Y-chromosome region frequently deleted in azospermic males. *Chromosome Res* 1998;6:481-6.
39. Yen PH. A long-range restriction map of deletion interval 6 of the human Y chromosome: a region frequently deleted in azospermic males. *Genomics* 1998;54:5-12.
40. Yen PH, Chai NN, Salido EC. The human DAZ genes, a high putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions. *Mamm Genome* 1997;8:756-9.
41. Menke DB, Mutter GL, Page DC. Expression of DAZ, an azospermia factor candidate, in human spermatogonia. [Letter] *Am J Hum Genet* 1997;60:237-41.
42. Haberman B, Mi HF, Edelman A. DAZ (Deleted in Azospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails. *Human Reprod* 1998;13:363-9.
43. Ferlin A, Moro E, Onisto M, Toscano E, Bettella A, Foresta C. Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic severe testiculopathies. *Hum Reprod* 1999;14:2286-92.
44. Lee JH, Lee DR, Yoon SJ, Chai YG, Roh SI, Yoon HS. Expression of DAZ, DAZL1 and protamine-2 in testis and its application for diagnosis of spermatogenesis in non-obstructive azospermia. *Mol Hum Reprod* 1998;4:827-34.
45. Briton-Jones C, Haines CJ. Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *HKMJ* 2000;6:184-9.
46. Cooke HJ, Lee M, Kerr S, Ruggiu M. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Hum Mol Genet* 1996;5:513-6.
47. Eberhart Ch, Maines JZ, Wasserman SA. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azospermia. *Nature* 1996;381:783-5.
48. Saxena R, de Vries JWA, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics* 2000;67:256-67.
49. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, et al. The Mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 1997;389:73-7.
50. Lahn BT, Page DC. Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome. *Nature Genet* 1999;21:429-33.
51. Yen PH. A long-range restriction map of deletion interval 6 of the human Y chromosome: a region frequently deleted in azospermic males. *Genomics* 1998;54:5-12.
52. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;423:825-37.
53. Repping S, Skaletsky H, Lange J. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet* 2002;71:906-22.
54. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 2000;9:2563-72.
55. Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling M, Affara N, Hurler ME. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet* 2000;37:752-8.
56. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapicco B, Foresta C. The human Y chromosome's azospermia factor b (AZFb) region: sequence structure and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet* 2003;40:18-24.
57. Repping S, Skaletsky H, Brown LG. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet.* 2003;35:247-51.
58. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletion in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2002;8:286-98.
59. Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH. A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet.* 2004;74:180-7.
60. Vogt PH. Genomic heterogeneity and stability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Mol Cell Endocrinol* 2004;224:1-9.