

DNA yanlış eşleşme onarımı ve erkek infertilitesi

DNA mismatch repair and male infertility

Neslihan Hekim[✉]

ÖZ

Yanlış eşleşme onarımı, erkek germ hücrelerinin gelişimi sürecinde farklı tipteki DNA hasarlarının onarımında yer alırken, aynı zamanda mayotik rekombinasyonda da önemli görevler üstlenir. Hayvan modelleri ve insan çalışmaları ile MMR genlerindeki değişikliklerin ve ekspresyon hatalarının fertilitite sorunlarına yol açabildiği bildirilmiştir. MMR genlerinin bazıları için dizileme çalışmaları yapılmış ve bazı nonobstrüktif infertil erkeklerde gözlemlenen fenotipler hakkında daha fazla bilgi sağlanmıştır. Bununla birlikte son yıllarda yapılan az sayıda çalışma MMR'daki epigenetik değişikliklerin erkek infertilitesiyle potansiyel ilişkisini ortaya koymuştur. Bu derlemede, spermatogenezde mayotik rekombinasyona ve onarım süreçlerine dahil olan MMR genleri ve proteinlerinin erkek fertilitesi üzerine etkisi ile ilgili mevcut bilgimiz özetlenerek, bu genler ve proteinlerdeki hataların erkek infertilitesi ile ilişkilerinin araştırıldığı güncel moleküler çalışmalara odaklanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: erkek infertilitesi, mayotik rekombinasyon, yanlış eşleşme

ABSTRACT

Mismatch repair is involved in the repair of different types of DNA damage during the development of male germ cells and also plays important roles in meiotic recombination. It has been reported in animal models and human studies that alterations in MMR genes and expression errors may lead to fertility problems. Sequencing studies have been performed for some of the MMR genes and more information has been provided about the phenotypes observed in some nonobstructive infertile men. However, few recent studies have revealed a potential relationship between epigenetic changes in MMR and male infertility. In this review, our current knowledge about the effects of MMR genes and proteins involved in meiotic recombination and repair processes in spermatogenesis on male fertility is summarized, and it is focused on recent molecular studies investigating the relationship of defects in these genes and proteins with male infertility.

Keywords: male infertility, meiotic recombination, mismatch repair

GENEL BİLGİ

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 12 ay veya daha uzun süreli düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra klinik olarak gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmıştır.^[1] Çiftlerin yaklaşık %15'i infertiliteden etkilenir; erkek faktörü kaynaklı infertilitenin infertil çiftlerin %50'sinde rol oynadığı; vakaların yaklaşık %30'unda bir kadın fertilitite faktörü ile birlikte, %20'sine ise tek başına bir etken olarak katkıda bulunduğu bildirilmiştir.^[2] Erkek infertilitesi, testislerde spermatozoanın tamamen yokluğundan sperm kalitesindeki farklı değişikliklere kadar oldukça

heterojen fenotiplere neden olan multifaktöriyel bir patolojik durumdur.^[3] Bu faktörlerin arasında genetik ve epigenetik değişiklikler, duktal tıkanma veya işlev bozuklukları, hipotalamik-hipofiz aks bozuklukları, viral ya da bakteriyel enfeksiyonlar, sistemik veya nörolojik hastalıklar, kanserler, tütün, uyuşturucu, alkol ve zenobiyotikler gibi toksik etkenler bulunmaktadır.^[3-5] İnfertil erkeklerin yaklaşık %40'unda ise infertilite etiyojisi bilinmemektedir ve bu olgular idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır.^[3] Erkek infertilitesinin altında yatan nedenlerin belirlenmesi, fertilitite bozukluklarının teşhis ve tedavisinin iyileştirilmesine yönelik kritik bir adımdır.

Seminifer tübüllerde meydana gelen spermatogenez, yaklaşık 2300 genin transkripsiyonel ve translasyonel olarak düzgün işlev görmesini gerektiren oldukça karmaşık bir süreçtir.^[6] Spermatogenez, spermatogoninin mitotik proliferasyon ve farklılaşma yoluyla primer spermatositleri oluşturması, mayoz bölünme sonucu spermatidlerin oluşması, yuvarlak spermatidlerin farklılaşmaya girdikleri spermiyogenez ve sonrasında spermiasyon olmak üzere belli

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Yazışma Adresi/ Correspondence:

Dr. Neslihan Hekim
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Kurupelit
Kampüsü, Atakum 55420 Samsun, Türkiye
Tel: +903623121919
E-mail: neslihan.taskurt@omu.edu.tr

Geliş/ Received: 06.01.2021

Kabul/ Accepted: 21.01.2021

aşamalardan oluşur.^[7] Olgun insan sperm kromatinindeki somatik histonların yaklaşık %85–95'i spermiyogenez sırasında protaminlerle yer değiştirilerek protamin-DNA toroidleri oluşturulur.^[8] Toroidal yapı protaminlerin serin amino asitlerinin fosforillenmesi, sistein disülfid bağları ve çinko köprüleri ile stabilize edilir.^[9] Sperm kromatinin bu özelleşmiş yapısı spermatozoanın epididimisteki geçişinde, depolanmasında ve ejakülasyon sonrasında dişi üreme sistemine transportu esnasında sperm DNA'sını hasardan korur.^[10] Bununla birlikte DNA replikasyonu esnasındaki hatalar, abortif apoptoz, spermiyogenez işlemi sırasında kromatinin yeniden modellenmesindeki hatalar, yüksek konsantrasyondaki reaktif oksijen türleri (ROS) ve kaspazların ve endonükleazların aktivasyonu gibi hem testiküler hem de post-testiküler nedenlerle sperm DNA hasarı ya da fragmantasyonu meydana gelebilir.^[7,11-13]

Sperm DNA'sı spermatozoanın maturasyonu sırasında, sitoplazmik içeriğin azaldığı ve DNA'nın daha sıkı paketlenildiği spermiyogenez aşamasına kadar DNA onarım mekanizmaları ile aktif olarak korunmaktadır.^[14] Erkek germ hattında etkili sperm DNA onarımı, mutasyonları önlemek ve spermatozoanın hatasız oluşumu ve işlevi için gereklidir.^[13] Paternal DNA'nın hasar görmesi erkekte üreme potansiyelini negatif yönde etkileyebilmektedir.^[15] Nitekim, birçok çalışma infertil erkeklerde, fertil erkeklerle kıyasla daha fazla DNA hasarı gözlemlendiğini ve yüksek sperm DNA hasarının sıklıkla düşük sperm sayısı, azalmış motilite, anormal morfoloji ve ileri paternal yaş ile ilişkili olduğunu göstermiştir.^[16-19] Sperm DNA hasarı ayrıca hem doğal yollarla hem de yardımcı üreme teknikleri ile meydana gelen gebeliklerde düşüklere, embriyoda gelişimsel bozukluklara, konjenital ve kromozomal anomalilere de neden olabilmektedir.^[20,21] Hasarlı paternal DNA, onarım mekanizmaları ya da oosit tarafından onarılamazsa fertilizasyon yoluyla çiftin çocuklarına aktarılmakta ve çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir.^[13]

Çalışmalar, DNA onarım yollarında ve homolog rekombinasyonda yer alan genlerdeki mutasyonların, polimorfizmlerin ve ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin erkek infertilitesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir.^[22-25] Bu derlemede yanlış eşleşme DNA onarımındaki hatalarla erkek infertilitesinin ilişkisi incelenmiştir.

YANLIŞ EŞLEŞME ONARIMI

Yanlış eşleşme onarımı (mismatch repair, MMR), DNA replikasyonunun doğruluğuna en az 100 kat katkıda bulunan evrimsel olarak korunmuş bir DNA onarım yoludur. MMR, DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan yanlış eşleşmiş baz çiftlerini ve iplik kayması olaylarından

kaynaklanan tekrarlayan DNA dizilerindeki insersiyon/delesyonları (ID'ler) tespit ederek yeni oluşan DNA'da bu bölgenin kesip çıkarılmasını ve hatasız olarak yeniden sentezini katalizler.^[26,27] Bugüne kadar insanda tanımlanan MMR proteinleri mutL homolog 1 (MLH1), MLH3, mutS homolog 2 (MSH2), MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1 Homolog 1 (PMS1 veya MLH2) ve PMS1 Homolog 2 (PMS2 veya MLH4) dimer formunda aktivite kazanırlar.^[28-30] MSH2'yi ortak bir alt birim olarak paylaşan iki heterodimerden biri olan MutS α (MSH2-MSH6) hücresel MSH2'nin yaklaşık %80–90'ını oluşturur.^[31] MutS α çoğunlukla 1 veya 2 bazlık yanlış eşleşmelerin onarımına katılır.^[32] MutS β (MSH2-MSH3) heterodimeri ise daha geniş yaklaşık 2–10 nükleotidlik ID yanlış eşleşmelerini tanır.^[32] MutS γ (MSH4-MSH5) heterodimeri, mayotik rekombinasyonda önemli bir rol oynar, ancak MMR'de yer almaz.^[33] Yanlış eşleşme onarımı, MutS α veya MutS β heterodimerinin yanlış eşleşme bölgesine bağlanmasıyla başlar. MutS heterodimerleri yapılarındaki ATPaz aktif bölgesi sayesinde yanlış eşleşmeye bağlandığında DNA boyunca hareket edebilen bir kelepçe yapısı oluşturur. MutS heterodimeri daha sonra MutL komplekslerinden biri tarafından tanınır.^[32] MLH1'in ortak olduğu üç MutL heterodimeri tanımlanmıştır. MLH1 ve PMS2'nin heterodimeri olan MutL α , insan hücrelerindeki primer MutL aktivitesidir.^[31] MMR'in minör yolağını oluşturan ve daha çok tek nükleotidlik ID onarımında rol oynayan MutL γ heterodimeri (MLH1 ve MLH3) çoğunlukla mayozda görev alır. MutL β heterodimerinin (MLH1 ve PMS1) ise yanlış eşleşme onarımına dahil olduğu gösterilmemiştir.^[28-30] MutL ile MutS etkileşimini takiben replikasyonda görev alan başka bir bileşen olan proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), yeni oluşan ipliği ATP'ye bağlı bir şekilde kesmek için MutL'yı aktive eder. Hatalı dizi ekzonükleaz I ya da replikatif polimeraz ile kesip çıkarılır ve sonra DNA dizisi tekrar sentezlenerek ligasyonla bağlanır.^[32]

MMR, normal bazların yanlış eşleşmelerinin yanı sıra oksidasyonla ya da alkilasyonla oluşan hasarlı bazları içeren yanlış eşleşmelerin onarımında da görev alır, örneğin replikasyon sırasında oksidatif hasar sonucu oluşan 7,8-dihidro-8-okso-guaninin (8-oxoG) karşısına yanlış yerleştirilen adenini ortadan kaldırarak mutasyonların önlenmesine katkıda bulunur.^[34] Bu şekilde replikasyonun doğruluğunu arttırması ve mikrosatellit kararlılığını korumasının yanı sıra MMR ayrıca mayotik rekombinasyon, DNA hasarı sinyalizasyonu, hücre döngüsünün durdurulması ve/veya apoptoz, immünglobulin lokuslarında sınıf değiştirme ve somatik hipermutasyon ve üçlü tekrar genişlemesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar.^[28,30,34] Ayrıca, MMR genlerindeki germ hattı mutasyonları,

kolon ve yumurtalık kanserleri ile birlikte bir dizi başka kansere de ailesel bir duyarlılık olarak ortaya çıkan Lynch sendromuna (kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser, HNPCC) neden olur.^[30]

SPERMATOGENEZDE MMR PROTEİNLERİNİN GÖREVLERİ

MMR proteinlerinin mayozdaki rolü ilk olarak model hayvan çalışmalarındaki nakavt hayvanların birçoğunun fertilitate problemleri göstermesiyle fark edilmiştir.^[33] MMR proteinleri, birinci mayotik bölünme sırasında uygun kromozom segregasyonunu sağlamak için homologlar arasındaki krossover oluşumunda önemli roller üstlenmektedirler. Bu süreçteki bozukluklar, infertiliteye ve ilk mayotik bölünmede meydana gelen kromozomal segregasyon hatalarından kaynaklanan anöploidilere (örneğin, Down, Turner sendromları) neden olabilmektedir.^[29]

Homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyon süreci, profaz I'de genom boyunca dağılmış yaklaşık 150–200 programlanmış çift zincir kırığının (double strand breaks, DSB'ler) oluşumu ile başlar. DSB'ler kesip çıkarılır, DNA sarmalının 3'ucu tek zincir bağlayıcı protein olan replikasyon protein A (RPA) ile kaplanır. Krossover oluşumundan sorumlu süreç olan homolog rekombinasyon için mükemmel yakın homolojiyle DNA kalıbının onarımı gerekmektedir. Eğer her iki zinciri de farklı homolog kromozomlardan oluşan heterodubleks DNA, çok sayıda eşleşmemiş nükleotid içeriyorsa MMR tarafından baskılanarak, krossover esnasında DSB onarımının doğruluğu sağlanır.^[35,36] Heterodubleks DNA daha sonra ya krossover olmayan ürünler oluşturur ya da Holliday bağlantısı (dHJ) ile sonuçlanır.^[29] MSH4 ve MSH5'in dahil olduğu ZMM (Zip1–4-Spo16, Mer3 ve Msh4,5) protein ailesi tarafından stabilize edilen dHJ'ler krossover ürünler oluşturur.^[36] MSH4-MSH5 ve MLH1-MLH3 kompleksleri, spermatogenezin anahtar aşaması olan profaz I'deki krossover öncesi kromozomların doğru segregasyonu için gereklidir.^[29] Ayrıca heterodubleks DNA'daki yanlış eşleşmeleri tanıma ve ardından gen dönüşümü ve heterodubleks reddi mekanizmalarında önemli rol oynarlar.^[29] MSH4-MSH5 heterodimeri homolog kromozomları saran kayan bir kelepçe oluşturmak için dHJ'ye bağlanır.^[37] İmmunolojik boyalarla boyanmış spermatozoidlerde zigoten evresinin başlarında ortaya çıkarak pakiten evresinin başlarında kaybolduğu belirlenen MSH4 proteininin, homolog kromozomlar arasında DNA dizi değişimini başlattığı bilinen proteinlerle fiziksel olarak etkileşime girdiği gözlemlenmiştir.^[38] MSH4-MSH5 kayan kelepçenin oluşumunun ardından pakiten aşamasının başlarında MLH3 önce MSH4 ile birlikte lokalize olur, ardından MLH1'in orta pakitte

lokalizasyonu meydana gelir. MLH1 odaklarının mayotik kromozomlar üzerindeki lokalizasyonu, MLH3 varlığına bağlıdır.^[37] MLH1'in, orta ve geç pakitteki spermatozoidlerde krossover odaklarında bulunması, hem hayvan hem de insan çalışmalarında mayotik rekombinasyonun araştırılmasında önemli bir protein haline gelmesine yol açmıştır. Spermatogenezin pakiten aşamasına ilişkin mayotik çalışmalar, nonobstrüktif infertil erkeklerde kromozom sinapsisinde bozulma, rekombinasyon sıklığında azalma ve rekombinasyon bölgelerinden tamamen yoksun kromozom sıklığında artış bildirilmiştir.^[25,39]

MMR'İN ERKEK İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLÜ

MMR eksikliği, model hayvanlarda ve spermatogenik bozukluk gösteren erkeklerde infertiliteyle ilişkilendirilmiştir (Tablo 1). Bu durum, MMR proteinlerinin DNA onarımından mayoza kadar çok çeşitli yollarda görev almasıyla ilgili olabilmektedir. Mayoz bölünme sırasında birçok MMR proteini uygun kromozom eşleşmesi, homolog kromozomların rekombinasyonu ve doğru segregasyon için gereklidir. MMR proteinlerinin spermatogenezdeki rollerini belirleyebilmek için birçok model hayvan çalışması yapılmıştır.^[33,40–42] *Msh4* *-/-* erkek farelerin 12 aya kadar herhangi bir ayırt edilebilir hastalık fenotipi olmaksızın normal olarak gelişmekle birlikte infertil olduğu, *Msh4* *+/+* ve *Msh4* *+/-* erkek farelerin ise fertil oldukları gözlenmiştir.^[41] *Msh4* *-/-* yetişkin erkeklerin testis ağırlıklarının kontrol-lerin yaklaşık yarısı kadar olduğu ve epididimis veya testislerin seminifer tübül lümeninde hiç spermatozoa olmadığı belirlenmiştir. Spermatogonial olgunlaşmanın başarısızlığı, profaz I'in zigoten fazı sırasında anormal kromozom eşleşmesi ile ilişkili gibi görünmektedir. *Msh4* nakavt farelerin germ hücrelerinde yapılan kromozom analizleri, kromozom eşleşmesinin düşük seviyede olduğunu ve çoğunlukla homolog olmayan kromozomlar arasında gerçekleştiğini belirlemiştir.^[41] Çift mutant *Msh4* *-/-/Msh5* *-/-* erkek fareler de infertildir ve bu hayvanların spermatozoidlerinde mayoz I sırasındaki kromozomal eşleşme derecesinin, *Msh5* *-/-* farelerinde görülene benzer şekilde ve *Msh4* nakavtlara kıyasla ise daha az olduğu gözlemlenmiştir. *Msh4* *-/-* ve *Msh5* *-/-* fareler karşılaştırıldığında, MSH5 eksikliğinin MSH4 eksikliğine göre daha ağır bir mayotik fenotipe neden olduğu, bununla beraber her iki proteinin de kromozomların sinapsisi için gerekli olduğu bildirilmektedir.^[41] MLH1-MLH3 kompleksi, MSH4-MSH5 kompleksinden daha sonraki bir aşamada pakiten sırasında sinaps bölgeleri üzerinde lokalize olur. Bu sebeple *Mlh1* ve *Mlh3* nakavt farelerdeki mayoz kusuru *Msh4* ve *Msh5* nakavt farelerde olduğundan daha sonra ortaya çıkar. *Mlh3* *-/-* farelerin

Tablo 1. Hayvan modelleri ve insan çalışmalarında infertiliteyle ilişkilendirilmiş MMR genleri ve proteinleri

Gen/protein	Nakavt model hayvanlardaki fenotip	Spermatogenik defektli hastalarda fenotip	Kaynak
MLH1	<ul style="list-style-type: none">· Diplotende tam spermatosit kaybı· Krossover ve homolog kromozom sinapsisinde hatalar· Mayotik arrest· Anöploidi· infertilite	<ul style="list-style-type: none">· İdiyopatik ağır oligozoospermi hastalarının sperm DNA'sında promotor metilasyonu artışı· NOA'da anormal ekspresyon· Uzamış spermatidlerin sayısı ile ekspresyon ilişkisi· Azospermi, oligozoospermi ve sperm DNA hasarı artışı ile ilişkilendirilmiş varyantlar	[25, 33, 42, 45-48, 51, 55]
MLH3	<ul style="list-style-type: none">· Testis boyutunda azalma· Spermatosit sayısında azalma ve apoptoz artışı· Segregasyon hataları ve anöploidi· Kan-testis bariyerini geçen makrofajlar· infertilite	<ul style="list-style-type: none">· NOA'da anormal ekspresyon· Seminifer tübül çapıyla ve uzamış spermatidlerin sayısı ile ekspresyon ilişkisi· Azospermi ve oligozoospermi ile ilişkilendirilmiş varyantlar	[22, 24, 25, 42, 43, 46, 48, 54, 56]
MSH2	<ul style="list-style-type: none">· Mlh3'ün sentromerlerde birikiminde azalma· Germ hücrelerinin kaybıyla SCO tübül oluşumu· Apoptotik germ hücrelerinde artış· Fertil	<ul style="list-style-type: none">· İdiyopatik OAT hastalarının sperm DNA'sında hafif promotor metilasyonu artışı ve sperm sayısı ile negatif korelasyon· SCOS hastalarında mRNA ve protein ekspresyonlarının azalması	[44, 59, 62, 63]
MSH3	<ul style="list-style-type: none">· Fertil	<ul style="list-style-type: none">· Azospermi ile ilişkilendirilmiş varyantlar	[42, 55]
MSH4	<ul style="list-style-type: none">· Profaz I zigotende arrest· Testis ağırlıklarında azalma· Homolog olmayan kromozomlar arası eşleşme· infertilite	<ul style="list-style-type: none">· XY cisimciğinin oluşturulamaması ve metafaz arrestle ilişkilendirilmiş varyantlar· NOA'da anormal ekspresyon· Seminifer tübül çapıyla ve uzamış spermatidlerin sayısı ile ekspresyon ilişkisi	[23, 25, 41, 46]
MSH5	<ul style="list-style-type: none">· Profaz I'de arrest· Msh4 nakavtlardan daha düşük kromozomal eşleşme oranı· infertilite	<ul style="list-style-type: none">· NOA'da anormal ekspresyon· Seminifer tübül çapıyla ve uzamış spermatidlerin sayısı ile ekspresyon ilişkisi· Azospermi ve oligozoospermi ile ilişkilendirilmiş varyantlar	[25, 41, 46, 51, 56]
PMS2	<ul style="list-style-type: none">· Bazı suşlarda infertilite	<ul style="list-style-type: none">· MA ve HS hastalarında ekspresyonda hafif azalma· Uzamış spermatidlerin sayısı ile ekspresyon ilişkisi· Azospermi, oligozoospermi ve sperm DNA hasarı artışı ile ilişkilendirilmiş varyantlar	[25, 40, 51, 62]

SCOS, Sertoli cell only sendromu; NOA, nonobstrüktif azospermi; OAT, oligoastenotatozoospermi; MA, maturasyon arresti; HS, hipospermatogenez

sağlıklı oldukları ve yaşamın ilk 9 ayında morbid kansere duyarlılık göstermedikleri ancak hem erkek hem de dişilerin infertil oldukları gözlenmiştir.^[42] *Mlh3* *-/-* farelerin testisleri, normal farelerin testislerinden daha küçüktür ve bu farelerde azospermi gözlenmiştir. *Mlh3* *-/-* erkeklerin testislerindeki spermatositlerin sayısının azalmakla birlikte çoğu hücrenin metafaz aşamasına ulaşabildiği bildirilmiştir. Sinaps normal şekilde gözlenmiş, Rpa lokalizasyonu da gerçekleşmiştir, ancak normal tip spermatositlerde, orta pakiten aşamasında *Mlh3* odakları gözlenirken nakavtlarda *Mlh1* odakları gözlemlenmemiştir.^[33,42] Bu da mayotik kromozomlara önce Rpa'nın sonra *Mlh3*'ün ve ardından *Mlh1*'in bağlandığını ortaya koymuştur. Metafazda ise segregasyon hataları ve bu hatalara bağlı olarak çoğunlukla sinaptik eşi olmayan univalent kromozomlar ve anöploidi gözlenmiştir, bu durum da apoptoza sebep olmaktadır.

Mlh1 ve *Mlh3* nakavt fareler mayoz açısından çok benzer fenotiplere sahip olmakla birlikte *Mlh1* eksikliği biraz daha ağır bir fenotip oluşturuyor gibi görünmektedir.^[42] *Mlh1* *-/-* farelerde, diplotende tam spermatosit kaybı gözlenirken *Mlh3* *-/-* farelerde çok sayıda spermatosit, metafaz I'e ilerler.^[42]

Dizileme çalışmaları erkek infertilitesi ile ilişkili MMR genlerindeki nadir varyantları ortaya çıkarmada yardımcı olabilir. Nitekim 2020 yılında aile öyküsü olan ve testiküller sperm ekstraksiyonunda canlı sperm elde edilemeyen 130 idiyopatik nonobstrüktif azospermi (NOA) hastasına tüm ekzom dizileme ve testis dokusunda ekspresyon analizi yapılan çok merkezli bir çalışma yayınlanmıştır.^[23] Sonuç olarak komplet spermatositik arrest tespit edilen iki hastanın *MSH4* geninde iki homozigot yanlış anlamlı

varyant tespit edilmiştir (c.1913C> T; p., Pro638Leu ve c.2261C> T; p. Ser754Leu). Çalışmada *in silico* olarak bu varyantların oldukça korunmuş amino asitleri etkilediği ve patojenik oldukları belirlenmiştir.^[23] *MSH4* mutasyonları bu hastalarda XY cisimciğinin oluşturulamaması, spermatositlerde belirlenen onarılmamış DSB'ler ile birlikte metafazda arrest ile sonuçlanmıştır.^[23] *MSH4* varyant taşıyıcılarında, fare modellerine kıyasla daha ileri bir evrede arrest gözlemlenmiştir.^[41] Son zamanlarda yayınlanan, Çin kökenli çok merkezden toplanan ve akraba olmayan 314 hastanın ve 400 fertil kontrolün dahil edildiği başka bir ekzom dizileme çalışması da *MLH3* genindeki nadir bir varyantın NOA için aday gen olabileceğini göstermiştir.^[43] Bu çalışmada maturasyon arrestli (MA) bir hastada, *MLH3* geninde tespit edilen, yüksek oranda korunmuş bir MutL bölgesini etkileyen ve daha önce erkek farelerde azospermeye neden olduğu belirtilen homozigot bir işlev kaybı varyantı (c.615delA, p.Asp206Thrfs*18) tespit edilmiştir.^[43]

Spermatogenezde yer alan MutS ve MutL homologlarında mRNA ve protein ekspresyon seviyesindeki değişiklikler birçok çalışmada erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiştir. MMR ailesi üyeleri, memeli testis dokusunda özellikle mayotik rekombinasyonun gerçekleştiği spermatositlerde yüksek oranda ifade edilir.^[25,44] Vazektomi prosedürü uygulanmış ve fertil yirmi sağlıklı erkek ve Sertoli cell only sendromu (SCOS) olan dört infertil hastanın testis biopsilerinde kantitatif gen ekspresyon analizi yapılan bir çalışmada SCOS hastalarında *MLH1* ve *MLH3* genlerinin ekspresyon seviyesinin, fertil gruba kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir.^[45] Fertil grupta ifade edildiği tespit edilen *MSH4* ve *MSH5*'ün ise SCOS hastalarında hiç ifade edilmediği saptanmıştır.^[45] MA veya hipospermatogenez (HS) gözlenen infertil erkeklerde *MLH1*, *MLH3*, *PMS2*, *MSH4* ve *MSH5* gen ekspresyonlarının spermatogenez devam eden obstrüktif azospermili (OA) hastalarla kıyaslandığı başka bir çalışmada ise benzer şekilde bu genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonlarının hastalar ve kontroller arasında önemli farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.^[25] Ekspresyondaki azalmanın MA fenotipinde daha belirgin olduğu, kontrollere kıyasla ekspresyonun, MA hastalarında *PMS2* için %24, *MSH4* için %60 ve HS hastalarında *PMS2* için %11, *MSH4* için %34 değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. MA alt grubu ile kontroller arasındaki ekspresyonlar karşılaştırıldığında, *MLH1*, *MLH3*, *MSH4* ve *MSH5* için anlamlı farklılıklar ve *PMS2* için istatistiksel anlamlılığı olmayan farklılıklar gözlenmiştir. HS alt grubu ile kontroller arasındaki ekspresyonların ise *MSH4* ve *MSH5* için farklı olduğu bulunmuştur.^[25] Çalışmada aynı zamanda seminifer tübüllerin çapıyla *MLH3*, *MSH4* ve *MSH5* ekspresyonunun ilişkili olduğu gösterilmiştir. İlave-

uzamış spermatidlerin sayısı ile bu genlerin transkripsiyon seviyeleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur, özellikle *MSH4* için korelasyon katsayısı dikkat çekicidir. Bu durum uzamış spermatid varlığıyla ilgili olarak *MSH4* transkriptlerinin bir eşik seviyesi olabileceğini düşündürmektedir.^[25] 2018 yılında yapılan bir pilot çalışmada ise idiyopatik ağır oligozoospermik erkeklerin spermelerinde *MLH1*'in promotor bölgesinin normozoospermik kontrollere kıyasla daha fazla metile olduğu bildirilmiştir.^[46] Elde edilen bu sonuç infertil hasta grubunda *MLH1*'in ekspresyon seviyesinin daha az olduğunu düşündürmektedir.

Testisteki gen ekspresyon profillerini incelerken testis dokusunun hücresel karmaşıklığı göz önüne alınmalıdır. Doku seviyesinde gen ekspresyon değişiklikleri, belirli bir hücre tipinde mRNA'nın transkripsiyonundaki değişiklikleri belirtebildiği gibi hücre tipi veya sayısındaki değişiklikleri de yansıtabilir. Spermatogenez defektli hastalarda MMR gen ekspresyonunun azalması, bu bireylerde MMR genlerini eksprese eden germ hücrelerinin sayısının azalmasıyla kısmen açıklanabilir. Yapılan bir çalışmada, OA ve NOA'lı 16 hastanın testis dokusunda *MLH1* ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde sağlıklı kontrollere kıyasla artış gösterdiği eş zamanlı PCR, western blot ve immünohistokimyasal boyama ile tespit edilmiştir. Çalışmada *MLH1* ekspresyonu, NOA grubu ile OA grubu arasında istatistiksel bir fark göstermemiştir.^[47] Daha önceki çalışmalarda spermatogenez bozukluğu olan hastaların testis dokularında MMR gen ekspresyonunun azaldığı belirtilmiştir.^[25,45] Bu çalışma da ise, *MLH1* ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde azospermili hastalarında, kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya paralel şekilde MA teşhisi alan hastaların dahil edildiği bir çalışmada bazı hastaların testis dokularında *MLH3* ve *MLH1*'in aşırı ekspresyonu gözlenmiştir.^[48] Hem *MLH3*'ü hem *MLH1*'i aşırı eksprese eden bir hastanın *MLH3* geninde 2531C/T (P844 L) yanlış anlamlı mutasyonu ile birlikte intronik varyant IVS9+66G/A saptanmıştır. Aynı ekibin daha önceki bir çalışmasında, IVS9+66G/A ile kombine 2531C/T (P844L)'nin yalnızca idiyopatik primer spermatogenez arrestli vakalarda tespit edildiği bildirilmiştir.^[48,49] *MLH3* ve *PMS2* proteinleri C-terminal bölgelerinde bulunan ortak amino asit dizileri yoluyla *MLH1* ile etkileşime girerler.^[50] Fare çalışmaları *Pms2*'nin eksikliğinin, *Mlh1*-*Mlh3* odaklarının sayısında bir değişikliğe neden olabileceğini göstermiştir.^[42] Bununla birlikte farelerle yapılan yeni çalışmalar, *Mlh1* etkileşim alanı bölgesinde herhangi bir bozulmaya neden olmayan *Pms2* nakavt erkek farelerin fertilitelerinin etkilenmediğini göstermektedir.^[40] Bu çalışmalar göz önüne alındığında, MutL proteinlerinin artan ekspresyonlarının MutL α ya da MutL γ 'nın baskın olmasına yol aç-

diğer heterodimerin sayısında dengesizlik oluşturabileceği düşünülebilir. Heterodimerlerin ekspresyon dengesindeki bu değişikliğin spermatogenez sırasında başarısızlığa yol açabildiği öne sürülmektedir.^[47,48]

Erkek infertilitesinin heterojenliğini ortadan kaldırmak için fare modelleriyle gerçekleştirilen tek hücre-RNA dizileme çalışmaları araştırmacılara MMR eksikliğinin etkilerini açıklamak adına daha geniş moleküler veriler sunabilmektedir. Normal ve nakavt farelerin testislerinden 57,600 hücre veri setinin analiz edildiği bir çalışmada, *Mlh3* *-/-* fare spermatozitlerinde kontrol noktası proteinleri aracılığıyla apoptozun tetiklenebileceği bulunmuştur.^[22] Bu çalışmada ayrıca ilginç bir şekilde, *Mlh3* *-/-* farelerin makrofajlarının diğer nakavt suşlara ve normal ırka kıyasla amiloid bileşikler açısından bir zenginleşme gösterdikleri belirlenmiştir.^[22] Bu çalışmada *Mlh3* nakavtlarda gözlenen amiloid bileşikler üretimi, bu mutantlarda daha önce bildirilmemiştir ve bu durumun olası fizyolojik rolü açık değildir. Apolipoprotein E (APOE) proteini için yapılan immünfloresan boyama normal ırklarda interstisyel boşlukla sınırlı bir bölgede ve düşük seviyelerde gözlenirken, *Mlh3* *-/-* hücreler daha yoğun boyanmış ve daha fazla APOE pozitif interstisyel hücre gözlemlenmiştir. Bu APOE pozitif hücreler, normal germ hücreleri ve Sertoli hücrelerinden farklı bir morfoloji sergilemiştir ve tübüllerin dışındaki APOE pozitif hücrelerine daha çok benzer oldukları tespit edilmiştir. Çalışmada yapılan ileri boyamalar *Mlh3* nakavtlarda bu bağışıklık hücrelerinin kan-testis bariyerini geçebileceğini ve immün ayrıcalıklı olarak kabul edilen bu alana girebileceklerini öne sürmektedir.^[22] İntratübüler makrofajların testis kusurları açısından nasıl bir etkide bulunduğu aydınlatılmayı beklemektedir.

MMR genlerindeki polimorfizmlerin araştırıldığı çalışmalar belirli topluluklardaki idiyopatik erkek infertilitesinin etiyojisinin aydınlatılmasına yardımcı olabilir. MMR genlerindeki mutasyonlar, çeşitli kanserler için potansiyel risk faktörleri olarak kabul edilmekle birlikte MMR genlerindeki polimorfizmlerin erkek infertilitesi üzerindeki potansiyel rolü hakkında yalnızca sınırlı veri mevcuttur. Çin popülasyonunda, 1292 idiyopatik infertil ve 480 fertil erkekle yapılan bir çalışmada *MLH1*'de bir intronik tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) (*rs4647269*), *PMS2*'de *MLH1* ve *PMS2* arasındaki etkileşimi önemli ölçüde etkileyebileceği belirlenen bir varyant (*rs1059060*, Ser775Asn) ve *MSH5*'teki *MSH4*-*MSH5* etkileşim alanı içinde yer alan bir SNP'in (*rs2075789*, Pro29Ser) azospermi veya oligozoospermi gelişimi için risk faktörleri olabileceği bildirilmiştir.^[51] *PMS2* *rs1059060* polimorfizminin normozoospermik erkeklerde infertilite riskine olası bir katkısı da gözlemlenmiştir.^[51] *MLH1* *rs4647269* ve *PMS2* *rs1059060*, normal sperm sayısına

sahip infertil hastalar arasında sperm DNA hasarının artışı ile ilişkilendirilmiştir.^[51] Destekleyici kanıtlar içeren başka ilişkilendirme çalışmaları da yapılmıştır. Çin'de başka bir bölgede 614 fertil kontrol ve 244 azospermili ve 72 oligozoospermili infertil erkek ile yapılan bir çalışmada daha önceden bazı tümörlerle ilişkili oldukları bildirilen *MLH1* *rs1800734* ve *MLH3* *rs175080* SNP'leri araştırılmıştır.^[52,53] Sonuçta *MLH3* *rs175080* varyant alel taşıyıcılarının frekansları, azospermik grup ve fertil kontroller arasında anlamlı farklılık göstermiş ve *rs175080* varyant genotipleri, normal homozigot genotipine kıyasla 1,86 kat infertilite riski artışı ile ilişkilendirilmiştir. *MLH3* *rs175080* ve *MLH1* *rs1800734* ile kombine *MLH3* *rs175080* polimorfizmlerinin dağılımları infertil ve fertil gruplar arasında farklı bulunmuştur.^[54] Hem *rs1800734* hem de *rs175080* varyant genotiplerini taşıyan erkeklerin azospermi riskinde yaklaşık iki kat artış göstermeleri, iki lokus arasında önemli bir etkileşime işaret etmektedir.^[54] Son yıllarda daha küçük bir Çin popülasyonunda yapılan başka bir araştırmada *MLH1* *rs1800734* ve *MLH1* *rs4647269* varyant alellerinin dağılımlarının idiyopatik ağır oligozoospermik hastalar ve fertil kontroller arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur.^[55] Benzer bir sonuç yine Çin'in Hunan kentinde yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir, *MLH3* C2531T varyant alel taşıyıcılarının idiyopatik azospermi veya ağır oligozoospermi açısından 1,98 kat risk artışı gösterdiği belirlenmiştir.^[56] Çalışmada aynı zamanda *MSH5* *rs2075789* varyant alel taşıyıcılarının da riskinin 2,51 kat arttığı ayrıca hem *MSH5* hem de *MLH3* varyant alel içeren genotipleri taşıyan erkekler için bu riskin çarpımsal bir etkiden daha fazla oranda 6,78 kata çıktığı belirlenmiştir.^[56] *MLH3* *rs175080* polimorfizminin, yardımcı üreme teknikleri uygulanan 122 kontrol ve 178 infertil erkekte değerlendirildiği başka bir çalışmada ise bu SNP'in oligozoospermiyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.^[24] Varyant homozigot taşıyıcılarının oligozoospermik erkeklerde daha fazla, normal tip genotipin ise daha az gözlemlendiği belirtilmiştir. Homozigot varyant genotip taşıyıcılarının ayrıca diğer iki genotipe kıyasla daha düşük progresif motilite değerlerine sahip olduğu belirtilmiştir.^[24] Bu sonuçlar, araştırmacıları *MLH3* *rs175080* polimorfizminin embriyo kalitesi üzerine etkisi olup olmadığı sorusuna yöneltmiştir. 2017'de yapılan bir çalışmada intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ve embriyo transferi tedavisi gören çiftlerde embriyolojik sonuçlarla *MLH3* *rs175080* polimorfizmi arasındaki olası ilişkiler araştırılmıştır. Erkek partnerleri homozigot varyant genotip taşıyıcıların oluşturduğu grupta önceki çalışmalarla paralel şekilde diğer iki gruba kıyasla önemli ölçüde daha düşük sperm konsantrasyonu ve progresif motilite gözlenmiştir.^[57] Ancak ilginç şekilde normal homozigotların bulunduğu gruba kıyasla diğer iki grupta (homozigot varyant

ve heterozigot) embriyo kalitesinin ve klinik gebelik oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile varyant genotipin sperm kalitesi üzerindeki etkisinin *in vitro* fertilizasyon sonrası embriyo gelişimini etkilemediği önerilmiştir.^[57] Diskordant sonuçlar gen-gen etkileşimleri, bireysel ve etnik farklılıklar ve seçilen hasta gruplarının heterojenliğinin altını çizmektedir.

Spermatogenez sırasında homolog rekombinasyon, krossover ve kromozomal sinapsta önemli görevleri olan MMR proteinlerine ek olarak, temel olarak onarımda görev alan MMR proteinlerinin de fertilite üzerine etkileri araştırılmıştır. Germ hücreleri, spermatogenez sırasında son derece yüksek düzeyde proliferatif aktivite sergiler ve bu nedenle diğer hücelere kıyasla DNA hasarına karşı daha duyarlıdır.^[12] Testis hücrelerinde yüksek doğrulukta DNA onarımı, gelişen germ hücrelerinin genomik bütünlüğünü ve kalitesini korumak için vazgeçilmez mekanizmalardan biridir ve MSH2 heterodimerleri bu aşamada önemli rol oynamaktadır. Farelerde *Msh2* geninin, mitotik olarak çoğalan spermatogoniada ve leptoten ve zigoten spermatositlerde yüksek oranda ekspresyon edildiği gözlenmiştir.^[58] *Msh2* mRNA ve protein ekspresyonları daha sonra, erken ve orta pakiten spermatositlerde azalmış ve postmayotik spermatidlerde ise çok daha az seviyeye gelmiştir. *Msh3* ekspresyonu ise, pakiten spermatositlerde en yüksek seviyede bulunmuştur.^[58] MLH3 ile birlikte MSH2-MSH3 heterodimerinin yanlış eşleşmeye ve genomik kararsızlığa duyarlı olan sentromerik DNA'daki ve Y kromozomu üzerindeki gibi ardışık tekrar bölgelerine lokalize olduğu belirlenmiş ve *Msh2* nakavt farelerde, MLH3'ün sentromerlerde birikiminde önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir.^[44,59] Tekrar dizilerinin yanlış hizalanmalarının bir sonucu olarak DNA üzerinde ortaya çıkan ikincil yapılar MSH2-MSH3 için substratlardır. MSH2-MSH3 kompleksi, MSH4-MSH5 tarafından yönlendirilen karşılıklı rekombinasyondaki bir işlevden ziyade, bu ardışık tekrar birimlerindeki krossover olmayan ve/veya onarım olaylarındaki bir işlevi destekler gibi görünmektedir. MutSβ'nın spermatogenezdeki rolü tekrar dizilerinde oluşabilecek bu ikincil yapıların stabilizasyonu yoluyla veya kromozomal translokasyonlara, genişlemiş tekrar dizilerine ve diğer sitogenetik hatalara neden olabilecek ikincil yapılardan kaynaklı DSB'lerin bastırılması yoluyla gibi görünmektedir.^[59] Kuzeybatı Çin bölgesinde yapılan bir çalışmada *MSH3* rs26279'un varyant alel içeren genotipleri, homozigot normal tipe kıyasla idiyopatik azospermi açısından 2,62 kata kadar artan risk ile ilişkilendirilmiştir.^[55] *MSH3* rs26279 varyant alel taşıyıcılarının daha önceki çalışmalarda üçlü tekrar dizilerinin genişlemesi ve kanser riski artışı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.^[60,61] *Msh2* -/- erkek farelerin testislerinde bazı seminifer tübüllerde daha az sayıda germ hücresi gözlenirken, bazı tübüllerin

SCO olduğu bildirilmiştir.^[44] *Msh2* +/- fareler, normal yavrularla benzer fenotiplere sahiptir ancak *Msh2* -/- hayvanların testislerinde, germ hücre komplemanındaki değişiklikler, kontrollere kıyasla seminifer tübül çaplarında azalmaya yol açmıştır. *Msh2* -/- erişkinlerinde apoptotik hücrelerde artış gözlenmemiştir ancak daha genç farelerden alınan testisler incelendiğinde apoptotik germ hücrelerinin sayısında az bir artış tespit edilmiştir. Germ hücresi kaybı gözlenmesine rağmen, *Msh2* -/- fareleri fertil olarak raporlanmıştır.^[44] 2019 yılında yapılan bir çalışmada NOA'lı erkeklerin testis dokularından gerçekleştirilen ekspresyon ve immünohistokimya analizleri ile *MSH2* transkriptlerinin ve protein ekspresyonunun, spermatogenez devam eden OA kontrollere kıyasla, SCOS numunelerinde en az seviyede olduğu belirlenmiştir.^[62] Aynı çalışmada kaspaz-3 immün boyama, DNA onarımı kaybının, hastaların testislerinde apoptozun artması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar *MSH2* ekspresyonunun, onarım ile ilgili görevlerine bağlı olarak, özellikle SCOS gelişimine katkıda bulunma olasılığını vurgulamaktadır. Küçük bir grup üzerinde yaptığımız çalışmada ise idiyopatik oligoastenoteratozoospermi teşhisi almış erkeklerin sperm DNA'sında *MSH2* promotor metilasyonunun istatistiksel anlamlılık kazanmamakla birlikte, hasta grubunda fertil/normozoospermik gruba kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.^[63] Çalışmamızda aynı zamanda *MSH2* promotor metilasyonunun sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı ile negatif korelasyonlu olduğu bulundu.^[63] *MSH2* ve *MSH3*'teki hataların semen parametreleri ve erkek fertilitesi üzerindeki etkilerini daha iyi anlayabilmemiz için daha büyük kohortlu çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

SONUÇ

Bu derlemede, mayotik rekombinasyon ve DNA onarımında önemli görevleri olan MMR genleri ve hedef proteinlerinin erkek fertilitesi üzerine etkileri tartışılmıştır. Erkek infertilitesi multifaktöriyel etiyolojili bir üreme sistemi hastalığıdır. Bununla birlikte, erkek infertilite vakalarının önemli bir kısmı idiyopatikdir.^[3] Nakavt model hayvanlar ve insanlarla yapılan çalışmalar, mayozda ve yanlış eşleşme onarımında yer alan genlerin mutasyonları, epigenetik değişiklikleri ve anormal ekspresyonlarının infertiliteyle sonuçlanabilecek spermatogenez hatalarına yol açabildiğini göstermektedir. Bu hatalar SCOS, mayotik arrest veya hipospermatogenezle azospermiye veya oligozoospermiye yol açarak infertiliteye veya gametlerde anöploidinin artmasına yol açan farklı şekillerde kendini gösterebilmektedir. Rekombinasyonun moleküler mekanizmaları ve MMR proteinlerinin infertilitedeki rolünü aydınlatmak için yapılan çalışmalar özellikle idiyopatik infertil erkekler için infertilitenin altında yatan nedenlerle

ilgili anlayışımızı arttırabilir. Derlenen bilgilerin ışığında gelecekte yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olmak isteyen infertil erkeklere öncesinde mayotik rekombinasyon ve yanlış eşleşme onarımında görev alan proteinlerdeki ve bunların genlerindeki mutasyon, polimorfizm ve epigenetik değişikliklerin taranmalarına odaklanılmasına ihtiyaç olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte hala MMR mekanizmasının erkek fertilesi üzerine etkilerine ilişkin bilgimizi arttırmaya yardımcı olmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Prof. Dr. Sezgin Güneş'e makaleyi okuyarak yaptığı değerli görüş ve eleştirileri için teşekkür ederim.

Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız

Çıkar Çatışması

Yazar çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek

Herhangi bir mali destek alınmamıştır.

Peer-review

Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the author.

Financial Disclosure

No financial disclosure was received.

KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, J de Mouzon, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology 2009. *Fertil Steril* 2009;92:1520–4. [CrossRef]
2. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril* 2018;110:810–4. [CrossRef]
3. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 2018;15:369–84. [CrossRef]
4. Kuang W. The Initial Consultation for Male Infertility. In: Sabanegh J, editors. *Male Infertility. Current Clinical Urology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. [CrossRef]
5. Hekim N, Gure MA, Mahmutoglu AM, Gunes S, Asci R, Henkel R. SNP's in xenobiotic metabolism and male infertility. *Xenobiotica* 2020;50:363–70. [CrossRef]
6. Xie Y, Khan R, Wahab F, Hussain HMJ, Ali A, Ma H, et al. The testis-specifically expressed Dpep3 is not essential for male fertility in mice. *Gene* 2019;711:143925. [CrossRef]
7. Kuchakulla M, Narasimman M, Khodamoradi K, Khosravizadeh Z, Ramasamy R. How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia* 2020;53:e13615. [CrossRef]
8. Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia* 2020;53:e13586. [CrossRef]
9. Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012;97:267–74. [CrossRef]
10. Bjorndahl L, Kvist U. Structure of chromatin in spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 2014;791:1–11. [CrossRef]
11. Bungum M. Role of sperm DNA integrity in fertility. In: Pereira LV, editor. *Embryology –Updates and Highlights on Classic Topics*. IntechOpen. 2012. [CrossRef]
12. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2015;31:309–19. [CrossRef]
13. Gunes S, Sertyel S. Sperm DNA Damage and Oocyte Repair Capability. In: Zini A, Agarwal A, editors. *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p.321–46. [CrossRef]
14. Marchetti F, Wyrobek AJ. DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2008;7:572–81. [CrossRef]
15. Aitken RJ, De Iulius GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010;16:3–13. [CrossRef]
16. Boushaba S, Belaaloui G. Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in algerian infertile male partners. *World J Mens Health* 2015;33:1–7. [CrossRef]
17. Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 2008;10:786–90. [CrossRef]
18. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;21:903–12. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03421.x>
19. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9601–6. [CrossRef]
20. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017;19:80–90. [CrossRef]
21. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:3–12. [CrossRef]
22. Jung M, Wells D, Rusch J, Ahmad S, Marchini J, Myers SR, Conrad DF. Unified single-cell analysis of testis gene regulation and pathology in five mouse strains. *eLife* 2019;8. [CrossRef]
23. Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med* 2020;22:1956–66. [CrossRef]
24. Markandona O, Dafopoulos K, Anifandis G, Messini CI, Dimitraki M, Tsezou A, et al. Single-nucleotide polymorphism rs 175080 in the MLH3 gene and its relation to male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1795–9. [CrossRef]
25. Terribas E, Bonache S, Garcia-arevalo M, Sanchez J, Franco E, Bassas L, Larriba S. Changes in the expression profile of the meiosis-involved mismatch repair genes in impaired human spermatogenesis. *J Androl* 2010;31:346–57. [CrossRef]
26. Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a012633. [CrossRef]
27. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 2017;58:235–63. [CrossRef]
28. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008;18:85–98. [CrossRef]
29. Manhart CM, Alani E. Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair (Amst)* 2016;38:84–93. [CrossRef]

30. Peltomaki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Fam Cancer* 2016;15:385–93. [\[CrossRef\]](#)
31. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 2006;281:30305–9. [\[CrossRef\]](#)
32. Kunkel TA, Erie DA. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet* 2015;49:291–313. [\[CrossRef\]](#)
33. Feitsma H, Leal MC, Moens PB, Cuppen E, Schulz RW. Mlh1 deficiency in zebrafish results in male sterility and aneuploid as well as triploid progeny in females. *Genetics* 2007;175:1561–9. [\[CrossRef\]](#)
34. Crouse GF. Non-canonical actions of mismatch repair. *DNA Repair (Amst)* 2016;38:102–9. [\[CrossRef\]](#)
35. Spies M, Fishel R. Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a022657. [\[CrossRef\]](#)
36. Cooper TJ, Crawford MR, Hunt LJ, Marsolier-Kergoat MC, Llorente B, Neale MJ. Mismatch repair impedes meiotic crossover interference. *bioRxiv* 2018. [\[CrossRef\]](#)
37. Sanderson ML, Hassold TJ, Carrell DT. Proteins involved in meiotic recombination: a role in male infertility? *Syst Biol Reprod Med* 2008;54:57–74. [\[CrossRef\]](#)
38. Neyton S, Lespinasse F, Moens PB, Paul R, Gaudray P, Paquis-Flucklinger V, Santucci-Darmanin S. Association between MSH4 (MutS homologue 4) and the DNA strand-exchange RAD51 and DMC1 proteins during mammalian meiosis. *Mol Hum Reprod* 2004;10:917–24. [\[CrossRef\]](#)
39. Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, García F, Egozcue S, et al. Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 2005;20:2133–9. [\[CrossRef\]](#)
40. Fischer JM, Dudley S, Miller AJ, Liskay RM. An intact Pms2 ATPase domain is not essential for male fertility. *DNA Repair (Amst)* 2016;39:46–51. [\[CrossRef\]](#)
41. Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, MF Kane, Hou H Jr, et al. MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev* 2000;14:1085–97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316572/>
42. Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, et al. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* 2002;31:385–90. [\[CrossRef\]](#)
43. Chen S, Wang G, Zheng X, Ge S, Dai Y, Ping P, et al. Whole-exome sequencing of a large Chinese azoospermia and severe oligospermia cohort identifies novel infertility causative variants and genes. *Hum Mol Genet* 2020;29:2451–9. [\[CrossRef\]](#)
44. Paul C, Povey JE, Lawrence NJ, Selfridge J, Melton DW, Saunders PTK. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS One* 2007;2:e989. [\[CrossRef\]](#)
45. Noguez C, Fernández C, Rajmil O, Templado C. Baseline expression profile of meiotic-specific genes in healthy fertile males. *Fertil Steril* 2009;92:578–82. [\[CrossRef\]](#)
46. Gunes S, Agarwal A, Henkel R, Mahmutoglu AM, Sharma R, Esteves SC, et al. Association between promoter methylation of MLH1 and MSH2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men-A pilot study. *Andrologia* 2018;50:e12903. [\[CrossRef\]](#)
47. Song WY, Meng H, Wang XG, Jin HX, Yao GD, Shi SL, et al. Reduced microRNA-188-3p expression contributes to apoptosis of spermatogenic cells in patients with azoospermia. *Cell Prolif* 2017;50:e12297. [\[CrossRef\]](#)
48. Ferras C, Fernandes S, Silva J, Barros A, Sousa M. Expression analysis of MLH3, MLH1, and MSH4 in maturation arrest. *Reprod Sci* 2012;19:587–96. [\[CrossRef\]](#)
49. Ferras C, Zhou X, Sousa M, Lindblom A, Barros A. DNA mismatch repair gene hMLH3 variants in meiotic arrest. *Fertil Steril* 2007;88:1681–4. [\[CrossRef\]](#)
50. Kadyrova LY, Gujar V, Burdett V, Modrich PL, Kadyrov FA. Human MutLgamma, the MLH1-MLH3 heterodimer, is an endonuclease that promotes DNA expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:3535–42. [\[CrossRef\]](#)
51. Ji G, Long Y, Zhou Y, Huang C, Gu A, Wang X. Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and male infertility. *BMC Med* 2012;10:49. [\[CrossRef\]](#)
52. Martinez-Uruena N, Macías L, Pérez-Cabornero L, Infante M, Lastra E, Cruz JJ, et al. Incidence of -93 MLH1 promoter polymorphism in familial and sporadic colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2013;15:e118–23. [\[CrossRef\]](#)
53. Liu Y, Zhang X, Jia J, Tang L, Gao X, Yan L, et al. Correlation between polymorphisms in DNA mismatch repair genes and the risk of primary hepatocellular carcinoma for the Han population in northern China. *Scand J Gastroenterol* 2015;50:1404–10. [\[CrossRef\]](#)
54. Zhang X, Ding M, Ding X, Li T, Chen H. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61:187–93. [\[CrossRef\]](#)
55. Zhao X, Mu C, Ma J, Dai X, Jiao H. The association of four SNPs in DNA mismatch repair genes with idiopathic male infertility in northwest China. *Int J Immunogenet* 2019;46:451–8. [\[CrossRef\]](#)
56. Xu K, Lu T, Zhou H, Bai L, Xiang Y. The role of MSH5 C85T and MLH3 C2531T polymorphisms in the risk of male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia. *Clin Chim Acta* 2010;411:49–52. [\[CrossRef\]](#)
57. Anifandis G, Markandona O, Dafopoulos K, Messini C, Tsezou A, Dimitraki M, et al. Embryological Results of Couples Undergoing ICSI-ET Treatments with Males Carrying the Single Nucleotide Polymorphism rs175080 of the MLH3 Gene. *Int J Mol Sci* 2017;18:314. [\[CrossRef\]](#)
58. Richardson LL, Pedigo C, Handel MA. Expression of deoxyribonucleic acid repair enzymes during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 2000;62:789–96. [\[CrossRef\]](#)
59. Kolas NK, Svetlanov A, Lenzi ML, Macaluso FP, Lipkin SM, Liskay RM, et al. Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J Cell Biol* 2005;171:447–58. [\[CrossRef\]](#)
60. Miao HK, Chen LP, Cai DP, Kong WJ, Xiao L, Lin J. MSH3 rs26279 polymorphism increases cancer risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:11060–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637639/>
61. Morales F, Vásquez M, Santamaría C, Cuenca P, Corrales E, Monckton DG. A polymorphism in the MSH3 mismatch repair gene is associated with the levels of somatic instability of the expanded CTG repeat in the blood DNA of myotonic dystrophy type 1 patients. *DNA Repair (Amst)* 2016;40:57–66. [\[CrossRef\]](#)
62. Singh V, Jaiswal D, Singh K, Trivedi S, Agrawal NK, Gupta G, et al. Azoospermic infertility is associated with altered expression of DNA repair genes. *DNA Repair (Amst)* 2019;75:39–47. [\[CrossRef\]](#)
63. Hekim N, Gunes S, Asci R, Henkel R, Abur U. Semiquantitative promoter methylation of MLH1 and MSH2 genes and their impact on sperm DNA fragmentation and chromatin condensation in infertile men. *Andrologia* 2020;53:e13827. [\[CrossRef\]](#)