

DNA Y-mikrodeletionGäller för
Klinisk kemi

LU

DNA Y-kromosomdeletion (STS-PCR på agarosgel)**Bakgrund, indikation och tolkning**

Y-kromosomen kodar för bland annat gener som är betydelsefulla för spermatogenesis. PCR-baserad diagnostik för analys av mikrodeletioner på Y-kromosomen används som rutindiagnostik vid infertilitetsutredningar. Deletioner i Y-kromosomen hos infertila män är ofta de novo mutationer i mannens germinalceller och hittas därför inte hos dessa infertila mäns fäder. En så kallad "azoospermia factor" (AZF) på Y kromosomens långa arm, anses vara involverad vid några tillstånd av manlig infertilitet där azoospermi (avsaknad av spermier) eller oligospermi (få spermier) förekommer. De Y-kromosomala mikrodeletionerna som i nuläget är kliniskt relevanta och har påvisats hos män med oligo- eller azoospermi är lokaliserade till regionerna AZFa, AZFb (P5/proximal P1), AZFbc (P5/distal P1 eller P4/distal P1) och AZFc (b2/b4) (Fig. 1). Vanligast vid azoospermi är deletioner i AZFc regionen, som också kallas DAZ (deleted in azoospermia). I vissa studier uppges att ca 10 % av infertila män i ett selekterat material, skulle kunna bära på mikrodeletioner i AZF regionen. Deletioner utanför detta område på Y-kromosomen kommer inte att upptäckas med vår analys. Metoden är inte heller känslig för mycket små deletioner (enstaka eller några baser) eller enbas-substitutioner (SNPar). Detektion av deletion betyder emellertid inte att det med säkerhet är denna som orsakar patientens infertilitet. Ett sådant kausalsamband är dock mycket troligt eftersom deletioner bara hittats hos infertila och inte hos män som blivit fäder.

Förekomst av Y- respektive X-kromosom verifieras med ZFY oligonukleotiderna, vilket också fungerar som en intern PCR kontroll som amplifierar band från både X- och Y-kromosom och SRY oligonukleotiderna som amplifierar band endast från Y-kromosomen. Ett batteri av STS primers (sequence-tagged-site markers), gjorda utifrån regioner på Y-kromosomen som är unika och inte uppvisar någon genetisk variation i en kaukasisk population, används för att hitta och kartlägga utbredningen av en deletion.

Analysen utförs i två steg. I första omgången screenas för deletioner i AZFa, AZFb respektive AZFc. I en andra analysomgång verifieras en funnen deletion och dess utbredning kartläggs.

Fas 1 (Y-mikrodeletion 1) görs med en standarduppsättning av sex STS markörer, (Simoni et al. 1999). Detekteras en deletion i detta steg görs en verifiering och en storleksbestämning i fas 2.

Fas 2 (Y-mikrodeletion 2) görs med en panel av STS markörer som täcker hela kromosom-armen (Vollrath et al. 1992, dbSNP 2006; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

DNA Y-mikrodeletion

Gäller för
Klinisk kemi

LU

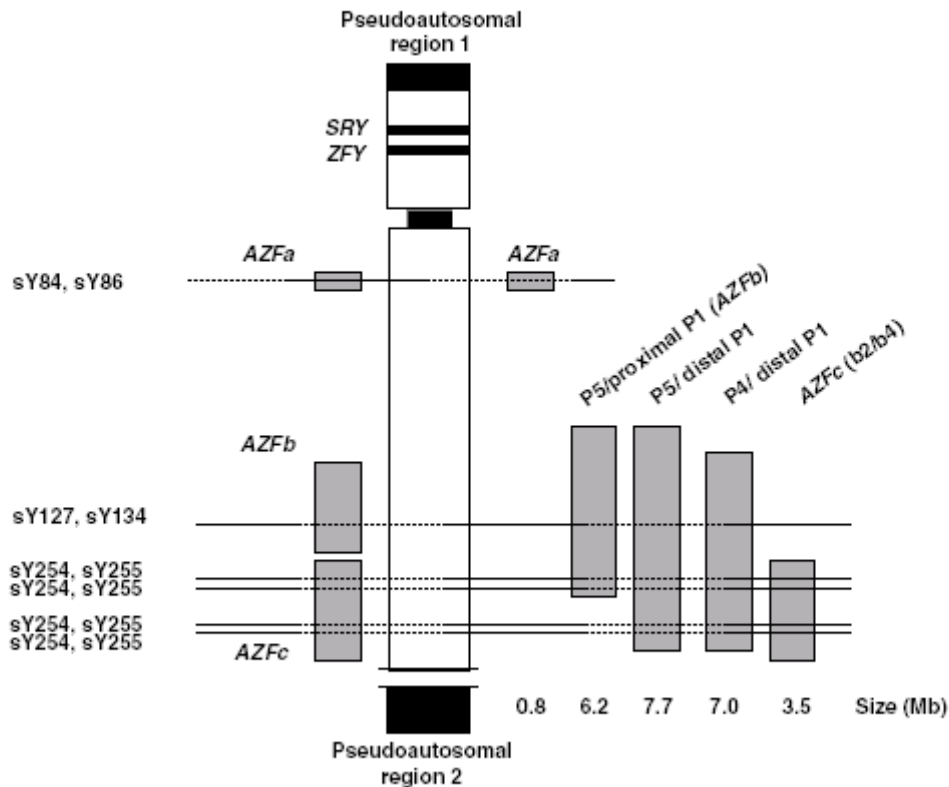


Fig. 1: Schematisk presentation av Y kromosomen och av deletionsmodeller enligt Voigt et al. (1, vänster) och Repping et al. (2, höger). Primerlokalisering visas med streckade linjer. Deletioner visas med skuggade boxar. Normalt finns fyra kopior av DAZ genen i AZFc regionen på Y kromosomen, motsvarande de fyra streckade linjerna för SY254, sY255. Deletion av AZFc (b2/b4, längst till höger) är vanligast, ca 80 % av alla deletioner. Deletion av AZFa ger upphov till komplett Sertoli Cell Only (SCO) syndrom som resulterar i azoospermi. Kompletta deletioner av AZFb eller AZFb+p5,p4c ger en liknande bild.

Analysprincip

DNA extraheras från ett blodprov. PCR-teknik används sedan för att amplifiera DNA-produkter från olika regioner av Y-kromosomen. Om en viss region omfattas av en deletion i ett givet prov, kommer den eller de PCR-analyser som ligger i denna region inte att ge någon produkt. En positiv intern kontroll i form av ett primerpar som producerar en produkt från X- och Y-kromosomen (ZFY) används i alla analyser. Saknas någon av PCR-produkterna i fas 1, görs en andra analys (fas 2) för att verifiera resultaten i den första analysen och för att närmare bestämma storleken av deletionen. I fas 2 körs även Y-specifikt primerpar (SRY) för att verifiera närvaro av en Y-kromosom. Detta primerpar ligger väl separerat från de förväntade deletionsområdena.

DNA Y-mikrodeletion

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Referensintervall

Samtliga fragment finns hos friska och fertila män.

Metodkaraktistika

Interferenser och felkällor

Kontamination med genomiskt DNA eller PCR-produkt kan ge upphov till missvisande resultat.

Mätområde

Ej tillämpbar på kvalitativ analys.

Detektionsgräns

Ej tillämpbar.

Mätosäkerhet

Metoden påvisar närvaro/frånvaro av vald målsekvens.

Spårbarhet

Samtliga använda markörer är beskrivna i litteraturlistan. Y-kromosom fas 1: (3). Y-kromosom fas 2: (4-6). Samtliga markörer går att finna via GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Ackreditering

Metoden är ackrediterad.

Referenser

1. Voight PH, Edelman A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y-chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 5:933-943, 1996
2. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. Recombination between Palindromes P5 and P1 on the Human Y Chromosome Causes Massive Deletions and Spermatogenic Failure. Am. J. Hum. Genet. 71:906-922, 2002
3. Simoni M, Bakker E, Eurlings MCM, Maathijs G., Moro E, Müller CR, Vogt PH. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. International Journal of Andrology 22(5):292-9, 1999
4. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Braun LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. The Human Y Chromosome: A 43 – Interval Map Based on Naturally Occurring Deletions. Science 258: 52-59, 1992

DNA Y-mikrodeletion

Gäller för
Klinisk kemi

LU

5. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havighurst T, Grosh J. Defining Regions of the Y-Chromosome Responsible for Male Infertility and Identification of a Fourth AZF Region (AZFd) by Y-Chromosome Microdeletion Detection. *Molecular Reproduction and Development* 53:27-41, 1999

6. Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature Genetic* 23: 429-433, 1999