



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**TESTİS BİYOPSİSİNDE MATÜRASYON ARRESTİ
SAPTANAN OLGULARDA MLH1 VARYANTLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yasemin ÜLGER

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TESTİS BİYOPSİSİNDE MATÜRASYON ARRESTİ
SAPTANAN OLGULARDA *MLH1* VARYANTLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Yasemin ÜLGER

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI

Bu tez TÜBİTAK tarafından 220S004 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2022

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Testis Biyopsisinde Matürasyon Arresti veya Hipospermatogenez Saptanan Olgularda MLH1 Varyantlarının Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurul Başkanlığı tarafından, 09/04/2020 tarihinde, İ4-210-20 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yasemin ÜLGER

Tarih:

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Turnitin

13.09.2022 11:39

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme konu: 13-Eyl-2022 11:01 +03
NUMARA: 1898700077
Kelime Sayısı: 39147
Gönderildi: 1

Uzmanlık Tezi Yasemin Ülger
tarafından

Benzerlik Endeksi

%9

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources: %9
Yayınlar: %1
Öğrenci Ödevleri: N/A

6% match (15-Ara-2015 tarihli internet)

<http://www.dis.ikc.edu.tr/files/8/Formlar%20pdf/FR%20143%20TEZ%20SINAV%20TUTANAI.pdf>

1% match (01-May-2020 tarihli internet)

<https://tibbigenetik-med.ege.edu.tr/tr-3784/personel.html>

1% match (09-Mar-2016 tarihli internet)

<http://edepot.wur.nl/201744>

1% match (28-Haz-2014 tarihli internet)

<http://tr.scribd.com/doc/97426500/Ekonomik-Krizin-Ailelerin-Ruhsal-Durumuna-Etkisi>

TÜRKİYE CUMHURİYETİ ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TESTİS
BİYOPSİSİNDE MATÜRASYON ARRESTİ VEYA HİPOSPERMATOGENEZ SAPTANAN
OLGULARDA MLH1 VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI Dr. Yasemin ÜLGER
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI TIPTA UZMANLIK TEZİ DANIŞMAN Dr. Öğr.
Üyesi Timur TUNCALI Bu tez TÜBİTAK tarafından 220S004 proje numarası ile
desteklenmiştir. ANKARA 2022 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,
Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Testis Biyopsisinde
Matürasyon Arresti veya Hipospermatogenez Saptanan Olgularda MLH1
Varyantlarının Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun
olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve
bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler,
yorumlar bana aittir. Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi
İnsan Araştırmaları Etik Kurul Başkanlığı tarafından, 09/04/2020 tarihinde, İ4-
210-20 numaralı kararla onaylanmıştır. Yukarıda belirtilen hususların
doğruluğunu beyan ederim. Öğrencinin Adı Soyadı: Yasemin ÜLGER Tarih:

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Yasemin ÜLGER	Sınav tarihi: 22.09.2022
Anabilim/Bilim Dalı: Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı: Dr.Öğr.Üyesi Timur TUNCALI	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Testis biyopsisinde matürasyon arresti saptanan olgularda <i>MLH1</i> varyantlarının araştırılması	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği	☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR	
<i>Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.</i>	

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Hatice ILGIN RUHİ
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN
GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

İnfertilite tüm dünyada çiftlerin %10-15'ini etkileyen, 1 yıl süreyle korunmasız ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan ve tüm dünyada insan sağlığını etkileyen ve kamusal kaynakların önemli bir kısmının aktarıldığı güncel bir sağlık sorunudur. Olguların yarısından erkek infertilitesi sorumludur. Erkek infertilitesi sadece başarısız üreme öyküsünden ibaret olmayıp artmış morbidite ve mortalite, kardiyovasküler hastalık, obezite, genitoüriner sistem kanserleri ve genitoüriner sistem dışı kanserlerde artmış risk, genel olarak artmış sistemik hastalık riskini içeren bir klinik tablodur. Bu nedenle semen parametrelerinin erkeklerin genel sağlık durumlarının belirteci olabileceği öne sürülmüştür.

Çalışmamızda azoospermi nedeniyle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yapılan olgularda testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) sırasında elde edilen testis biyopsi örneklerinde matürasyon arresti veya hipospermatogenez saptanan olgularda, kanserle ilişkili önemli bir gen olmakla birlikte spermatogenez sırasında mayozda oluşan çift zincir kırıklarının da onarımında rol alan ve rekombinasyon odaklarında yer aldığı gösterilmiş olan *MLH1* geninin dizileme ile tespit edilebilecek varyantlarını araştırdık. Testis biyopsisinde saptanan patolojik sonucun tespiti, etiyoloji ve prognoz açısından önemlidir. Amacımız, azoospermi olgularında matürasyon arresti (daha az ölçüde hipospermatogenez) ile ilişkili *MLH1* geninde varyant tespit etmek ve bunu azoospermi etiyolojisine yönelik non-invaziv bir teknik olarak geliştirmektir ve patolojik mekanizmaların aydınlatılmasına ışık tutmaktır. Bundan daha da önemlisi, *MLH1* geninde saptanacak olası bir varyant, erkek infertilitesi ile kanser arasında son derece önemli somut bir katkı sunacaktır. Bu çalışma 220S004 numara ile TÜBİTAK tarafından 1002 proje kapsamında desteklenmiştir.

Tez konumun belirlenmesi, geliştirilmesi, çalışmanın her aşamasında sunduğu fikirler ve destek için tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI hocama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Bizden çalışma boyu desteğini hiç esirgemeyen Prof. Dr. Kaan AYDOS hocama, laboratuvar imkanlarından faydalanmamızda bize destek olan Dr. Öğr. Üyesi Halil Gürhan Karabulut hocama da ayrıca çok teşekkür ederim. Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi hocam başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim boyunca beni destekleyen ve alabileceğimiz en iyi eğitimi alabilmemiz için ellerinden geleni yapan tüm hocalarıma ile değerli uzmanlarım Öğr. Gör. Dr. Arzu Vicdan, Öğr. Gör. Dr. Sadiye Ekinci ve Öğr. Gör. Dr. Şule Altınar'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eğitim hayatım boyunca her günün birbirinden daha eğlenceli geçmesini sağlayan başta Ar.Gör.Dr. İbrahim Kaplan olmak üzere, Ar.Gör.Dr. Hande Nur Cesur Baltacı, Ar.Gör.Dr. Berna Sevim, Ar.Gör.Dr. Mustafa Oğuz ACAR, Ar.Gör.Dr. Okan KURTÇU'ya ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Uzm.Dr.Elif Can Taşdelen ve Uzm. Dr. Ezgi Gökpınar İli'ye içten arkadaşlıkları ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Eğitimimin ilk bölümünün geçtiği EÜTF Tıbbi Genetik Ana Bilim dalındaki başta Prof. Dr. Haluk Akın ve Prof. Dr. Özgür Çoğulu olmak üzere tüm hocalarıma şükranlarımı sunuyorum. Doç. Dr. Asude Durmaz, Doç. Dr. Emin Karaca, Doç. Dr. Burak Durmaz ve Doç. Dr. Ayça Aykut'a tüm katkıları ve sundukları fırsatlar için teşekkür ederim. Prof. Dr. Ferda Özkınay hocama ve Doç. Dr. Tahir Atik ile Doç. Dr. Esra Bilge Işık'a ayrıca teşekkür ederim.

Tanışmamızdan bu yana bana desteklerine sunan Erhan Parıltay'a, dostum Semih Aşıkovalı ve dostum Emine İpek Ceylan'a da içten teşekkürlerime burada yer vermek isterim.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	iii
Kabul ve Onay Sayfası	iv
Önsöz	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller Dizini	xiv
Tablolar Dizini	xv

1. TÜRKÇE ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1 Erkek İnfertilitesinde Genel Değerlendirme.....	7
4.1.1 Semen Analizi (SA).....	7
4.1.2 Hormon Testleri.....	9
4.1.3 Sperm DNA Fragmentasyon Testi.....	10
4.1.4 Anti-Sperm Antikoru (ASA).....	10
4.1.5 Testis Biyopsisi.....	10
4.1.6 Görüntüleme.....	12
4.1.7 Azoospermi Algoritması.....	13
4.2 Erkek İnfertilitesinin Nedenleri ve Risk Faktörleri.....	13
4.2.1 Erkek İnfertilitesi için Kanıtlanmış Risk Faktörleri.....	14
4.2.2 Erkek İnfertilitesinde Komorbid Durumlar.....	15
4.2.2.1 Erkek İnfertilitesinde Kanser.....	15
4.2.2.2 <i>MLH1</i> ve Kanser.....	16
4.2.3 Erkek İnfertilitesinin Nedenleri.....	16
4.2.3.1 Hipogonadotropik Hipogonadizm.....	16
4.2.3.2 Spermatogenezde Primer Testiküler Nedenler.....	17

4.2.3.3 Sperm Transport Defektleri.....	18
4.2.3.4 İdiyopatik Erkek İnfertilitesi.....	19
4.3 Genetik Yönüyle Erkek İnfertilitesi.....	19
4.3.1 Genetik Test Endikasyonları.....	19
4.3.2 Karyotip Analiziyle Saptanan Nedenler.....	20
4.3.2.1 Klinefelter Sendromu.....	21
4.3.2.2 46,XX Erkek Sendromu.....	21
4.3.3 Y Mikrodelesyonları.....	22
4.3.4. Monogenik Nedenler.....	23
4.3.5 Erkek İnfertilitesinde Aday Gen Yaklaşımları.....	29
4.4 <i>MLH1</i> , Mayoz ve İnfertilite İlişkisi.....	30
4.4.1 Rekombinasyonda Rol Oynayan Proteinler.....	32
4.4.2 Rekombinasyon Defektleri, Matürasyon Arresti ve <i>MLH1</i>	34
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
5.1. Olguların Seçimi.....	36
5.1.1. Olguların Değerlendirilmesi.....	36
5.1.2. Olguların Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri.....	36
5.2. Periferik Kan Örneklerinin Alınması.....	37
5.3. DNA İzolasyonu.....	38
5.3.1. Lizatın Hazırlanışı.....	39
5.3.2. DNA Pürifikasyonu.....	39
5.3.2.1.DNA'nın Bağlanması.....	39
5.3.2.2.DNA'nın Yıkanması.....	39
5.3.2.3.DNA'nın Elüsyonu.....	40

5.3.2.4.DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Değerlendirilmesi.....	40
5.3.3. DNA'nın Saklanması.....	40
5.4. Elde Edilen DNA'dan <i>MLH1</i> 'in Ekzon ve İntron-Ekzon Bileşkelerini İçeren 19 Bölgenin PCR ile Çoğaltılması, Pürifikasyonu ve Yöntem Validasyonu...	40
5.4.1. <i>MLH1</i> Primerleri.....	41
5.4.2. Hedef Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması.....	42
5.4.3. Ürünlerin Jelde Yürütülmesi ve Yöntem Validasyonu.....	43
5.5. Hizmet Alımı ile Örneklerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği ile MiSeq Cihazında Dizilenmesi ve Varyantların Biyoinformatik Analizi.....	44
5.6. Saptanan Varyantların Sanger Dizileme ile Konfirme Edilmesi.....	46
5.6.1. PCR Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu.....	46
5.6.2. Dizi Analizi Reaksiyonu.....	47
5.6.3. Dizi Analizi Reaksiyonu Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu.....	48
5.6.4. Ürünlerin Kapiller Elektforez Yöntemiyle Yürütülmesi.....	49
5.7. İstatistiksel Analiz.....	49
6. BULGULAR.....	50
6.1. Hasta Grubunun Özellikleri.....	51
6.2. Matürasyon Arresti Olan Olgularda Saptanan Varyantlar.....	52
6.3. Varyantların Sınıflaması ve Klinik Özellikleri.....	54
6.3.1. Benign Varyantlar.....	56
6.3.1.1. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.453+79A>G, rs4234259.....	56
6.3.1.2. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.655A>G (p.Ile219Val), rs1799977.....	58
6.3.1.3. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1038+86T>C, rs2286939.....	59
6.3.1.4. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1668-19A>G, rs9876116.....	61
6.3.1.5. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1990-121C>T, rs2241031.....	62
6.3.1.6. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.-93G>A, rs1800734.....	64
6.3.1.7. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1039-78A>G, rs11129748.....	65

6.3.1.8. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1558+14G>A, rs41562513...	67
6.3.1.9. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1039-8T>A, rs193922367.....	67
6.3.1.10. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1410-51C>T, rs7633154....	68
6.3.1.11. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.*35_*37del, rs193922366...	68
6.3.1.12. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.885-81G>C, rs104894999..	69
6.3.1.13. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.454-51T>C, rs4647255.....	69
6.3.2. Olası Benign Varyantlar.....	69
6.3.2.1. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1897-145C>G, rs145050866..	69
6.3.2.2. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.198C>T (p.Thr66=), rs61751642.....	70
6.3.2.3. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.*32C>T, rs200903126.....	70
6.3.2.4. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.453+25A>G, rs4647246.....	71
6.3.2.5. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.307-29C>A, rs139620056.....	71
6.3.3. Önemli Bilinmeyen Varyantlar.....	72
6.3.3.1. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1559-131A>T.....	72
6.3.3.2. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.2104-57_2104-56insG.....	72
6.3.3.3. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1559-144G>T.....	72
6.3.3.4. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.454-36C>A.....	73
6.3.3.5. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1559-5535_1559- 5534insCCGCTCTGCGC.....	73
6.3.4. Olası Patojenik ve Patojenik Varyantlar.....	73
6.3.4.1. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.1852_1853delAAinsGC (p.Lys618Ala), rs35502531.....	73
6.3.4.2. <i>MLH1</i> (ENST00000231790.8):c.977T>C(p.Val326Ala), rs63751049.....	74
6.3.4.3. Lys618Ala ve Val326Ala Klinik Özellikleri.....	75
6.4. Genel Alel Frekansları.....	77
6.4.1. Ma Grubunda, Global Ve Fin Olmayan Avrupa Popülasyonlarında Alel Frekansları.....	77
6.4.2. Val326Ala, Lys618Ala, <i>MLH1</i> :c.*32C>T, <i>MLH1</i> :c.*35_*37del ve <i>MLH1</i> :c.-93G>A NGS Analizini Gerçekleştiren Özel Laboratuvarın Ekzom Verisiyle ve Diğer Global Popülasyon alel Frekanslarıyla Karşılaştırılması.....	80
7. TARTIŞMA.....	83
7.1. Benign Varyantlar.....	86

7.1.1. Ile219Val.....	85
7.1.2. Bir Promoter Varyantı: <i>MLH1</i> :c.-93G>A.....	88
7.1.3. <i>MLH1</i> :c.*35_*37del.....	93
7.2. Olası Benign Varyantlar.....	94
7.3. Önemi Bilinmeyen Varyantlar.....	96
7.4. Olası Patojenik Varyantlar.....	97
7.5. Patojenik Varyantlar.....	101
7.6. <i>MLH1</i> Fonksiyonlarına Yönelik Deneysel Çalışmalar.....	102
7.7. Epidemiyolojik Çalışmalar.....	104
7.8. Çalışmanın Kısıtlılıkları.....	104
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	105
9. KAYNAKLAR.....	107
10. EK-1 ACMG SINIFLANDIRMASI.....	150

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACMG	: <i>American College of Medical Genetics</i>
AIS	: Androjen insensivite sendromu
ASA	: Anti-sperm antikoru
ASRM	: <i>American Society for Reproductive Medicine</i>
AT	: Atrofik testis
AZF	: Azoospermi faktörü
B	: Benign
BAM	: <i>Binary alignment map</i>
BLAT	: <i>Blast-like alignment tool</i>
CADD	: <i>Combined Annotation-Dependent Depletion</i>
CAVD	: Konjenital vas deferens agenezisi (<i>congenital agenesis of vas deferens</i>)
CBAVD	: Konjenital bilateral vas deferens agenezisi
CCI	: Charlson Komorbidite indeksi (<i>Charlson comorbidity index</i>)
CGH	: karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
CNV	: Kopya sayısı değişikliği (<i>copy number variant</i>)
CUAVD	: Konjenital unilateral vas deferens agenezisi
ÇZK	: Çift zincir kırıkları
DEHP	: Di-2-etilheksil ftalat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FSH	: Foliküle stimüle edici hormone
GATK	: <i>Genome Analysis Toolkit</i>
GnomAD	: <i>Genome Aggregation Database</i>
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormone
HGMD	: <i>Human Gene Mutation Database</i>
HJ	: Holiday Junction
HS	: Hipospermatogenez
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enfeksiyonu (<i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
IGV	: <i>Integrative genomics viewer</i>
IVF	: İn vitro fertilizasyon (<i>in vitro fertilization</i>)
KHH	: Konjenital hipogonadotropik hipogonadizm

KİS/CIS	: Karsinoma in situ (<i>carcinoma in situ</i>)
KRK (CRC)	: Kolorektal kanser (<i>colorectal cancer</i>)
LH	: Luteinize edici hormone
MA	: Matürasyon arresti
MAIS	: Hafif androjen insensivite sendromu (<i>mild androgen insensitivity syndrome</i>)
mIU	: Mili-internasyonal ünite (<i>mili-International Unit</i>)
mL	: Mililitre
MLH1:	: MutL Homolog 1
MMR	: Yanlış eşleşme onarımı (<i>Mismatch repair</i>)
Ng	: Nanogram
NGS	: Yeni nesil dizileme (<i>next generation sequencing</i>)
NOA	: Non-obstruktif azospermi
O	: Olgu
OA	: Obstruktif azospermia
OB	: Olası benign
ÖB	: Önemi bilinmeyen
OD	: Otozomal dominant
OP	: Olası patojenik
OR	: Otozomal resesif
P	: Patojenik
PAIS	: Parsiyel androjen insensivite sendromu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu- <i>Polymerase chain reaction</i>
PGT	: Preimplantasyon genetik test
PGT-A	: Preimplantasyon genetik tanı – anöploidi
pHJ	: Proto-HJ
POY	: Prematür overyen yetmezlik
PSD	: Primer siliyer diskinezi
RNA	: Ribonükleik asit
SA	: Semen analizi
SCO	: <i>Sertoli cell only</i>
SEI	: Tek uç invazyonu (<i>single end invasion</i>)
SK	: Sinaptonemal kompleks
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi- <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSD	: Splice bölgesi defekti (<i>Splice-site defect</i>)

T	: Testosteron
Ta	: Annealing sıcaklığı (<i>annealing temperature</i>)
TESE	: Testiküler sperm ekstraksiyonu (<i>testicular sperm extraction</i>)
TGK	: Tekrarlayan gebelik kaybı
TRUS	: Transrektal ultrasonografi
USG	: Ultrasonografi
UTR	: Translasyona uğramayan bölge - <i>Untranslated region</i>
VCF	: <i>Variant call format</i>
WHO	: Dünya sağlık örgütü - <i>World Health Organization</i>
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Erkek infertilitesi genel değerlendirme akış şeması.....	13
Şekil 4.2.	Sinaptonemal kompleks yapısı ve MLH1'in yerleşimi.....	31
Şekil 4.3.	Homolog rekombinasyonda rol oynayan proteinler.....	32
Şekil 6.1.	Lys618Ala ve Val326Ala heterozigot olguların elektroferogram görüntüleri..	76
Şekil 6.2.	Lys618Ala ve Val326Ala varyantlarının gen ve protein düzeyinde yerleşimleri.....	76
Şekil 6.3.	Val326Ala ve Lys618Ala Alel Frekansları.....	77

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4.1.	Semen analizi parametrelerinin normal değerleri.....	8
Tablo 4.2	Semen analizinde saptanabilen anomaliler.....	9
Tablo 4.3	Hipogonadotropik hipogonadizmin nedenleri.....	17
Tablo 4.4	Primer testiküler nedenler.....	18
Tablo 4.5	NOA'nın sendromik olmayan genetik nedenleri.....	26
Tablo 5.1.	PureLink® Genomic DNA mini kit içeriği.....	38
Tablo 5.2	<i>MLH1</i> için forward ve reverse primerler.....	41
Tablo 5.3	PCR'da kullanılan kimyasalların miktarı.....	42
Tablo 5.4.	PCR koşulları.....	43
Tablo 5.5	<i>MLH1</i> Mutasyon Spektrumu.....	46
Tablo 5.6	BigDye™ Terminator v3.1 cycle Sequencing kit içeriği.....	47
Tablo 5.7	Dizi analizinde kullanılacak malzemeler ve miktarları.....	48
Tablo 5.8	Dizi analizi reaksiyon koşulları.....	48
Tablo 6.1	Testis biyopsisinde Matürasyon Arresti Saptanan Olguların Özellikleri.....	50
Tablo 6.2	Matürasyon arresti olan 42 olguda saptanan <i>MLH1</i> varyantları.....	52
Tablo 6.3	<i>MLH1</i> varyantlarının ACMG kriterlerin göre sınıflandırılması.....	55
Tablo 6.4	<i>MLH1</i> :c.453+79A>G varyantının klinik özellikleri.....	56
Tablo 6.5	<i>MLH1</i> :c.655A>G varyantının klinik özellikleri.....	58
Tablo 6.6	<i>MLH1</i> :c.1038+86T>C varyantının klinik özellikleri.....	60
Tablo 6.7	<i>MLH1</i> :c.1668-19A>G varyantının klinik özellikleri.....	61
Tablo 6.8	<i>MLH1</i> :c.1990-121C>T varyantının klinik özellikleri.....	63
Tablo 6.9	<i>MLH1</i> :c.-93G>A varyantının klinik özellikleri.....	64
Tablo 6.10	<i>MLH1</i> :c.1039-78A>G varyantının klinik özellikleri.....	66
Tablo 6.11	Lys618Ala ve Val326Ala heterozigot olguların klinik özellikleri	75
Tablo 6.12	MA grubu alel frekanslarının GnomAD ve 1000 Genom Global alel frekanslarıyla karşılaştırması.....	79
Tablo 6.13	MA grubu alel frekanslarının GnomAD ve 1000 Genom Fin olmayan Avrupa popülasyonu alel frekanslarıyla karşılaştırması.....	79
Tablo 6.14	Val326Ala, Lys618Ala, c.35*_-37del, c.*32C>T ve c.-93G>C alel frekanslarının karşılaştırılması.....	81

TÜRKÇE ÖZET

Amaç:

İnfertilite tüm dünyada çiftlerin %13-15'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur ve olguların yaklaşık yarısı erkek infertilitesinden kaynaklanmaktadır. Nonobstruktif azoospermi (NOA) erkek infertilitesinin önde gelen nedenlerinden biri olmakla birlikte olguların %85'inde genetik ve moleküler nedenler henüz aydınlatılamamıştır. Testis biyopsisi sonuçları kullanılarak yapılan endofenotipleme ile NOA'da tek gen varyantlarının araştırılması güncel bir yaklaşımdır ve bugüne kadar bu yaklaşımla NOA olgularının bir kısmından *TEX11*, *MEIOB* gibi birkaç genin sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Öncelikle kanserdeki rolüyle bilinen ve bir yanlış eşleşme onarımı (MMR) proteini olan MLH1'in mayozda rekombinasyon odaklarında yerleşim gösterdiği ve MSH4, MSH5, MLH3 ile birlikte rekombinasyonda görev aldığı hem hayvan hem de insan çalışmalarında gösterilmiştir. NOA'lı olguların testis dokularında anti-MLH1 antikorlarıyla yapılan immünohistokimyasal incelemelerde MLH1 odaklarının sayısında azalma ile MLH1 fonksiyon bozukluğunun diğer bir göstergesi olan mikrosatellit instabilitesinde ise artış olduğu saptanmıştır. Öte yandan *MLH1* geni varyantlarının insanlarda erkek infertilitesi, NOA ve testis biyopsisi sonuçları ile ilişkisini olumlayan veya olumsuzlayan bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bu projede literatürdeki bu eksikliği gidermek amacıyla testis biyopsisi sonucunda öncelikle matürasyon arresti olan veya hipospermatogenez saptanan NOA'lı olgularda yeni nesil dizileme ile *MLH1* varyantlarının araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve yöntem:

Toplamda 42 hastanın onamları alındıktan sonra periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplerde -20°C'de çalışma başlayana kadar saklanmıştır. Primerlerin oluşturulmasında *MLH1* geninin biyolojik olarak en yaygın ifadesi olan ve en uzun transkriptine göre (NM_000249.4), promoter bölgesini de içerecek şekilde literatür bilgisi kullanılmış ve Primer3, in-silico PCR ve

BLAT ile özgünlükleri teyit edilmiştir. Dreamtaq master miks kullanılarak ampikonlar elde edilmiş ve %2'lik agaroz jelde PCR doğruluğu tespit edildikten sonra yeni nesil dizileme ile dizilenmiştir. Yeni nesil dizileme tamamlandıktan sonra “.BAM” uzantılı dosyalarda 42 hastanın *MLH1* genindeki varyantlar IGV programında incelenmiştir. Varyantlar VarSome kullanılarak ACMG kriterlerine göre sınıflandırılmıştır. Sapyanan varyantlar Sanger dizileme ile de doğrulanmıştır.

Bulgular:

13 benign, 5 olası benign, 6 önemi bilinmeyen, 1 olası patojenik ve 1 patojenik varyant tespit edilmiştir. Lys618Ala olası patojenik, Val326Ala ise patojenik varyant olarak sınıflandırılmıştır.

Sonuç:

Araştırmamızda matürasyon arrestine bağlı NOA fenotipi için risk oluşturabilecek ya da yatkınlık yaratacak iki kodlayıcı varyant bulunmuştur. V326A ve K618A olan bu varyantlar dışında önemi bilinmeyen bazı varyantlar literatürde ilk kez ortaya konmuştur. Ek olarak, benign veya olası benign olarak sınıflandırılmakla birlikte, bir promoter varyantı rs1800734 ve iki 3'UTR varyantı kompleks hastalık patofizyolojisi ile uyumlu olarak NOA'da yatkınlık oluşturabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Bu varyantlar NOA'da monogenik etkiden çok kişiselleştirilmiş tıp kapsamında yatkınlık faktörleri olarak önerilebilir. Bu yatkınlık faktörlerinin *MLH1* varyantları olmasının önemi, erkek genel sağlık durumunun göstergesi olarak kabul edilen erkek infertilitesiyle kanser arasında bağlantı kurmasında yatmaktadır.

Anahtar kelimeler: Erkek İnfertilitesi, Matürasyon arresti, Non-obstrüktif Azoospermi, Yeni Nesil Dizileme, DNA Onarım Yetmezliği

ABSTRACT

Aim:

Infertility is an important health issue that affects 13-15% of couples worldwide and male factor is a cause or a contributor to the half of the cases. Although nonobstructive azoospermia (NOA) is one of the leading causes of male infertility, genetic and molecular aetiology of NOA remains unexplained in 85% of the cases. Investigation of monogenic causes of NOA by endophenotyping using testicular biopsy results is an up-to-date approach by which it has been shown that several genes such as *TEX11*, *MEIOB* are responsible in some cases with NOA.

Being a mismatch repair (MMR) protein and primarily known for its role in cancer, MLH1 has been shown to be a constituent in recombination foci and a participant in recombination together with MSH4, MSH5 and MLH3 both in animal and human studies. Reduced number of the MLH1 foci detected by immunocytochemistry analyses using anti-MLH1 antibodies and an increase in the microsatellite instability which is indicative of MLH1 dysfunction have been evidenced in testicular tissues of cases with NOA. On the other hand, no study in humans has been found to affirm nor negate an association between variants of *MLH1* gene with male infertility, NOA and testicular biopsy results. To fill this gap in the literature, it is aimed in this project to investigate the *MLH1* variants by next-generation sequencing in NOA cases with testicular biopsy results of maturation arrest or hypospermatogenesis.

Materials and methods:

After obtaining the consents of 42 patients in total, the blood samples were stored at -20°C until the study began. The primers for the gene *MLH1* were adapted from the literature based on the most biologically relevant and longest transcript (NM_00249.4) of the gene including the promoter region. The specificity of the primers were confirmed by using Primer3, in-silico PCR and BLAT tools. Amplicons obtained using Dreamtaq master mix and confirmed

on a 2% agarose gel; afterwards they were sequenced by next generation sequencing technology. “.BAM” files were obtained for each patient and investigated for variants using IGV. Detected variants were confirmed by Sanger sequencing.

Results:

13 benign, 5 likely benign, 6 uncertain significance, 1 likely pathogenic and 1 pathogenic variants were detected. Lys618Ala and Val326Ala were classified as likely pathogenic and pathogenic, respectively.

Conclusions:

In this study, two coding variants have been detected which may be risk factors for the NOA phenotype related to maturation arrest. For the first time in the literature some variants of uncertain significance have been reported other than the V326A and K618A variants. Additionally, although classified as benign or likely benign, one promoter variant and two 3'UTR variants may cause susceptibility to NOA in accordance with the pathophysiology of complex disease. It is not realistic to assume these variants are monogenic causes of NOA; however, they can be considered as susceptibility factors within the context of precision medicine. The value of these factors as *MLH1* variants is that they make the connection of cancer with male infertility which is regarded as an indicator of general male health status.

Key Words: Male infertility, Maturation arrest, Nonobstructive Azoospermia, Next Generation Sequencing, DNA Repair Deficiency

GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite 1 yıl süreyle korunmasız cinsel ilişkiye rağmen konsepsiyonun gerçekleşmemesi olarak tanımlanır ve dünyada çiftlerin %13-15'ini etkilediği için önemli bir sağlık sorunudur (1). Erkek infertilitesi olguların yarısına yakınından sorumludur (2). Azoospermi ejakulatta sperm olmaması olarak tanımlanır ve tüm erkeklerin %1'inde, infertil erkeklerin ise %10-15'inde görülerek erkek infertilitesinin önemli bir nedenini oluşturmaktadır (1).

Azoospermi etiyolojisi pretestiküler, testiküler ve posttestiküler sebepler olmak üzere üç ana başlık altında incelenebildiği gibi, klinik olarak obstrüktif ve non-obstrüktif azoospermi (NOA) olarak da sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma genital yolda sperm çıkışını engelleyen bir tıkanıklık varlığına ya da yokluğuna göre yapılmaktadır (3). NOA, azoospermi olgularının yaklaşık %60'ını oluşturur (4). Bilinen nedenler arasında kriptorşidizm, testiküler torsiyon, testiküler travma, testiküler kanser, varikosel, endokrin ve genetik nedenler yer almaktadır (5).

NOA'da genetik nedenlerin %85'i aydınlatılamamış olmakla birlikte 47,XXY karyotipiyle karakterize Klinefelter sendromu ve diğer sayısal/yapısal kromozomal anomaliler ile Y kromozomu AZF bölgelerinin mikrodelsiyonları iyi bilinen nedenler arasındadır ve NOA ile başvuran erkeklerde bu testler rutin olarak yapılmaktadır (4,6).

Erkek infertilitesi ilişkili olduğu komorbiditeler nedeniyle aynı zamanda genel erkek sağlığı hakkında bilgi verici kabul edilmektedir (7,8). Erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiş bu komorbiditelerin NOA'lı erkeklerde daha şiddetli seyrettiği de bildirilmiştir (9). Bunlar arasında kanser önemli bir yer kaplamaktadır. Erkek infertilitesiyle en çok ilişkilendirilmiş kanser testis tümörüdür ve bu tümör 15-34 yaş arası erkeklerde en sık görülen solid malignitedir (7,10,11). Diğer pek çok araştırmacı erkek infertilitesiyle birçok kanser türü arasında ilişki saptamışlardır; bildirilmiş olan kanserler arasında kolorektal kanser, tiroid kanseri, mesane kanseri, beyin tümörleri, Hodgkin lenfoma, non-Hodgkin lenfoma ve lösemi yer almaktadır (7,12-19). Bu kanserler aynı zamanda Lynch sendromu kanser spektrumunda bulunmaktadır (20). Erkek infertilitesinin epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiş olan kanserle bu ilişkisi

nedeniyle genetik etiyojinin aydınlatılması kanserle ilişkisinin netleştirilmesi ve sonucunda tarama ve erken tanı uygulamalarının bu hasta grubu için de uygulanması açısından önem taşımaktadır.

Kanserle erkek infertilitesi arasındaki ilişki pek çok araştırmacının ilgisini DNA onarım mekanizmalarına yöneltmiştir, nitekim bu yolda rol oynayan proteinlerden bazıları hem mayoz hem de mitozda görev almakta ve her iki fenotipe yatkınlık yaratabilmektedir (21–23). *MLH1* DNA onarım mekanizmalarından biri olan yanlış eşleşme onarım yolağı genlerinden biridir ve patojenik varyantları Lynch sendromu vakalarının yaklaşık yarısından sorumludur (20). *MLH1* İnsan Protein Atlasındaki (The Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org) tek hücre RNA-seq verilerine göre testiste spermatositlerde oldukça yüksek ekspresyon göstermektedir (24). Bu ekspresyon verisiyle uyumlu olarak insan çalışmaları dahil pek çok hayvan çalışmasında *MLH1*'in memelilerde rekombinasyonda oynadığı gösterilmiştir (25–28).

Genel bilgiler bölümünde detaylı olarak tartışılacağı üzere *MLH1* ile infertilite arasında ilişki olduğunu düşündüren pek çok çalışma bulunmakla birlikte, *MLH1* geninin hem sık hem de nadir varyantlarının matürasyon arresti olan NOA olgularında araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu veriler ışığında bu çalışmada testis biyopsisinde matürasyon arresti veya hipospermatogenez saptanan NOA olgularında *MLH1* geninin dizileme ile saptanabilen patojenik ve olası patojenik varyantlarının varlığını ortaya koymak amaçlanmıştır. Hipotezimiz “*MLH1* varyantları NOA ve matürasyon arrestine yatkınlık oluşturur” olarak belirlenmiştir.

GENEL BİLGİLER

İnfertilite 1 yıl süreyle korunmasız cinsel ilişkiye rağmen konsepsiyonun gerçekleşmemesi olarak tanımlanır ve dünyada çiftlerin %13-15'ini etkilediği için önemli bir sağlık sorunudur (1). Dünya sağlık örgütü (WHO) ve Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) tarafından hastalık olarak sınıflandırılan bir durumdur (29). Tek başına erkek faktörü infertilite nedeniyle başvuran çiftlerin %20'sinden sorumludur ve buna ek olarak %30-40 kadarında bilgi vericidir (30). Toplamda erkek faktörü vakaların %50'sinde etiyolojinin bir parçasıdır (31).

Primer infertilite başvuru zamanına kadar erkek bireyin hiç klinik gebelik elde edememesi olarak tanımlanır (32). Sekonder infertilite ise daha önce aynı ya da farklı partnerlerle sağlanmış bir klinik gebeliğin olup mevcut durumda konsepsiyonun sağlanamamasını ifade eder (32). Anormal semen analizinin etiyolojisi vakalarının %30'unda belirlenemez ve bu durum idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanır (33). İnfertil çiftte semen analizi (SA) normal ve kadın partnerde infertiliteye neden olacak bir patoloji yok ise bu durum açıklanamayan infertilite olarak isimlendirilir ve çiftlerin %25'ini oluşturur (33).

4.1 Erkek İnfertilitesinde Genel Değerlendirme

Çiftlerin infertilite açısından değerlendirilmesi kadın ve erkek partnerin her ikisinin de değerlendirilmesini ifade eder. Değerlendirme fizik muayene ve temel tanısal testlerle başlar (32). Kadın birey için over rezervinin, over fonksiyonlarının, tubal yapıların ve uterin boşluğun değerlendirilmesi gerekir (34). Erkek bireyde ilk değerlendirmede istenecek temel tanısal test bir veya daha fazla SA'dir.

4.1.1 Semen Analizi (SA)

Normal semenin yaklaşık %10'u testis, %20'si prostat ve %70'i seminal vezikül kaynaklıdır (32). SA parametrelerinin sınır değerleri 12 ay ya da daha kısa sürede partneri gebe

kalan 1900 erkeğin değerlerine dayanarak belirlenmiştir ve 5. persentili ifade eder (35,36). SA normal parametreleri Tablo 4.1’de verilmiştir (37).

Tablo 4.1. Semen analizi parametrelerinin normal değerleri

Semen Parametresi	Alt Referans Sınır (%95 güven aralığında 5. persentil)
Semen hacmi	1.5 mL (1.4 -1.7)
Total sperm sayısı	Ejakulatta 39 milyon (33-46 milyon)
Sperm konsantrasyonu	15 milyon/mL (12-16 milyon/mL)
Vitalite	%58 canlı (% 55-63)
Progresif motilite	%32 (%31-34)
Total motilite (progresif + progresif olmayan)	%40 (%38-42)
Normal morfoloji	%4 (%3-4)

SA parametreleri bir kişi için bile farklı zamanlarda değişkenlik gösterebileceğinden en az 1 ay arayla en az iki SA yapılması idealdir (32). Tek başına bu değerler bireyin infertil ya da fertil olduğu hakkında bilgi vermez; ancak SA’nin infertilite açısından tanı koydurucu olduğu istisnai durumlar da mevcuttur (38). Bunlar komplet globozoospermi gibi bazı teratozoospermi tipleri, nekrozoospermi veya komplet astenozoospermidir (39). Anormal SA erkek infertilitesi anlamına gelmemekle birlikte spesifik erkek infertilitesine yol açan bazı tanılarda SA genelde anormaldir (38). Semen analizinde saptanabilecek patolojik bulgular Tablo 4.2’de yer almaktadır. SA parametrelerindeki anomalilerin sayısı arttıkça *subfertilite* tanısının doğru olarak konma olasılığı artmaktadır (39).

Tablo 4.2. Semen analizinde saptanabilen anomaliler

Aspermi	Ejakulat olmaması
Hipospermi	Semen volümünün düşük olması
Oligospermi	Sperm sayısının alt limitin altında olması
Azoospermi	Semende sperm olmaması
Astenozoospermi	Sperm motilitesinin düşük olması
Teratozoospermi	Normal morfolojide sperm oranının düşük olması
Nekrozoospermi	Ejakulatta canlı sperm olmaması
Piyospermi	Ejakulatta normalin üst sınırında lökosit olması

4.1.2 Hormon Testleri

Testosteron (T) ve Folikül Stimüle edici Hormon (FSH) laboratuvar testleri birinci basamak testler değildir ve ASRM'nin önerisi endokrinopatinin düşünüldüğü durumlarda bu testlerin yapılmasıdır ancak konu tartışmalıdır (38). T ve FSH düzeylerinin belirlenmesi gereken durumlar aşağıda özetlenmiştir (40):

1. Azalmış libido
2. Erektile disfonksiyon
3. Özellikle 10 milyon/mL'nin altındaki oligozoospermi
4. Azoospermi

Gün içerisinde düzeyi azaldığı için T sabah kanından çalışılmalıdır (32). Eğer sabah açlık total T düzeyi <300 ng/dL saptanırsa total ve serbest T, serum luteinize edici hormon (LH), östradiol ve prolaktin düzeyleri belirlenmelidir (41).

FSH düzeyleri klasik olarak 1.0-20 mIU/mL olarak belirlense de bu düzeyler arasında olan bir FSH değeri spermatogenezin kesin olarak normal olduğu anlamına gelmez. Üst sınırın 7.6 mIU/mL üzeri spermatogenezde bir problem olduğuna işaret eder (32). Prolaktin düzeylerinin de yüksek olması erkekte libido ve cinsel fonksiyonları etkiler, ancak düşük olması da erkek cinsel disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (42).

4.1.3 Sperm DNA Fragmentasyon Testi

Bu test henüz yaygınlaşmadığı ve standardize olmadığı için, yanı sıra test yaptıranlar ile yaptırmayanlar arasında fertilité açısından sonuç değişmediği için ilk değerlendirmede infertil erkeklerde önerilmemektedir (32,43,44). Ancak test zaten yapılmışsa, infertiliteyle ve düşüklerle olası ilişkisi danışmanlık sırasında anlatılabilir (32). Bazı çalışmalar sperm DNA'sında fragmentasyon saptanan infertil veya tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda ejakulat spermi yerine testiküler sperm kullanılmasının ICSI sonuçlarını arttırdığını belirtmişlerdir (45).

4.1.4 Anti-Sperm Antikoru (ASA)

Kan testis bariyerinin bütünlüğünün kaybına yol açan travma, kabakulak orşiti, testis malignitesi, bazal obstrüksiyon veya vazektomi gibi durumlarda sperm antijenlerinin kan dolaşımına karışması ya da genital yol enfeksiyonları nedeniyle ASA'ları gelişebilir (46). ASA spermin oosite penetrasyonunu bozarak infertiliteye neden olabilmektedir (32). İlk değerlendirmede önerilen bir test değildir (32). İnfertiliteye yol açma mekanizması göz önünde bulundurulduğunda özellikle de intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılacaksa ASA testine gerek yoktur (32).

4.1.5 Testis Biyopsisi

Obstrüktif (OA) ve non-obstrüktif azoospermi (NOA) ayırımında tanısal amaçlı kullanılması artık önerilmemektedir (32). Bu ikisinin ayırımında FSH düzeyleri (7.6 IU/L'den yüksek olması) ve testis longitudinal ekseni (4.6. cm'den kısa olması) %89 kesinlikle

spermatojenik disfonksiyon olduğunu gösterir; tersi durumda obstrüksiyon varlığı %96 olasılıkla söylenebilir (32). Ancak laboratuvar parametrelerinin bilgi verici olmadığı durumlar olabilir (47). Bazen obstrüktif lezyon kaynaklı sperm üretiminde azalma olabilir ve hipospermatogenez tablosu görülebilir. Buna örnek olarak vazektomi sonrası kronik obstrüksiyon sonucu azalmış spermatogenez gösterilebilir (47,48).

OA ile NOA ayrımı dışında testis biyopsisinin başka kullanım alanları da mevcuttur. Bunlardan biri testiküler disgenezis ve karsinoma in situ (KİS). İnfertilite, testis gelişimiyle ilgili problemler (kriptorşidizm) ve kanser arasındaki ilişki iyi bilinmektedir (49,50). Genç yaş erkeklerde de en sık görülen solid tümör olduğu ve KİS prevelansının infertil erkeklerde oranının %1-5 olduğu göz önünde bulundurulduğunda, testis biyopsisi yapıldığında sadece spermatogenezin değil, kanser ve in situ kanser varlığının da araştırılması mümkün olmaktadır (47).

TESE işleminden önce ya da eşzamanlı yapılan testis biyopsisi sperm elde etme başarısını öngörmeye hala daha en başarılı değişkendir (47,51). Burada spermatojenik yetersizliğin şiddeti ve tipi değerlendirilerek histopatolojik tanı konur. Literatüre göre bu tanımlar matürasyon arresti (MA), hipospermatogenez (HS), Sertoli Cell Only (SCO) ve atrofik testistir (AT) (*seminifer tübül hiyalinizasyonu olarak da geçer ve SCO'dan başlıca farkı budur*) (47).

SCO tübüler germ hücresi içermez. Homojen ya da spermatojenik odaklarla bir arada olabilir ancak sadece saf olarak bulunduğunda bu terim kullanılmalıdır (47). MA sıklıkla primer spermatosit aşamasında olmakla birlikte genel olarak sperm matürasyonunun herhangi bir evreden ileriye gidememesi olarak tanımlanır. Bazıları tarafından inkomplet MA terimi hipospermatogenezi tariflemek için kullanılmıştır (47). Tübüllerde matür sperm bulunabiliyor ama serilerde azalma görülüyorsa uygun histolojik tanı HS olacaktır. TESE başarısı diğer histolojik tiplere göre daha yüksek olmakla birlikte bu hastaların da çoğunun semeninde sperm görülmez (47).

Testis biyopsisi bir sonraki yapay döllenme işlemleri için sperm elde etme ve kriyoprezervasyonda kullanılabilir. Bir diğer testis biyopsisi endikasyonu hipogonadotropik hipogonadizmde uzamış gonadotropin tedavisi sonrası tedaviye devam etmenin sonuçlarını

öngörmede kullanımıdır. Son olarak genotip-fenotip araştırmaları kapsamında, yeni genetik etiyojilerin keşfedilmesi için endofenotiplemede de testis biyopsisinden sıklıkla faydalanılmaktadır. Bunlar arasında genetik etiyojisi açısından en çok dikkat çeken primer spermatosit evresindeki MA'dır (47).

4.1.6 Görüntüleme

İnfertilite nedeniyle başvuran erkeğin ilk değerlendirmesinde skrotal ultrasonografik görüntüleme (USG) yapılmamalıdır (32). Obez veya dartos kasının kasılı kalmasına bağlı olduğu durumlarda spermatik kord venlerini değerlendirmek için renkli doppler ultrasonografi yapılabilir ve belli kriterlere göre varikosel tanısı konabilir (32). Ancak fizik muayene ile saptanamayan varikosellerin tedavisinin semen parametrelerinde ve fertilitede düzelmeye etkisi yoktur (32,52,53).

Benzer şekilde eğer endikasyon yoksa ilk değerlendirmede transrektal USG (TRUS) de yapılmamalıdır (32). Seminal vezikül çıkışı tıkayan obstrüksiyonlarda semen asidik olur ($\text{pH} < 7$), dolayısıyla semen analizinde pH'ı normal olan bireylerde distal genital yol obstrüksiyonu olma ihtimali oldukça düşüktür ve TRUS önerilmez (54). Ejakulatuvar ağrı diğer bir endikasyondur. TRUS ile obstrüksiyonun saptanması tedaviyi değiştirebilir. Diğer endikasyonlar düşük volümle birlikte azoospermi ve palpe edilebilir vasa veya düşük semen volümü ve belirgin astenozoospermidir (32).

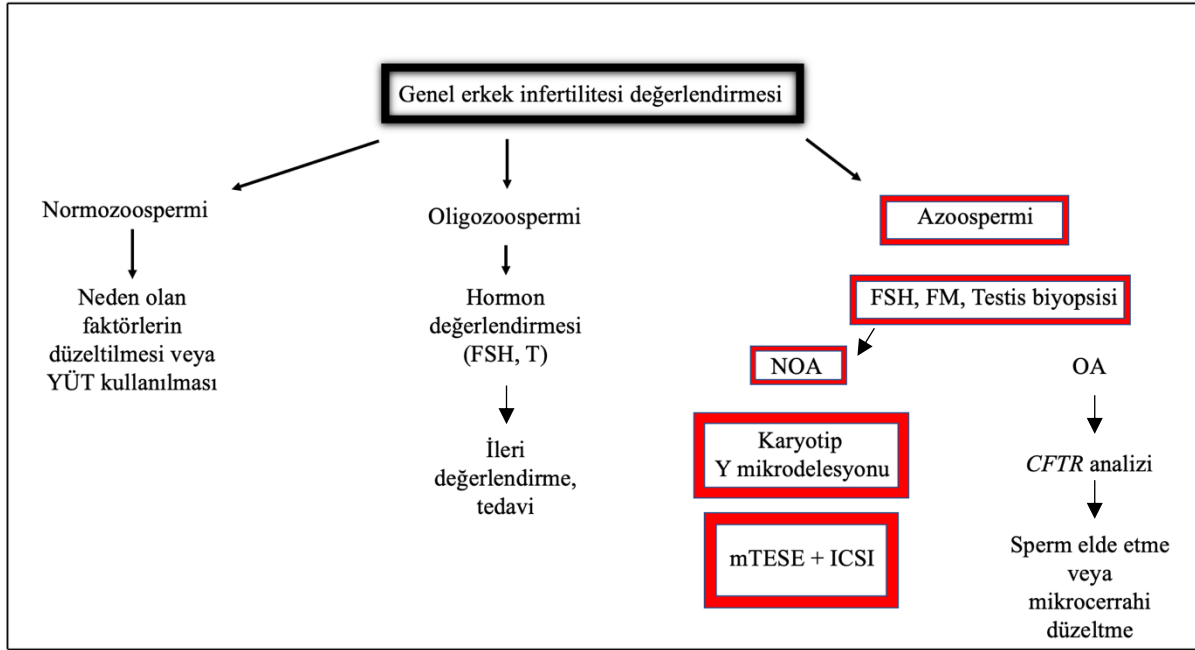
Varikosel infertil erkeklerde %40 oranında görülür ve %85 sol taraflıdır (55). %15 bilateral ya da daha az oranda sağ taraflı olabilir (55). Bazı uzmanlar bu durumda abdominal görüntüleme gerektiğini belirtse de rehberlere göre abdominal görüntüleme yeni gelişen veya gerilemeyen varikosel durumlarında, özellikle büyük olması halinde yapılmalıdır (32).

Unilateral vas deferens yokluğunda %26-75 oranında ipsilateral böbrek anomalisi beklenir (56,57). *CFTR* mutasyonları varlığında bile unilateral renal agenezis görülebilir

(58,59). Bu nedenle vasa agenezis durumlarında renal ultrasonografi dahil abdominal görüntüleme önerilir (32).

4.1.7 Azoospermi Algoritması

Genel erkek infertilitesi değerlendirilmesi dışında SA’nde azoospermi saptanması durumunda FSH, fizik muayene ve gerekirse testis biyopsisi ile OA ve NOA ayrımı yapılır. Tezin konusu olduğu üzere NOA tespit edilirse şekil 1’deki algoritma takip edilmelidir (60).



Şekil 4.1. Erkek infertilitesi genel değerlendirme akış şeması (60)

Kısaltmalar: mTESE mikro testiküler sperm ekstraksiyonu, YÜT yardımcı üremek teknikleri, FSH foliküle stimüle edici hormon, T testosteron, FM fizik muayene, NOA non-obstruktif azoospermi, OA obstruktif azoospermi

4.2 Erkek İnfertilitesinin Nedenleri ve Risk Faktörleri

İnfertilitenin etiyolojisinin aydınlatılması; tedavi edilebilir, geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz ya da tedavi edilemez durumların belirlenmesinde önemlidir (32). Çiftlerin fertilitate

açısından prognozunun belirlenmesi doğal gebelik, in vitro fertilizasyon (IVF) seçeneğinin değerlendirilmesi veya yardımcı üreme tekniklerinin hiç denenmemesi gibi kararların alınmasında etkilidir (32). Etiyolojinin aydınlatılması erkek infertilitesine eşlik edebilecek ya da erkek infertilitesinin bir sonuç olduğu morbid ve mortal durumların belirlenmesi için de önemlidir (61). Örneğin infertilite testis malignitesinin ya da hipofiz tümörünün bulgularından biri olabilir (61). Etiyolojinin aydınlatılmasının diğer bir önemi, genetik nedenlerin tespit edilmesi ve bunların bir sonraki nesile aktarılma olasılığının belirlenmesine imkân vermesidir (32). Bu durumda preimplantasyon genetik test (PGT) önerilmesi söz konusu olabilir. Erkek infertilitesine neden olan hastalıkların diğer komorbid durumlarının olması halinde bu durumlar için tarama ve tedavi önerilmesi söz konusu olabilir. Nitekim erkek infertilitesinde, sağlığı etkileyen diğer durumlarla da karakterize tanı oranı en az %50'dir (32).

4.2.1 Erkek İnfertilitesi için Kanıtlanmış Risk Faktörleri

İleri erkek yaşı (40 yaş ve üzeri) doğacak olan çocukta de novo mutasyon, yapısal kromozomal anomali, doğum defektleri ile akondroplazi, otizm, şizofreni gibi hastalıklar için risk faktörüdür (62–64). Kafein risk faktörü değildir, ancak sperm anöploidisini artırır (32,65). Alkol semen volümünü hafifçe azaltır ve sperm morfolojisini bozar; ancak sperm konsantrasyonu veya motilitesini etkilemez (32,65). Cep telefonları erkek infertilitesini etkilemez (32,65). Sigara, kötü diyet ve stres hafif düzeyde fertilitiyi azaltırken obezite fertilitiyi orta düzeyde azaltır (32,65).

İlaçlardan anabolik steroid kullanımı azalmış fertilitiyle ilişkilidir, ancak kalıcı infertilite yapmaz (32,65). Kemoterapötiklerin ve radyoterapinin fertiliti üzerine olumsuz etkisi iyi bilinmektedir (32,65). Metotreksat fertilitiyi etkilemez (32,65). Finasterid 5 mg/gün azalmış semen volümüyle ilişkilidir (32,65). İlacın üremeye etkisi bilinmiyorsa REPROTOX® gibi veri tabanları kullanılabilir (66).

Çevresel faktörlerden Di-2-etilheksil ftalat (DEHP) sperm konsantrasyonu, motilitesini azaltırken sperm DNA hasarını artırır (65). Benzin ve doğal gazla mesleki maruziyeti olanlarda semen volümü ve sperm motilitesi azalmıştır (65). İnfertil erkeklerde kurşun ve kadmiyum

düzeyleri daha yüksek, çinko düzeyleri daha düşüktür (67–70). Bazı pestisitler (pyrethroidler, organofosfatlar ve abamektin kötü semen parametreleriyle ilişkilidir (32,71).

4.2.2 Erkek İnfertilitesinde Komorbid Durumlar

İnfertil erkeklerde fertil kontrollere göre üreme ve genel sağlıkla ilişkili olarak komorbidite sıklığı artmıştır (14,72–76). İnfertilite nedeniyle değerlendirilen erkeklerin %1-6'sında tanı almamış bir tıbbi patoloji söz konusudur ve bu durum SA'nde normal değerleri olan erkeklerde de görülebilmektedir (56,61). Bunlar arasında testis tümörü başta olmak üzere çeşitli kanserler de yer almaktadır (10,13–15,17,18,75). İnfertil erkeklerde hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite ve diyabet gibi komorbiditeler daha yüksek sıklıkla görülür (77,78). Bir meta-analiz sonucuna göre Charlson Komorbidite indeksi (Charlson Comorbidity Index-CCI) skoru anormal SA ile pozitif korelasyon göstermektedir (8). Erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiş kanser dahil tüm sağlık sorunları NOA'lı bireylerde daha şiddetli ve sık görülmektedir (9).

4.2.2.1 Erkek İnfertilitesinde Kanser

Dört çalışmanın sonucu anormal semen parametreleri olanlarda daha yüksek oranda testiküler kanser tanısı aldıklarını göstermişlerdir (11,14,15). Testiküler kanser erkek infertilitesiyle en çok ilişkilendirilmiş kanser tipidir ve 15-34 yaş arası erkeklerde en sık görülen solid tümördür (7).

Birkaç araştırmada testis tümörü dışında erkek infertilitesiyle çok sayıda kanser tipi arasında ilişki bulunmuştur. Bu tanımlar arasında Lynch sendromu spektrumunda da yer alan kolorektal kanser, tiroid kanseri, mesane kanseri, beyin tümörleri, Hodgkin lenfoma, non-Hodgkin lenfoma and lösemi gibi maligniteler yer almaktadır (7,12-19). Ancak bu kanserlerle olan ilişkisi tam olarak netleştirilememiştir (32).

Azoospermisi olan erkeklerde genel olarak tüm kanser tipleri daha yüksek oranda görülmektedir (75).

4.2.2.2 *MLH1* ve Kanser

MLH1 19 ekzondan oluşan bir gendir. *MLH1* proteini genetik bütünlüğün sağlanmasında son derece önemli bir onarım mekanizması olan DNA yanlış eşleşme onarımında (*mismatch repair*-MMR) görev alan proteinler arasında yer almaktadır. *MLH1* mutasyonları Lynch sendromu adı verilen ve kolon, rektum, mide, over, endometriyum gibi çeşitli kanserlerle seyreden bir kanser sendromunun altta yatan nedenlerinin yarısını oluşturmaktadır (20). Diğer bazı mutasyonları ise Lynch sendromunun varyantları olan Turcot sendromu ve Muir-Torre sendromuyla ilişkilidir. Lynch sendromlularda kolorektal kanser başta olmak üzere çeşitli kanserlere yönelik antineoplastik ajanların fertilite üzerindeki olumsuz etkisi bilinmektedir. Ancak mayozda rekombinasyon odaklarında görev alan *MLH1* proteinin mayozda işlevini yerine getirememesinin bu infertiliteye katkısı bilinmemektedir.

4.2.3 Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Bu bölümde erkek infertilitesinin nedenleri genel olarak ele alınmıştır ve genetik açıdan etiyolojinin değerlendirilmesi bir sonraki bölümde detaylı bir şekilde açıklanacaktır.

4.2.3.1 Hipogonadotropik Hipogonadizm

Hipogonadotropik hipogonadizmle sonuçlanan hem edinsel hem konjenital pek çok endokrin ve sistemik patoloji bulunmaktadır (Tablo 4.3). Herhangi bir şiddetli hastalık tablosu, morbid obezite ve nutrisyonel defektler de normal hipofiz-gonadal aksı etkileyecektir. Bu nedenler infertil erkeklerin %5-15'inde etiyolojiyi oluşturmaktadır (33,79–81).

Tablo 4.3. Hipogonadotropik hipogonadizmin nedenleri

Konjenital	Edinsel
Konjenital GnRH eksikliği (Kallmann sendromu)	Hipofizer veya hipotalamik tümörler (hipofiz makroadenomları, kraniyofarenjiyoma)
Demir yüklenmesiyle seyreden genetik hastalıklar (örn. hemakromatozis)	Hipofiz ve hipotalamusu tutan infiltratif hastalıklar (sarkoidoz, vb.)
Genetik sendromlar (Prader-Willi sendromu, Laurence-Moon-Biedl sendromu, ailesel serebellar ataksi vb.)	Kafa travması, radyasyon, cerrahi
	Hipofizi etkileyen vasküler patolojiler (anevrizma, vb.)
	Hormonal dengesizlik (hiperprolaktinoma; androjen, östrojen, kortizol fazlalığı)
	İlaçlar (ekzojen androjen, psikotropik ilaçlar, GnRH agonist veya antagonistleri)

Kısaltmalar: GnRH Gonadotropin releasing hormone

4.2.3.2 Spermatogeneze Primer Testiküler Nedenler

Spermatogenezin primer testiküler nedenleri olguların %70-80'inden sorumludur (80–82). Olgularda spermatogeneze defekti gösteren semen anomalileri mevcuttur. Bu grup hastaların çoğunluğunda etiyoloji aydınlatılamamıştır, bilinen nedenler Tablo 4.4'te sınıflandırılmıştır (80-82).

Tablo 4.4 Primer testiküler nedenler

Konjenital	Edinsel
Klinefelter sendromu ve karyotipik varyantları (örn. 46,XY/47,XXY)	Varikosel
Y mikrolelesyonu ve Y kromozomu yeniden düzenlenmeleri	Sistemik hastalık: böbrek yetmezliği, siroz, orak hücreli anemi, çölyak hastalığı, amiloidoz
Kriptorşidizm	Enfeksiyonlar: viral, granülatöz orşit; epididimo-orşit (gonore, klamidy)
Miyotonik Distrofi	Travma
Konjenital anorşi	Testiküler torsiyon
Androjen insensivite sendromları	İmmünolojik hastalıklar: poliglandular otoimmün hastalık, antisperm antikorları
5-alfa redüktaz eksikliği	
Östrojen reseptör veya sentez bozuklukları	

4.2.3.3 Sperm Transport Defektleri

Vakaların %2-7'sini oluşturmaktadır. Spermin hareket etme yeteneğini kazandığı epididimise zarar veren ilaçlar ve toksinler; vas deferens yokluğu (*CFTR* mutasyonları, Young sendromu, enfeksiyon, vazektomi); seminal kanallarda, prostatta ve ejakülatör kanallarda görülen patolojiler bu grupta sınıflandırılmaktadır (33). Ayrıca erektile disfonksiyon ve prematür ejakülasyon da bu başlık altında değerlendirilmektedir.

4.2.3.4 İdiyopatik Erkek İnfertilitesi

Olguların %10-20'sini oluşturmaktadır. İdiyopatik primer testiküler spermatogenez bozukluklarından farkı hastaların semen parametrelerinin normal olmasıdır (33).

4.3 Genetik Yönüyle Erkek İnfertilitesi

Genetik nedenler yukarıda belirtilmiş olan erkek infertilitesi etiyolojisinin dört grubunda da önemli bir yer teşkil etmektedir. Genel olarak bakıldığında erkek infertilitesinin en azından %15'inden genetik faktörler sorumludur (83,84). Azoospermide altta yatan genetik etiyoloji olasılığı oldukça yüksektir (83).

Hastanın infertilitesinden sorumlu genetik nedenlerin tespiti hastanın ve çocuklarının üreme sağlığı ve genel sağlığı, TESE işleminde prognoz, hormonal tedavilere yanıtın belirlenmesi ve kişisel tıp uygulamasında (farmakogenetik) önemli etkileri olması açısından önemlidir. Erkek infertilitesinin genetik etiyoloji açısından değerlendirilmesi karyotip analizi, azoospermi faktörü (AZF) mikrolelesyonları ve bilinen monogenik nedenler açısından mutasyon taramasını kapsamaktadır (83).

4.3.1 Genetik Test Endikasyonları

Azoospermiyle birlikte primer infertilite, şiddetli oligozoospermi (<5 milyon/mL) ile yüksek FSH, testiküler atrofi veya azoosperminin nedeninin sperm üretimindeki bir patolojiden kaynaklandığı düşünülüyorsa karyotip ve Y mikrolelesyon analizi planlanmalıdır (32).

Benzer şekilde tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde erkek partnerden karyotip analizi mutlaka çalışılmalıdır (32). Bu erkeklerde 13, 18, 21, X ve Y kromozomları için sperm anöploidi testi de planlanabilir (85–88). Bunun nedeni, bu test sonucuna göre tedavi planlanmasının değişme olasılığıdır (89). Nitekim bu bireyler doğal gebelik için denemeyi,

donor sperm kullanmayı, evlat edinmeyi veya ICSI ile preimplantasyon genetik test-anöploidi (PGT-A) seçeneğini değerlendirebilirler (89). Kanıt değeri yüksek olmayan bazı çalışmalarda anormal sperm anöploidi testi nedeniyle PGT-A yapıldığında sonuçların daha olumlu olduğu belirtilmiştir (32).

4.3.2 Karyotip Analiziyle Saptanan Nedenler

Karyotip analizi ile sayısal ve yapısal kromozomal değişikliklerin incelenmesi erkek infertilitesinin genetik açıdan değerlendirilmesinde yapılması gereken ilk testtir; zira NOA olgularının yaklaşık %15'inde ve orta düzey oligozoospermisi (ml'de 10 milyondan az spermatozoa) olan vakaların %4'ünde kromozomal bir anomali saptanmaktadır ve erkek infertilitesinde en sık görülen genetik anomalileri karyotiple saptanan patolojiler oluşturmaktadır (33,90). Sperm konsantrasyonundan bağımsız olarak habitüel abortus, malformasyonlar, gelişim geriliği açısından kişisel veya aile öyküsü olan olgularda da karyotip incelemesinin yapılması gerekmektedir (32).

Sayısal ve yapısal kromozomal anomalilerin mayoz sırasında kromozom sinapsisini bozarak spermatojenik defektlere sebep olduğu düşünülmektedir (91). Spermatogenez ile ilişkili genlerde dozaj farklılığına (delesyon/duplikasyon) yol açan kromozomal translokasyonlar veya bu translokasyonların kırık noktalarının spermatogenez ile ilişkili bir gende yer alması diğer patojenik mekanizmaları oluşturmaktadır (92).

NOA'da en sık görülen kromozomal anomali Klinefelter sendromu olarak adlandırılan 47,XXY kromozom kuruluşu ve varyantlarıdır (47,XXY/46,XY mozaikliği, 48,XXXY, 49,XXXXY, 45,X/47,XXY). Translokasyon ve inversiyon gibi yapısal kromozomal anomaliler oligozoospermi olgularında daha sık görülmektedir (83).

4.3.2.1 Klinefelter Sendromu

Genel popülasyondaki sıklığı 1/600 iken NOA olgularında 7 erkekten 1'inde görülmektedir (80). Bu olguların testisleri sert ve küçüktür ve testis histolojisinde seminifer tübüllerde yoğun hiyalinizasyon izlenir. Spontan puberte görülmekle birlikte androjenizasyon zayıftır; zayıf virilizasyon, jinekomasti veya hipergonadotropik hipogonadizm görülebilir. Aynı zamanda metabolik sendrom, otoimmün hastalık, venöz tromboembolizm ve bilişsel veya psikiyatrik rahatsızlıklar bu olgularda genel topluma göre daha sık görülür (93,94).

Klinefelter sendromunda en sık görülen semen bozukluğu (>%90) NOA'dır (93,94). Bununla birlikte özellikle mozaik ve/veya erken yaştaki vakalarda semende spermatozoa ve doğal gebelik literatürde bildirilmiştir (95). Bu olgulara yapılan TESE işleminde prognozun başlıca belirleyicisi yaştır ve 31 yaş altında sperm elde etme başarısı anlamlı ölçüde daha yüksektir (96,97). Mikrocerrahi olarak yapılan mikro-TESE'nin başarısı ise %50'lere yaklaşmaktadır (98). Erken yaşta tanı alan vakalarda kriyoprezervasyon ile spermatazoa muhafaza edilebilir (93). TESE ile elde edilen spermatozoa intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile oositi suni döllemede kullanılır. Bu bireylerde semende sperm anöploidisinde artış görüldüğünden ICSI sonrası PGT-A ile embriyoların kromozomal anomaliler açısından taranması önerilmektedir (99,100). Bununla birlikte şu ana kadar ICSI ile sağlanan döllemelerden seks kromozom anöploidisi olan birey bildirilmemiştir (32).

4.3.2.2 46,XX Erkek Sendromu

SRY geninin %80-90 translokasyon sonucu X kromozomunda yer almasından kaynaklanır (101,102). Bu olgularda erkek fenotipi görülebilmekle birlikte inmemiş testis, jinekomasti, hipoandrojenizm veya belirsiz cinsel organ (ambigius genitalia) sıklığı da artmıştır (103). Erkek fenotipi olan olguların tamamı azoospermiktir (103). Bu hastalarda Y kromozomunda bulunan AZF bölgesi yer almadığından TESE ile sperm eldesi mümkün değildir (104).

Y kromozomunda mikroskobik olarak görülebilen izodisentrik Y kromozomu, halka yapısındaki Y kromozomu ve diğer yapısal defektler önemlidir (105,106). Y kromozomu yapısal anomalilerinde mozaiklik sıktır ve 45,X içeren hücrelerin oranı TESE başarısını olumsuz etkilemektedir (105,107). Y kromozomunda AZF bölgelerinin korunmuş olması iyi prognozu gösterir, bu nedenle AZF mik rodelesyonlarının değerlendirilmesi önemlidir (32). Y kromozomu yapısal anomalileri genellikle hipoandrojenizm veya genel sağlık sorunlarıyla ilişkili değildir (83).

Otozomal kromozomlarda Robertsonian veya resiprokal translokasyonlar ve inversiyonlar yapısal anomali olarak oligozoospermik olgularda (bu olguların %4-8'inde) normozoospermiklere göre 10 kat daha sık görülür (90). Erkekteki bu yapısal anomaliler fetüste anöploidi, dengesiz kromozomal translokasyon ve imprinting hastalıkları riskini arttırdığı için bu bireylere PGT önerilmelidir (33,83).

4.3.3 Y Mik rodelesyonları

Kırık noktalarına göre AZFa, AZFb ve AZFc olarak isimlendirilirler (104,107). Genel popülasyonda AZF bölgesinin tamamen yokluğu oldukça nadirdir (1/4000); ancak idiyopatik NOA olgularının %10'unda, şiddetli oligozoospermik (ml'de 2 milyonun altında) bireylerin %5'inde görülmektedir (108). AZF mik rodelesyonları azoospermi ve şiddetli oligozoospermi vakalarının en sık moleküler genetik nedenini oluşturmaktadır; bu nedenle klinik uygulamada bu bireylerde AZF mik rodelesyonlarının değerlendirilmesi gerekmektedir (107).

AZF mik rodelesyonlarının çoğu *de novodur*; ancak oligozoospermik erkekte doğal gebelik yine de mümkün olduğundan, AZFc delesyonları ile parsiyel AZFa ve AZFb delesyonları doğal yoldan fetüse aktarılabilir (31). Testis biyopsisinde AZFa mik rodelesyonunda Sertoli Cell Only (SCO), AZFb veya AZFb + AZFc mik rodelesyonlarında spermatojenik arrest görülür ve bu olgular hemen daima azoospermiktir (2, 28,31). AZFc mik rodelesyonlarında ise hasta azoospermik veya oligozoospermik olabilir; bu nedenle TESE ve ardından ICSI ile kendi biyolojik çocuklarına sahip olabilirler (82,107,109). Nitekim AZFc delesyonu olan erkeklerin yaklaşık %50'sinde TESE ile sperm elde edilebilmektedir (32).

Komplet AZFa veya AZFb delesyonu erkeklerde TESE ile sperm elde dilemez (32). Bununla birlikte kullanılan primer sayısına göre kısmi AZFa ve AZFb delesyonlarını yakalamak mümkündür, ancak bunlarda prognozu öngörmek de bir o kadar güçtür (110,111). *DDX3Y* bölgesini de içeren AZFa delesyonlarında spermatojenik yetersizlik görülürken, *USPY9* bölgesini içeren ama daha küçük AZFa delesyonlarında spermatogenez üzerinde herhangi bir olumsuz etki görülmez (111). Benzer durum küçük AZFb delesyonları için de geçerlidir (112).

AZFc delesyonu taşıyıcısı kişinin, TESE ve ICSI işlemi ile döllenme sağlandığında, fetüsün erkek olması durumunda, aynı mikrodèlesyonun taşıyıcısı olacağı ve delesyonun bir sonraki nesilde genişleyebileceği konusunda bilgilendirilmesi gerekir (113,114). AFZc delesyonunda sperm üretimindeki azalma progresiftir; bu açıdan erken dönemde koruyucu kriyopreservasyon fertilitenin korunmasına yardımcı olabilir (107).

4.3.4. Monogenik Nedenler

Androjen reseptör (*AR*) geni kantitatif spermatojenik bozukluklara yol açabilir. X kromozomu üzerinde yer alan genin mutasyonlarının fenotipik spektrumu oldukça geniştir. Fenotipin dışı olduğu komplet androjen duyarsızlığı sendromu (AIS – *androgene insensitivity seyndrome*), zayıf virilizasyon gösteren erkek fenotipinin olduğu kısmi androjen duyarsızlığı sendromu (PAIS – *partial androgene insensitivity seyndrome*) veya sperm üretiminde bozukluk haricinde tamamen normal erkek fenotipinin olduğu hafif androjen insensivite sendromu (MAIS – *mild androgene insensitivity seyndrome*) görülebilir (115). İnfertilite nedeniyle başvuran erkek bir olguda PAIS ya da MAIS'ten şüpheleniliyorsa, örneğin yüksek androjen sensivite indeksi (testosteron ve LH serum düzeylerinin çarpımıyla elde edilir) ile birlikte hipoandrojenizm mevcutsa *AR* mutasyonları araştırılabilir; nitekim PAIS'te bu mutasyonlar %41 sıklıkla görülmektedir (116).

Duktal obstrüksiyona neden olarak azoospermiye yol açan konjenital vas deferens yokluğu (CAVD) söz konusu ise *CFTR* mutasyonları araştırılmalıdır; nitekim renal agenezisin eşlik etmediği CAVD olgularının %80'inden bu genin mutasyonları sorumludur (117). Unilateral CAVD infertil erkeklerin %1-2'sinde görülmektedir; tek taraflı olduğu için fertil de

olabilirler (55). Bilateral olması durumunda tipik olarak semen volümü 1 ml'nin altında ve asidik (pH<7), semende spermatozoa ve immatür germ hücrelerinin yokluğu ile karakterizedir (118). *CFTR* mutasyonları hafif ve ağır mutasyonlar olarak ikiye ayrılır ve fenotipin şiddetini belirler: otozomal resesif geçiş gösteren bu mutasyonlar iki hafif veya bir hafif ve bir ağır mutasyon olması durumunda CAVD'a neden olur. Testiküler fonksiyonlar normal olduğundan TESE ile kolaylıkla sperm elde edilir ve ICSI ile döllenme gerçekleştirilir. Ancak erkek bireyin mutasyonu aktarma riski vardır ve kistik fibrozis hastalığı için taşıyıcılık yüksek olduğu için eşi *CFTR* mutasyonu açısından taranmalıdır. Risk durumunda PGT-M önerilir (83,118).

CBAVD olgularının %20'sinde, CUAVD olgularının %60'ında *CFTR* mutasyonu saptanamamaktadır (117). Yapılan çalışmalarda *CFTR*-negatif CBAVD olgularının bazılarında X'e bağlı geçiş gösteren *ADGRG2* geninde 3 farklı çerçeve kaydırıcı mutasyon tespit edilmiştir (59,119). *CFTR* mutasyonu saptanamayan olgularda bu gende tarama yapmak düşünülebilir (59,83,119).

Hipotalamik-hipofiz aksını bozarak infertiliteye sebep olan genetik nedenleri tespit etmek önemlidir. Konjenital hipogonadotropik hipogonadizm (KHH) nadir görülen, bununla birlikte değişkenlik gösteren ekspresivite, penetrans ve kalıtım paterni ile oldukça kompleks bir genetik hastalıktır (120). Klasik fenotipi pubertenin gecikmesi ya da yokluğu, hipoandrojenizm, jinekomasti, kriptorşidizm, mikropenis ve küçük testisler olmakla birlikte tek bulgu hafif hipoandrojenizm de olabilir (120). KHH anosmi veya hiposmi ile birlikte olduğunda Kallmann sendromu olarak isimlendirilir (120). Gelişimsel gerilik, yarı damak, orta yüz defektleri, dental agenezis, tek taraflı böbrek agenezisi veya işitme defektiyle seyreden sendromik KHH olguları da vardır (120). Nitekim KHH ile ilişkili genler aynı zamanda Goldon Holmes, CHARGE, Waardenburg sendromu gibi klinik tablolarla da ilişkilidir (120).

KHH genetiği birkaç nedenle oldukça komplekstir. *FGFR1*, *PROKR2* gibi bazı genlerdeki aynı mutasyonlar Kallmann sendromuna yol açabileceği gibi normosmik KHH fenotipine de neden olabilir. Genetik danışmanlık açısından hangi fenotipe yol açacağının öngörülememesi kompleks bir durum yaratır. Kalıtım paterni klasik Mendelian kalıtım dışında %15 olguda digenik veya oligogenik seyir gösterir (121,122).

KHH'nin altta yatan genetik nedenlerinin ortaya konması hastaların %80'ininde gonadotropin tedavisiyle 9-18 ay içerisinde spermatogenezin sağlanabilmesi ve özellikle spontan gebelikte mutasyonların fetüse aktarılma riskinin varlığı açısından önemlidir (123). Mevcut durumda yeni nesil dizileme ile olguların %40 kadarına genetik tanı konabilmektedir (84,120).

Oligoastenozoospermi ile seyreden ve büyük baş ile çok sayıda flagella içeren spermatozoa olarak tanımlanan makrozoospermi olgularının %87.7'sinden *AURKC* genindeki homozigot c.144delC mutasyonu sorumludur (124,125). Başka bir genetik etiyolojinin bulunmadığı bu sperm fenotipine sahip olgularda in vitro fertilizasyon (IVF) öncesi *AURKC* geninde mutasyon varlığının araştırılması gereklidir (124). Mutasyona sahip bireylerin spermlerinin tamamı poliploid olduğundan ICSI önerilmez (83).

Globozoospermi infertil erkeklerin %0.1'inde görülen, akrozom içermeyen yuvarlak sperm başıyla karakterize spermatozoa fenotipini ifade eder ve akrozom içermediği için zona pellusidada akrozom reaksiyonu gerçekleştiremez ve döllenme olmaz (83). İnsanlarda *DPY19L2*, *ZPBP*, *PICK1* ve *SPATA16* olmak üzere dört gen globozoospermi ile ilişkilendirilmiştir ve bunlar arasında *DPY19L2* genindeki delesyon başta olmak üzere homozigot mutasyonlar olguların %60-80'ini oluşturmaktadır (126). Semendeki tüm spermilerin globozoospermik olması durumunda bu genin mutasyonlarının taranması önerilmektedir (127). Aynı yaş grubunda başka nedenlerle infertil olanlara göre fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları düşük olsa da, %100 globozoospermi fenotipi olan olgularda ICSI dışında bir seçenek bulunmamaktadır (128).

Primer silier diskinezi (PSD) silia motilitesinin olmaması nedeniyle kronik solunum yolu enfeksiyonlarıyla seyreden, anormal yerleşim gösteren iç organlar ve astenozoospermiye bağlı infertilite ile karakterize nadir, otozomal resesif geçiş gösteren bir tablodur (129). Olguların %30'undan *DNAH5* ve *DNAH5* mutasyonları sorumludur (126). Hastaların çoğunda spermier ışık mikroskopunda normal gözüktür; ancak dinein yokluğu, mikrotübüler translokasyonlar gibi ultrayapısal defektler elektron mikroskopisi ile tespit edilebilir (126,130).

ICSI ile gebelik mümkündür ve başarı oranları fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum parametrelerinde sırasıyla %58-65, %45-55 ve %35-36'dır (128).

Genel ve iyi bilinen bu örnekler dışında NOA'nın sendromik olmayan ve literatürde bildirilmiş olan monogenik nedenleri Tablo 4.5'te özetlenmiştir.

Tablo 4.5. NOA'nın sendromik olmayan genetik nedenleri

Nonsendromik Azoospermi Genleri	Kalıtım Paterni	Fenotip Özellikleri	OMIM
<i>SYCP2</i>	OD	Primer spermatosit evresinde MA NOA	258150 (131)
<i>MSH4</i>	OR	Azalmış testis volümü 1. kromozom perisentrik inversiyonu Azalmış FSH, LH NOA Dişilerde POY	108420 (132)
<i>SYCP3</i>	OD	MA, dişilerde birinci trimester TGK NOA	270960 (133)
<i>NR5A1</i>	OD	Azoospermi, oligospermi, kriptozoospermi	613957 (134)
<i>NANOS1</i>	OD	Azoospermi, SCO	615413 (135)
<i>TAF4B</i>	OR	Azalmış testis volümü NOA Artmış FSH Normal LH, T, P	615841 (136)
<i>ZMNYD15</i>	OR	MA NOA Tübüler membranda kalınlaşma Artmış FSH Normal LH, T, P	615842 (136)
<i>SYCE1</i>	OR	MA NOA	616950 (137)
<i>MEIOB</i>	OR	XY bivalentlerinde azalma Metafaz spermatositlerinde azalmma Tübüllerde piknotik nükleuslar NOA	617706 (138)

<i>TEX14</i>	OR	MA Metafaz spermatositleri yokluğu NOA	617707 (139)
<i>TEX15</i>	OR	Azalmış testis volümü NOA Oligozoospermi veya kriptozoospermi Artmış FSH ve LH Azalmış T ve inhibin B	617960 (140)
<i>FANCM</i>	OR	Azalmış testis volümü Oligoastenozoospermi (bazı hastalarda) NOA SCO Yüksek FSH ve LH Düşük T	618086 (141)
<i>SPINK2</i>	OR	Oligozoospermi İmmotil sperm Akrozom yokluğu Seminifer tübül yapılarında disorganizasyon İmmatür gem hücreleri NOA	618091 (142)
<i>TDRD9</i>	OR	İnkomplet matürasyon arresti Bazı seminifer tübüllerde SCO paterni NOA	618110 (143)
<i>SOHLH1</i>	OD	SCO NOA	618115 (144)
<i>MIAP</i>	OR	Şiddetli oligozoospermi Kriptozoospermi NOA Spermatosit evresinde MA (çoğu hasta) Yuvarlak spermatid evresinde MA (bazı hastalarda) Elektron mikroskopisinde mitokondriyel kılıfta ödem	619108 (145)
<i>XRCC2</i>	OR	Azalmış testis volümü Zigoten aşamasında MA NOA	619145 (146)
<i>C14orf39</i>	OR	Spermatosit evresinde MA (çoğu hasta) Dişilerde POY NOA	619202 (147)
<i>PNLDC1</i>	OR	Oligoastenoteratozoospermi Geç pakiten evresinde MA Bazı hastalarda düşük T	619528 (148)

		NOA	
<i>TERB2</i>	OR	MA NOA	619645 (149)
<i>TERB1</i>	OR	MA NOA	619646 (149)
<i>STAG3</i>	OR	MA NOA Kromozomal akslarda kısalık ya da yokluk Kohezin aksının yokluğu Sentomer sayısında artış	619672 (150)
<i>RNF212</i>	OR	MA NOA İlk mayotik bölünmede apoptoz Crossover oluşumlarının yokluğu Univalent oluşumu	619673 (151)
<i>FBXO43</i>	OR	Düşük sperm sayıları Progresif motilitede azalma Teratozoospermi Büyümüş amorf sperm başları Lakunar kromatin defektleri NOA MA	619696 (152)
<i>PDHA2</i>	OR	NOA Şiddetli oligoastenozoospermi Nekrozoospermi HS MA	619828 (153)
<i>ZSWIM7</i>	OR	Azalmış testis volümü NOA MA Azalmış rekombinasyon İnkomplet sinapsis	619831 (154)
<i>MOV10L1</i>	OR	NOA MA	619878 (155)
<i>MSH5</i>	OR	Azalmış testis volümü NOA MA Düşük T Dişilerde POF	619937 (156)
<i>SHOC1</i>	OR	Azalmış testis volümü NOA Zigoten aşamasında MA	619949 (157)

<i>TEX11</i>	X'e bağı	Azoospermia MA Miks testiküler atrofi	309120 (139)
<i>GCNA</i>	X'e bağı	İnfertilite Şiddetli oligoastenozoospermi NOA Premayotik MA	301077 (158)

Kısaltmalar:MA, matürasyon arresti; NOA, non-obstruktif azoospermi; POY, prematür overyen yetmezlik;

TGK, tekrarlayan gebelik kaybı; OR, otozomal resesif; OD, otozomal dominant; T, testosteron; FSH,

foliküle stimüle edici hormon; LH, luteinize edici hormon

4.3.5. Erkek İnfertilitesinde Aday Gen Yaklaşımları

Spermatogenez bozukluğu olan olguların %40'ında genetik etiyoloji tespit edilememektedir (82). Bunların genetik etiyolojisini aydınlatmada çeşitli yaklaşımlar sergilenmiş ve ona göre yöntemler kullanılmıştır (82). Bu yaklaşımlardan birisi aday gen arama yaklaşımıdır. Spermatogeneizde rol oynadığı düşünülen yaklaşık 2000 gen olmakla birlikte ve bazı genlerde patolojik varyantlar saptanmış olmasına rağmen, bunların validasyon çalışmaları başarısız olmuştur (159,160). Aday gen çalışmaları çoğunlukla nadir varyantlarla ilişkilidir. Öte yandan sık görülen varyantlar için tek nükleotid polimorfizmi (SNP) dizin (array) analizi kullanılmış ve globozoospermide başarılı bir şekilde iki aday gen olan *SPATA16* ve *DPY19L2* genlerinin bulunmasını sağlamıştır (161,162). SNP array teknolojisine dayalı Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) tek aday gen çalışmalarında olduğu gibi anlamlı nadir varyantlar bulunmasına karşılık çoğu için validasyon çalışmaları yapılmamıştır (160,163,164). Netice olarak GWAS, sık görülen varyantların erkek infertilitesine anlamlı ölçüde katkıda bulunmadığını göstermiştir; buna karşılık teyit edilmiş sık görülen SNP'lerin, düşük etkili olsa da aynı bireyde bulunduğu zaman spermatogenezi etkileyebileceği de öne sürülmüştür (165,166).

SNP array ve GWAS dışında karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) dizin'ler infertilite hastalarında kopya sayısı değişikliklerini (CNV) saptamak üzere kullanılmıştır (167). Örneğin Yazarbaş ve ark. 19p, Xp ve Xq'da kopya sayısı artışları saptarken Xq, 22q, Yq Xp ve

11q'da delesyonlar saptanmışlardır (168). Çalışmalar arasında örtüşen CNV'ler bulunmamakla birlikte, bazı araştırmaların sonucunda belli bölgeler saptanmıştır. Örneğin X kromozomuna bağlı CNV'leri tespit etmek için yapılan bir CGH'de *CNV67* genindeki kopya sayısı değişiklikleri anlamlı bulunmuştur (168,169). *TEX11* intragenik delesyonları da X kromozomuna özgü CGH dizin ile keşfedilmiştir (170). Daha sonraki çalışmalarda da *TEX11* geninin mutasyonlarının komplet mayotik arrest ile ilişkili olduğu kesinleşmiştir (170,171).

CNV'ler açısından göz önünde bulundurulması gereken diğer bir nokta ise üç farklı çalışmada CGH array kullanılarak saptanılan CNV yükünün infertil erkeklerde anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmasıdır (172–174). Bu yüksek CNV yükü bazı infertil erkeklerin genomlarının çok stabil olmadığı ve DNA kaybına yatkın olduğunu gösteriyor olabilir. Bu durum spermatogenez dışında genel sağlığı da etkilebilir ki bu da infertil erkeklerde fertil erkeklere göre daha anlamlı ölçüde görülen yüksek morbidite ve düşük yaşam beklenti süresiyle uyumludur (72,175).

4.4 *MLH1*, Mayoz ve İnfertilite İlişkisi

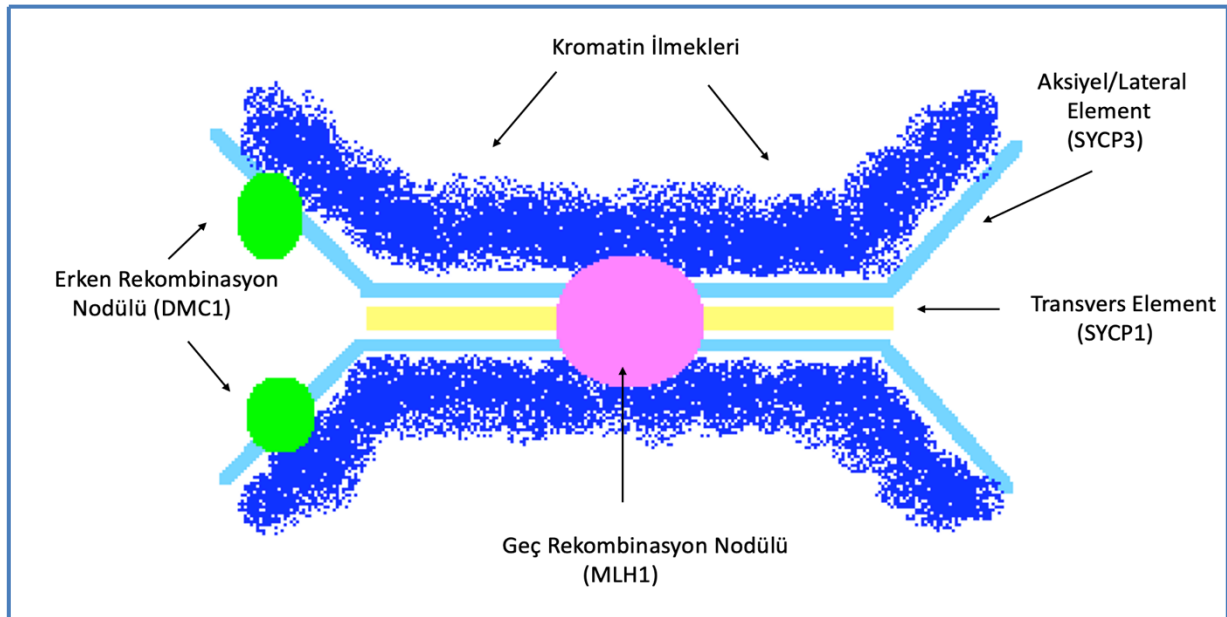
Spermatogenez sürecinde kromozom eşleşmesi ve sinapsis, homolog rekombinasyon, genetik bütünlük, DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli proteinlerin ekspresyonları artar. *MLH1*'in de içinde yer aldığı DNA onarım proteinlerinin spermatogenezin doğal işleyişi içerisinde çok önemli bir yeri vardır (176).

Mayoz, 23 kromozomlu haploid kuruluştaki gamet oluşumu için 46 kromozom içeren diploid germ hücrelerinin ardı ardına iki bölünme geçirdiği bir süreçtir. Kromozom sayısının yarıya inmesi döllenme sonrası diploid yapıda zigot oluşabilmesi için gereklidir ve bu sırada kromozom homologlarının gametlere rastgele dağılması genetik çeşitliliğinin sağlanmasının önemli bir basamağını oluşturur (177).

Genetik çeşitliliği sağlayan diğer basamak ise birinci mayotik bölünmeden evvel homolog kromozomların birbirini bularak sinapsis oluşturmaları, genetik materyal alışverişinde

bulunmaları, yani rekombinasyondur. Genetik materyal alışverişi Profaz I'de gerçekleşir ve pek çok insan, fare ve ökaryot çalışmasında gösterildiği gibi yanlış eşleşme onarımı proteinlerinin kusursuz çalışmasını gerektirir (178–181). Profaz I leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinesis evrelerinden oluşur. Leptoten aşamasında kromozomlar kalınlaşır ve homologlar sinapsis yapmaya başlar, çift zincir kırıklarının (ÇZK) da bu dönemde oluşmaya başlamasıyla rekombinasyon süreci başlar (182,183). Rekombinasyon için homolog kromozomların eşleşmesi sinaptonemal kompleks (SK) adı verilen özel bir yapı ile stabilize olur (Şekil 2), bu yapının oluşumu da zigoten aşamasında tamamlanır (176,184,185). MLH1 proteini bu yapıda geç rekombinasyon nodülü içerisinde yer alır ve çift zincir kırıklarından genetik materyal transferinin gerçekleşmesinde önemli bir rol oynar (176).

Şekil 4.2. Sinaptonemal kompleks yapısı ve MLH1'in yerleşimi

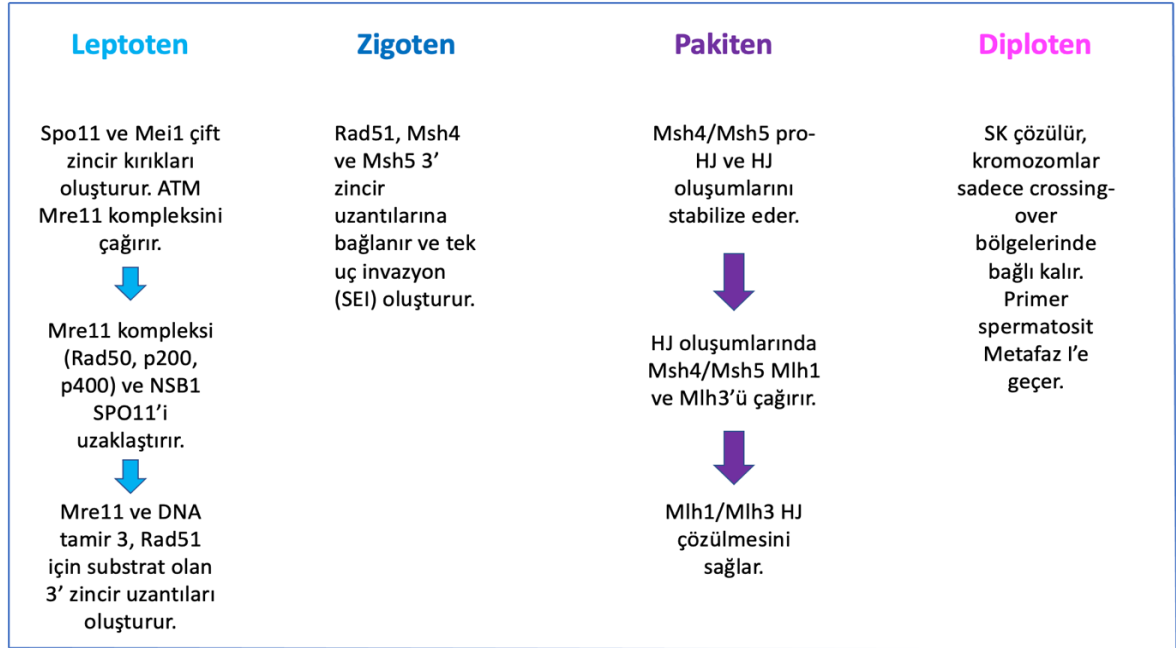


SK iki aksiyel/lateral ve bir transvers elementten oluşan üçlü bir yapıdır. Leptoten aşamasında her homologun iki kardeş kromatidine ait DNA aksiyel elementlere bağlanır. Zigoten aşamasında transvers element aksiyel elementleri birbirine yaklaştırır. Pakiten matür SK ve sıkıca bağlanmış DNA ile sinapsis süreci tamamlanır. Rekombinasyon bu yapıda gerçekleşir. Erken rekombinasyon nodülleri çift zincir kırıklarının bulunduğu bölgeleri temsil eder ve MLH1'in de içinde yer aldığı geç rekombinasyon nodülü bu kırıklardan bazılarında rekombinasyon gerçekleşmesini sağlar. Pakiten sonrası SK dağılır, kiazmatlar (crossing over bölgeleri) geç metafaz I/anafaz I'e kadar homologları bir arada tutar.

4.4.1 Rekombinasyonda Rol Oynayan Proteinler

Rekombinasyonda görev alan proteinler Şekil 4.2’de özetlenmiştir. SPO11 proteini bir topoizomerez varyantıdır (176). Leptoten sırasında çift zincir kırıklarının oluşabilmesi için gereklidir ve olmadığında çift zincir kırıkları oluşmaz ve mayoz defekti ortaya çıkar (176,183,186,187). Fare modellerinde *Atm*, *Dmc1*, *Mei1* defektleri de SPO11 ekspresyonunda ya da lokalizasyonunda bozulmalara neden olur ve bu da bu genlerin ürünlerinin SPO11 ile birlikte çalıştığını düşündürmektedir (188–193).

Şekil 4.3. Homolog rekombinasyonda rol oynayan proteinler



Kısaltmalar:HJ, holiday junction

SPO11, erken mayotik dönemde yüksek düzeyde eksprese olan *Mre11* tarafından çift zincir kırığı bölgesinden uzaklaştırılır (194). Bu protein RAD50, p200, p400 ve NBS1 gibi proteinler içeren bir kompleksle birlikte çalışır ve çift zincir kırıklarından 3' serbest uçlar oluşturur (183). Bu 3' uçlar tek uç invazyon yapısı olarak (single-end invasion-SEI) görev görür ve RAD51 ile diğer yanlış eşleşme onarımı proteinleri tarafından substrat olarak kullanılır (181,183).

SK yapısını oluşturan proteinler son derece önemlidir, nitekim bu yapı homolog çiftleri stabil kılar ve diğer rekombinasyon proteinleriyle etkileşimi sağlar (181,184,195). SK oluşumu leptoten ve zigoten evrelerini kapsar ve bu süreç boyunca diploten aşamasında dağılıncaya kadar eşleşmiş ve sinapsis yapmış homolog kromozomları bir arada tutar. Leptoten aşamasında Zip3/SYCP3 ekspresyonu başlar (176). Zip3/SYCP3 ekspresyonu erken zigoten aşamasında Zip2/SYCP2'nin kromozomlarla etkileşmesini sağlar, bu etkileşim homolog çiftler boyunca Zip1/SYCP1 polimerizasyonunu tetikler (182,184,195). Mayadaki Zip proteinlerinin memelideki karşılığı SYCP1-2-3'tür (185). SYCP3 ilk olarak leptotende eksprese olur ve kondense kardeş kromatidlerle etkileşir. SYCP3, SYCP2'nin homolog çiftin lateral elementiyile etkileşimini doğrudan yönetir. Homolog çiftin lateral elementinde hem SYCP3 hem de SYCP2 SYCP1'in santral element ile etkileşmesini sağlar (176,182,184,195).

RAD51 rekombinasyonda ve çift zincir kırıklarının onarımında rol alır (181,183). Ekspresyonu leptotende başlar ve zigotenin sonlarına doğru tepe yapar (196). Sinapsis ve SEİ oluşumunda yer alan proteinlerle etkileşir. Mayada Zip3 ile Rad51 arasındaki fiziksel etkileşim gösterilmiştir (184). Rad51'in tek zincir DNA üzerinde filament oluşturduğu ve homolog çift zincirli DNA ile zincir değişimini katalize ettiği gösterilmiştir (195,197).

Memeli *Msh4* ve *Msh5* spesifik olarak germ hücrelerinde eksprese olur ve mayadaki formlarıyla temel fonksiyonel bölgeler açısından yüksek homoloji gösterir (178,198–200). MSH4 mayoza spesifiktir ancak yanlış eşleşme onarımında değil; mayoz I'de resiprokal rekombinasyon ve segregasyonda görev alır. MLH3 de spermatositlerde vardır ve MSH4 ile ko-presipite olur (178,198-200). MSH4 ve MSH5 heterodimer olarak fonksiyon gösterir. *Msh4* veya *Msh5* içermeyen farelerde çift zincir kırıkları oluşur ancak sinapsis tamamlanamaz ve primer spermatosit aşamasında başarısızlığa ve duraklamaya neden olur (178,181).

Msh4 ve *Msh5*'in RAD51 ile ko-lokalle olduğu in vivo olarak gösterilmiştir (196). *Msh4*'ün ekspresyonunun Rad51 ile benzer patern göstermesi *Msh4-5* heterodimerinin SEİ yapısının oluşumunda Rad51 ile birlikte çalıştığını düşündürmektedir (196). Rekombinasyon sırasında oluşan ve dörtlü DNA zincirinden meydana gelen, genetik materyal değişimi sırasında oluşan özel bir yapı olan holiday junction (HJ) öncesi ara bir form olan proto-HJ (pHJ) yapısının

stabilizasyonunu da sağlarlar (181,201). Msh4-Msh5 aynı zamanda rekombinasyonun tamamlanması ve HJ çözülmesi için Mlh1-Mlh3 kompleksini bölgeye çağırır (196,201).

Mlh3 ve Mlh1 pakiten ve diploten sırasında rekombinasyon nodüllerine birlikte lokalize olurlar ve burada rekombinasyon ile kiazmata ayrılmasını sağlarlar (176). Profaz I - Metafaz I transizyonunda görev alırlar (27). İnsan ve diğer canlılardaki çalışmalarda Mlh1-Mlh3 heterodimerinin HJ yapısının çözülmesinde ve rekombinasyonun tamamlanmasında rol aldığı belirtilmiştir (27,179,180,202). Ayrıca MLH1'in crossover bölgelerinde yer aldığı ve rol oynadığı pek çok fare ve insan çalışmasında gösterilmiştir (21,25,26,203–209).

4.4.2 Rekombinasyon Defektleri, Matürasyon Arresti ve *MLH1*

Pek çok organizmada yapılan çalışmalar sonucunda spermatogenez sırasında birkaç mayotik kontrol noktası olduğu ve rekombinasyon defekti olduğunda spermatogenezin durdurulduğu ve matürasyon arresti fenotipinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (176). Gözlenen matürasyon arrestinin rekombinasyon defektine bağlı olup olmadığını araştıran araştırmacılar, histolojik olarak normal spermatogenez gözlenen bireylerle testis biyopsisinde matürasyon arresti olan NOA olgularında rekombinasyon olaylarının sıklığını ve lokalizasyonunu karşılaştırmışlardır (21,210). İnfertil olguların neredeyse yarısında spermatogenez sırasında ölçülebilir rekombinasyon defekti saptanmış, bu da profaz I'in zigoten aşamasında arrest olan erkeklerin, fare modellerindeki gibi rekombinasyon genlerinde defekt olabileceğini düşündürmüştür (210). NOA olgularında sinapsis oluşumu ve/veya rekombinasyonda herhangi bir problem olup olmadığını araştıran başka çalışmalarda da sinaptik defektlerde artma ve rekombinasyonda azalma gösterilmiştir (182,211). Erkeklerde *MLH1* ekspresyon kaybı farelerde görülen bir azoospermi fenotipine yol açar (212,213). Başka bir çalışmada da NOA'lı olgularda MLH1 pozitif lokusların ve primer spermatidlerin sayısının OA'lı bireylere göre azaldığı gösterilmiştir (180). Tüm bu veriler MLH1 ekspresyonunda azalmanın rekombinasyonu olumsuz etkilediği ve germ hücresi yetmezliğine yol açtığını düşündürmektedir (180).

Bu verilere dayanarak, araştırmamızın amacı testis biyopsisinde matürasyon arresti saptanan NOA olgularında *MLH1* geninin dizileme ile saptanabilen patojenik ve olası patojenik varyantlarının varlığını göstermek ve matürasyon arresti fenotipiyle bağlantısını ortaya koymaktır.



GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız ile ilgili etik kurul kararı 09.04.2020 tarihinde İ4-210-20 no.lu karar ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurul onayıyla alınmıştır. Çalışma 1002 TÜBİTAK Hızlı Destek Projesi olarak projelendirilmiş ve 220S004 numarasıyla mali olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

5.1. Olguların Seçimi

5.1.1 Olguların Değerlendirilmesi

AÜTF Kısırlık Merkezinde, Prof. Dr. Kaan Aydos gözetiminde 2019-2020 tarihleri arasında azoospermi nedeniyle başvuran ve katılma kriterlerine uyan bireyler aydınlatılmış onamları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Semen analizi, testis volümlerinin skrotal ultrasonografi ile değerlendirilmesi, hormon profili (FSH, total testosteron), bilinen genetik etiyolojilere yönelik periferik kandan karyotip analizi ve Y mikrolezyon testi rutin değerlendirme kapsamında yapılmıştır. Bunların yanı sıra sperm elde etmek amaçlı yapılan TESE işlemi sırasında yeterli miktarda testis dokusunda patolojik inceleme yapılmıştır. Bu veriler ve yapılan mikro-TESE işleminde sperm elde edilip edilmediği kayıt altına alınmıştır. TESE sonucunda sperm elde edilmesi “pozitif”, sperm elde edilememesi ise “negatif” olarak ifade edilmiştir. Ayrıntılı özgeçmiş ve soy geçmiş sorgulaması yapılmıştır. Bireysel ve en az üç kuşak ailede kanser öyküsü (kanseri tipi, tanı yaşı, aldığı tedaviler), ailede infertilite, adet düzensizliği, prematür overyen yetmezlik (erken menopoz), tüp bebek tedavisi gören bireylerin varlığı, ailede genetik hastalık öyküsü ve ailede akraba evliliği sorgulanmıştır.

5.1.2 Olguların Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

Araştırmaya başlıca dahil edilme kriteri semen analizinde WHO kriterlerine göre azoospermi saptanması ve testis biyopsisinde matürasyon arresti veya hipospermatogenez saptanması olarak belirlenmiştir (36). Ancak hedeflenen sayıda matürasyon arresti hastasına ulaşıldığı için hipospermatogenez hastaları çalışmaya alınmamıştır. Diğer bir dahil edilme kriteri, azoospermi ve infertiliteyi açıklayan genetik ya da genetik dışı bilinen bir neden olmamasıydı. Çalışmaya dahil olabilmek için 18 yaşını tamamlamış olma şartı aranmıştır. Pandemi nedeniyle hedeflenen hasta sayısı 40 ile sınırlı tutulmuştur, proje sonunda 42 matürasyon arresti hastasına ulaşılmıştır.

NGS ile patojenik ve olası patojenik olarak saptanan varyantlar Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanmıştır. Segregasyon analizi aile bireylerine ait DNA örneklerine ulaşılamadığından yapılamamıştır.

Dışlanma kriterleri aşağıdaki gibidir:

- 1- Orşit, kabakulak, testis torsiyonu, testis travması, testis tümörü, kriptorşidizm (inmemiş testis), bilateral vas deferens, vazektomi ve diğer ürolojik hastalık öyküsü olanlar
- 2- Radyoterapi ve kemoterapi gibi gonadotoksik tedavi almış olanlar
- 3- Hormon profilinde hipogonadotropik hipogonadizm saptanan olgular
- 4- Periferik kan karyotip analizinde yapısal ve sayısal kromozomal anomali saptanmış olan bireyler
- 5- Y mikrolelesyon testi sonucu AZFa, AZFb veya AZFc delesyonu saptanmış olgular
- 6- Testis biyopsisinde Sertoli cell only sendromu ve atrofik testis saptanan olgular

5.2 Periferik Kan Örneklerinin Alınması

Projede *MLH1* geninde gametik varyantların saptanması hedeflenmiştir. Periferik kanda dolaşan lökositlerin DNA'sında bu varyantların saptanması mümkündür. Bu amaçla EDTA'lı

mor tüpte 2.5 cc kan alınmıştır. DNA izolasyonu en kısa sürede yapılmış, en kısa sürede yapılamaması halinde -20C°’de saklanmıştır.

5.3 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için silika membran spin kolon tekniğine dayalı bir DNA pürifikasyon kiti olan PureLink® Genomic DNA mini kiti (Katalog no: K1820-01) kullanılmıştır (214). Kit içeriği Tablo 5.1’de listelenmiştir.

Tablo 5.1. PureLink® Genomic DNA mini kit içeriği

Komponent	Miktarı	Saklama sıcaklığı
PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer	10 mL	Oda sıcaklığı
PureLink® Genomic Digestion Buffer	9 mL	Oda sıcaklığı
PureLink® Genomic Wash Buffer 1	10 mL	Oda sıcaklığı
PureLink® Genomic Wash Buffer 2	7.5 mL	Oda sıcaklığı
PureLink® Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)	10 mL	Oda sıcaklığı
RNase A (20 mg/mL) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA	1 mL	Oda sıcaklığı
Proteinase K (20 mg/mL) in storage buffer (proprietary)	1 mL	Oda sıcaklığı
PureLink® Spin Columns with Collection Tubes	50	Oda sıcaklığı
PureLink® Collection Tubes (2.0 mL)	100	Oda sıcaklığı

Kit içinde olmayan gerekli malzeme ve cihazlar: %100 etanol, steril mikrosantrifüj tüpleri, PBS, en az 10.000 x g yapabilen mikrosantrifüj cihazı, ısı bloğu

Solüsyonların hazırlanışı: PureLink® Genomic Wash Buffer 1 ve 2'ye ürünlerin üzerinde yazan oranda %100 etanol eklendi ve etanol eklenen ürünlerin kapakları işaretlendi.

5.3.1. Lizatın Hazırlanışı

- 1- Isı bloğu 55°C'ye getirildi.
- 2- Steril mikrosantrifüj tüpüne 200 µL kan örneği, 20 µL Proteinaz K, 20 µL RNAaz A eklendi. Kısa süre için vortekslenip 2 dakika oda ısında bekletildi.
- 3- 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen karışım elde etmek için vortekslendi.
- 4- Isı bloğunda 10 dakika 55°C'de inkübe edildi.
- 5- Ardından 200 µL %100 etanol lizata eklendi, 5 saniye homojen solüsyon elde etmek için vortekslendi.

5.3.2. DNA Pürifikasyonu

5.3.2.1 DNA'nın Bağlanması:

- 1- 5.3.1'de hazırlanan lizat (yaklaşık 640 µL) koleksiyon tüpü içerisindeki spin kolonlara aktarıldı.
- 2- Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10000 x g'de santrifüj edildi.
- 3- Koleksiyon tüpü atılıp spin kolon temiz bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.

5.3.2.2 DNA'nın Yıkınması:

- 1- %100 etanol eklenmiş Wash Buffer 1'den 500 µL spin kolona eklendi.
- 2- Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10000 x g'de santrifüj edildi.

- 3- Koleksiyon tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.
- 4- %100 etanol eklenmiş Wash Buffer 2'den 500 µL spin kolona eklendi.
- 5- Oda sıcaklığında 3 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edilip, koleksiyon tüpü atıldı.

5.3.2.3 DNA'nın Elüsyonu:

- 1- Spin kolon steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 2- Kolona 100 µL PureLink® Genomic Elution buffer eklendi (arzu edilen DNA verimi ve konsantrasyona göre bu oran 25-200 µL arasında değiştirilebilir).
- 3- Oda sıcaklığında 1 dakika için inkübe edildi.
- 4- Tüp oda sıcaklığında 1 dakika için maksimum hızda santrifüj edildi. Tüp içerisinde pürifiye edilmiş genomik DNA bulunur. Kolon atıldı.

5.3.2.4. DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun değerlendirilmesi

DNA'nın konsantrasyonu ve saflığını değerlendirmek için A260/A280 değeri spektrofotometrik olarak NanoDrop2000 (Thermo Fisher) cihazı ve programı kullanılmıştır (215).

5.3.3. DNA'nın Saklanması

Saflaştırılmış DNA elde edildikten sonra doğrudan PCR aşamasına geçilebileceği gibi uzun süre saklamak üzere -20°C'de saklanabilir. Soğuk zinciri kırmamak için kısa zamanlı kullanımlar için +4 °C'de bekletilebilir.

5.4 Elde Edilen DNA'dan *MLH1*'in Ekzon ve İntron-Ekzon Bileşkelerini İçeren 19 Bölgenin PCR ile Çoğaltılması, Pürifikasyonu ve Yöntem Validasyonu

5.4.1 *MLH1* Primerleri

MLH1 genine ait 5'UTR, 3'UTR, promoter, 19 ekzon ve intron-ekzon bileşkelerini çoğaltmak için kullanılan primerlere Tablo 5.2'de yer verilmiştir (216). Primerler USCS in-silico PCR, Primer Blast ve Ensemble Blat uygulamaları ile spesifikite açısından değerlendirilmiştir.

Tablo 5.2 *MLH1* için forward ve reverse primerler

Bölge	Forward primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Ta(°C)	Boyut
Promoter dizisi P1	CGAGCAGCTCTCTCTTCAGG	CGCTGTCCGCTCTTCCTATT	56	506 bp
Promoter dizisi P2	GCCAGATCACCTCAGCAGA G	GTAGCCCTTAAGTGAGCCCG	63	531 bp
Ekzon 1	CAGAGTTGAGAAATTTGACT GG	TAAGTCGTAGCCCTTAAGTGAG	52	339 bp
Ekzon 2	TGTATGAGCCTGTAAGACAA AG	TAGTTTCCAGAACAGAGAAAGG	51	315 bp
Ekzon 3	GGGAATTCAAAGAGATTTG G	GAGGTCTCTGCAGGTAATAATAG	52	373 bp
Ekzon 4	CTCATCGTTGCCACATATTA	GTACTCAAGATCTCTGCCAAAA	51	319 bp
Ekzon 5	TCCCCTTGGGATTAGTATCT AT	CCCACAAAAGCCAATAGTCAT	51	306 bp
Ekzon 6	CACTATCTTAAGACCTCGCT TT	GCTAAACCTTGACCAGAAACTA	51	325 bp
Ekzon 7-8	AGAGGAGTCTGTGTTTTGAT TC	AGCCTGTGTATTTGACTAAAGC	54	643 bp
Ekzon 9	AGTTAGTTTATGGGAAGGAA CC	AAGAACCAGACTCCAACAGTC	52	438 bp

Ekzon 10	ATAGTAAGATAGTGGGCTG GAA	TACCTGTAAGAAGGGACAGAAC	54	432 bp
Ekzon 11	TATTTGAACACACTCAGACT CG	TAGGAACAACAGCACAATACC	56	476 bp
Ekzon 12	GTACTGCTCCATTTGGGGAC	ACAGGACCATTCCAGCACCA	52	617 bp
Ekzon 13	TGTCAGATAAGCAGTCTACC AG	TTAGTAAAGGAAGAGGAGCTTG	52	468 bp
Ekzon 14	CCTCATTTGTGTTTCGTTTC	GTCGAACTTGGATTTGAAAC	51	411 bp
Ekzon 15	CATGTTTCAGGGATTACTTC TC	GGCTACCAAATGACTATTTTGC	51	356 bp
Ekzon 16	GTATATGGGGGATGAGTGTT AC	CAGAAGTATAAGAATGGCTGTC	54	319 bp
Ekzon 17- 18	GTGCTGTTTGTTCAGGATGAA	CTACATCAGCAGATGGAAGTAA	56	864 bp
Ekzon 19	CAGGACACCAGTGTATGTTG	CTGTGACATGTTCAAGACCTC	54	497 bp

*Ta: Annealing Temperature; primerler için annealing sıcaklığı

5.4.2. Hedef Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher) cihazında DreamTaq Green PCR master mix(2X) kullanılarak çoğaltıldı (216,217). PCR’da kullanılan kimyasalların miktarı ve PCR koşullarına Tablo 5.3 ve 5.4’te yer verilmiştir

Tablo 5.3 PCR’da kullanılan kimyasalların miktarı

DreamTaq Green PCR master mix(2X)	12,5 µL
Forward Primer (10pmol/µL)	1.5 µl
Reverse Primer (10pmol/µL)	1.5 µl
DNA (100-150 ng)	-(DNA konsantrasyonuna göre)

Water, nuclease free	-(Hacmi tamamlayacak kadar)
Toplam hacim	25 µL

Tablo 5.4. PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	96	5 dk	1
Denatürasyon	95	1 dk	40
Annealing	*	30 sn	
Extention	72	1 dk	
Final Extention	72	7 dk	1

*Primer dizisine göre optimize edilmiş Ta Tablo 5.2’de yer almaktadır.

5.4.3. Ürünlerin Jelde Yürütülmesi ve Yöntem Validasyonu

Kullanılan malzemeler: Tris base, borik asit, EDTA, agaroz, beher tüp

Kullanılan cihazlar: Mikrodalga fırın, Microcomputer Electrophoresis Power Supply E452 (Consort, Belgium), Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.), Gel Logic 200 Imaging System (Kodak)

Solüsyonların hazırlanması (218):

- **5x TBE (1 L):** 54 gr Tris base, 27,5 gr Borik asit ve 20 mL 0,5 mM EDTA karıştırılarak dH₂O ile 1 litreye tamamlanır. Solüsyon + 4 °C’de saklanır.
- **1x TBE:** 5x TBE solüsyonu 1:4 oranında dH₂O ile sulandırılarak hazırlanır. Solüsyon + 4 °C’de saklanır.

- **0,5 M EDTA (100 mL):** 18,61 gr EDTA ve 2 gr NaOH tableti, 80 mL distile su içinde çözdürülür, pH 8,0 yapılarak dH₂O ile hacim 100 mL'ye tamamlanır. Solüsyon + 4 °C'de saklanır.
- **Etidyum Bromid (10 mL):** 100 mg Etidyum Bromid, 10 mL distile su içinde vorteks ile karıştırılmıştır. Alüminyum folyo ile sarılarak + 4 °C'de saklanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bu amaçla 90 ml 1x TBE ve 1,8 gr agaroz beher tüpte karıştırılarak oluşan çözelti mikrodalga fırında orta (medium) ayarada 4 dakika ısıtıldı. Eriyen jel içine 1.0 µl EtBr (Etidyum Bromid) (10 mg/ml) eklenerek karıştırıldı. Jel, elektroforez aparatına döküldükten sonra soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankı 1x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi. PCR basamağında kullanılan DreamTaq Green PCR master miksinde boya olması nedeniyle görüntülemeye yükleme tamponu gerekmemektedir. 5 µl PCR ürünü agaroz jele yüklendi. 90 volt (V)'da 45 dakika elektroforez uygulandı. Jel, Kodak Gel 200 cihazında görüntülenerek, Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York) kullanılarak analiz edildi. Elde edilen bantların boyları, GeneRuler 50 bp DNA Ladder kullanılarak kontrol edildi (218).

Jel görüntülemesinde hedef bandın varlığı ve ekstra bantların yokluğu amaçlandı. Bu amaca ulaşılmadığında PCR koşulları ve kimyasalların oranı tekrar gözden geçirilerek yöntem teyit edildi. Bu yöntem ile her ampikon için ideal PCR koşulları optimize edilmiştir.

5.5 Örneklerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği ile Miseq Cihazında Dizilenmesi ve Varyantların Biyoinformatik Analizi

Her bir olgu için 19 ampikon DNA konsantrasyonlarına göre birleştirildikten sonra buz aküsü ile firmaya teslim edildi. Çalışmada, DNA kütüphanelerinin oluşturulması için “Illumina Nextera DNA Flex Library Preparation Kit” ve dizileme çalışmalarında ise “Illumina MiSeq” yeni nesil dizileme platformu kullanıldı. Çalışma öncesinde, her bir genomik DNA örneğinin yapısal bütünlüğü jel elektroforezi ile test edildi. Sonrasında DNA örneklerinin konsantrasyonu

Qubit florometre sistemleri ile ölçüldü ve uygun konsantrasyonda olanlar tespit edildi. Olası protein ve RNA kontaminasyonları da Nanodrop spektrofotometre ile incelendi.

Kütüphane hazırlama sürecinde, kullanılan kitin (Illumina Nextera DNA Flex Library Preparation Kit) önerilen üretici protokolü izlendi. Kütüphane hazırlanması sürecinde ürün saflaştırma basamaklarında Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter) kullanıldı. Dizileme basamağı, “Illumina MiSeq” dizileme platformu ile yapıldı ve 2x150bp’lik okumalar halinde gerçekleştirildi (219).

Okuma sonucunda elde edilen “.FASTQ” formatındaki ham verilerin kalite kontrolü “FastQC” programıyla yapıldı (220). “.FASTQ” verileri 5’ ve 3’ uçları kalite parametreleri önceliklenerek belli uzunluklarda kesildikten sonra “BWA mem v.0.7.12” programı kullanılarak referans genoma hizalandı (221). Hizalamanın ardından, kalite kontrol verilerine göre filtreleme işlemleri “Samtools v.1.2.0” programı ile gerçekleştirildi (221). Referans genom ile olan farklılıkların tespiti için “GATK v.4” programı kullanıldı (222). Ardından “Variant Effect Predictor” programı ile varyantların annotasyonu yapıldı (223).

“.BAM” ve “.VCF” dosyaları firmadan teslim alındı. Firmanın yaptığı analizlere ek olarak bu dosyalar ayrıca IGV programında incelenerek MutationTaster, Clinvar, PolyPhen, SIFT gibi biyoinformatik araçlar ve GnomAD ve 1000 Genomes gibi genel veritabanları ile lokus spesifik mutasyon veritabanları kullanılarak varyant analizi yapıldı (224). Elde edilen varyantlar ACMG kriterlerine göre sınıflandırılırken VarSome kullanıldı (225,226). Sınıflandırma yaparken incelenen fenotip kolon kanseri veya Lynch sendromu yerine infertilite olduğu için BP6 kriteri varyant sınıflamasına dahil edilmedi. ACMG kriterleri için Ek-1’e bakınız.

MLH1 genindeki mutasyon spektrumu HGMD (*The Human Gene Mutation Database*) kamusal verilerine göre Tablo 5.5’de belirtilmiştir (227). DNA dizileme yöntemiyle bu mutasyonların %80-90’ı tespit edilebilmektedir (228). Projemizde sadece dizileme ile tespit edilebilecek varyantlar değerlendirilmiş olup büyük delesyon ve duplikasyonların analizini

kapsamamaktadır. Dizileme ile tespit edilemediği için promoter hipermetilasyonu değerlendirilmesi de proje kapsamına alınmamıştır.

Tablo 5.5. *MLH1* Mutasyon Spektrumu

Missense/Nonsense	383
Splicing	182
Düzenleyici dizi	9
Küçük delesyon	249
Küçük insersiyon	101
Küçük indel	27
Büyük delesyon	130
Büyük insersiyon/duplikasyon	23
Kompleks yeniden düzenlenmeler	10

5.6 Saptanan Varyantların Sanger Dizileme ile Doğrulanması

Yeni nesil dizileme yöntemiyle ACMG kriterlerine göre olası patojenik, patojenik ve analizler sonucunda patojenik olma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülen önemi bilinmeyen varyantlar Sanger dizileme yöntemi ile teyit edildi. Bunun için saptanan varyantın olduğu bölgeyi kapsayan **primerler ile** bölgenin amplifikasyonu yapıldı ve jelde görüntülendi.

5.6.1 PCR Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu

Amplikonların pürifikasyonu için enzimatik yöntemle pürifikasyon yapan ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup kiti (Katalog no:78200.200.UL) kullanıldı (229).

Kitin içinde olmayan gerekli malzemeler ve cihazlar: 0,2 µL PCR tüpü, Veriti™ Thermal Cyclers

- ExoSAP-IT™ reaktifi -20°C’den çıkartıldı. 5 µL post-PCR ürünü ile 2 µL ExoSAP-IT™ reaktifi 0.2 ml’lik PCR tüpünde karıştırıldı ve 7 µL’lik reaksiyon volümü elde edildi.
- Kalıt primer ve nükleotidleri elimine etmek için 37°C’de 15 dakika inkübe edildi.
- ExoSAP-IT™ reaktifini inaktive etmek için 80°C’de inkübe edildi.

Elde edilen PCR ürünü -20°C’de kullanılabileceği kadar saklandı.

5.6.2. Dizi Analizi Reaksiyonu

Pürifiye edilen ürünlerin dizi analizi reaksiyonu için BigDye™ Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit 100rxn (Katalog no:4337455) kiti kullanıldı (230). Kit içerisindeki malzemelere Tablo 5.6’da yer verilmiştir.

Tablo 5.6. BigDye™ Terminator v3.1 cycle Sequencing kit içeriği

1 x 800µl tube of BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix
1 tube M13 (-21) Primer
1 tube pGEM Kontrol DNA
2 x 1mL tubes of 5X Sequencing Buffer

Kitin içinde olmayan, gerekli malzemeler: Vorteks cihazı, mikrosantrifüj cihazı, Veriti™ thermal cycler (Thermo Fisher)

Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan malzemeler ile miktarları ve reaksiyon koşulları Tablo 5.7 ve 5.8’de verilmiştir.

Tablo 5.7. Dizi analizinde kullanılacak malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4 µL
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	2 µL
Forward/Reverse Primer (1pm/µl)	2 µL
Pürifiye edilmiş PCR ürünü	2 µL
Deiyonize su (RNAaz ve DNAaz içermeyen)	10 µL
Toplam	20 µL

Tablo 5.8 Dizi analizi reaksiyon koşulları

	İnkübasyon	25 döngü			Duraklama
		Denatürasyon	Annealing	Uzama	
Ramp rate	-	1°C/saniye			
Sıcaklık	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Süre(dakika:saniye)	01:00	00:10	00:05	04:00	Pürifiye edilene kadar

5.6.3 Dizi Analizi Reaksiyonu Sonrası Ürünlerin Pürifikasyonu

Kullanılan malzemeler ve cihazlar: Sephadex G-50, mikrosantrifüj cihazı, spin kolon, koleksiyon tüpleri, 1.5 mL Eppendorf tüpleri

Bu basamak için SEPHADEX G-50,100 GR kullanıldı (231). Spin kolonlara 650 µL Sephadex aktararak 5200 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonlar temiz ve numaralandırılmış yeni tüplere yerleştirilip dizi analizi reaksiyonu sonrası elde edilen 10 µL’lik PCR ürünleri spin kolonlardaki Sephadex’in orta kısmına bırakıldı. Spin kolonlar 5200 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek ürün pürifikasyon işlemi tamamlandı.

5.6.4. Ürünlerin Kapiller Elektforez Yöntemiyle Yürütülmesi

Kullanılan cihazlar: Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer

Kullanılan malzemeler: Hi-Fi Formamid

Dizi analizi için Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazı kullanıldı (232). Pürifiye edilmiş 10 µL’lik PCR ürünleri, 5 µL formamid ile beraber 96-Well Plate üzerindeki kuyularda karıştırıldı. Plate bileşenleri doğru bir şekilde bir araya getirilerek cihaz üzerinde B pozisyonuna yerleştirildi. FastSeq50_POP7 run module ve 3130POP7_BDTv3-KB-Denovo-v5.2 analiz protokolü kullanıldı. Varyant değerlendirmesi için SeqScape version 2.7 ve Sequencing Analysis version 5.1 yazılımları kullanıldı.

5.7. İstatistiksel Analiz

Değişkenlerin analizinde SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, United States) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk francia testi ile değerlendirilirken varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Alel frekansların popülasyonlara göre birbiri ile karşılaştırılmasında ise Pearson Chi-Square ve Fisher Exact testi kullanıldı. Nicel değişkenler tablolarda ortalama (standart sapma) şeklinde ifade edilirken kategorik değişkenler ise n (%) olarak gösterildi. Değişkenler %95 güven düzeyinde incelendi, $p < 0.05$ olan test sonuçları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

6.1 Hasta Grubunun Özellikleri

Proje süresinde çalışmaya semen analizinde azoospermi saptanan ve TESE sırasında yapılan testis biyopsisi sonucu matürasyon arresti olarak raporlanan ve infertiliteyi açıklayan genetik ya da genetik dışı etiyoloji saptanmayan toplam 42 olgu dahil edilmiştir. Olguların TESE sonuçları, testis volümleri ve hormon profilleri Tablo 6.1’de belirtilmiştir. Olguların kan örnekleri TESE işleminin hemen öncesinde alınmıştır. Tüm olguların onamları alınmış ve araştırmacının iletişim bilgileri paylaşılmıştır. Öncelikle araştırılan fenotip matürasyon arresti olduğundan ve hedef sayıya ulaşıldığından hipospermatogenez olguları çalışmaya dahil edilmemiştir.

Tablo 6.1 Testis biyopsisinde Matürasyon Arresti Saptanan Olguların Özellikleri

Olgular	Yaş	TESE sonucu	Testis volümleri (ml/ml)	FSH (mIU/mL)	T (ng/mL)	Biyopsi sonucu
O1	48	Negatif	18/18	10	5,00	MA
O2	27	Negatif	20/20	1,7	9,00	MA
O3	27	Negatif	22/22	5	2,70	MA
O4	31	Pozitif	12/12	8	3,30	MA
O5	27	Negatif	22/22	3	6,00	MA
O6	31	Negatif	20/20	8	3,80	MA
O7	29	Pozitif	20/20	5,5	6,00	MA
O8	34	Negatif	24/24	13	4,60	MA
O9	29	Pozitif	16/16	7	3,00	MA
O10	33	Negatif	16/16	22	8,00	MA
O11	34	Negatif	16/16	9	4,00	MA
O12	40	Negatif	18/18	2,9	5,00	MA
O13	35	Negatif	16/16	1,8	7,50	MA
O14	34	Negatif	20/20	12	5,00	MA
O15	29	Negatif	18/18	4	6,50	MA

O16	33	Negatif	5/5	29	2,00	MA
O17	40	Negatif	12/12	24	4,20	MA
O18	28	Negatif	14/14	16	3,90	MA
O19	39	Negatif	16/19	46	4,30	MA
O20	27	Pozitif	14/14	14	MD	MA
O21	33	Pozitif	22/22	2	4,00	MA
O22	25	Pozitif	22/22	4	1,90	MA
O23	43	Negatif	4/4	1,2	MD	MA
O24	45	Pozitif	18/18	8	MD	MA
O25	25	Negatif	18/18	5	4,00	MA
O26	27	Negatif	16/16	4,2	5,00	MA
O27	35	Negatif	20/20	5	2,10	MA
O28	27	Pozitif	22/22	3	4,00	MA
O29	38	Negatif	10/10	13	3,40	MA
O30	37	Pozitif	16/16	21	2,20	MA
O31	31	Negatif	10/10	12	2,50	MA
O32	38	Negatif	22/22	14	3,70	MA
O33	27	Negatif	22/22	17	2,80	MA
O34	38	Negatif	12/12	14	4,00	MA
O35	34	Pozitif	4/4	37	1,70	MA
O36	42	Negatif	16/16	11	4,00	MA
O37	23	Negatif	24/24	4,6	4,20	MA
O38	29	Pozitif	22/22	8	5,00	MA
O39	28	Negatif	16/16	4	5,30	MA
O40	38	Negatif	18/18	9	8,00	MA
O41	41	Negatif	22/22	4	2,80	MA
O42	33	Negatif	20/20	6	2,80	MA

MA: Matürasyon Arrest, MD: Mevcut değil, T: Testosteron, FSH: Foliküle stimüle edici hormon, TESE: testiküler sperm ekstraksiyonu

6.2 Olgularda Saptanan Varyantlar

Olgularda saptanan varyantlar Tablo 6.2’de yer almaktadır. Varyantların hepsi *MLH1* geninin ENST00000231790.8 transkriptine göre analiz edilmiştir. Sınıflandırmada ACMG kriterleri baz alınarak VarSome insan genomik varyant arama motoru kullanılmıştır (227, 228). Buna göre benign, olası benign, önemi bilinmeyen, olası patojenik ve patojenik olarak sınıflandırılan varyantlar Tablo 6.3’te yer almaktadır. Her varyantla ilgili literatür verisi ilişkili başlıkta verilmiştir; ancak benign, olası benign ve önemi bilinmeyen varyantlar alel frekanslarının istatistiksel karşılaştırılmasına dahil edilmemiştir.

Tablo 6.2. 42 olguda saptanan *MLH1* varyantları

		c.453+79A>G(rs4234259)	c.655A>G(rs1799977)	c.1038+86T>C(rs2286939)	c.1668-19A>G(rs9876116)	c.1990-121C>T(rs2241031)	c.-93G>A(rs1800734)	c.1039-78A>G(rs11129748)	c.1897-145C>G(rs145050866)	c.1558+14G>A(rs41562513)	c.1039-8T>A(rs193922367)	c.198C>T(rs61751642)	c.*32C>T(rs200903126)	c.977T>C(rs63751049)	c.1410-54C>T(rs7633154)	c.453+25A>G(rs4647246)	c.307-29C>A(rs139620056)	c.1852_1853delAAinsGC(rs35502531)	c.*35_*37del(rs193922366)	c.885-81G>C(rs104894999)	c.454-51T>C(rs4647255)	c.454-36C>A	c.2104-57_2104-56insG	c.1559-144G>T	c.1559-131A>T c.1559-131A>T	c.1559-5535_1559-5534insCCGCTCTGCGC
O1	1			1	1	1																				
O2	1	1	1	1	1	1	1																			
O3	2	2	2	2	2	2																				
O4	2	2	2	2	2	2		2														1				
O5							1																			
O6	1		1	1	1	1		1																		
O7	2	1	2	2	2	2		2	1																	
O8	1		1	1	1	1		1		1	1															
O9							1																			
O10							2					1														
O11	2				2	2		2															1			

O 12	1	1	1	1	1		1																				
O 13	1	1	1	1	1	1	1																				
O 14	1	1	1	1	1	1	1																				
O 15							1																				
O 16							1																	1			
O 17	1	1	1	1	1		1																			1	
O 18							2																				
O 19	1		1	1	1		1																				
O 20							2					1															
O 21							1																				
O 22	1		1	1	1	1	1																				
O 23	1	1	1	1	1	1	1					1												1			
O 24	2		2	2	2					2				2	2	2											
O 25	2	2	2	2	2		2																				
O 26							1																				
O 27							2																				
O 28	2	2	2	2	2		2										1										
O 29	2	2	2	2	2																						
O 30							2																				
O 31							2																				
O 32										1	1							1	1	1							
O 33	1	1	1	1	1		1											1	1								
O 34							1																				

Tablo 6.3. *MLH1* varyantlarının ACMG kriterlerin göre sınıflandırılması

Benign	Olası Benign	Önemi Bilinmeyen	Olası Patojenik	Patojenik
c.453+79A>G rs4234259	c.1897-145C>G rs145050866	c.1559-5535_1559- 5534insCCGCTCTGCGC	c.1852_1853delAAinsGC p.Lys618Ala rs35502531	c.977T>C, p.Val326Ala rs63751049
c.655A>G (p.Ile219Val)/ rs1799977	c.198C>T, p.Thr66= rs61751642	c.1559-131A>T		
c.1038+86T> C/ rs2286939	c.453+25A>G/ rs4647246	c.454-36C>A		
c.1668- 19A>G/ rs9876116	c.307-29C>A/ rs139620056	c.2104-57_2104_56insG		
c.1990- 121C>T/ rs2241031	c.*32C>T/ rs200903126	c.1559-144G>T		
c.-93G>A/ rs1800734				
c.1039- 78A>G/ rs11129748				
c.1558+14G> A rs41562513				
c.1039-8T>A/ rs193922367				
c.1410-54C>T rs7633154				

c.*35_*37del/ rs193922366				
c.885-81G>C/ rs104894999				
c.454-51T>C/ rs4647255				

6.3.1 Benign Varyantlar

6.3.1.1 *MLH1*(ENST00000231790.8):c.453+79A>G, rs4234259

Beşinci intronda yer alan bu kodlamayan varyant 16 olguda heterozigot, 8 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.3809'dur. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki sıklığı 0.05'ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır (GnomAD Avrupa:0.442, 1000 Genom Avrupa: 0,4414, GnomAD global: 0,397, 1000 Genom Global:0,3). Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur. Kodlamayan bir varyant olarak splicing'i etkilediğine dair bir bulgu olmadığı için **BP7** kriteri uygun görülmüştür. Bu haliyle söz konusu varyant benign olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 6.4. *MLH1* :c.453+79A>G varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.453+79A>G, rs4234259	Homozigot yaban	13 (72,2)	5 (27,8)	0,163
	Heterozigot	14 (87,5)	2 (12,5)	
	Homozigot mutant	4 (50)	4 (50)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	

c.453+79A>G, rs4234259	Homozigot yaban	42-27 (32)	32,33±4,72	0,463
	Heterozigot	48-23 (34)	34,63±6,97	
	Homozigot mutant	45-25 (30)	32±6,74	
FSH				
		Max- Min(M)	Ort±ss	p
c.453+79A>G, rs4234259	Homozigot yaban	29-2 (10)	11,07±7,48	0,927
	Heterozigot	46-1,2 (7)	12,08±13,16	
	Homozigot mutant	13-3 (6,75)	7,06±3,12	
Testosteron				
		Max-Min(M)	Ort±ss	p
c.453+79A>G, rs4234259	Homozigot yaban	8-2 (4)	4,42±1,89	0,820
	Heterozigot	9-1,7 (4,2)	4,31±1,95	
	Homozigot mutant	6-2,7 (4)	3,91±1,04	
Testis volümü				
		Max-Min(M)	Ort±ss	p
c.453+79A>G, rs4234259	Homozigot yaban	22-5 (16)	16,39±4,51	0,763
	Heterozigot	24-4 (20)	17,69±6,15	
	Homozigot mutant	22-10 (18)	17,25±4,4	
p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi				

p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

Bu varyant için homozigot mutant olanlarda TESE başarısı en yüksek saptanırken heterozigot olanlarda en düşüktü. FSH değerleri homozigot yaban tipte olanlarda en yüksekti, testis volümleri de homozigot yaban tipte olanlarda en düşüktü. Testosteron düzeyleri benzerdi. Hiçbir farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

6.3.1.2 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.655A>G (p.Ile219Val), rs1799977

Bu missense varyant 11 olguda heterozigot, 5 olguda ise homozigot halinde bulunup kohorttaki alel frekansı 0.25'tir. GnomAD global ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.233 ve 0.1296'dır. Avrupa popülasyonu ayrıca ele alındığında bu varyant veri

tabanlarında daha yüksek sıklıkta olup (GnomAD Avrupa:0.319, 1000 Genom Avrupa:0.3250). Genel popülasyondaki alel frekansı 0.05'ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır.

Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=2.05, <6.8). İn-siliko modellemelerde bazı programlar patojenite lehine sonuç verirken (MutationTaster, FATHMM, DEOGEN2, LIST-S2, M-CAP, GenoCanyon ve fitCons) diğer programlar benign olduğu yönünde öngöründe bulunmaktadır (SIFT, PolyPhen-2, Revel, MetaLR, Mutation Assesor, DANN); bu nedenle PP3 veya BP4 skorlaması yapılamamaktadır. Bu bilgiler ışığında bu varyant **benign varyant** olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 6.5 *MLH1*:c.655A>G varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.655A>G (p.Ile219Val)	Homozigot yaban	18 (69,2)	8 (30,8)	0,349
	Heterozigot	10 (90,9)	1 (9,1)	
	Homozigot mutant	3 (60)	2 (40)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.655A>G (p.Ile219Val)	Homozigot yaban	48-25 (33)	33,54±5,85	0,379
	Heterozigot	43-23 (34)	33,82±6,69	
	Homozigot mutant	38-25 (27)	29,6±5,18	
		FSH		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.655A>G (p.Ile219Val)	Homozigot yaban	46-2 (9,5)	12,85±10,66	0,533
	Heterozigot	24-1,2 (4,6)	7,34±7,32	
	Homozigot mutant	13-3 (5)	6,8±3,9	
		Testosteron		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
	Homozigot yaban	8-1,7 (4)	4,19±1,75	0,301

c.655A>G (p.Ile219Val)	Heterozigot	9-2,8 (4,6)	4,93±2,08	
	Homozigot mutant	4-2,7 (3,4)	3,48±0,54	
		Testis volümü		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.655A>G (p.Ile219Val)	Homozigot yaban	24-4 (16,5)	16,69±4,92	0,779
	Heterozigot	24-4 (20)	18±5,66	
	Homozigot mutant	22-10 (18)	16,8±5,59	

**p*<0,05 anlamlı fark var, *p*>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

MLH1:c.655A>G varyantı için homozigot mutant olanlarda TESE pozitifliği daha yüksekti (%40), FSH ve testosteron ortalaması daha düşük saptandı. Varyant için heterozigot olanlarda TESE başarısı en düşüktü (%9,1). Homozigot yaban tiplerin tam tersi olarak homozigot mutant tipte FSH en düşüktü, testosteron ise heterozigotlarda en yüksekti. Testis volümü benzer şekilde heterozigotlarda daha yüksekti. Hiçbir farklılık istatistiksel olarak anlamlılık taşımamaktadır.

6.3.1.3. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1038+86T>C, rs2286939

İntron 11'de yer alan bu kodlamayan varyant 16 olguda heterozigot, 7 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.3571'dir. GnomAD ve 1000 Genom global veri tabanlarındaki alel frekansı sırasıyla 0.3070 ve 0.3093'tür. Avrupa popülasyonu ile kıyaslandığında 1000 Genom Avrupa'da 0.4414 sıklıkla Avrupa genel popülasyonunda kohorttan daha yüksek sıklıkta görülmektedir. GnomAD Avrupa popülasyonundaki sıklığı 0,441'di. Veri tabanlarındaki sıklığı 0.05'ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.052, <6.8. İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde bir veri bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığında varyant **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 6.6. *MLH1*:c.1038+86T>C varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.1038+86T>C	Homozigot yaban	14 (73,7)	5 (26,3)	0,102
	Heterozigot	14 (87,5)	2 (12,5)	
	Homozigot mutant	3 (42,9)	4 (57,1)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1038+86T>C	Homozigot yaban	42-27 (33)	32,42±4,6	0,451
	Heterozigot	48-23 (34)	34,63±6,97	
	Homozigot mutant	45-25 (29)	31,71±7,23	
		FSH		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1038+86T>C	Homozigot yaban	29-2 (9)	10,96±7,29	0,867
	Heterozigot	46-1,2 (7)	12,08±13,16	
	Homozigot mutant	13-3 (5,5)	6,79±3,26	
		Testosteron		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1038+86T>C	Homozigot yaban	8-2 (4)	4,4±1,84	0,841
	Heterozigot	9-1,7 (4,2)	4,31±1,95	
	Homozigot mutant	6-2,7 (3,7)	3,9±1,14	
		Testis volümü		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1038+86T>C	Homozigot yaban	22-5 (16)	16,37±4,39	0,740
	Heterozigot	24-4 (20)	17,69±6,15	
	Homozigot mutant	22-10 (18)	17,43±4,72	

**p*<0,05 anlamlı fark var, *p*>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

MLH1:c.1038+86T>C TESE pozitifliği homozigot mutant olanlarda en yüksekti (%57,1). FSH ve testosteron değerleri homozigot mutant olanlarda en düşüktü. FSH değeri en

yüksek olanlar homozigot yaban tip genotipinde olanlardı. Testis volümleri de homozigot yaban tip genotipine sahip olgularda daha düşüktü. Bu farklılıkların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildir.

6.3.1.4 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1668-19A>G, rs9876116

İntron 14’de yer alan bu kodlamayan varyant 16 olguda heterozigot, 8 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.3809’dur. GnomAD ve 1000 Genom global alel frekansları sırasıyla 0.3708 ve 0.3123’tür. Avrupa popülasyonu ile değerlendirildiğinde GnomAD 0.446 ve 1000 Genom 0.4344 veri tabanlarındaki sıklığı kohorttaki alel sıklığından yüksektir. Alel frekansı 0.05’ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur. İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde bir tahmin bulunmamaktadır. Bu kriterlere göre varyant **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 6.7 *MLH1*:c.1668-19A>G varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.1668-19A>G	Homozigot yaban	13 (72,2)	5 (27,8)	0,163
	Heterozigot	14 (87,5)	2 (12,5)	
	Homozigot mutant	4 (50)	4 (50)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1668-19A>G	Homozigot yaban	42-27 (32)	32,33±4,72	0,463
	Heterozigot	48-23 (34)	34,63±6,97	
	Homozigot mutant	45-25 (30)	32±6,74	
		FSH		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1668-19A>G	Homozigot yaban	29-2 (10)	11,07±7,48	0,927

	Heterozigot	46-1,2 (7)	12,08±13,16	
	Homozigot mutant	13-3 (6,75)	7,06±3,12	
Testosteron				
		Max-Min(M)	Ort±ss	p
c.1668-19A>G	Homozigot yaban	8-2 (4)	4,42±1,89	
	Heterozigot	9-1,7 (4,2)	4,31±1,95	0,820
	Homozigot mutant	6-2,7 (4)	3,91±1,04	
Testis volümü				
		Max-Min(M)	Ort±ss	p
c.1668-19A>G	Homozigot yaban	22-5 (16)	16,39±4,51	
	Heterozigot	24-4 (20)	17,69±6,15	0,763
	Homozigot mutant	22-10 (18)	17,25±4,4	

*p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

MLH1:c.1668-19A>G için homozigot olanlarda TESE başarısı daha yüksek (%50) saptanmıştır. Yine homozigot mutantlarda FSH ve testosteron daha düşüktü; ancak hiçbir farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir.

6.3.1.5 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1990-121C>T, rs2241031

İntron 17’de yer alan bu kodlamayan varyant 16 olguda heterozigot, 8 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.3809’dur. GnomAD ve 1000 Genom global veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.394 ve 0.3039’dur. Avrupa popülasyonu ile değerlendirildiğinde GnomAD (0.442) ve 1000 Genom (0.4423) veri tabanlarındaki alel sıklığı kohorttaki alel sıklığından yüksektir. Veri tabanlarındaki sıklığı 0.05’ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-3.24, <6.8) İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde bir öngörü bulunmamaktadır. Bu kriterlere göre **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 6.8. *MLH1*:c.1990-121C>T varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.1990-121C>T	Homozigot yaban	13 (72,2)	5 (27,8)	0,163
	Heterozigot	14 (87,5)	2 (12,5)	
	Homozigot mutant	4 (50)	4 (50)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1990-121C>T	Homozigot yaban	42-27 (32)	32,33±4,72	0,463
	Heterozigot	48-23 (34)	34,63±6,97	
	Homozigot mutant	45-25 (30)	32±6,74	
		FSH		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1990-121C>T	Homozigot yaban	29-2 (10)	11,07±7,48	0,927
	Heterozigot	46-1,2 (7)	12,08±13,16	
	Homozigot mutant	13-3 (6,75)	7,06±3,12	
		Testosteron		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1990-121C>T	Homozigot yaban	8-2 (4)	4,42±1,89	0,820
	Heterozigot	9-1,7 (4,2)	4,31±1,95	
	Homozigot mutant	6-2,7 (4)	3,91±1,04	
		Testis volümü		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1990-121C>T	Homozigot yaban	22-5 (16)	16,39±4,51	0,763
	Heterozigot	24-4 (20)	17,69±6,15	
	Homozigot mutant	22-10 (18)	17,25±4,4	

**p*<0,05 anlamlı fark var, *p*>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

MLH1:c.1990-121C>T için homozigot olanlarda TESE başarısı daha yüksekti (%50). FSH ve testosteron değerleri homozigot mutant genotiptekilerde daha düşüktü. Testis volümleri

homozigot yaban tip genotipe sahip olanlarda daha düşüktü. Hiçbir değişken için arada istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

6.3.1.6 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.-93G>A, rs1800734

Promoterda yer alan bu kodlamayan varyant 17 olguda heterozigot, 9 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.4166'dır. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.232 ve 0.3205'tir. GnomAD Avrupa (0.222) ve 1000 Genom Avrupa(0.2654) veri tabanlarındaki sıklığı 0.05'ten büyük olduğu için **BA1** kriterini de karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.737, <6.8). İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde bir öngörü bulunmamaktadır. Bu kriterlere göre VarSome kullanıldığında **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır ancak varyant **OMIM'de önemi bilinmeyen varyant** olarak belirtilmektedir.

Tablo 6.9. *MLH1*:c.-93G>A varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.-93G>A	Homozigot yaban	12 (75)	4 (25)	0,999
	Heterozigot	12 (70,6)	5 (29,4)	
	Homozigot mutant	7 (77,8)	2 (22,2)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.-93G>A	Homozigot yaban	48-25 (34)	34,56±6,89	0,419
	Heterozigot	43-23 (33)	31,76±5,53	
	Homozigot mutant	42-27 (33)	33,22±5,19	
		FSH		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.-93G>A	Homozigot yaban	46-2,9 (8,5)	11,96±10,63	0,035*

	Heterozigot	37-1,2 (4,2)	8,44±9,98	
	Homozigot mutant	22-4 (12)	12,67±6,32	
Testosteron				<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.-93G>A	Homozigot yaban	6-2,7 (4)	4,05±0,87	
	Heterozigot	9-1,7 (4,1)	4,4±2,09	0,809
	Homozigot mutant	8-2,1 (3,95)	4,5±2,41	
Testis volümü				<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.-93G>A	Homozigot yaban	24-10 (18)	18,19±4,07	
	Heterozigot	24-4 (20)	16,76±6,67	0,454
	Homozigot mutant	20-10 (16)	15,56±2,79	

* $p < 0,05$ anlamlı fark var, $p > 0,05$ anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

Bu varyant için TESE başarısı heterozigotlarda daha yüksekti (%29,4), homozigot mutantlarda ise en düşüktü (%22,2). FSH düzeyi heterozigotlarda en düşüktü ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,035$). Homozigot yabanlarda testosteron anlamlı farklılık olmamakla birlikte daha düşüktü. Testis volümlerinin küçükten büyüğe sıralaması ise homozigot mutant, heterozigot ve homozigot yaban tip olarak saptanmıştı. Arada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

6.3.1.7 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1039-78A>G, rs11129748

İntron 11'de yer alan bu kodlamayan varyant 14 olguda heterozigot, 6 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.3095'tir. GnomAD ve 1000 Genom 0.345 ve 0.2464'tür. GnomAD Avrupa (0.441) ve 1000 Genom (0.4374) veri tabanlarındaki sıklığı 0.05'ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-1.1, <6.8). İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde öngörü bulunmamaktadır. Bu kriterlere göre varyant **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 6.10 *MLH1*:c.1039-78A>G varyantının klinik özellikleri

		TESE		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
c.1039-78A>G	Homozigot yaban	17 (73,9)	6 (26,1)	0,159
	Heterozigot	12 (85,7)	2 (14,3)	
	Homozigot mutant	2 (40)	3 (60)	
		Yaş		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1039-78A>G	Homozigot yaban	48-27 (33)	33,35±6,21	0,275
	Heterozigot	43-23 (34)	34,21±6,13	
	Homozigot mutant	34-25 (29)	29,2±3,49	
		FSH		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1039-78A>G	Homozigot yaban	29-1,7 (9)	10,3±7	0,677
	Heterozigot	46-1,2 (7)	12,96±13,8	
	Homozigot mutant	9-3 (5,5)	6,1±2,41	
		Testosteron		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1039-78A>G	Homozigot yaban	9-2 (4)	4,54±2,03	0,596
	Heterozigot	7,5-1,7 (4,2)	3,89±1,55	
	Homozigot mutant	6-3,3 (4)	4,26±1,02	
		Testis volümü		<i>p</i>
		Max-Min(M)	Ort±ss	
c.1039-78A>G	Homozigot yaban	22-5 (16)	16,65±4,45	0,863
	Heterozigot	24-4 (20)	17,5±6,57	
	Homozigot mutant	22-12 (18)	17,6±3,85	

**p*<0,05 anlamlı fark var, *p*>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

TESE başarısı homozigot mutant genotipte daha yüksekti. FSH düzeyi heterozigotlarda en yüksek, homozigot mutantlarda en düşüktü. Testosteron düzeyi heterozigotlarda en düşük, homozigot yaban tiptekilerde en yüksekti. Testis volümleri homozigot yaban tip genotipinde daha düşüktü. Hiçbir değişken istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

6.3.1.8 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1558+14G>A, rs41562513

İntron 13'te yer alan bu kodlayıcı olmayan bu varyant 2 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0238'dir. GnomAD ve 1000 Genom global veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.0366 ve 0.0501'dir. GnomAD Avrupa'da 0.0406 ve 1000 Genom Avrupa'da 0.0338 olup karşılaştırılan tüm popülasyonlarda kohorta göre daha yüksek sıklıkta görülmektedir. Veri tabanlarındaki sıklığı 0.05'ten büyük olduğu için **BA1** kriterini karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.851, <6.8). İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde bir öngörü bulunmamaktadır. Bu kriterlere göre varyant **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.1.9. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1039-8T>A, rs193922367

İntron 11'de yer alan bu kodlayıcı olmayan bu varyant 2 olguda heterozigot, 1 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0476'dır. GnomAD Global veri tabanındaki frekansı 0.0257 olup kohortta daha sık görülmüştür. GnomAD Avrupa veri tabanındaki sıklığı 0.0301'dir. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.155, <6.8). İn siliko modellemelerde splicing'i inceleyen SpliceAI, dbSNV Ada ve RF programları benign varyant öngörüsünde bulunmaktadır ve bu yüzden **BP4** kriterini almaktadır. Sonuç olarak bu veriler ışığında varyant **benign** bir değişiklik olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.1.10. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1410-54C>T, rs7633154

İntron 12'de yer alan bu kodlayıcı olmayan varyant olan bu değişiklik 1 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0238'dir. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.0446 ve 0.0501 olup bu veri tabanlarındaki alel frekansı daha yüksektir. Ancak GnomAD Avrupa ve 1000 Genom Avrupa verileriyle (0.0040) kıyaslandığında (0.00512) kohortta daha yüksek sıklıkta görülmüştür. Bazı veri tabanlarındaki sıklığı 0.05'ten büyük, bazılarında ise düşük olup 0.05'e yakın olduğu için olduğu için **orta BA1** kriterini karşılamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.008, <6.8). Bu kriterler uygulandığında varyant **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.1.11. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.*35_*37del, rs193922366

3'UTR'de yer alan bu varyant 1 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.011904'tür. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı 0.0168 ve 0.0176 olup bu veri tabanlarında daha sık görülmektedir. GnomAD Avrupa popülasyonunda 0.021, 1000 Genom Avrupa'da 0.0229 sıklıkla görülmektedir. Varyantın sıklığı kanser fenotipi için beklenenden yüksek frekansta olduğu için **BS1**, homozigot sağlıklı bireyler bulunduğu **BS2** kriterini karşılamaktadır (her ikisi de incelenen fenotip infertilite olduğu için orta olarak sınıflandırılmıştır). Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=0.319, <6.8). Herhangi bir fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. İn siliko modellemelerde öngörüle bulunulmamıştır. Bu kriterler uygulandığında **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.1.12. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.885-81G>C, rs104894999

İntron 10'da yer alan bu kodlayıcı olmayan varyant 2 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0238'dir. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı 0.0234 ve 0.0102'dir. GnomAD Avrupa ve 1000 Genom Avrupa alel frekansları sırasıyla 0.0336 ve 0.0298'dir. Veri tabanlarındaki alel frekansı kanser fenotipine göre beklenenden yüksek olduğu için **orta BS1** ve homozigot olarak sağlıklı bireylerde görüldüğü için **orta BS2** kriterleri alınmıştır (her ikisi de incelenen fenotip infertilite olduğu için orta güçte

alınmıştır). Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.536, <6.8). Bu kriterler uygulandığında **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.1.13 *MLH1* (ENST00000231790.8):c.454-51T>C, rs4647255

İntron 5'te yer alan bu kodlamayan intronik varyant 2 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0238'dir. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı 0.0237 ve 0.0216'dır. GnomAD Avrupa (0.029) ve 1000 Genom Avrupa (0.0298) veri tabanlarında daha yüksek sıklıkta görülmektedir. Veri tabanlarındaki alel frekansı kanser fenotipine göre beklenenden yüksek olduğu için **orta BS1** ve homozigot olarak sağlıklı bireylerde görüldüğü için **orta BS2** kriterleri alınmıştır (her ikisi de incelenen fenotip infertilite olduğu için orta güçte alınmıştır). Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=0.135, <6.8). Bu kriterler uygulandığında **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.2 Olası benign varyantlar

6.3.2.1. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1897-145C>G, rs145050866

İntron 16'da yer alan budlayıcı olmayan bu varyant 1 olguda heterozigot olarak saptanmış olup kohorttaki alel frekansı 0.0011'dir. GnomAD ve 1000 Genom global veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.00589 ve 0.0074'tür ve alel frekansı global popülasyonda daha yüksektir. GnomAD Avrupa popülasyonunda 0.000259 ve 1000 Genom Avrupa veri tabanında 0.001 sıklıkta görülmektedir. GnomAD genomlarında bu varyantı homozigot olarak taşıyan bireyler olduğu için **BS2** kriteri kullanılmaktadır, ancak araştırılan fenotip infertilite olduğu için bu kriterin gücü orta olarak belirlenmiştir. Bazı popülasyonlarda sık görüldüğü için **BS1** kriteri kullanılmıştır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=0.601, <6.8). İn siliko modellemelerde benign ya da patojen olduğu yönünde tek öngörü evrimsel korunmuşluğun düşük olmasıdır. İlişkili literatür

bulunmamaktadır. Sonuç olarak varyant VarSome'a göre olası **benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.2.2. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.198C>T (p.Thr66=), rs61751642

Kodlayıcı dizide ekzon 2'de yer alan bu sinonim varyant, 1 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.011904'tür. GnomAD veri tabanındaki frekansı 0.000298 olup kohortta global popülasyondan daha yüksektir. Benzer şekilde GnomAD Avrupa popülasyonunda da 0.000528 sıklıkta görülmektedir. Varyant 1000 Genom veri tabanında yer almamaktadır. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=-0.773, <6.8) ve in siliko modellemede tek öngörü budur (**BP4 destekleyici**). Splicing mekanizmalarını etkilemediği öngörülmektedir (**BP7**). Sağlıklı bireylerde homozigot olarak görüldüğünden ancak bu bireylerin fertilitesi bilinmediğinden **BS2 orta** güçte kullanılmıştır. İlgili literatür bulunmamaktadır. Varyant **olası benign** olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.2.3. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.*32C>T, rs200903126

3'UTR'de yer alan bu kodlamayan varyant 1 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.011904'tür. GnomAD ve 1000 Genom global veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.00158 ve 0.0001'dir. GnomAD Avrupa popülasyonunda 0.0000916 sıklıkta görülürken 1000 Genom veri tabanında 0.00001'in altındadır. Popülasyon veri tabanlarında sağlıklı bireylerde homozigot olarak görüldüğünde **BS2** kriteri kullanılmıştır, ancak bu kriter VarSome'da güçlü olarak kabul edilirken, bireylerin fertilitesi bilinmediği için orta güçte uygulanmıştır; bu değişiklik VarSome sınıflandırmasını değiştirmemiştir. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur (phyloP100way=0.004, <6.8). İn siliko modellemelerde DANN algoritması benign varyant olduğu yönünde öngörde bulunmuş olup patojenik öngörü saptanmamıştır. Bu nedenle **BP4 destekleyici** kriteri kullanılmıştır. Splicing etkilediği öngörülmediğinden **BP7** kriteri seçilmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde bu varyant **olası benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.2.4. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.453+25A>G, rs4647246

İntron 5'te yer alan bu kodlayıcı olmayan bu intronik varyant 1 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0238'dir. GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.00549 ve 0.0032'dir. GnomAD Avrupa ve 1000 Genom veri tabanlarında 0.00513 ve 0.003 sıklıkta görülmüştür. Homozigot olarak sağlıklı bireylerde görüldüğü için **BS2** kriteri kullanılmıştır; ancak araştırılan fenotip infertilite olduğu için bu kriterin gücü orta olarak belirlenmiştir. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur, tek in siliko öngörü bu olduğu için **BP4 destekleyici** kriteri uygulanmıştır. Varyantın sık görüldüğü popülasyonlar olduğu için **BS1** kriteri kullanılmıştır. Bu kriterler uygulandığında varyant **olası benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.2.5. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.307-29C>A, rs139620056

İntron 3'te yer alan bu kodlayıcı olmayan intronik varyant 1 olguda homozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0238'dir. 1000 Genom global ve Avrupa veri tabanındaki frekansları sırasıyla 0.0032 ve 0.003'tür. GnomAD globalde 0.0055, Avrupa'da 0.00514 sıklıkla görülmektedir. Homozigot olarak sağlıklı bireylerde görüldüğü için **BS2** kriteri kullanılmıştır; ancak araştırılan fenotip infertilite olduğu için bu kriterin gücü orta olarak belirlenmiştir. Varyantın bulunduğu lokus evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olmayan bir lokustur, tek in siliko öngörü bu olduğu için **BP4 destekleyici** kriteri uygulanmıştır. Varyantın sık görüldüğü popülasyonlar olduğu için **BS1** kriteri kullanılmıştır. Bu kriterler uygulandığında varyant **olası benign** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

6.3.3. Önemi Bilinmeyen Varyantlar

6.3.3.1. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1559-131A>T

Bir olguda heterozigot olarak saptanan intron 13'te yer alan bu kodlayıcı olmayan varyantın kohorttaki alel frekansı 0.011904'tür. Bu varyant veri tabanlarında yer almamaktadır. Evrimsel korunmuşluk düzeyi yüksek bir lokus değildir (phyloP100way=0.84, <6.8), tek in siliko öngörü bu olduğu için **BP4 destekleyici** kriteri uygulanmıştır. ClinVar'da yer almamaktadır. Bu veriler eşliğinde önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılmıştır. İlişkili literatür bulunmamaktadır.

6.3.3.2. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.2104-57_2104-56insG

Bir olguda heterozigot olarak saptanmıştır. Varyant intron 18'de yerleşim göstermektedir. Veri tabanlarında yer almamaktadır. İn siliko modellemede sadece evrimsel olarak korunmuşluk düzeyi yüksek bir bölge olmadığı belirtilmiş ve **destekleyici BP4** kriteri uygulanmıştır. ClinVar'da yer almamaktadır. Bu veriler ışığında **önemi bilinmeyen varyant** olarak sınıflandırılmıştır. İlişkili literatür bulunmamaktadır.

6.3.3.3. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1559-144G>T

İntron 13'te yer alan bu varyant iki olguda heterozigot olarak saptanmıştır. Veri tabanlarında yer almamaktadır. İn siliko modellemede sadece evrimsel olarak korunmuşluk düzeyi yüksek bir bölge olmadığı belirtilmiş ve **destekleyici BP4** kriteri uygulanmıştır. ClinVar'da yer almamaktadır. Bu veriler ışığında **önemi bilinmeyen varyant** olarak sınıflandırılmıştır. İlişkili literatür bulunmamaktadır.

6.3.3.4. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.454-36C>A

İntron 5'te yer alan bu kodlayıcı olmayan varyant bir olguda heterozigot olarak saptanmıştır. Veri tabanlarında yer almamaktadır. İn siliko modellemede sadece evrimsel olarak korunmuşluk düzeyi yüksek bir bölge olmadığı belirtilmiş ve **destekleyici BP4 kriteri**

uygulanmıştır. ClinVar’da yer almamaktadır. Bu veriler ışığında **önemi bilinmeyen varyant** olarak sınıflandırılmıştır. İlişkili literatür bulunmamaktadır.

6.3.3.5. *MLH1*(ENST00000231790.8):c.1559-5535_1559-5534insCCGCTCTGCGC

İntron 13’te yer alan bu kodlayıcı olmayan varyant bir olguda heterozigot olarak saptanmıştır. İn siliko modellemede sadece evrimsel olarak korunmuşluk düzeyi yüksek bir bölge olmadığı belirtilmiş ve **destekleyici BP4** kriteri uygulanmıştır. ClinVar’da yer almamaktadır. Bu veriler ışığında Varsome ve Franklin platformlarında **önemi bilinmeyen varyant** olarak sınıflandırılmıştır. İlişkili literatür bulunmamaktadır.

6.3.4. Olası Patojenik ve Patojenik Varyantlar

6.3.4.1. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.1852_1853delinsGC (p.Lys618Ala), rs35502531

Bir olguda heterozigot olarak saptanan bu missense değişiklik popülasyon veri tabanlarında bulunmamaktadır, bu nedenle PM2 kriteri sınıflamaya dahil edilmemiştir. Kohortta 0,0119 ve yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisinde 0,0016 sıklıkta görülmüştür, kohortta daha yüksek frekansta görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir. Lys618Ala genin 16.ekzonunda sıcak noktada bulunmaktadır (**PM1 güçlü**). Aynı kodonda bilinen bir amino asit değişiklikleri (Lys618Thr, Lys618RArg) mevcuttur ve bunlar UniProt’ta patojenik olarak sınıflanmakla birlikte ClinVar’da uzman panelinde benign olarak belirtildiği için **orta PM5** uygulanmıştır. Araştırılan fenotip Lynch sendromu yerine infertilite olduğunda BP6 kriteri devre dışı bırakılmıştır. Polyphen2’ de olasılıkla hasar verici (0.94) olarak öngörülmesi ve evrimsel olarak yüksek korunmuşluk gösteren bir bölgede olması (phyloP100way=7.34,>6.8) nedeniyle **PP3 destekleyici** kriteri kullanılmıştır; ayrıca CADD skoru 40’tır ve patojeniteyi desteklemektedir (234). Bu kriterlerle VarSome kullanılarak sınıflandırma yapıldığında varyant **olası patojenik** varyant olarak sınıflandırılmaktadır.

Bu varyant için heterozigot olan O28 aynı zamanda c.453+79A>G, c.655A>G (p.Ile219Val), c.1038+86T>C, c.1668-19A>G, c.1990-121C>T ve c.1039-78A>G için homozigot genotipe sahipti; ancak c.-93G>A varyantı için homozigot yabanı tipti.

6.3.4.2. *MLH1* (ENST00000231790.8):c.977T>C(p.Val326Ala), rs63751049

11. ekzonda yer alan bu missense varyant 1 olguda heterozigot olarak tespit edilmiş olup kohorttaki alel frekansı 0.0119'dur ve yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisindeki alel frekansından anlamlı ölçüde olmasa da yüksektir (0,0026). GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarındaki frekansı sırasıyla 0.00047 ve 0.0002 olup arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (sırasıyla $p=0,039$ ve $0,035$). GnomAD Avrupa 0.00061 ve 1000 Genom Avrupa'da 0.000999'dur ve arada istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır. Veri tabanlarındaki sıklık çok düşük olduğundan **güçlü PM2** kriterini karşılamaktadır. 17 amino asitlik bölgede 36 missense/in-frame varyant bulunmakta ve bunların 6'sı patojenik, biri benign ve 29'u önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldığı için sıcak bölge olarak kabul edilmektedir, bu nedenle güçlü PM1 kriteri uygulanmıştır. Evrimsel korunmuşluğu yüksek bir bölgedir (phyloP100 skoru 7.64). UniProt'da bazı fonksiyonel çalışmalara dayanarak patojenik olarak sınıflandırıldığı için PS3 kriteri orta düzeyde kullanılmıştır. Araştırılan klinik Lynch sendromu yerine infertilite olduğu için BP6 devre dışı bırakıldı. İn siliko modellemelerde BayesDel_addAF, DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MVP, MutationAssessor, MutationTaster ve SIFT patojenik öngöründe bulunurken PrimateAI benign öngöründe bulunduğu için PP3 destekleyici olarak uygulanmıştır. 28,5 olan CADD skoru patojeniteyi desteklemektedir (234). Ayrıca homozigot sağlıklı bireylerde görüldüğü için **BS2** kriteri de uygulanmıştır, ancak bu sağlıklı bireylerin fertilitesi bilinmediği için orta güçte kanıt olarak ele alınmıştır. Bu kriterler uygulandığında **patojenik** varyant olarak sınıflandırılmıştır.

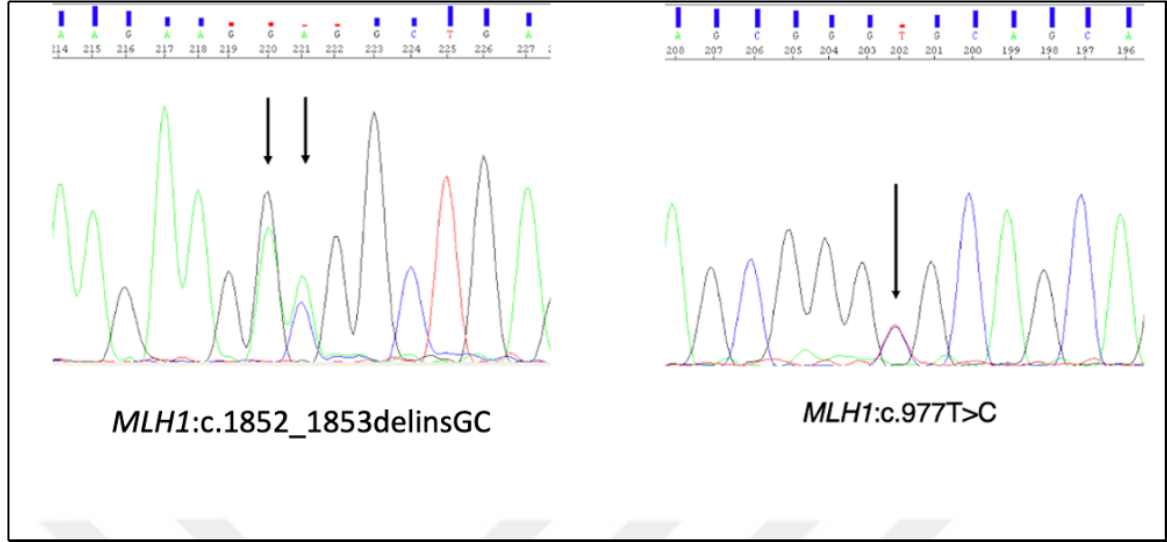
Bu varyant için heterozigot genotipe sahip 43 yaşındaki olgu (O23) ayrıca c.1039-78A>G, c.-93G>A, c.1990-121C>T, c.1668-19A>G, c.1038+86T>C, c.655A>G (p.Ile219Val) ve c.453+79A>G için de heterozigot genotipe sahipti.

6.3.4.3. Lys618Ala ve Val326Ala Klinik Özellikleri

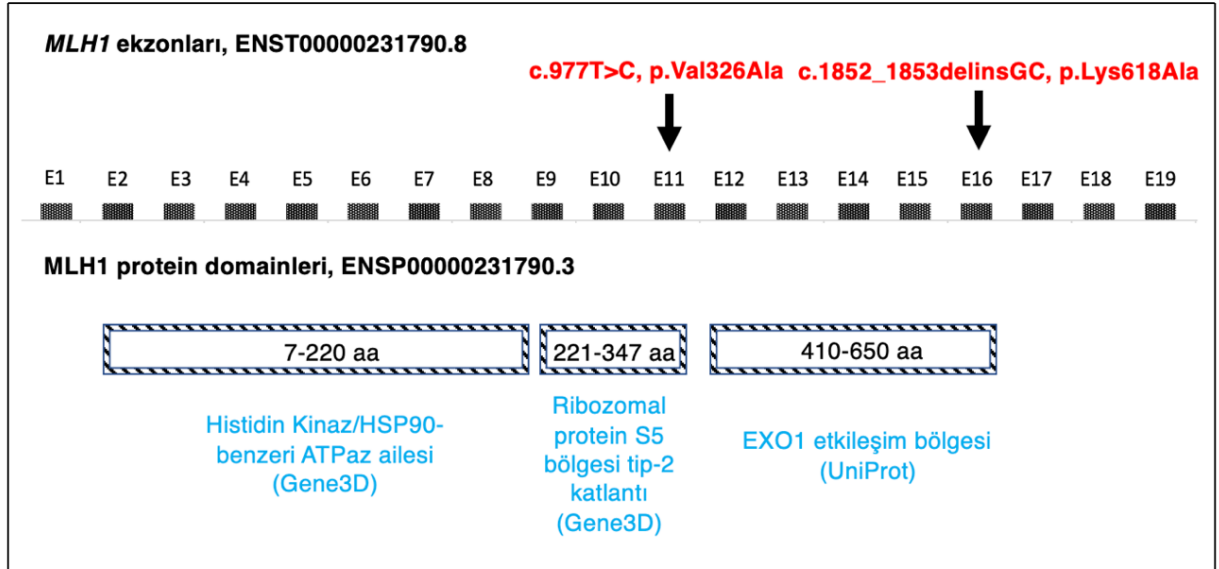
Olgulara ait klinik veriler Tablo 6.11’de özetlenmiştir. Her iki olguda da tekrarlayan düşük kaybı, kadın veya erkek infertilitesi, prematür overyen yetmezlik, kişisel veya ailesel kanser, erken menapoz veya in vitro fertilizasyon tedavisi öyküsü yoktu. Olguların elektroferogram görüntüleri, gen ve protein bölgeleri üzerindeki yerleşimleri şekil 6.1 ve 6.2’de, alel frekansları şekil 6.3’de gösterilmiştir.

Tablo 6.11 Lys618Ala ve Val326Ala heterozigot olguların klinik özellikleri

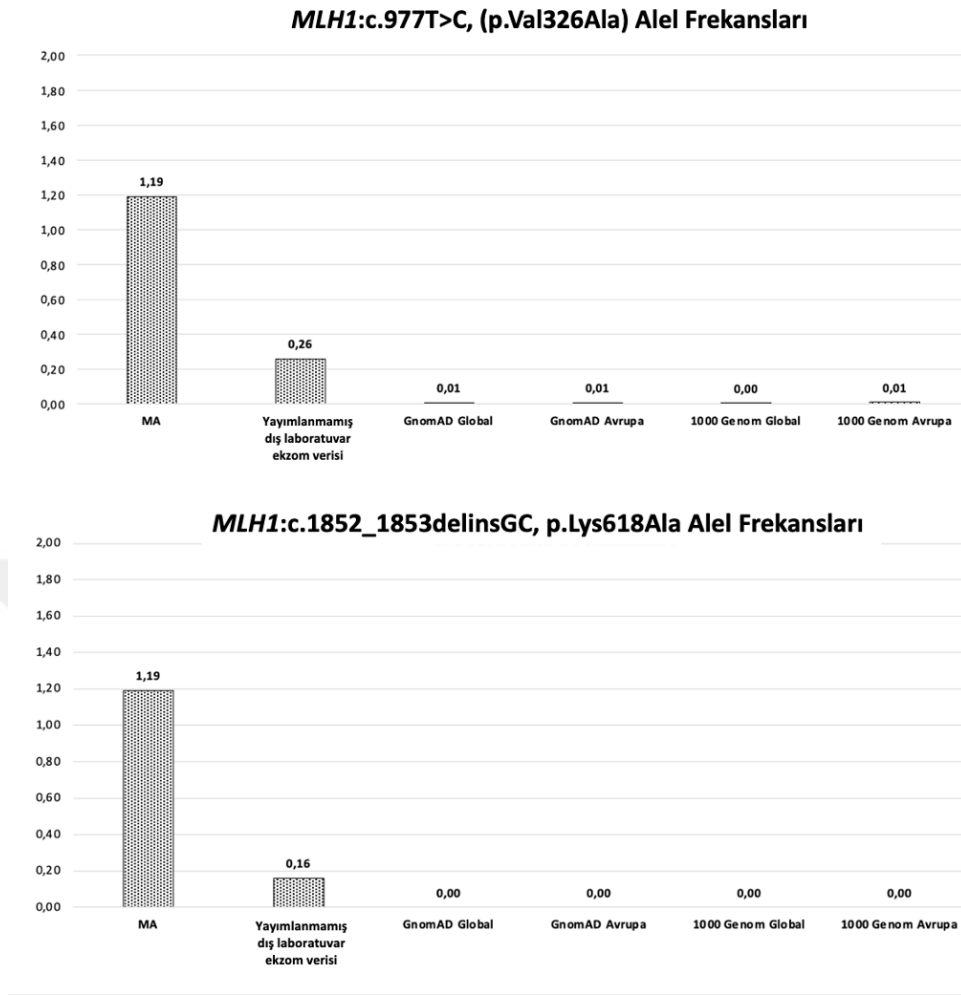
Klinik Özellikler	Olgular	
	O28	O23
DNA değişikliği (NM_000249.4)	c.1852_1853delinsGC	c.977T>C
Protein değişikliği	p.Lys618Ala	p.Val326Ala
Testis volümü (ml/ml)	22/22	4/4
FSH (mIU/ml)	3	1,2
Testosteron (ng/ml)	4	NA
Karyotip	46,XY	46,XY
Y mikrolelesyonu	Normal	Normal
TESE	Pozitif	Negatif



Şekil 6.1. Lys618Ala ve Val326Ala heterozigot olguların elektroferogram görüntüleri



Şekil 6.2. K618A ve V326A varyantlarının gen ve protein düzeyinde yerleşimleri



Şekil 6.3. Val326Ala ve Lys618Ala Alel Frekansları

6.4. Genel Alel Frekansları

6.4.1. Kohortta, Global ve Fin Olmayan Avrupa Popülasyonlarında Alel Frekansları

Frekansların karşılaştırıldığı popülasyon veri tabanları sağlıklı erişkin insanlardan oluşan, farklı alt popülasyonlar içeren veri tabanlarıdır. GnomAD global ve Fin olmayan Avrupa versiyon 2.1, 1000 Genom global ve Avrupa popülasyon alel frekansları belirtilmiştir. NOA grubunda 84 alel, GnomAD ekzom global ve Avrupa’da 251.388 ve 113.686 alel, 1000 Genom Global ve Avrupa veri tabanlarında sırasıyla 5008 ve 1006 alel bulunmaktadır.

Lys618Ala varyantı popülasyon veri tabanlarında yer almadığı için istatistiksel değerlendirme yalnızca yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Alel frekansları arasındaki istatistiksel karşılaştırma Lys618Ala, Val326Ala, *MLH1*:c.*32C>T, *MLH1*:c.*35_*37del ve *MLH1*:c.-93G>A için yapılmıştır; diğer önemi bilinmeyen, benign ve olası benign varyantlar analize dahil edilmemiştir. Veri tabanlarına göre alel frekansları aşağıdaki Tablo 6.12 ve 6.13'te yer almaktadır.

Tablo 6.12. Kohort alel frekanslarının GnomAD ve 1000 Genom Global alel frekanslarıyla karşılaştırması

Varyant	MA	GnomAD-Global	1000 Genom Global
c.453+79A>G	0,3809	0,397	0,3000
c.655A>G	0,2500	0,233	0,1296
c.1038+86T>C	0,3571	0,3070	0,3000
c.1668-19A>G	0,3809	0,3708	0,3123
c.1990-121C>T	0,3809	0,394	0,3039
c.-93G>A	0,3929	0,232	0,3205
c.1039-78A>G	0,3095	0,345	0,2464
c.1897-145C>G	0,0011	0,00589	0,0074
c.1558+14G>A	0,0238	0,0366	0,0501
c.1039-8T>A	0,0476	0,0257	-
c.198C>T p,Thr66=)	0,0119	0,000298	-
c.*32C>T	0,0119	0,00158	0,0010
c.977T>C, p,Val326Ala	0,0119	0,00047	0,0002
c.1410-54C>T	0,0238	0,0446	0,0501
c.453+25A>G	0,0238	0,00549	0,0032
c.307-29C>A	0,0238	0,0055	0,0032
c.1852_1853delinsGC	0,0119	-	-
c.*35_*37del	0,0119	0,0168	0,0176
c.885-81G>C	0,0238	0,0234	0,0102
c.454-51T>C	0,0238	0,0237	0,0216

c.1559-131A>T

0,0119

-

-

Tablo 6.13. Kohort alel frekanslarının GnomAD ve 1000 Genom Fin olmayan Avrupa popülasyonu alel frekanslarıyla karşılaştırması

Varyant	MA	GnomAD-Avrupa	1000 Genom Avrupa
c.453+79A>G	0,3809	0,442	0,4414
c.655A>G	0,2500	0,319	0,3250
c.1038+86T>C	0,3571	0,4414	0,4414
c.1668-19A>G	0,3809	0,446	0,4344
c.1990-121C>T	0,3809	0,442	0,4423
c.-93G>A	0,3929	0,2654	0,2654
c.1039-78A>G	0,3095	0,441	0,4374
c.1897-145C>G	0,0011	0,000259	0,0010
c.1558+14G>A	0,0238	0,0406	0,0338
c.1039-8T>A	0,0476	0,0301	-
c.198C>T p,Thr66=)	0,0119	0,0005	-
c.*32C>T	0,0119	0,0000916	0,0000
c.977T>C, p,Val326Ala	0,0119	0,00061	0,0010
c.1410-54C>T	0,0238	0,00512	0,0040
c.453+25A>G	0,0238	0,00513	0,0030
c.307-29C>A	0,0238	0,00514	0,0030
c.1852_1853delinsGC	0,0119	-	-
c.*35_*37del	0,0119	0,021	0,0229
c.885-81G>C	0,0238	0,0336	0,0298
c.454-51T>C	0,0238	0,029	0,0298
c.1559-131A>T	0,0119	-	-

6.4.2. Val326Ala, Lys618Ala, *MLH1*:c.*32C>T, *MLH1*:c.*35_*37del ve *MLH1*:c.-93G>A Yayınlanmamış Dış Laboratuvar Ekzom Verisiyle ve Diğer Global Popülasyon alel Frekanslarıyla Karşılaştırılması

Val326Ala ve Lys618Ala sırasıyla patojenik ve olası patojenik olarak sınıflandırıldığı için istatistiksel analize alınmıştır. *MLH1*:c.*32C>T varyantı olası benign ve *MLH1*:c.*35_*37del ile *MLH1*:c.-93G>A varyantları benign varyantlar olarak sınıflandırılmakla birlikte literatürdeki çelişkili sonuçlar nedeniyle istatistiksel analize dahil edilmiştir. Bu varyantların alel frekanslarının istatistiksel olarak karşılaştırılması Tablo 6.14'te yer almaktadır.

Lys618Ala varyantı global ve Avrupa veri tabanlarında tanımlanmamıştır, bu nedenle kohort sadece yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisiyle kıyaslanmıştır. Kohortta daha yüksek sıklıkla görülmesine karşılık yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisinden istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Val326Ala varyantı da benzer şekilde yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisindeki alel frekansından daha yüksek frekanstadır, ancak anlamlı fark bulunmamaktadır. Öte yandan bu varyant kohortta global veri tabanlarına göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. Yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisindeki sıklığı 1000 Genom Avrupa haricinde tüm popülasyonlardaki sıklıktan anlamlı ölçüde daha yüksektir.

MLH1:c.35_*37del varyantının kohorttaki alel frekansı diğer tüm popülasyonlara göre daha düşüktür ve anlamlı farklılık yoktur. Bununla birlikte bu varyant yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisinde GnomAD Global veri tabanından anlamlı ölçüde daha yüksek sıklıkta saptanmıştır. *MLH1*:c.*32C>T varyantı kohortta yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi dahil diğer tüm gruplara göre daha yüksek frekansta görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlılığı bulunmamaktadır. Yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisinde ise hem global hem de Avrupa popülasyonuna göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. *MLH1*:c.-93G>A varyantı alel frekansı kohortla yayınlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ve frekanslar birbirine yakındır. Diğer yandan bu varyantın kohorttaki sıklığı 1000 Genom Global haricinde diğer tüm gruplara göre

istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunurken, yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisinde tüm global ve Avrupa veri tabanlarına göre anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır.

Bu veriler ışığında Ly618Ala ve Val326Ala olası patojenik ve patojenik olarak sınıflandırıldığından, *MLH1*:c.-93G>A varyantı ise sık görülen ancak oldukça tartışılan bir değişiklik olduğu için ileri istatistiksel analize alınmıştır.

Tablo 6.14 Val326Ala, Lys618Ala, *MLH1*:c.35*₋₃₇del, *MLH1*:c.*32C>T ve *MLH1*:c.-93G>A alel frekanslarının karşılaştırılması

		Val326Ala	Lys618Ala	c.35* ₋₃₇ del	c.*32C>T	c.-93G>A
MA	A	0,0119	0,0119	0,0119	0,0119	0,3929
Yayımlanmamış Dış Laboratuvar Ekzom Verisi	B	0,0026	0,0016	0,0234	0,0076	0,3399
GnomAD Global*	C	0,0005	-	0,0167	0,0015	0,2320
GnomAD Avrupa*	D	0,0006	-	0,0210	0,0009	0,2222
1000 Genom Global	E	0,0002	-	0,0175	0,0010	0,3205
1000 Genom Avrupa	F	0,0009	-	0,0228	0,0000	0,2654
İkili Karşılaştırma	A vs B	0,212	0,147	0,999	0,482	0,352
	A vs C	0,039	-	0,999	0,124	0,001

	A vs D		0,051	-	0,999	0,075	<0.001
	A vs E		0,033	-	0,999	0,095	0,195
	A vs F		0,148	-	0,999	0,077	0,015
	B vs C		<0.001	-	0,001	<0.001	<0.001
	B vs D		<0.001	-	0,398	<0.001	<0.001
	B vs E		0,001	-	0,053	<0.001	0,049
	B vs F		0,482	-	0,999	0,005	<0.001

Pearson Ki-kare testi(Monte Carlo), Fisher Exact test(Monte Carlo)

Kısaltmalar: MA, matürasyon arresti

*GnomAD Global ve Avrupa veri tabanlarından versiyon 2.1.1 kullanılmıştır. rs1800734 varyantı için genom verisi kullanılmıştır. GnomAD Avrupa için Fin olmayan Avrupa kökenlilere ait veri kullanılmıştır.

TARTIŞMA

MLH1 proteinin hem insanlarda hem de diğer memelilerde homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyonda rol oynadığı iyi bilinmektedir (25,26). Baker ve arkadaşları farelerde yaptıkları deneylerde *Mlh1* proteininin mayotik kromozomlarda crossing-over bölgelerine lokalize olduğunu göstermişlerdir. Bu farelerin *Mlh1* noksan spermatidlerinde yüksek oranda erkenden ayrılmış kromozomlar ve ilk bölünmede duraklama olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada da sinaptonemal kompleksteki MLH1 odaklarının sayısı ve dağılımının crossing-over'ların sayısı ve dağılımıyla uyumlu olduğu gösterilmiştir (27). Baker ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada farelerde DNA onarımında gerekli olan *Pms2* ve *Mlh1* genlerinin yokluğunun aynı zamanda mayotik arrest ile karakterize infertilite fenotipine yol açtığı gösterilmiştir (235).

Lynn ve arkadaşları hayvanlarda olduğu gibi sağlıklı erkeklerde de MLH1 odaklarının mayotik rekombinasyon bölgelerinin belirteci olduğunu göstermişlerdir (26). Aynı çalışmada hem bireyler arasında hem de aynı bireyin hücreleri arasında MLH1 odaklarının sayısında, bir başka deyişle rekombinasyon sıklığında çeşitlilik olduğunu belirlenmiş ve MLH1 odaklarının sayısının sinaptonemal kompleksin uzunluğu ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya konulmuştur. Bu çalışmada *MLH1* ile rekombinasyonun ilişkisi net olarak ortaya konmakla birlikte, infertil erkekler üzerinde çalışılmamıştır.

Gonsalves ve arkadaşları fertil, NOA ve OA'lı erkekler arasında MLH1 odaklarının sıklığını karşılaştırarak rekombinasyon frekansında farklılık olup olmadığını araştırdıkları çalışmalarında, NOA'lı olgularda anlamlı ölçüde azalmış rekombinasyon olduğunu belirlemişlerdir (21). Testis biyopsisi sonuçlarına göre de matürasyon arresti ve hipospermatogenez tanılı olgularda MLH1 odaklarının sayısının kontrol ve OA gruplarına göre anlamlı ölçüde azalmış olduğunu saptamışlardır. Başka çalışmalarda da rekombinasyon defektlerinin erkek infertilitesindeki önemi teyit edilmiştir (236).

Enguita-Marruedo ve arkadaşları testis biyopsisi örneklerinde mayoza giriş, kromozom eşleşmesi, DNA çift-zincir kırığı onarımı, crossing-over formasyonu, mayotik metafaz oluşumu, metafaz arresti ve spermatid oluşumunu saptamaya yönelik yaptıkları detaylı kantitatif immünofloresan incelemede mayotik arrestin daha detaylı bir patolojik sınıflamasını

gerçekleştirmişlerdir (237). Bu sınıflamada infertil erkeklerde en sık metafaz arresti olduğunu belirlemişlerdir. Farelerdeki metafaz arrestinin temel olarak crossing-over oluşumu bozulduğunda gözlenmesi, *Mlh1* ve *Rnf212* genlerindeki mutasyonların crossing-over oluşumunu tamamıyla engellediğinin saptanması nedeniyle, MLH1 odaklarının da azaldığı metafaz arresti olan olgularda ***MLH1*'in mutasyonlarının araştırılmasını önermişlerdir** (237). Bunun yanı sıra Terribas ve ark. erkek infertilitesinde testiste MMR ekspresyonunun azaldığını ve bunun matürasyon arrestinde en belirgin olduğunu belirtmiştir (238).

Erkek infertilitesi ve kanser monogenik sebeplere bağlı olabileceği gibi hem küçük etkili çok sayıda genetik faktörün ve çevresel etmenlerin etki ettiği multifaktöriyel kompleks hastalıklar olarak da ele alınabilir. Erkek infertilitesinin çeşitli kanserler için risk faktörü olduğunu gösteren kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır ve infertilitenin kanser riski için biyobelirteç olabileceğini öne sürenler vardır (13,14,75,239,240). MLH1 ve diğer MMR proteinlerinin kanserdeki rolü ve hayvan ile insan çalışmalarında gösterilen mayozdaki rolü göz önünde bulundurulduğunda kanser ile erkek infertilitesi arasındaki bağlaç olabilecekleri daha önce de kurgulanmıştır (238,241,242).

Bütün preklinik ve klinik araştırmalar değerlendirildiğinde bu çalışmada *MLH1* başta olmak üzere MMR DNA onarım genlerindeki ekspresyon veya fonksiyon değişikliğine yol açacak varyantların matürasyon arresti ile karakterize NOA'ya neden olduğu ve matürasyon arresti ile karakterize NOA olgularının bir kısmından *MLH1* genindeki ekspresyon veya fonksiyon değişikliklerine yol açan varyantların sorumlu olduğu hipotezi kurulmuştur. Bu amaçla *MLH1* genine ait nadir ve sık görülen varyantların, matürasyon arresti ile seyreden NOA fenotipinin monogenik nedeni ya da infertiliteye yatkınlık yaratan risk faktörleri olma potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile matürasyon arrestine bağlı azoospermisi olan infertil erkeklerde *MLH1* geni promoter, 5'UTR, 3'UTR, ekzonlar ve intron-ekzon bileşkelerinde yer alan varyantların tamamı araştırılmıştır.

Daha önce *MLH1*'de yer alan tek nükleotid değişiklikleri ile infertilite arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Ancak bu çalışmalarda testisteki patolojiye göre bir endofenotipleme yapılmadığı gibi tüm geni dizilemek yerine belli SNP'ler incelenmiştir.

Örneğin Ji G ve ark.'nın araştırdıkları SNP'ler ile bu çalışmada saptananlar arasında ortak olan tek SNP rs1799977 varyantıdır ve mevcut çalışmada da infertiliteyle ilişkili bulunmamıştır (241). Diğer yandan *MLH1*'de yer alan ve Ji G ve ark. saptadığı infertiliteyle ve sperm DNA fragmentasyonu ile anlamlı ilişki gösteren *MLH1*:c.791-1406C>T (rs4647269) varyantı da çalışmamızda bulunmamıştır (241).

Sadece *MLH1*:c.-93G>A varyantının değerlendirildiği diğer bir vaka-kontrol çalışmasında bu varyantın azoospermi veya oligospermi ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (243). Çin'de yapılan ve *MLH1*'e ait sadece *MLH1*:c.-93G>A ile *MLH1*:791-1406C>T varyantlarının değerlendirildiği başka bir çalışmada bu iki varyant için şiddetli oligozoospermi grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (244). Bu çalışmalarda da testis patolojisine göre endofenotipleme yapılmamıştır ve sadece bir veya iki SNP'e bakılmıştır. İnfertiliteye neden olabilecek nadir varyantlar değerlendirilmemiştir. Mevcut çalışmada *MLH1*:c.-93G>A ile matürasyon arresti arasında anlamlı ilişkili bulunmamıştır; ancak aşağıda detaylandırılacağı üzere bu regülatuar varyant oldukça tartışmalı bir varyanttır. İki çalışma arasındaki farklılığın sebebi etnik köken olabilir veya her iki çalışmanın da Çin'de yapıldığı düşünülürse örneklem seçimi araştırma sonuçlarındaki farklılığı açıklayabilir. Son olarak Ghieh ve arkadaşları matürasyon arresti olan NOA hastalarında ekzom sekanslama ile ilişkili gen bulma amacıyla yaptıkları çalışmada bir olguda K377E ve K377T önemi bilinmeyen iki varyant saptamışlardır (245). Bununla birlikte olgunun kendisi ve varyantların patojenitesi makalede tartışılmamıştır.

Çalışmamızda biri kodlayıcı (Ile219Val, rs1799977), biri promoter (c.-93G>A, rs1800734), biri 3'UTR varyantı (c.*35_*37del, rs193922366) ve diğerleri intronik varyantlar olmak üzere toplam 13 benign varyant tespit edilmiştir. Bir 3'UTR varyantı (c.*32C>T, rs200903126), bir sinonim kodlayıcı bölge varyantı (c.198C>T, rs61751642) ve kalanı intronik varyantlardan oluşan 5 olası benign varyant saptanmıştır. Olası patojenik ve patojenik varyantların ikisi de kodlayıcı varyantlardı (sırasıyla Lys618Ala ve Val326Ala). Bulunan 5 önemi bilinmeyen varyantın tamamı intronikti.

7.1. Benign Varyantlar

MLH1:c.-93G>A varyantı kohortta en sık görülen varyant olmuştur (0.4166); bunu eşit frekansa sahip üç varyant (c.453+79A>G, rs4234259; c.1668-19A>G, rs9876116; c.1990-121C>T, rs2241031) takip etmiştir. *MLH1*(ENST00000231790.8)'e göre c.453+79A>G (rs4234259), c.655A>G (Ile219Val) (rs1799977), c.1038+86T>C (rs2286939), c.1668-19A>G (rs9876116), c.1990-121C>T (rs2241031), c.1039-78A>G (rs11129748), c.1558+14G>A (rs41562513) ve c.454-51T>C (rs4647255) varyantları Avrupa popülasyonunda NOA grubuna göre daha sık görülmüştür, bu nedenle NOA ile ilişkisiz polimorfizmler oldukları düşünülmektedir.

Literatürde c.453+79A>G, c.1038+86T>C, c.1990-121C>T ve c.1039-78A>G c.1039-78A>G varyantları çeşitli çalışmalarda benign varyantlar olarak değerlendirilmiştir (246–248). Hansen MF ve ark. c.1558+14G>A (rs41562513) varyantını benign olarak değerlendirmiş ve Auclair ve ark. tarafından bu varyantın splicing'i etkilemediği fonksiyonel olarak gösterilmiştir (249,250). c.1668-19A>G (rs9876116) varyantı da çeşitli çalışmalarda benign varyant olarak değerlendirilmiştir (246,247,249,251). Nitekim Slovenya popülasyonunda mide kanserinde (c.1668-19A>G), Fin popülasyonunda herediter prostat kanserinde (c.1668-19A>G ve c.454-51T>C), İsveç popülasyonunda Lynch sendromu (LS) olgularında c.1668-19A>G varyantı kansere neden olan varyant olarak değil polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (252–254). Diğer yandan Leman ve ark. splicing için gerekli olan dal noktasını etkileyen varyantları değerlendirdikleri bir çalışmalarında c.1668-19A>G varyantının BPP ve SVM-BPfinder tarafından dal noktasını değiştirdiği, Branchpointer ve LaBranchoR programlarında ise etkilemediği saptanmış ancak deneysel olarak teyit edilmemiştir (255). Bu veriler ışığında bu varyantların da NOA ile ilişkisiz polimorfizmler olduğu düşünülmektedir.

7.1.1. Ile219Val

Bu varyant hakkında zengin bir literatür ve çok sayıda fonksiyonel çalışmalar bulunmaktadır ve genel olarak benign bir polimorfizm olarak değerlendirilmektedir. Örneğin Andersen ve ark. çalışmalarında PMS2 ile bağlanma, MMR in vitro aktivitesi testi, immünohistokimyasal boyama (IHC) ve mikrosatellit instabilitesini (MSI) değerlendirdiklerinde, Ile219Val varyantının patojenik olmadığını belirlemişlerdir (256).

Raevaara ve Trojan Ile219Val varyantının DNA onarım fonksiyonlarının yaban tipteki gibi fizyolojik olduğunu; Kondo ve ark. PMS2 ile bağlanmasının etkin olduğunu göstermişlerdir (257–259). Ayrıca mRNA stabilitesinde azalma ya da aberran splicing’e de söz konusu değildir (260). Shimodaira ve ark. ve Takahashi ve ark. da yaptıkları deneylerde bu varyantın nötral bir değişiklik olduğunu belirlemişlerdir (261,262).

Diğer yandan Ile219Val ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar fonksiyonel çalışmaların aksine çelişkili sonuçlar göstermektedir. Örneğin, bu varyant için homozigositinin Kore’deki sporadik kolorektal kanser (KRK) vakaları arasında azalmış MLH1 protein ekspresyonuyla (IHC) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (263). Bazı çalışmalarda bu SNP’in yüksek mutasyon frekansı ile ilişkili bir haplotip için prediktif olabileceği öne sürülmüştür (264–267). Kolon kanseri için risk faktörü olan ülseratif kolit fenotipi için de beş kat risk artışına sebep olduğu tespit edilmiştir (267,268). Nejda ve ark. bu değişikliğin erkeklerde daha belirgin olmak üzere İspanyol popülasyonunda artmış sporadik KRK riskine neden olduğunu bildirmişlerdir (269). Milanizadeh ve ark. da Ile219Val varyantını 219 sporadik KRK, 248 kontrolde değerlendirmiş ve KRK için yatkınlık faktörü olduğunu öne sürmüşlerdir (270). KRK dışında; Zhang ve arkadaşlarının 9 çalışmadan oluşan meta analiz sonuçlarına göre rs1799977 A>G varyantıyla belirgin bir şekilde artmış meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur (271). Santos ve ark. bu varyantı iyi differansiye tiroid kanserinde radyoyodin tedavisinden bir ay sonra iki ayrı kohortta mikronükleusların varlığı ve sıklığı ile, Andrushchenko ve ark. solunum yolu enfeksiyonlarına karşı direnç ile ilişkilendirmiştir (272,273).

Bununla birlikte diğer pek çok epidemiyolojik araştırmalarda bu varyantın, fonksiyonel çalışmalarla uyumlu olarak, artmış kolon kanser riskiyle anlamlı ilişkisi olmadığı gösterilmiştir (212,264,267,274,275). Chen ve ark. meta-analizlerinde Ile219Val varyantının KRK’e yatkınlık riski oluşturduğuna dair yeterli kanıt olmadığını belirtmişlerdir (276). Xiao ve ark. Çin popülasyonunda bu polimorfizm ile mide kanseri arasında bir ilişki bulunmadığını bildirmiştir (277).

Ile219Val'nin erkek infertilitesi, matürasyon arresti ve NOA ile ilişkisi bugüne kadar ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Fonksiyonel çalışmalar, diğer fenotiplerle ilişkili yapılan epidemiyolojik yayınlardaki çelişkili sonuçlar ve veri tabanlarındaki, özellikle Avrupa popülasyonundaki, alel sıklığının NOA grubundan yüksek olması bu varyantın NOA fenotipiyle ilişkili olmadığını düşündürmektedir. MMR genlerinde yapılagelmiş fonksiyonel çalışmaların ileride tartışılacak dezavantajlarının yanında testis dokusuna ya da spermatogonia ve spermatosit düzeyinde mayoza yönelik fonksiyonel çalışmanın bulunmaması ve etnik köken farklılıkları ve araştırılan fenotip farklılığı Ile219Val için NOA ile ilişkili olmadığını belirtirken göz önünde bulundurulmalıdır.

7.1.2. Bir Promoter Varyantı: *MLH1*:c.-93G>A

MLH1:c.-93G>A kohortumuzda en sık görülen varyant olmuştur. Matürasyon arrestine bağlı NOA'da yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi ve genel popülasyona dayalı veri tabanlarından daha yüksek sıklıkla **görölmüştür**. Aynı zamanda *MLH1*:c.-93G>A varyantının alel frekansı yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi, GnomAD global ve Avrupa ile 1000 Genom Avrupa'ya göre anlamlı ölçüde daha yüksektir.

Zhang ve ark. da bu varyantın azoospermi ya da oligospermiyle ilişkisi olmadığını bildirirken, Zhao ve ark. şiddetli oligospermiyle bu varyant arasında anlamlı bir ilişki olduğunu tespit etmiştir (243,244). Bu birbirinden farklı sonuç veren iki çalışma dışında *MLH1*:c.-93G>A erkek infertilitesinde araştırılmamış, yayınlar KRK başta olmak üzere diğer kanserler ve bazı hastalık üzerinde araştırılmıştır.

Benign bir varyant olarak geçmekle birlikte araştırmacılar *MLH1*:c.-93G>A'nın bir promoter varyantı olması nedeniyle gen ekspresyonunda ve fenotipte etkisi olacağını düşünmüşlerdir. Bu nedenle literatürde bu varyantla ilgili KRK başta olmak üzere çeşitli fenotiplerle ilişkisini araştıran çok sayıda epidemiyolojik çalışma yer almaktadır. Örneğin rs1800734 bugüne kadar artmış kolon, endometriyal, over, Hodgkin lenfoma hastalarında tedaviye bağlı sekonder tümör riski, skuamöz hücreli akciğer kanseri, oral skuamöz hücreli karsinoma ve glioblastoma riski ile ilişkilendirilmiştir (274,278–285). Çeşitli araştırmalara göre

skuamöz hücreli akciğer kanserinin yanı sıra Avrupa, Kore ve Tayvan popülasyonlarında akciğer adenokanseri riskini de arttırmaktadır (283,286–288). Bir başka çalışmada sigara içenlerde artmış hiperplastik polip ve adenom varlığı ile anlamlı ilişkisi olduğu bildirilmiştir (289). Zhu ve ark. ise rs1800734 varyantının hepatoselüler karsinomda kötü prognoz belirteci olduğunu belirtmişlerdir (290).

KRK özelinde özellikle MSI yüksek ve tümör dokusunda MLH1 protein ekspresyonu kaybıyla ilişkilendirilmiştir (267,291). Whiffin ve ark. 10,409 KRK ve 6,965 kontrolden oluşan çalışmalarında bu varyantın MSI yüksek KRK ile ilişkili olduğunu bulmuştur ve meta analizlerinin sonucunda da düşük penetranslı bir varyant olduğunu bildirmişlerdir (292). Pardini ve ark. yaptıkları GWAS sonucunda rs1800734'ün kolon kanseri riskini arttırdığını ve temel olarak MMR defektlerinde olduğu gibi proksimal yerleşim gösteren kolon tümörüyle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (293). Campbell ve ark. tıpkı Raptis ve ark. gibi *MLH1* c.-93G>A polimorfizmi için homozigot olanlarda mikrosatellit instabil kolon kanseri riskini arttığını kaydetmişlerdir (267,274). Diğer yandan MSI negatif kolon kanseriyle ilişkisi bulunmazken, sigara içen homozigot AA bireylerde MSI negatif KRK fenotipinin görülme olasılığını anlamlı ölçüde azaltmaktadır (267). 2014'te Ma ve ark.'nın yaptıkları oldukça geniş bir meta-analizde rs1800734 varyantının KRK ile güçlü bir ilişkisi olduğunu ortaya koymuşlardır (294). 2021 tarihli bir meta GWAS analizinde (48,214 KRK, 64,159 kontrol) proksimal kolon kanseri için istatistiksel olarak en güçlü lokusun rs1800734 olduğu belirlenmiştir (295).

Diğer yandan kanserle anlamlı ilişkisi olmadığını belirten çok sayıda çalışma da mevcuttur. Si W ve ark. epitelyal over tümörüyle, Song ve ark. da invaziv over kanseriyle, Kooshemehri ve ark. İran'da prostat kanseriyle, Xiao ve ark. Çin popülasyonunda mide kanseriyle bu varyant arasında bağlantı olmadığını bildirmişlerdir (277,296–298). He ve ark. yaptıkları meta-analiz sonucunda (12 yayın; 4,128 kanser, 4,678 kontrol) rs1800734 varyantının Asya popülasyonunda herhangi bir kanser tipiyle ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir (299). KRK özelinde ise Mik ve ark. sporadik kolon kanserinde *MLH1* c.-93G>A polimorfizmini araştırdıkları vaka-kontrol çalışmasında vakalarda G alelinin daha yüksek oranda bulunduğunu ve çoğu çalışmanın aksine GG genotipinin artmış sporadik kolon kanseri riskiyle ilişkili olduğunu saptamışlardır (300); yine de tekrarlayan tümörlerde AA genotipinin

anlamli ölçüde daha sık olduğunu belirtmişlerdir ($p=0.022$). Benzer şekilde İspanya ve Meksika kökenlilerde yapılan çalışmalarda da A alelinin G aleline göre KKK riskini azalttığı bildirilmiştir (301,302). Chen ve ark. meta-analizlerinde rs1800734 varyantının kolorektal kansere yatkınlık riski oluşturduğuna dair yeterli kanıt olmadığını belirtmişlerdir ve Hansen ve ark. da rs1800734 varyantını benign değışiklik olarak sınıflamışlardır (249,276).

Epidemiyolojik çalışmalarda *MLH1*:c.-93G>A için *MLH1*:İle219Val polimorfizminde olduğu gibi çelişkili bulgular bildirilmiştir. Farklı sonuçların nedeni etnik köken farklılığı, örneklem seçimi, fenotip ve çalışmanın istatistiksel gücü gibi çeşitli faktörlere bağılı olabilir. Bu nedenle bu varyantla ilgili yapılmış fonksiyonel çalışmaları da incelemek önemlidir.

Bu varyantın *MLH1* geninin ekspresyonunu azalttığı düşünölmekte ancak nasıl azalttığı tam olarak bilinmemektedir (286). Park ve ark. bu varyantın bir transkripsiyon faktörü olan AP-4 için konsensüs bağlanma dizisinde yer aldığını bildirmişler ve bu şekilde ekspresyonu etkileyebileceğini öne sürmüşlerdir; ancak 2004'te akciğer kanserinde promoter fonksiyonunu incelemek için yaptıkları lusiferaz deneyinde A ile G aleli arasında ekspresyon farkını gösterememişlerdir (283). Diğer yandan Liu ve ark. A alelinin, alel-spesifik transkripsiyon faktörü AP4'ün bağlanmasını bozduğunu ve bunun sonucunda uzun mesafe etkileşim ile *DCLK3* ekspresyonunun arttığını göstermişler ve bunun da epitelden mezenşime transizyonda gerekli olan genlerin ekspresyonunu arttırarak malign dönüşüme öncelik ettiğini önermişlerdir (303). Biyoinformatik yaklaşımlarla bu varyantın varlığında TFAP4, Pbx1b ve Myf-5 gibi aday proteinler için bağlanma bölgelerinin ortadan kalktığı; AP-3, HNF-3b ve GCR için bağlanma bölgelerinin oluştuğu belirlenmiştir (304–306). Bunlardan TFAP4 için Salvio ve ark. ChIP testini kullanarak AA genotipindeki hücre serilerinde bağlanmanın bozulduğunu in vitro olarak göstermişlerdir (306). Perera ve ark. KKK ve endrometriyum kanseri (EK) hücre serilerinin yanı sıra tümöral olmayan hücre serilerinde bu varyantı içeren ve içermeyen promoter aktivitesini değerlendirmişlerdir. *MLH1* promoterında G alelinin A alelinden tüm hücre serilerinde artmış oranda lusiferaz aktivitesi gösterdiği kayıt altına alınmıştır; A aleli olduğunda kolon kanseri hücrelerinde 5 kat (HCT116), malign olmayan kolon hücresinde (CCD-841-CoTr) ise yaklaşık 18 katlık (17.73) aktivite kaybı söz konusudur (278). Funck ve ark. normal ve tümör kolon dokusunda *MLH1* ekspresyonunu inceledikleri bir çalışmada, AA genotipinin GG fenotipine göre ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla azalttığını ve

MLH1:c.-93G>A varyantının KRK için risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir (307). Ekspresyon araştırmalarının aksine Shin ve ark. *MLH1*:c.-93G>A ile DNA onarım mekanizmasında azalma arasında bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir (308).

Transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi dışında ekspresyonun azalmasında bir diğer mekanizma promoter hipermetilasyonudur ve *MLH1*:c.-93G>A da çok sayıda çalışmada artmış *MLH1* promoter hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmiştir ve bu ilişki endometriyal tümörlerle kolorektal tümörlerde de gösterilmiştir (274,286,305,309,310). Mrjkonjic ve ark. üç farklı vaka grubunda *MLH1*:c.-93G>A varyantının etkisini incelemiş ve varyantın IHC negatifliği, MSI yüksekliği ve yanı sıra *MLH1* promoter hipermetilasyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterdiğini belirtmişlerdir (311). Nitekim mikrosatellit instabilitesi gösteren ve MMR sisteminin çalışmadığı sporadik kolorektal kanserlerin çoğunda *MLH1* promoter hipermetilasyonu görülmektedir (312). Fennell ve ark. *MLH1* -93AA genotipinin displastik sesil serrated adenomlarda *MLH1* protein kaybı ve promoter hipermetilasyonu ile ilişkili olduğunu; ancak geleneksel serrated adenomlarda A alelinin metilasyona yatkınlık oluşturmadığını belirtmişlerdir (304). Miyakura ve ark. çalışmalarında AA genotipinin promoter hipermetilasyonu için en önemli risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir; ancak metilasyonun anlamlı ölçüde A alelinde daha sık görülse de G alelinde de görülebildiğini kaydetmişlerdir (305). Thomas ve ark. *MLH1*:c.-93G>A varyantının MSI sporadik KRK ile ilişkili olduğunu ama mikrosatellit stabil (MSS) KRK ile ilişkisi olmadığını tekrar ortaya koyduktan sonra bu varyantın promoter hipermetilasyonu ile ilişkisini incelemişlerdir. Normal kolon mukozasında rs1800734'ün olduğu yerde veya Deng bölgesi C'de çok az ya da hiç metilasyon olmadığını, bu bölgenin 5' tarafının ilerisinde ise yoğun CpG adası kıyı metilasyonu olduğunu tespit etmişler ve bu metilasyonun GG genotipi olanlarda anlamlı ölçüde daha sık olduğunu belirlemişlerdir; ancak metilasyon paternindeki bu farklılık normal kolon mukozasında mRNA ekspresyonunda herhangi bir denge kaybına yol açmadığını görmüşlerdir. Kanser dokusunda ise *MLH1*:c.-93G>A varyantının olduğu kritik bölgede metilasyonun AA ve AG hastalarında anlamlı ölçüde daha yüksek olduğunu tespit etmişler ve heterozigotlarda ekspresyonu incelediklerinde A alelinin metilasyonla anlamlı ölçüde daha ilişkili olduğunu ve ekspresyonun da metilasyon düzeyi ile ters korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. Yanı sıra MSI+ KRK hücre serisi olan CO-115 hücre serilerinde (bu hücre serisi CpG adalarının yoğun hipermetilasyon gösterdiği ve ekspresyonun kantitatif PCR ile saptanamadığı bir hücre serisidir) sitozin analogu olan ve DNA metilasyonunu inhibe eden 5-azasitidin ve 5-aza-2'-

deoksisitidin kullanmışlar ve A alelinin deneyin her aşamasında daha çok metile olduğunu, metilasyon kaybının A alelinde daha yavaş ve uzun sürdüğünü ve etki ortadan kalkınca çok daha hızlı tekrar metile olduğunu kaydetmişlerdir (313). Savio ve Bapat da benzer şekilde rs1800734 için heterozigot hücre serilerinde CpG adasının kıyı bölgesinde A alelinde G aleline göre anlamlı şekilde artmış hipometilasyon saptamışlar; başka deyişle kıyı (*shore*) bölgesinin G alelinde anlamlı ölçüde daha çok metillendiğini tespit etmişlerdir. Bu kıyı bölgesinin enhancer ilişkili histon olan H3K4me1'den zengin olduğu ama H3K27ac içermediği, dolayısıyla hipometile kıyı bölgesinin ekspresyon regülasyonunda inaktif olduğunu bildirmişlerdir, bu da diğer çalışmada saptanan normal mukozada mRNA ekspresyonunda denge kaybının görülmemesiyle uyumludur. Yanı sıra GG ve GA hücre serilerinin transkripsiyon faktörü AP4'ten anlamlı ölçüde daha zengin olduğunu tespit ederek, Thomas ve ark.'nın TFAP4'ün G alelini seçmeye meyilli olduğunu bildirdiği çalışmayı desteklemişlerdir. Son olarak kıyı hipometilasyonunun, normal kolon dokusu ve kanda A aleli ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterdiğini, ancak tümör dokusunda hipometilasyon ile genotip arasındaki bu ilişkinin ortadan kalktığını bildirmişlerdir (306). Tüm bu çalışmalar varyantın ekspresyon üzerinde etkili olabileceğini ve fenotipi etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Shrestha ve ark. *mlh1* heterozigot ve *mlh1* promoter hipermetilasyonu olan erkek farelerin spermalarında mikrosatellit instabilitesinde artış tespit ettiklerini, Güneş ve ark. oligospermik erkeklerin semeninde *MLH1* metilasyonunun normospermik olanlara göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğunu ve bu metilasyonun reaktif oksijen ürünlerinin varlığıyla korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (314,315). Bu metilasyon çalışmalarında *MLH1*:c.-93G>A değerlendirilmemiştir ve mevcut çalışmada da *MLH1* promoter hipermetilasyonu incelenmemiştir. Ancak kanserdeki mekanizma ve infertil erkeklerdeki semende artmış *MLH1* promoter hipermetilasyonu ve *mlh1* heterozigot farelerin spermalarında kayıpla uyumlu MSI artışı, benzer bağlantının infertilite ve *MLH1*:c.-93G>A için de geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada ise TESE, FSH ve testosteron düzeyleriyle *MLH1*:c.-93G>A açısından homozigot yaban tip, heterozigot ve homozigot mutant genotiplerinin ilişkisi değerlendirilmiş, istatistiksel olarak anlamlı fark sadece FSH düzeyinde görülmüştür ($p=0.035$). Buna göre AA genotipinde FSH düzeyleri en yüksek, AG genotipinde ise en düşüktür. Bu patern kohortta

analiz edilebilecek sıklıkta görülen ve benign olan diğer varyantlarda görülen değişikliklerden farklılık göstermektedir. Benzer şekilde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da AA genotipinde TESE başarısı en düşük, AG genotipinde ise en yüksektir. Hipotezimize göre AA genotipi olan olgularda TESE başarısı en düşük ve FSH düzeyi en yüksek olmalıyken, bunun tam tersi normal GG genotipinde olanlarda gözlenmeliydi. Aksine heterozigotlarda en yüksek TESE başarısının ve FSH düzeyinin en düşük olması ya kohortun yeterince dengeli ve geniş olmaması ya da varyantın rastlantısal olarak bulunmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Alel frekansları da göz önünde bulundurulursa varyantın NOA ile ilişkisi şüpheli görünmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarıyla beraber literatürdeki tüm bulgu ve görüşler göz önünde bulundurulduğunda bu varyantın daha geniş bir kohortta genotiplenmesi ve eş zamanlı *MLH1* promoter hipermetilasyonunun değerlendirilmesi, *MLH1* promoter aktivitesi ile bu varyantın promoter aktivitesi üzerine etkisinin testis dokusunda, semende ve spermatogonia ve spermatositte fonksiyonel olarak çalışılması gibi çok sayıda yeni araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar neticesinde *MLH1*:c.-93G>A varyantının matürasyon arresti olan NOA'daki olası rolü ve etki mekanizması netleştirilebilir.

7.1.3. *MLH1*:c.*35_*37del

MLH1:c.*35_*37del varyantının yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi dahil genel popülasyon veri tabanlarındaki alel frekansı NOA grubuna göre daha yüksek saptanmıştır. Bu varyantı heterozigot olarak içeren tek olgunun (O32) testis volümleri 22/22 ml, testosteron düzeyi 3,7 ng/ml ve FSH düzeyi 14 mIU/ml olup TESE ile sperm elde edilememiştir. Bu olgu aynı zamanda *MLH1*:c.1039-8T, *MLH1*:c.885-81G>C ve *MLH1*:454-51T>C değişikliğine de sahipti. Bu dört varyantın hangi oranla fenotipten sorumlu olduğunu kestirmek şu an için mümkün değildir; ancak kompleks hastalık kalıtımıyla ilişkili olarak her birinin küçük boyutta etki ederek fenotipe yol açmaları olasıdır.

İnfertilite ve NOA ile MA özelinde *MLH1*:c.*35_*37delTTC varyantının etkisinin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir, bu nedenle diğer varyantlarda olduğu gibi varyantla ilgili bilgi ve görüşlere onkoloji literatüründen ulaşılabilmektedir.

Curia ve ark. çalışmasında varyantı içeren vakalarla ilgili tümör özelliklerinin bilgisi olmamakla birlikte, olgulardan birinde ekspresyonda değişiklik olmazken diğerinde iki katlık değişimle alelik bir imbalans saptanmıştır, yine de varyantı polimorfizm olarak değerlendirmiştir (316). Hansen ve ark. çalışmasında olası benign varyant olarak geçmektedir (249). Mao ve ark. relaps löseminin MMR fonksiyon bozukluğu ile yakından ilişkili olduğunu bildirmiş ve bir olgularında mikrosatellit instabilitesinde artış saptadıktan sonra ilişkili tüm genler araştırılmış ancak sadece *MLH1* 3'UTR bölgesindeki TTC delesyonunu saptayabilmişlerdir. Fonksiyonel çalışmada, yaban tipe göre iki kat daha az lusiferaz aktivitesi göstermiş, mRNA'dan real time PCR ile de ekspresyondaki istatistiksel olarak anlamlı ölçüdeki azalmayı tespit etmişlerdir. Olgunun kanından mRNA izolasyonu sonrasında hazır haldeki *MLH1* düzeyinin en az %33 oranında daha az olduğunu saptamışlardır. Mekanizmayı tam olarak açıklayamamaları da 3'UTR varyantının mRNA'yı destabilize ederek *MLH1* ekspresyonunu azalttığını belirtmişlerdir. Ekspresyon çalışmasını protein düzeyinde de yaptıklarında, translasyon düzeyindeki negatif etkinin daha büyük olduğunu, bu varyantın hem transkripsiyon hem de translasyonu etkilediğini bildirmişlerdir (317). Bu yayının üzerine Tinat ve ark. 527 LS hastasında bu varyantı taramışlar ve alellik frekansın 0.018 olduğunu hesaplamışlardır. 100 kişiden oluşan kontrol grubunda alelik frekans 0.035 olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar bu varyantın LS'ye sebep olan bir varyant olmadığını, ancak patojenik bir varyanta modifier etki gösterebileceğini ya da genel popülasyonda KRK için risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (318).

7.2. Olası Benign Varyantlar

Bir diğer 3'UTR varyantı *MLH1*:c.*32C>T varyantıdır ve olası benign olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyant için heterozigot olan olgunun testis volümleri 14/14 ml, FSH düzeyi 12 mIU/mL idi ve TESE işlemi başarılıydı. Bu varyantla ilgili ne infertilite ne de onkolojiyle ilgili fonksiyonel ya da epidemiyolojik bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer yandan

genel olarak UTR bölgeleri düşünüldüğünde, GWAS sonucunda mutasyonların daha ziyade 5'UTR bölgesinde olduğu ve 3'UTR bölgesindeki varyantların çoğunlukla polimorfizm olduğu belirtilmiştir (319–321). 3'UTR bölgesinin RNA stabilitesi, mRNA translasyonu ve lokalizasyonu gibi önemli rolleri bulunmaktadır. Bu bölgede RNA bağlayan proteinler (RBP) ve miRNA için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu nedenle 3'UTR'deki varyantlar miRNA ve RBP için bağlanma bölgelerini bozarak ya da yeni bağlanma bölgeleri oluşturarak gen ekspresyonu ve translasyonu etkileyebilirler (319). Mekanizmalardan biri 3'UTR bölgesinin uzunluğudur ve bunun önemi hem sağlık hem hastalıkta mRNA stabilitesini, translasyonu ve doku spesifik ekspresyonunu etkilediğinin gösterilmesiyle anlaşılmıştır (322–326). Diğer bir mekanizma varyantların mRNA ve kodlamayan RNA'ların (ncRNA) UTR'lerinde yer alıp RNA transkriptinin sekonder yapısını, başka deyişle konformasyonunu bozmasıdır ki bu tek nükleotid değişikliklerine RiboSNitch adı verilmektedir (327). Çalışmamızda saptadığımız 3'UTR varyantlarının (c.*32C>T ve c.*35_37del) miRNA ve RBP bağlanma bölgelerini etkileyip etkilemediği ya da RNA transkriptinin sekonder yapısını bozup bozmadığı bilinmemektedir. Bu varyantların frekansı polimorfizm düzeyinde olsa bile fonksiyonel olarak değerlendirilmeleri hem kanser hem NOA için önem taşımaktadır.

Diğer olası benign varyant olarak sınıflandırılan varyant sinonim bir varyant olan *MLH1*:c.198C>T, p.Thr66=) varyantıdır. Arnold ve ark. daha önce patojenik olmadığı düşünülen bu varyantın ESEfinder kullanıldığında patojenik olduğunu ancak yapılan cDNA analizinde varyantın splicing'i etkilemediğini göstermişlerdir (328,329). Kohortumuzda tek bir olguda heterozigot olarak saptanmıştır ve NOA grubunda GnomAD global ve Avrupa veri tabanlarındaki alel frekansından daha yüksek görülmüştür. CADD skoru 10.25'tir ve ClinVar'da tek yıldızla olası benign olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyantı içeren olgu rs1800734 için de heterozigottu ve TESE ile başarılı bir şekilde sperm elde edilmişti. Olgumuzda eşlik eden *MLH1*:c.-93G>A ile bu varyanttan hangisinin fenotip üzerinde ne ölçüde etkili olduğunu belirlemek şu an için mümkün değildir. Bu varyantın matürasyon arrestine bağlı NOA fenotip üzerinde etkisinin varlığını net olarak ortaya koyabilmek için daha geniş bir kohortta ve ayrıca farklı etnik gruplarda epidemiyolojik çalışmalar, mayoz açısından etkisinin gösterilebileceği fonksiyonel çalışmalara gerek vardır. Bu olguda sperm elde edilmiş olması varyantın kötü prognozla ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

Diğer olası benign varyantlardan *MLH1*:c.307-29C>A varyantı veri tabanlarında bulunmazken, *MLH1*:453+25A>G varyantı Avrupa popülasyonunda NOA grubuna göre daha yüksek alel frekansında görülmüştür. Bu iki varyant aynı olguda homozigot olarak saptanmıştı. Nitekim aynı olgu benign bir varyant olan *MLH1*:c.1039-8T>A (rs193922367) ve *MLH1*:c.1410-54C>T varyantları için de homozigot olan tek olguydu. 45 yaşındaki bu olgunun testis hacimleri 18/18 ml ve FSH düzeyi 8 mIU/mL idi ve TESE işlemi ile başarılı bir şekilde sperm elde edilebilmişti.

Bir olgu olası benign olarak sınıflandırılan *MLH1*:c.1897-145C>G (rs145050866) varyantı için heterozigot ve *MLH1*:c.-93G>A için GG genotipine sahipti. 29 yaşındaki bu olguda TESE sperm elde edilebilmişti. Olgunun testis volümleri 20/20 ml, FSH düzeyi 5.5 mIU/mL ve testosteron seviyesi 6 ng/mL idi. Bu varyant GnomAD ve 1000 Genom veri tabanlarında global popülasyonda daha sık görülmektedir ancak NOA grubundaki alel frekansı Avrupa genel popülasyonundan yüksektir. Kodlayıcı olmayan bu varyantla ilgili herhangi bir epidemiyolojik ya da fonksiyonel çalışma bulunmadığı için varyantın bu çalışma ile ilk kez ortaya konması ve ileriki diğer çalışmalarla rolünün netleşmesi önemlidir.

7.3. Önemi Bilinmeyen Varyantlar

Bu çalışmada beş varyant önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırıldı. Bu varyantlar veri tabanlarında ve ClinVar'da olmadığı gibi ilişkili literatür de bulunmamaktadır. Bunlar *MLH1*: c.1559-5535_1559-5534insCCGCTCTGCGC, *MLH1*: c.1559-131A>T, *MLH1*: c.454-36C>A, *MLH1*: c.2104-57_2104_56insG ve *MLH1*: c.1559-144G>T varyantlarıdır.

MMR genlerinin de içinde olduğu yüksek risk genlerinde sınıflanamayan varyantların (ÖB) önemli bir kısmında splicing defektleri olabilir (250,330). Yüksek düzeyde korunmuşluk gösteren intronik dinükleotidler olan 5'GT ve 3'AG mutasyonlarının bir sonraki ekzonun transkripte dahil edilememesiyle sonuçlandığı iyi bilinmektedir; ancak splice bölgelerine yakın yerleşimli intronik veya splicing ile ilişkili kriptik bölgelerde yer alan varyantlar da fonksiyonel olmayan protein ile sonuçlanabilir (330–332). Ayrıca missense değişiklik yapması öngörülen varyantların, hatta sinonim, küçük indellerin bazılarının nükleotid düzeyinde ekzonik splice

enhancer (ESE) ve ekzonik splice silencer (ESS) bölgelerini içeren Splicing Regulatory Elements (SRE) dizilerini değiştirip patolojik splicing'e yol açtığı gösterilmiştir (260,330,333–336). Örneğin *MLH1* geni 10.ekzonunda kodlayıcı mutasyon olarak bilinen 20 varyant tekrar analiz edildiğinde 17'sinin ekzonik splicing mutasyonu (%77) olduğu anlaşılmıştır (337). *MLH1* özelinde incelendiğinde missense varyantların %27'sinin, nonsense mutasyonların %36'sının splicing'i bozduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (338). O kadar ki patojenitesi bilinmeyen missense varyantlarda ve nötral varyantlarda protein çalışmalarından önce olası SRE mutasyonunu ekarte etmek için klinik tanıda RNA temelli testlere mümkün olduğunca yer verilmesi önerilmektedir (332,339). Bu tür varyantlara splice-site bozuklukları (SSD-splice site defects) anlamında SSD varyantları da denmektedir (339).

Olası etki mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda genom sekanslamanın da yaygınlaşması ve fonksiyonel çalışmaların yapılması ile bu varyantların öneminin netleşeceği öngörülmektedir. Bu anlamda düzenli aralıklarla literatür takibi önem kazanmaktadır.

7.4. Olası Patojenik Varyantlar

Diğer varyantların çoğu gibi Lys618Ala varyantı da insan matürasyon arresti ve NOA'da ilk kez bu araştırmayla bildirilmektedir. Bu nedenle fenotiple ilişkisini irdeleyen çalışmalar KRK üzerinden ilerlemektedir. Örneğin Hampel ve ark. çalışmalarında biri Amsterdam kriterlerini karşılamayan ancak Bethesda'ya uygun iki hastadan birinde bu varyantın 5 belirteçten 3'ünü, diğer hastada 5 belirtecin hepsini etkileyerek mikrosatellit instabilitesine yol açtığını göstermişlerdir ancak varyantın frekansından dolayı çalışmalarında bu varyantı polimorfizm olarak değerlendirmişlerdir (340). Pastrello ve ark. da K618A varyantını MSI-yüksek, İHC'de MLH1 protein ekspresyon kaybıyla ilişkili bulmuş ve patojenik olarak sınıflandırmışlardır (341). Ward ve ark. ise Lys618Ala varyantını saptadıkları bir vakada İHC'de MLH1 ekspresyonunun korunduğunu ve tümörün mikrosatellit stabil olduğunu belirtmişler ve bu varyantı önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirmişlerdir (342). Benzer şekilde Liu ve ark. da Lys618Ala'nin bulunduğu tümörün mikrosatellit stabil olduğunu belirtmişlerdir (343). Piñol ve ark. Lys618Ala varyantının LS fenotipiyle segregasyonu gösteren çalışmalardan bahsetmiş; ancak kanser olmayanlarda da bu varyantın saptandığını

belirtmişlerdir (343–347). Kendi çalışmalarında bu varyantı taşıyan vaka Amsterdam kriterlerini karşılamazken Bethesda kriterlerini karşılamış, mikrosatellit instabilitesinin arttığı gösterilmiş ancak MLH1 ekspresyonunda immünohistokimyasal boyama ile azalma görülmemiştir. Araştırmacılar net bir yorumda bulunmamakla birlikte immünohistokimyasal boyamanın sensitivitesinin burada belirleyici olma ihtimalinden bahsetmişlerdir. Bazı araştırmacılar K618A'nın patojenik olduğunu belirtirken (346–355); bazıları ise önemi bilinmeyen bir varyant veya polimorfizm olarak değerlendirmiştir (254,342,349,356–360). Tannergård ve ark. varyantın hastalıkla birlikte segregе olmadığını, Samowitz ve ark. da varyantın kendi çalışmalarında sağlıklı kişilerde de görülebildiğini bildirmişlerdir, ancak bu kişilerin fertilitesi hakkında bir veri bulunmamaktadır (254,345).

Andersen ve ark. PMS2 ile bağlanma, MMR in vitro aktivitesi, immünohistokimyasal boyama ve MSI değerlendirdiklerinde ve in siliko karşılaştırmalar yaptıkları çalışmada; K618A'nın Polyphen tarafından olasılıkla hasar verici, MAPP-MMR algoritmasında “zararlı” olarak değerlendirildiğini; diğer bir fonksiyon göstergesi olan hücre içi lokalizasyonun çekirdekte olup bozulmadığını ve PMS2 ile bağlanmasının hafifçe azaldığını gözlemlemişlerdir ve K618A'nın PMS2'yle zayıf bağlanması nedeniyle normal MMR fonksiyonunun bozulabileceğini belirtmişlerdir (256). Bu çalışmada K618A varyantının EXO1'e bağlanması değerlendirilmemiştir (256). PMS2 ile zayıf etkileşim/bağlanma başka çalışmalarda da gösterilmiştir; örneğin Guerrette ve ark. %85 oranında bağlanmada azalma bildirmişlerdir (259,359,361,362). Guerrette ve ark. PMS2'ye bağlanmada aynı ölçüde azalmayı K618T varyantında da saptamışlardır. Kondo ve ark. da maya iki-hibrid deneyinde K618A ve K618T'nin ikisinde de yaban tipe göre PMS2 ve EXO1'e azalmış bağlanma görüldüğünü bildirmişlerdir (PMS2, K618A/K618T:64.2/79.2) (259). Her ikisinde EXO1'e bağlanma PMS2'ye olduğundan çok daha etkilenmiş görünmektedir (K618A/K618T: 27.1/10.8); ancak yine de patojenik olduğu bilinen varyantlara göre normal protein davranışına daha yakın görünmektedirler, bu da borderline patojenik varyant olma ihtimalini desteklemektedir.

Öte yandan Bianchi ve ark. ve Kosinski ve ark. PMS2 ile bağlanmanın in vitro koşullarda doğal olduğunu gözlemlemişlerdir (257,363,364). Papp ve ark. kendi kolorektal kanser hastalarında saptadıkları bu varyantın, proteinin diğer proteinlerle etkileşim gösterdiği karboksil ucunda yer aldığı için önemsemişlerdir; diğer çalışmalarda PMS2 ile bağlanma az da

olsa tespit edilebilmekte, ancak Vo ve ark. aynı rezidüde K618T değişikliği olduğunda MRE11'e bağlanmanın neredeyse tamamen bozulduğunu göstermişlerdir (365,366). K618A ile MRE11 etkileşimini değerlendiren bir çalışma ise literatürde mevcut değildir. MRE11 mayozda çift zincir kırığını düzeltmede SPO11 proteinini kompleksten çıkararak etki göstermektedir.

İn vitro MMR aktivitesini değerlendiren fonksiyonel çalışmalarda ise K618A varyantı yaban tip ile benzer aktivite göstermiştir (256,257,262,367,368). Örneğin Takahashi ve ark. in vitro MMR aktivitesinin K618A'da %82.7'ye düştüğünü göstermişler ve normale yakın olarak yorumlamışlardır (262). Raevaara ve ark. bunlara ek olarak K618A varyant proteininin ekspresyon ve stabilitesini, subselüler yerleşimini, protein-protein etkileşimini ve onarım kapasitesini değerlendirmiş ve tüm parametrelerin normal olduğunu saptamışlardır (257). Blasi ve ark. ise insan overyen karsinoma hücrelerinden *MLH1*-defektif alt klon oluşturduktan sonra hücreleri çeşitli *MLH1* varyantları ile transfekte etmiş ve metile edici ajanlara tolerans ve direnç, MSI, *HPRT1* geninde mutasyon oranı gibi MMR aktivitesinin sonucu olan parametreleri kullanarak varyantları değerlendirmişlerdir. K618A ile transfeksiyonun hücrenin fenotipini düzeltmediğini gözlemlemişlerdir (369).

Raevaara ve ark. ekspresyonun normal olduğunu bildirirken Hinrichsen ve ark. K618A varyantını değerlendirdiklerinde MMR aktivitesinin yeterli olduğunu ancak ekspresyonunda %80 azalma olduğunu saptamışlardır (257,367). Azalmış ekspresyonun altta yatan nedeninin protein stabilitesinde azalma olduğunu gözlemlemişler ve K618A'nın yarı ömrünün, in vitro pulse-chase metodu ile ölçerek normalin ortalama %64'üne kadar azaldığını tespit etmişlerdir (367). Trojan ve ark. da insan hücre serilerinde yaptıkları deneyde K618T'nin patojenik olduğunu belirlemişlerdir ve hatta ekspresyonunun ölçülemeyecek kadar düşük olduğunu gözlemlemişlerdir ancak Vogelsang ve ark. maya hücrelerinde tasarladıkları deneyde K618T'nin nötral bir varyant olduğunu bildirmişlerdir (258,370).

Daha güncel bir çalışmada *MLH1* varyant proteinleri yapısal stabilizasyon ve degradasyonları yönünden araştırılmıştır (371). Abildgaard ve ark. varyant proteinlerin yaban tip proteine göre termodinamik katlanma stabilitelerindeki değişikliği ölçmüşler ve pozitif değer alan varyantları destabilize edici olarak yorumlamışlardır ve bu anlamda I219V de

K618A da zayıf ölçüde pozitif saptanmıştır (0.66/0.61). Proteinlerin stabil olarak hazır halde bulunma oranları farklılık göstermektedir. Bu çalışmada termodinamik stabilite bozuldukça fonksiyonel hazır halde bulunan protein fraksiyonunun azaldığı gösterilmiştir. I219V varyantında fonksiyonel hazır halde bulunma oranı yaban tipten bile fazla iken (%112,5) K618A varyantında hafif bir azalma vardır (%80) (371). Bir diğer fonksiyonel test olan dominant mutator effect (DME) 0-3 arasında proteinin ne kadar fonksiyonel olduğunu göstermektedir (262,371). I219V tamamen fonksiyonelken (3) K618A azalmış fonksiyon gösterir (1). Abildgaard ve ark. da aynı çalışmada çeşitli varyantların PMS2'ye bağlanma aktivitesini değerlendirmiş ve deneylerindeki diğer basamaklarda stabil bir protein varyantı olmadığı belirlenen K618A'nın PMS2 ile güçlü etkileşim gösterdiğini ortaya koymuşlardır (371). Gueneau ve ark. K618A PMS2 ile etkileşim bölgesinin distalinde yer aldığı için PMS2'ye bağlanmanın bozulmadığını bildirmişlerdir; ancak London ve ark. daha güncel olan çalışmalarında dimerizasyon ünitesinin 502 ile 756 arasında olduğunu belirtmişlerdir (372,373). Bu durumda K618A etkileşim bölgesinde bulunmaktadır.

Ekspresyon ve protein fonksiyonunu değerlendiren çalışmaların yanında K618A'nın splicing'i etkileyip etkilemediği de araştırılmıştır. Buna göre Auclair ve ark. yaptıkları çalışmada K618A varyantının splicing'i etkilemediğini göstermişlerdir (250).

K618A varyantında dimerizasyon ve deneylerde ölçülen MMR aktivitesi patojenik bir varyant olmadığı yönünde deliller sunsa da hem Perera ve Bapat hem de Abildgaard (372) K618A varyantının stabil olmadığını ve yarı ömrünün yaban tip MLH1 proteine göre anlamlı ölçüde daha kısa olduğunu bildirmişlerdir (371,374). Örneğin Perera ve Bapat'ın çalışmasında K618A varyant MLH1 proteininin yarı ömrü yaban tip MLH1 proteinin yarı ömrü olan 10-10.5 saatten 3-4 saate inmiştir (374).

Moreno-Ortiz ve ark., Fearnhead ve ark. ve Castillejo ve ark. K618A'nın nötral kabul edilmesi gerektiğini ama yine de yatkınlık varyantı olabileceği belirtmişlerdir (360,375,376). Medeiros ve ark. da yüksek penetranslı bir mutasyon olmadığını ama risk faktörü olarak kabul edilmesinin uygun olacağını önermişlerdir (377).

7.5. Patojenik Varyantlar

Tarafımızca NOA açısından olası patojenik olarak sınıflandırılan diğer varyant V326A'dır. İlgili veriler onkoloji literatüründen gelmektedir. Örneğin Curia ve ark. bu varyantı LS hasta serilerinde bir olguda heterozigot olarak tespit etmiş ve varyantı kontrol grubunda saptamamışlardı (316). V326A varyantını tespit ettikleri vakada kolon adenomu mevcuttu ve immünohistokimyasal boyamada MLH1 ekspresyon kaybı varken MSH2 pozitif. MSI'de 4 belirteçten ikisinde instabilite mevcuttu. Bu vakada alelik imbalansı değerlendirdiklerinde 17 katlık bir alelik ekspresyon farkı olduğunu tespit etmişlerdi (316). Diğer yandan Pastrello ve ark. V326A varyantını mikrosatellit stabil tümörle ilişkili bulmuş, cDNA analizinde patoloji saptamamış ancak bir miktar azalmış alelik imbalans tespit etmiş ve benign olarak sınıflandırmıştır (341).

Fornasarig ve ark. yayınlarında missense değişiklikleri patojenik olarak değerlendirmediklerini belirtmişler ancak kolorektal kanser vakalarından birinde ve yine KRK öyküsü olan babasında V326A varyantının saptandığını bildirmişlerdir (378). Ancak ilgili vakada tümörün mikrosatellit stabil olması, distal yerleşimli ve kötü prognozlu olması tipik MMR defektine uymamaktadır. Genuardi ve ark. 1999 yılında yayınlanan çalışmalarında bu varyantı iki olguda bildirmişlerdir. Aynı aileden biri sporadik KRK, diğeri ise **olası** LS olan iki kişide saptanan bu varyantın kendi kriterlerine göre patojenik olmadığı yönünde görüş bildirmişlerdir (379).

Shimodaria ve ark. bu varyantın fonksiyonel çalışmasını tasarladıkları deneylerinde V326A varyantının yaban tipe yakın fonksiyon gösterdiğini kaydetmişlerdir; ancak bu varyantın dominant mutator etkiden bağımsız olarak MLH1 fonksiyonunu bozabileceğini ya da etkisinin tespit edilemeyecek kadar az olabileceğini de eklemişlerdir (261). Trojan ve ark. V326A varyantının ekspresyonun yaban tipe yakın olduğunu ve MMR aktivitesinin de normal olduğunu bildirmiştir (258). Takahashi ve ark. maya hücrelerinde tasarlanan bir deneyde dominant mutator etki açısından V326A'nın üç deneyde de fonksiyonel olduğunu, in vitro MMR aktivitesinin ise %26,9'a indiğini, SIFT skorunun 0 olduğunu ve göreceli ekspresyonunun %25-75 arasında olduğunu bildirmişlerdir (262). Ellison ve ark. yine maya

hücresinde insan V326A varyantına denk gelen proteinleri mutasyon sıklıklarını baz alarak değerlendirmişlerdir; I326V normal maya MLH1 proteininden farklılık göstermezken, I326A'da etkinlik yaban tip ile null varyant arasında sıralanmış ancak yine de null MLH1'den anlamlı ölçüde daha az mutasyon frekansı saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumu etkinliği azalmış polimorfizm olarak değerlendirmişlerdir (380). Kondo ve ark. maya iki-hibrid deneylerinde kodonun evrimsel olarak korunmuş bir lokus olduğunu belirtmişlerdir. Karboksi ucunda yer almadığı için PMS2 ile etkileşiminin normal olduğu gözlenmiş ancak EXO1 ile etkileşiminin hafifçe azaldığı (65.3/100) tespit edildiğinden, protein etkileşimleri için proteinin bağlanma ünitesinde yer almadan farklı mekanizmalarla etkileşimin bozulabileceği hipotezini desteklenebilir (259,381). Ayrıca London ve ark.'nın MLH1 proteini üzerine yaptıkları çalışmaya göre Val326Ala, proteinin ATPaz ünitesi içerisinde yer almaktadır (3-336 aa) ve proteinin bu bölgesi fonksiyonel anlamda mayoz için önemlidir (373,382).

7.6. MLH1 Fonksiyonlarına Yönelik Deneysel Çalışmalar

MLH1 gibi çok fonksiyonlu ve çok etkileşimli proteinlerin fonksiyonel çalışmalarındaki bazı güçlükler özellikle K618A ve V326A ile ilgili çelişkili sonuçları anlaşılır kılabilir. Deneylerin sonuçlarını değerlendirirken deneylerin hiçbirinde MMR kompleksini oluşturan diğer proteinlerin; örneğin MLH3 veya MRE11, DNA'nın kendisinin veya DNA hasarının olmadığını göz önünde bulundurmak gerekmektedir (349). Bir mutasyon proteinin diğer tüm proteinlerle etkileşimini ya da bütün bilinen fonksiyonlarını etkilemeyebilir. Proteinlerle etkileşim açısından, örneğin PMS2 ile etkileşim korunmuş olabilir; ancak EXO1, MLH3, MRE11 ve mayozda görev alan diğer proteinlerle etkileşimlerinin hangi koşullarda ne düzeyde etkilendiği bilinmemektedir. Çoklu fonksiyonlar açısından benzer şekilde V326A varyantı dominant mutator etki açısından fonksiyonelken in vitro MMR aktivitesi %26,9'a inmiştir; bu da fonksiyon kaybı olduğunda bütün parametrelerin etkilenmeyebileceğini göstermektedir. Kansere ilgili mekanizmalarda fonksiyon korunurken testiste mayozdaki işlevsellik etkilenmiş olabilir; nitekim testis dokusunda ya da spermde MLH1 varyantlarını değerlendiren herhangi bir fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle fonksiyonel çalışmanın hangi dokuda ve hücre tipinde yapıldığı da önemlidir. Örneğin rs1800734 için promotor aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada Perrera ve ark. A aleli olduğunda kolon kanseri hücrelerinde 5 kat (HCT116), malign olmayan kolon hücresinde (CCD-841-CoTr) ise yaklaşık 18 katlık

(17.73) aktivite kaybı tespit etmişlerdir (278). Tür farklılığı da önemlidir. Maya hücrelerinde mutasyon frekansının çalışılması örneğinde olduğu gibi, proteinin fonksiyonlarına ait tek bir parametre başka bir canlı türünde çalışıldığında çeşitli sorunlarla karşılaşılabilir. Yaban tip amino asit maya amino asidinin fonksiyonel olarak yerini alamayabilir ya da kritik bölgelerde insan ile maya arasında homoloji çok az olabilir ve karşılık gelen maya kodonu değerlendirilemeyebilir (380). MLH1 ile ilgili fonksiyonel çalışmaların çoğu in vitro MMR aktivitesi, protein etkileşimi, ekspresyon, protein stabilitesi gibi kısımlara odaklanmış ve patojenite bu parametrelere göre değerlendirilmiştir. Nitekim tüm çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde, K618A'nın ekspresyonunda azalma ve PMS2'ye bağlanma özellikleri açısından sonuçlar çelişkilidir; ancak stabil bir varyant olmadığı ve yarı ömrünün azaldığı araştırmalar arasında tutarlılık göstermektedir. Son bilgilere göre de PMS2 bağlanma bölgesinde yer almaktadır.

Bugüne kadar yapılmış olan tüm fonksiyonel çalışmalar fikir verici de olsa, NOA açısından bu varyantların değerlendirilebilmesi için mayoz, sperm matürasyonu göz önünde bulundurularak fonksiyonel deneylerin tasarlanması gerekmektedir. Hem K618A hem de V326A açısından fonksiyonel çalışmaların değerlendirilmesindeki önemli bir eksiklik varyant proteinin ATPaz aktivitesi ile ATP ve DNA'yı bağlama kapasitesinin değerlendirilmemiş olmasıdır. Nitekim Avdievich ve ark. ATP bağlama bölgesinin ve ATPaz aktivitesinin farelerde fertilite için önemli olduğu belirtmiş; Hoffmann ve ark. ATP ve DNA'yı bağlama fonksiyonunun mayozdaki crossing-over için esansiyel olduğunu ortaya koymuştur (382,383). Bu anlamda her iki varyanta yönelik fonksiyonel çalışmalar mayozdaki fonksiyonlarını gerçeğe en yakın şekilde değerlendirmek açısından yetersizdir ve bu eksikliğin canlı, doku, hücre tipi göz önünde bulundurularak mayozla ilişkili proteinlerle etkileşimi, ATPaz aktivitesinin yanı sıra ATP ve DNA bağlama kapasitelerini değerlendirecek fonksiyonel çalışmalarla giderilmesi gerekir. Kodlayıcı varyantlar, promoter ve 3'UTR varyantları başta olmak üzere saptanan varyantların fonksiyonel etkilerinin testis dokusu ve germ hücresi özelinde ve mayozda MLH1 proteininin etkileşim gösterdiği proteinler göz önünde bulundurularak tasarlanan fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

7.7. Epidemiyolojik Çalışmalar

Varyantların patojenitesi açısından önemli olan epidemiyolojik çalışmalar kanser fenotipi üzerinden yapılmıştır. Kanser fenotipinde risk saptanmaması NOA için riskli olmadığı anlamına gelmeyebilir, nitekim kanser için hazırlanan vaka-kontrol çalışmalarında olguların fertilite durumu belirtilmemiştir. Benzer şekilde ClinVar kanser fenotipi üzerinden sınıflama yapmaktadır ve bu çalışma açısından varyantların NOA fenotipiyle ilişkisini değerlendirirken bu sınıflamayı kullanmak çok uygun olmayabilir. Bu yüzden farklı etnik kökende ve daha büyük kohortlarda vaka-kontrol çalışmalarının yapıp bu varyantların etkilerinin teyit edilmesi ve etkilerinin netleşmesi önem taşımaktadır.

7.9. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardır. Bunlardan biri varyantların etkilerini değerlendirecek bir deney tasarımının tez kapsamında olmamasıdır. Bir diğeri *MLH1* geninin mutasyon yelpazesi içerisinde bulunan delesyon/duplikasyon ve promoter hipermetilasyonu bu çalışmada değerlendirilmemiştir. Kohortun pandemi koşulları ve maddi nedenlerle küçük olmasının yanında, etnik olarak karşılaştırılabilecek yayımlanmamış dış laboratuvar ekzom verisi olmasına rağmen bu veri tabanı ideal bir kontrol grubu olmaktan uzaktır ve çalışmanın gücünü azaltmaktadır. İdeal bir kontrol grubu olmamasının sebepleri çeşitli tıbbi endikasyonlarla ekzom analizi yapılan ve fertilitesi bilinmeyen her iki cinsiyete ait bireylere ait veriler olmasıdır. Her ne kadar endikasyonun infertilite ya da kanser olmadığı bilinse de spesifik endikasyon, kanıtlanmış fertilite ve aile öyküsü barındırmamaktadır. Çalışma sonuçlarının bu kısıtlılıklar eşliğinde değerlendirilmesi uygun olacaktır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızda matürasyon arrestine bağlı NOA fenotipi için risk oluşturabilecek ya da yatkınlık yaratacak iki kodlayıcı varyant bulunmuştur. V326A ve K618A olan bu varyantlar dışında önemi bilinmeyen bazı varyantlar literatürde ilk kez ortaya konmuştur. Ek olarak, benign veya olası benign olarak sınıflandırılmakla birlikte, bir promoter varyantı olan rs1800734 ve iki 3'UTR varyantı kompleks hastalık patofizyolojisi ile uyumlu olarak NOA'ya yatkınlık yaratan varyantlar olabilirler. Bu varyantları NOA'nın monogenik nedenleri olarak öngörmek gerçekçi olmayacaktır; ancak kişiselleştirilmiş tıp kapsamında yatkınlık faktörleri olarak değerlendirilebilirler. Bu yatkınlık faktörlerinin *MLH1* varyantları olmasının önemi, erkek genel sağlık durumunun göstergesi olarak kabul edilen erkek infertilitesiyle kanser arasında bağlantı kurmasında yatmaktadır.

Bu çalışmanın sonuçlarının hastaların klinik değerlendirmesine ve genetik danışmanlığına etkisinin yansıtılması için farklı tasarıda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmalar arasında;

- ✓ Etnik olarak uyumlu, fertil olduğu bilinen ideal bir kontrol grubuyla daha çok sayıda olgunun yer aldığı bir vaka-kontrol çalışması,
- ✓ Farklı etnik gruplarda vaka-kontrol çalışmalarının tasarlanması,
- ✓ K618A ve/veya V326A varyantı taşıyan çok sayıda olgu içeren bir kohortun oluşturulması ve varyantları içermeyen NOA olgularıyla kıyaslanarak varyantların klinik özelliklerinin ve farklarının belirlenmesi; olası prognostik değerlerinin ortaya konması,
- ✓ Çok sayıda fonksiyona sahip bir protein olan MLH1'in özellikle mayoz ile ilişkili fonksiyonlarının değerlendirildiği fonksiyonel çalışmaların tasarlanması;
 - İnsan testis dokusu veya spermatosit düzeyinde çeşitli fonksiyonlarının değerlendirilmesi
 - Diğer majör mayoz proteinleriyle etkileşimi
 - Proteinin ATPaz aktivitesi
 - Proteininin DNA bağlama kapasitesi

gibi deneyler yer almaktadır. Bu alışmalar infertilite ile kanser arasındaki ilişkinin netleşmesi, infertilite nedeniyle başvuran erkeklerin klinik olarak değerlendirilmesinde özellikle Lynch sendromu spektrumunda olan kanserlere karşı daha duyarlı ve dikkatli olunmasıyla birlikte tarama ve erken tanı olanağı yaratması bakımından değerli olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Jarvi K, Lo K, Fischer A, Grantmyre J, Zini A, Chow V, et al. CUA guideline: The workup of azoospermic males. *J Can Urol Assoc* [Internet]. 2010 Jun [cited 2020 Feb 14];4(3):163–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20514278>
2. Coutton C, Fissore RA, Palermo GD, Stouffs K, Touré A. Male Infertility: Genetics, Mechanism, and Therapies. Vol. 2016, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2016.
3. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. Vol. 68, Clinics. Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo; 2013. p. 39–60.
4. Ghieh F, Mitchell V, Mandon-Pepin B, Vialard F. Genetic defects in human azoospermia [Internet]. Vol. 29, Basic and Clinical Andrology. BioMed Central Ltd.; 2019 [cited 2020 Feb 14]. p. 4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31024732>
5. Naz M, Kamal M. Classification, causes, diagnosis and treatment of male infertility: a review. Vol. 17, Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. Springer Netherlands; 2017. p. 89–109.
6. Witherspoon L, Flannigan R. Meiotic arrest in azoospermic men: current implications of a recently reported novel technique for classification of arrest stage. Vol. 112, Fertility and Sterility. Elsevier Inc.; 2019. p. 1044–5.
7. Lo EM, Hotaling JM, Pastuszak AW. Urologic conditions associated with malignancy. *Urol Oncol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Aug 27];38(1):23–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30611645/>
8. Boeri L, Ventimiglia E, Cazzaniga W, Pederzoli F, Fallara G, Pozzi E, et al. Risk of health status worsening in primary infertile men: A prospective 10-year follow-up study. *Andrology* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Aug 27];10(1):128–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34369670/>
9. Glazer CH, Eisenberg ML, Tøttenborg SS, Giwercman A, Flachs EM, Bräuner EV, et al. Male factor infertility and risk of death: a nationwide record-linkage study. *Hum Reprod* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Aug 27];34(11):2266–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31725880/>
10. Walsh TJ, Schembri M, Turek PJ, Chan JM, Carroll PR, Smith JF, et al. Increased risk of high-grade prostate cancer among infertile men. *Cancer* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2020 Dec 29];116(9):2140–7. Available from:

/pmc/articles/PMC2893877/?report=abstract

11. Walsh TJ, Croughan MS, Schembri M, Chan JM, Turek PJ. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Arch Intern Med* [Internet]. 2009 Feb 23 [cited 2022 Aug 27];169(4):351–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19237718/>
12. Nagirnaja L, Aston KI, Conrad DF. The Genetic Intersection of Male Infertility and Cancer. *Fertil Steril* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Aug 27];109(1):20. Available from: </pmc/articles/PMC5761685/>
13. Hanson BM, Eisenberg ML, Hotaling JM. Male infertility: a biomarker of individual and familial cancer risk. *Fertil Steril* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Aug 27];109(1):6–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307404/>
14. Hanson HA, Anderson RE, Aston KI, Carrell DT, Smith KR, Hotaling JM. Subfertility increases risk of testicular cancer: evidence from population-based semen samples. *Fertil Steril* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Aug 27];105(2):322-328.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26604070/>
15. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Aug 27];110(5):810–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30316415/>
16. Del Giudice F, Kasman AM, Ferro M, Sciarra A, De Berardinis E, Belladelli F, et al. Clinical correlation among male infertility and overall male health: A systematic review of the literature. *Investig Clin Urol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Dec 29];61(4):355–71. Available from: </pmc/articles/PMC7329649/?report=abstract>
17. Anderson RE, Hanson HA, Patel DP, Johnstone E, Aston KI, Carrell DT, et al. Cancer risk in first- and second-degree relatives of men with poor semen quality. *Fertil Steril* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Dec 29];106(3):731–8. Available from: </pmc/articles/PMC5617641/?report=abstract>
18. Anderson RE, Hanson HA, Lowrance WT, Redshaw J, Oottamasathien S, Schaeffer A, et al. Childhood Cancer Risk in the Siblings and Cousins of Men with Poor Semen Quality. *J Urol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Dec 29];197(3):898–905. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28131504/>
19. Eisenberg ML, Li S, Brooks JD, Cullen MR, Baker LC. Increased risk of cancer in infertile men: analysis of U.S. claims data. *J Urol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2022 Aug 27];193(5):1596–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25463997/>
20. Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW, Stoffel EM, Deffenbaugh AM, Reid JE, et

- al. Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in lynch syndrome. *J Am Med Assoc*. 2006 Sep 27;296(12):1469–78.
21. Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps C V., Greene C, et al. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2020 Feb 16];13(22):2875–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15385442>
 22. Mukherjee S, Ridgeway AD, Lamb DJ. DNA mismatch repair and infertility. *Curr Opin Urol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Aug 27];20(6):525–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20852424/>
 23. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2003 Jul [cited 2022 Aug 27];9(4):331–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12926527/>
 24. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80-) [Internet]. 2015 Jan 23 [cited 2022 Aug 27];347(6220). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1260419>
 25. Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, et al. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* [Internet]. 1996 Jul [cited 2020 Apr 1];13(3):336–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673133>
 26. Lynn A, Koehler KE, Judis LA, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, et al. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* (80-) [Internet]. 2002 Jun 21 [cited 2020 Feb 16];296(5576):2222–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052900>
 27. Marcon E, Moens P. MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. *Genetics* [Internet]. 2003 Dec [cited 2020 Feb 16];165(4):2283–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704203>
 28. Ferrás C, Zhou X lei, Sousa M, Lindblom A, Barros A. DNA mismatch repair gene hMLH3 variants in meiotic arrest. *Fertil Steril*. 2007 Dec 1;88(6):1681–4.
 29. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Sep 2];113(3):533–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32115183/>
 30. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions

- (1988-1989). Hum Reprod [Internet]. 1991 [cited 2022 Sep 2];6(6):811–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1757519/>
31. Kumar N, Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J Hum Reprod Sci [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Sep 2];8(4):191–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26752853/>
 32. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. Fertil Steril [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];115(1):54–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33309062/>
 33. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. Eur Urol [Internet]. 2012 Aug [cited 2020 Apr 1];62(2):324–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591628>
 34. Optimizing natural fertility: a committee opinion. Fertil Steril [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Sep 2];117(1):53–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34815068/>
 35. WHO. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Geneva, Switzerland. WHO Press [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 2]; Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
 36. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update [Internet]. 2010 Nov 24 [cited 2022 Sep 2];16(3):231–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19934213/>
 37. Edition F. Examination and processing of human semen. World Health [Internet]. 2010 [cited 2020 Apr 1];Edition, V(10):286. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
 38. Pfeifer S, Butts S, Dumesic D, Fossum G, Gracia C, La Barbera A, et al. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. Fertil Steril [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Sep 2];103(3):e18–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25597249/>
 39. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J

- Med [Internet]. 2001 Nov 8 [cited 2022 Sep 2];345(19):1388–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11794171/>
40. Sigman M, Jarow JP. Endocrine evaluation of infertile men. Urology [Internet]. 1997 Nov [cited 2022 Sep 2];50(5):659–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9372871/>
 41. Mulhall JP, Trost LW, Brannigan RE, Kurtz EG, Redmon JB, Chiles KA, et al. Evaluation and Management of Testosterone Deficiency: AUA Guideline. J Urol [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Sep 2];200(2):423–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29601923/>
 42. Corona G, Wu FC, Rastrelli G, Lee DM, Forti G, O'Connor DB, et al. Low prolactin is associated with sexual dysfunction and psychological or metabolic disturbances in middle-aged and elderly men: the European Male Aging Study (EMAS). J Sex Med [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 2];11(1):240–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24345293/>
 43. Bradley CK, McArthur SJ, Gee AJ, Weiss KA, Schmidt U, Toogood L. Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis. Andrology [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];4(5):903–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27231097/>
 44. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell D. 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 [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];19(1):80–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27345006/>
 45. Esteves SC, Roque M, Bradley CK, Garrido N. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. Fertil Steril [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];108(3):456–467.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28865546/>
 46. Heidenreich A, Bonfig R, Wilbert DM, Strohmaier WL, Engelmann UH. Risk factors for antisperm antibodies in infertile men. Am J Reprod Immunol [Internet]. 1994 [cited 2022 Sep 3];31(2–3):69–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8049027/>
 47. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. Hum Reprod [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug

- 27];22(1):2–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16887924/>
48. Raleigh D, O'Donnell L, Southwick GJ, De Kretser DM, McLachlan RI. Stereological analysis of the human testis after vasectomy indicates impairment of spermatogenic efficiency with increasing obstructive interval. *Fertil Steril* [Internet]. 2004 Jun [cited 2022 Sep 3];81(6):1595–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15193483/>
 49. Asklund C, Jørgensen N, Kold Jensen T, Skakkebaek NE. Biology and epidemiology of testicular dysgenesis syndrome. *BJU Int* [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 3];93 Suppl 3(3):6–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15086436/>
 50. Møller H, Prener A, Skakkebaek NE. Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* [Internet]. 1996 [cited 2022 Sep 3];7(2):264–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8740739/>
 51. Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates RD. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* [Internet]. 1997 Jan [cited 2022 Sep 3];49(1):91–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9000192/>
 52. Kroese AC, de Lange NM, Collins J, Evers JL. Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2012 Oct 17 [cited 2022 Sep 3];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23076888/>
 53. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];21(1):56–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25038770/>
 54. Avellino GJ, Lipshultz LI, Sigman M, Hwang K. Transurethral resection of the ejaculatory ducts: etiology of obstruction and surgical treatment options. *Fertil Steril* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];111(3):427–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30827517/>
 55. Biyani CS hekha., Cartledge J, Janetschek G. Varicocele. *BMJ Clin Evid* [Internet]. 2009 [cited 2022 Sep 3];2009. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19445764/>
 56. Kolettis PN, Sandlow JI. Clinical and genetic features of patients with congenital unilateral absence of the vas deferens. *Urology* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2022 Sep 3];60(6):1073–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12475673/>
 57. Schlegel PN, Shin D, Goldstein M. Urogenital anomalies in men with congenital absence of the vas deferens. *J Urol* [Internet]. 1996 [cited 2022 Sep 3];155(5):1644–8. Available

- from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8627844/>
58. Lane VA, Scammell S, West N, Murthi G V. Congenital absence of the vas deferens and unilateral renal agenesis: implications for patient and family. *Pediatr Surg Int* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Sep 3];30(7):733–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24879556/>
 59. Patat O, Pugin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, et al. Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Aug 4 [cited 2022 Sep 3];99(2):437–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27476656/>
 60. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part II. *Fertil Steril* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];115(1):62–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33309061>
 61. Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. *Fertil Steril* [Internet]. 1994 [cited 2022 Sep 3];62(5):1028–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7926114/>
 62. Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2010 Aug 20 [cited 2022 Sep 3];16(1):65–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19696093/>
 63. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* [Internet]. 2012 Aug 23 [cited 2022 Sep 3];488(7412):471–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22914163/>
 64. Jónsson H, Sulem P, Kehr B, Kristmundsdóttir S, Zink F, Hjartarson E, et al. Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland. *Nature* [Internet]. 2017 Sep 28 [cited 2022 Sep 3];549(7673):519–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28959963/>
 65. Treadwell JR; Oristaglio J. Aua guideline on male infertility evidence report. Edited by ECRI. 2019;
 66. Reprotox • Home Page [Internet]. [cited 2022 Sep 3]. Available from: <https://www.reprotox.org/>
 67. Lead in Drinking Water | Sources of Lead | CDC [Internet]. [cited 2022 Sep 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/nceh/lead/prevention/sources/water.htm>

68. Koh DH, Locke SJ, Chen YC, Purdue MP, Friesen MC. Lead exposure in US worksites: A literature review and development of an occupational lead exposure database from the published literature. *Am J Ind Med* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Sep 3];58(6):605. Available from: [/pmc/articles/PMC4711746/](#)
69. Barbosa F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A Critical Review of Biomarkers Used for Monitoring Human Exposure to Lead: Advantages, Limitations, and Future Needs. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 3];113(12):1669. Available from: [/pmc/articles/PMC1314903/](#)
70. Zhang Y, Li S, Li S. Relationship between cadmium content in semen and male infertility: a meta-analysis. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2019 Jan 21 [cited 2022 Sep 3];26(2):1947–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460654/>
71. Whorton D, Krauss RM, Marshall S, Milby TH. Infertility in male pesticide workers. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1977 Dec 17 [cited 2022 Sep 3];2(8051):1259–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/73955/>
72. Salonia A, Matloob R, Gallina A, Abdollah F, Saccà A, Briganti A, et al. Are infertile men less healthy than fertile men? Results of a prospective case-control survey. *Eur Urol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2022 Aug 27];56(6):1025–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297076/>
73. Cazzaniga W, Capogrosso P, Ventimiglia E, Pederzoli F, Boeri L, Frego N, et al. High Blood Pressure Is a Highly Prevalent but Unrecognised Condition in Primary Infertile Men: Results of a Cross-sectional Study. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2020 Dec 29];6(1):178–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082228/>
74. Negri L, Benaglia R, Fiamengo B, Pizzocaro A, Albani E, Levi Setti PE. Cancer risk in male factor-infertility. *Placenta* [Internet]. 2008 Oct [cited 2022 Sep 3];29 Suppl B(SUPPL.2):178–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18755508/>
75. Eisenberg ML, Betts P, Herder D, Lamb DJ, Lipshultz LI. Increased risk of cancer among azoospermic men. *Fertil Steril* [Internet]. 2013 [cited 2020 Dec 29];100(3):681–685.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23790640/>
76. Poppe K, Glinioer D, Tournaye H, Maniewski U, Haentjens P, Velkeniers B. Is systematic screening for thyroid disorders indicated in subfertile men? *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2006 Mar [cited 2022 Sep 3];154(3):363–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16498047/>
77. Ventimiglia E, Capogrosso P, Boeri L, Serino A, Colicchia M, Ippolito S, et al. Infertility as a proxy of general male health: Results of a cross-sectional survey. *Fertil Steril*

- [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2020 Dec 29];104(1):48–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26006735/>
78. Eisenberg ML, Li S, Behr B, Pera RR, Cullen MR. Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil Steril* [Internet]. 2015 [cited 2020 Dec 29];103(1):66–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25497466/>
 79. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Martini FO, McLachlan R, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 Sep 3];23(6):660–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28981651/>
 80. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R, et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];32(1):18–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27864361/>
 81. Ventimiglia E, Capogrosso P, Boeri L, Ippolito S, Scano R, Moschini M, et al. Validation of the American Society for Reproductive Medicine guidelines/recommendations in white European men presenting for couple’s infertility. *Fertil Steril* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2022 Sep 3];106(5):1076-1082.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27473348/>
 82. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2011 Apr [cited 2022 Sep 3];25(2):271–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21397198/>
 83. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Sep 3];15(6):369–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29622783/>
 84. Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Sep 3];5(7):544–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27395771/>
 85. Jeve YB, Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];7(3):159–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25395740/>
 86. Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl* [Internet]. 2012 Jan [cited 2022 Sep 3];14(1):32–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120929/>

87. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2000 [cited 2022 Sep 3];6(1):93–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10711834/>
88. Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, et al. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 1999 [cited 2022 Sep 3];16(5):253–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10335472/>
89. Kohn TP, Kohn JR, Darilek S, Ramasamy R, Lipshultz L. Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Sep 3];33(5):571–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27020275/>
90. Vincent MC, Daudin M, De Mas P, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F, et al. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];23(1):18–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11780918/>
91. Sun F, Turek P, Greene C, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* [Internet]. 2007 Mar [cited 2022 Sep 3];87(3):565–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17140569/>
92. Harewood L, Fraser P. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 3];23(R1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24907073/>
93. Calogero AE, Giagulli VA, Mongioì LM, Triggiani V, Radicioni AF, Jannini EA, et al. Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders [Internet]. Vol. 40, *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Dec 29]. p. 705–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28258556/>
94. Belling K, Russo F, Jensen AB, Dalgaard MD, Westergaard D, Meyts ER De, et al. Klinefelter syndrome comorbidities linked to increased X chromosome gene dosage and altered protein interactome activity. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Sep 3];26(7):1219–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28369266/>
95. Aksglaede L, Juul A. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Sep 3];168(4). Available

from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23504510/>

96. Rohayem J, Nieschlag E, Zitzmann M, Kliesch S. Testicular function during puberty and young adulthood in patients with Klinefelter's syndrome with and without spermatozoa in seminal fluid. *Andrology* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Sep 3];4(6):1178–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27611179/>
97. Rohayem J, Fricke R, Czeloth K, Mallidis C, Wistuba J, Krallmann C, et al. Age and markers of Leydig cell function, but not of Sertoli cell function predict the success of sperm retrieval in adolescents and adults with Klinefelter's syndrome. *Andrology* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];3(5):868–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26235799/>
98. Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Sep 3];23(3):265–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28379559/>
99. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* [Internet]. 2001 [cited 2022 Sep 3];121(5):655–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427153/>
100. Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, et al. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2003 Jul [cited 2022 Sep 3];9(4):319–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12926526/>
101. Zenteno-Ruiz JC, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. 46,XX sex reversal. *Arch Med Res* [Internet]. 2001 [cited 2022 Sep 3];32(6):559–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11750731/>
102. Bashamboo A, McElreavey K. Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Dev* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 Sep 3];10(5–6):313–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27915330/>
103. Vorona E, Zitzmann M, Gromoll J, Schüring AN, Nieschlag E. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 [cited 2022 Sep 3];92(9):3458–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17579198/>
104. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier LD, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence

- classes. *Nature* [Internet]. 2003 Jun 19 [cited 2022 Sep 3];423(6942):825–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12815422/>
105. Lange J, Skaletsky H, van Daalen SKM, Embry SL, Korver CM, Brown LG, et al. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell* [Internet]. 2009 Sep 4 [cited 2022 Sep 3];138(5):855–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737515/>
 106. Kim JW, Park SY, Ryu HM, Lee DE, Lee BY, Kim SY, et al. Molecular and clinical characteristics of 26 cases with structural Y chromosome aberrations. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2012 Jun [cited 2022 Sep 3];136(4):270–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22688216/>
 107. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* [Internet]. 2014 Jan [cited 2022 Sep 3];2(1):5–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24357628/>
 108. Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 3];22(6):754–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24193344/>
 109. Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Sep 3];136(5):637–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28456834/>
 110. Tang D, Liu W, Li G, He X, Zhang Z, Zhang X, et al. Normal fertility with deletion of sY84 and sY86 in AZFa region. *Andrology* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];8(2):332–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31559707/>
 111. Alksere B, Berzina D, Dudorova A, Conka U, Andersone S, Pimane E, et al. Case of Inherited Partial AZFa Deletion without Impact on Male Fertility. *Case Rep Genet* [Internet]. 2019 Oct 31 [cited 2022 Sep 3];2019:1–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31781421/>
 112. Stouffs K, Vloeberghs V, Gheldof A, Tournaye H, Seneca S. Are AZFb deletions always incompatible with sperm production? *Andrology* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Sep 3];5(4):691–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28395120/>
 113. Zhang F, Lu C, Li Z, Xie P, Xia Y, Zhu X, et al. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc

- deletions in male infertility. *J Med Genet* [Internet]. 2007 Jul [cited 2022 Sep 3];44(7):437–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17412880/>
114. Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, et al. The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 [cited 2022 Sep 3];18(6):1122–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088127/>
 115. Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, Macdougall J. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2012 [cited 2022 Sep 3];380(9851):1419–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22698698/>
 116. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Sep 3];33(5):887–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22334387/>
 117. Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Giménez J, Segura A, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* [Internet]. 2000 [cited 2022 Sep 3];15(7):1476–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10875853/>
 118. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieusset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: Clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril*. 2000;74(6):1164–74.
 119. Yang B, Wang J, Zhang W, Pan H, Li T, Liu B, et al. Pathogenic role of ADGRG2 in CBAVD patients replicated in Chinese population. *Andrology* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];5(5):954–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805948/>
 120. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, De Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015 Sep 20 [cited 2022 Sep 3];11(9):547–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26194704/>
 121. Pitteloud N, Durrani S, Raivio T, Sykiotis GP. Complex genetics in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Front Horm Res* [Internet]. 2010 [cited 2022 Sep 3];39:142–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20389092/>
 122. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, et al. Digenic mutations

- account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2022 Sep 3];117(2):457–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17235395/>
123. Dwyer AA, Raivio T, Pitteloud N. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Reversible hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Sep 3];174(6):R267–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26792935/>
 124. Pulay AJ, Réthelyi JM. Multimarker analysis suggests the involvement of BDNF signaling and microRNA biosynthesis in suicidal behavior. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2016;171(6):763–76.
 125. Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B, Cell Pathol* [Internet]. 1977 [cited 2022 Sep 3];26(2):111–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/415424/>
 126. Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2015 Oct 31 [cited 2022 Sep 3];21(4):455–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25888788/>
 127. Chianese C, Fino MG, Riera Escamilla A, López Rodrigo O, Vinci S, Guarducci E, et al. Comprehensive investigation in patients affected by sperm macrocephaly and globozoospermia. *Andrology* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];3(2):203–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25755131/>
 128. Dávila Garza SA, Patrizio P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter’s syndrome, Kartagener’s syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and “stump” tail sperm: an updated literature review. *Curr Opin Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2022 Sep 3];25(3):229–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23587797/>
 129. Knowles MR, Zariwala M, Leigh M. Primary Ciliary Dyskinesia. *Clin Chest Med* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];37(3):449–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27514592/>
 130. Chemes HE, Carizza C, Scarinci F, Brugo S, Neuspiller N, Schwarsztein L. Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 1987 [cited 2022 Sep 3];47(2):310–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3545911/>
 131. Schilit SLP, Menon S, Friedrich C, Kammin T, Wilch E, Hanscom C, et al. SYCP2 Translocation-Mediated Dysregulation and Frameshift Variants Cause Human Male

- Infertility. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2020 Jan 2 [cited 2022 Sep 3];106(1):41–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31866047/>
132. Li P, Ji Z, Zhi E, Zhang Y, Han S, Zhao L, et al. Novel bi-allelic MSH4 variants causes meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 Dec 1;20(1).
 133. Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2003 Nov 22 [cited 2022 Sep 3];362(9397):1714–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14643120/>
 134. Bashamboo A, Ferraz-De-Souza B, Loureno D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2010 Oct 8 [cited 2022 Sep 3];87(4):505–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20887963/>
 135. Angeles Julaton VT, Reijo Pera RA. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Jun [cited 2022 Sep 3];20(11):2238–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21421998/>
 136. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, et al. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 3];51(4):239–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24431330/>
 137. Pashaei M, Rahimi Bidgoli MM, Zare-Abdollahi D, Najmabadi H, Haji-Seyed-Javadi R, Fatehi F, et al. The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Sep 3];37(2):451–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31916078/>
 138. Gershoni M, Hauser R, Barda S, Lehavi O, Arama E, Pietrokovski S, et al. A new MEIOB mutation is a recurrent cause for azoospermia and testicular meiotic arrest. *Hum Reprod* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Sep 3];34(4):666–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30838384/>
 139. An M, Liu Y, Zhang M, Hu K, Jin Y, Xu S, et al. Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Sep 3];38(8):1997–2005. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33728612/>
 140. Colombo R, Pontoglio A, Bini M. Two Novel TEX15 Mutations in a Family with Nonobstructive Azoospermia. *Gynecol Obstet Invest* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022

- Sep 3];82(3):283–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28355598/>
141. Zhang Y, Li P, Liu N, Jing T, Ji Z, Yang C, et al. Novel Bi-Allelic Variants of FANCM Cause Sertoli Cell-Only Syndrome and Non-Obstructive Azoospermia. *Front Genet* [Internet]. 2021 Dec 15 [cited 2022 Sep 3];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34976027/>
 142. Kherraf Z, Christou-Kent M, Karaouzene T, Amiri-Yekta A, Martinez G, Vargas AS, et al. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2017 Aug [cited 2022 Sep 3];9(8):1132–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28554943/>
 143. Arafat M, Har-Vardi I, Harlev A, Levitas E, Zeadna A, Abofoul-Azab M, et al. Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J Med Genet* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];54(9):633–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28536242/>
 144. Choi Y, Jeon S, Choi M, Lee MH, Park M, Lee DR, et al. Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive azoospermia. *Hum Mutat* [Internet]. 2010 [cited 2022 Sep 3];31(7):788–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20506135/>
 145. Wyrwoll MJ, Temel ŞG, Nagirnaja L, Oud MS, Lopes AM, van der Heijden GW, et al. Bi-allelic Mutations in M1AP Are a Frequent Cause of Meiotic Arrest and Severely Impaired Spermatogenesis Leading to Male Infertility. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2020 Aug 6 [cited 2022 Sep 3];107(2):342–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32673564/>
 146. Yang Y, Guo J, Dai L, Zhu Y, Hu H, Tan L, et al. XRCC2 mutation causes meiotic arrest, azoospermia and infertility. *J Med Genet* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];55(9):628–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30042186/>
 147. Fan S, Jiao Y, Khan R, Jiang X, Javed AR, Ali A, et al. Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2021 Feb 4 [cited 2022 Sep 3];108(2):324–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33508233/>
 148. Nagirnaja L, Mørup N, Nielsen JE, Stakaitis R, Golubickaite I, Oud MS, et al. Variant PNLDC1, Defective piRNA Processing, and Azoospermia. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Aug 19 [cited 2022 Sep 3];385(8):707–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34347949/>
 149. Salas-Huetos A, Tüttelmann F, Wyrwoll MJ, Kliesch S, Lopes AM, Goncalves J, et al. Disruption of human meiotic telomere complex genes TERB1, TERB2 and MAJIN in

- men with non-obstructive azoospermia. *Hum Genet* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];140(1):217–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33211200/>
150. Liu W, Gao X, Zhang H, Liu R, Cao Y, Yu R, et al. Analysis of STAG3 variants in Chinese non-obstructive azoospermia patients with germ cell maturation arrest. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Sep 3];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33980954/>
 151. Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, Moreno-Mendoza D, Chianese C, Sleddens-Linkels E, Contini E, et al. Sequencing of a “mouse azoospermia” gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum Reprod* [Internet]. 2019 Jun 4 [cited 2022 Sep 3];34(6):978–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31125047/>
 152. Wu H, Zhang X, Shen Q, Liu Y, Gao Y, Wang G, et al. A homozygous loss-of-function mutation in FBXO43 causes human non-obstructive azoospermia. *Clin Genet* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];101(1):55–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34595750/>
 153. Kherraf ZE, Cazin C, Bouker A, Fourati Ben Mustapha S, Hennebicq S, Septier A, et al. Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2022 Mar 3 [cited 2022 Sep 3];109(3):508–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35172124/>
 154. Li Y, Wu Y, Zhou J, Zhang H, Zhang Y, Ma H, et al. A recurrent ZSWIM7 mutation causes male infertility resulting from decreased meiotic recombination. *Hum Reprod* [Internet]. 2021 Apr 20 [cited 2022 Sep 3];36(5):1436–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33713115/>
 155. Sarkardeh H, Totonchi M, Asadpour O, Sadighi Gilani MA, Zamani Esteki M, Almadani N, et al. Association of MOV10L1 gene polymorphisms and male infertility in azoospermic men with complete maturation arrest. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 3];31(7):865–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24817005/>
 156. Hollingsworth NM, Ponte L, Halsey C. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev* [Internet]. 1995 Jul 15 [cited 2022 Aug 27];9(14):1728–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7622037/>
 157. Yao C, Yang C, Zhao L, Li P, Tian R, Chen H, et al. Bi-allelic SHOC1 loss-of-function mutations cause meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *J Med Genet* [Internet].

- 2021 Oct 1 [cited 2022 Sep 3];58(10):679–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32900840/>
158. Hardy JJ, Wyrwoll MJ, Mcfadden W, Malcher A, Rotte N, Pollock NC, et al. Variants in GCNA, X-linked germ-cell genome integrity gene, identified in men with primary spermatogenic failure. *Hum Genet* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Sep 3];140(8):1169–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33963445/>
 159. Mitchell MJ, Metzler-Guillemain C, Toure A, Coutton C, Arnoult C, Ray PF. Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clin Genet* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Sep 3];91(2):208–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27779755/>
 160. Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Sep 3];150(5):R159–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26447148/>
 161. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2011 Mar 11 [cited 2022 Sep 3];88(3):351–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21397064/>
 162. Dam AHDM, Kosciński I, Kremer JAM, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2007 [cited 2022 Sep 3];81(4):813–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17847006/>
 163. Hu Z, Xia Y, Guo X, Dai J, Li H, Hu H, et al. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat Genet* [Internet]. 2011 Feb [cited 2022 Sep 3];44(2):183–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197933/>
 164. Zhao H, Xu J, Zhang H, Sun J, Sun Y, Wang Z, et al. A genome-wide association study reveals that variants within the HLA region are associated with risk for nonobstructive azoospermia. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2012 May 4 [cited 2022 Sep 3];90(5):900–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22541561/>
 165. Kosova G, Scott NM, Niederberger C, Prins GS, Ober C. Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2012 Jun 8 [cited 2022 Sep 3];90(6):950–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22633400/>
 166. Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castané E, Carrell DT. Evaluation of 172 candidate

- polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 [cited 2022 Sep 3];25(6):1383–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20378615/>
167. Riggs ER, Ledbetter DH, Martin CL. Genomic Variation: Lessons Learned from Whole-Genome CNV Analysis. *Curr Genet Med Rep* [Internet]. 2014 Sep [cited 2022 Sep 3];2(3):146–50.
 168. Yararbas K, Ilgin Ruhi H, Aydos K, Elhan A, Tukun A. Is idiopathic male infertility really idiopathic ? Detection of DNA copy number variations and candidate chromosomal loci among azoospermic males by high resolution comparative genomic hybridization. *Pamukkale Medical Journal*. 2019; 12(1):199-208.
 169. Lo Giacco D, Chianese C, Ars E, Ruiz-Castañ E, Forti G, Krausz C. Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility. *J Med Genet* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 3];51(5):340–4.
 170. Shen Y, Xu J, Yang X, Liu Y, Ma Y, Yang D, et al. Evidence for the involvement of the proximal copy of the MAGEA9 gene in Xq28-linked CNV67 specific to spermatogenic failure. *Biol Reprod* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];96(3):610–6.
 171. Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med*. 2015 May 28;372(22):2097–107.
 172. Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, et al. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2015 Sep [cited 2022 Sep 3];7(9):1198–210.
 173. Lopes AM, Aston KI, Thompson E, Carvalho F, Gonçalves J, Huang N, et al. Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. *PLoS Genet* [Internet]. 2013 [cited 2022 Sep 3];9(3).
 174. Krausz C, Giachini C, Lo Giacco D, Daguin F, Chianese C, Ars E, et al. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. *PLoS One* [Internet]. 2012 Oct 9 [cited 2022 Sep 3];7(10).
 175. Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P, et al. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2022 Sep 3];6(4).
 176. Jensen TK, Jacobsen R, Christensen K, Nielsen NC, Bostofte E. Good semen quality and

- life expectancy: A cohort study of 43,277 men. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2020 Dec 29];170(5):559–65.
177. E., Francesca K., Gordon Lamp DJL. DNA Repair Genes and Genomic Instability in Severe Male Factor Infertility. In: *The Genetics of Male Infertility*. 2007. p. 145–59.
 178. Topping, Daniel. Petricia Brown TH. The Immunocytogenetics of Human Male Meiosis. In: *The Genetics of Male Infertility*. 2007. p. 115–26.
 179. De Vries SS, Baart EB, Dekker M, Siezen A, De Rooij DG, De Boer P, et al. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev* [Internet]. 1999 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];13(5):523–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10072381/>
 180. Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, et al. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* [Internet]. 2002 Aug [cited 2020 Feb 14];31(4):385–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091911>
 181. Sun F, Greene C, Turek PJ, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Immunofluorescent synaptonemal complex analysis in azoospermic men. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 3];111(3–4):366–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16192718/>
 182. Svetlanov A, Cohen PE. Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: Understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp Cell Res* [Internet]. 2004 May 15 [cited 2022 Sep 3];296(1):71–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15120996/>
 183. Costa Y, Speed R, Öllinger R, Aisheimer M, Semple CA, Gautier P, et al. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2022 Sep 3];118(Pt 12):2755–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944401/>
 184. Richardson C, Horikoshi N, Pandita TK. The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2004 Aug [cited 2022 Sep 3];3(8–9):1149–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15279804/>
 185. Agarwal S, Roeder GS. Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* [Internet]. 2000 Jul 21 [cited 2022 Sep 3];102(2):245–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10943844/>
 186. Öllinger R, Alsheimer M, Benavente R. Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2005 Jan [cited 2022 Sep 3];16(1):212–7. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15496453/>

187. Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* [Internet]. 2000 [cited 2022 Sep 3];6(5):989–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11106739/>
188. Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* [Internet]. 2000 [cited 2022 Sep 3];6(5):975–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11106738/>
189. Barlow C, Hirotune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, et al. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* [Internet]. 1996 Jul 12 [cited 2022 Sep 3];86(1):159–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8689683/>
190. Elson A, Wang Y, Daugherty CJ, Morton CC, Zhou F, Campos-Torres J, et al. Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Nov 12 [cited 2022 Sep 3];93(23):13084–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8917548/>
191. Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T. The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* [Internet]. 1998 [cited 2022 Sep 3];1(5):707–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9660954/>
192. Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, et al. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* [Internet]. 1998 [cited 2022 Sep 3];1(5):697–705. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9660953/>
193. Libby BJ, De La Fuente R, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Cobb J, Inselman A, et al. The mouse meiotic mutation mei1 disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev Biol* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2022 Sep 3];242(2):174–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11820814/>
194. Libby BJ, Reinholdt LG, Schimenti JC. Positional cloning and characterization of Mei1, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Dec 23 [cited 2022 Sep 3];100(26):15706–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668445/>
195. Goedecke W, Eijpe M, Offenberger HH, Van Aalderen M, Heyting C. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* [Internet]. 1999 Oct [cited 2022 Sep 3];23(2):194–8. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508516/>
196. Börner GV, Kleckner N, Hunter N. Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* [Internet]. 2004 Apr 2 [cited 2022 Sep 3];117(1):29–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15066280/>
 197. Oliver-Bonet M, Turek PJ, Sun F, Ko E, Martin RH. Temporal progression of recombination in human males. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 Sep 3];11(7):517–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16123081/>
 198. Fukuda T, Ohya Y. Recruitment of RecA homologs Dmc1p and Rad51p to the double-strand break repair site initiated by meiosis-specific endonuclease VDE (PI-SceI). *Mol Genet Genomics* [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Sep 3];275(2):204–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16341884/>
 199. Her C, Wu X, Bailey SM, Doggett NA. Mouse MutS homolog 4 is predominantly expressed in testis and interacts with MutS homolog 5. *Mamm Genome* [Internet]. 2001 [cited 2022 Sep 3];12(1):73–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11178747/>
 200. Winand NJ, Panzer JA, Kolodner RD. Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2022 Sep 3];53(1):69–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9787078/>
 201. Paquis-Flucklinger V, Santucci-Darmanin S, Paul R, Saunières A, Turc-Carel C, Desnuelle C. Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. *Genomics* [Internet]. 1997 Sep 1 [cited 2022 Sep 3];44(2):188–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9299235/>
 202. Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M, Fishel R. hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell* [Internet]. 2004 Aug 13 [cited 2022 Sep 3];15(3):437–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15304223/>
 203. Santucci-Darmanin S, Neyton S, Lespinasse F, Saunières A, Gaudray P, Paquis-Flucklinger V. The DNA mismatch-repair MLH3 protein interacts with MSH4 in meiotic cells, supporting a role for this MutL homolog in mammalian meiotic recombination. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2002 Jul 15 [cited 2020 Apr 1];11(15):1697–706. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095912>
 204. Sun F, Trpkov K, Rademaker A, Ko E, Martin RH. Variation in meiotic recombination

- frequencies among human males. *Hum Genet* [Internet]. 2005 Feb [cited 2022 Sep 3];116(3):172–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15578224/>
205. Topping D, Brown P, Judis LA, Schwartz S, Seftel A, Thomas A, et al. Synaptic defects at meiosis I and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* [Internet]. 2006 Nov 12 [cited 2020 Feb 16];21(12):3171–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861745>
 206. Barlow AL, Hultén MA. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 1998 [cited 2022 Sep 3];6(4):350–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9781043/>
 207. 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* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 3];20(8):2133–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890739/>
 208. Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, et al. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 3];20(3):683–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15689348/>
 209. Sun F, Kozak G, Scott S, Trpkov K, Ko E, Mikhaail-Philips M, et al. Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: case report. *Hum Reprod* [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 3];19(8):1770–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15205399/>
 210. Tease C, Hultén MA. Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 3];107(3–4):208–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15467366/>
 211. Gonsalves J, Turek PJ, Schlegel PN, Hopps C V., Weier JF, Reijo Pera RA. Recombination in men with Klinefelter syndrome. *Reproduction* [Internet]. 2005 Aug [cited 2022 Sep 3];130(2):223–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049160/>
 212. Wang TF, Kung WM. Supercomplex formation between Mlh1-Mlh3 and Sgs1-Top3 heterocomplexes in meiotic yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 3];296(4):949–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12200140/>
 213. Lipkin SM, Rozek LS, Rennert G, Yang W, Chen PC, Hacia J, et al. The MLH1 D132H

- variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2004 Jul [cited 2022 Feb 19];36(7):694–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15184898/>
214. Maduro MR, Casella R, Kim E, Lévy N, Niederberger C, Lipshultz LI, et al. Microsatellite instability and defects in mismatch repair proteins: a new aetiology for Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Sep 3];9(2):61–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12569174/>
 215. Denham J, Marques FZ, Charchar FJ. Leukocyte telomere length variation due to DNA extraction method. *BMC Res Notes*. 2014 Dec 4;7(1):1–6.
 216. Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A. DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2020 May 4];8(6):62692. Available from: www.plosone.org
 217. Zahary MN, Kaur G, Hassan MRA, Singh H, Naik VR, Ankathil R. Germline mutation analysis of MLH1 and MSH2 in malaysian lynch syndrome patients. *World J Gastroenterol*. 2012 Feb 28;18(8):814–20.
 218. Ferrara F, Temperton N. Chimeric influenza haemagglutinins: Generation and use in pseudotype neutralization assays. *MethodsX*. 2017 Jan 1;4:11–24.
 219. Downey N. Extraction of DNA from agarose gels. *Methods Mol Biol*. 2003;235:137–9.
 220. Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. Improved Protocols for Illumina Sequencing. *Curr Protoc Hum Genet* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2020 Jun 30];79(1):18.2.1-18.2.42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hg1802s79>
 221. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [cited 2020 Jul 7]. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 222. Brandler WM, Antaki D, Gujral M, Noor A, Rosanio G, Chapman TR, et al. Frequency and Complexity of de Novo Structural Mutation in Autism. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):667–79.
 223. Srour M, Chitayat D, Caron V, Chassaing N, Bitoun P, Patry L, et al. Recessive and dominant mutations in retinoic acid receptor beta in cases with microphthalmia and diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet*. 2013 Oct 3;93(4):765–72.
 224. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* [Internet]. 2016 Jun 6 [cited 2020 Jul 7];17(1):1–14. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13059-016-0974-4>

225. Strafella C, Caputo V, Pagliaroli G, Iozzo N, Campoli G, Carboni S, et al. NGS Analysis for Molecular Diagnosis of Retinitis Pigmentosa (RP): Detection of a Novel Variant in PRPH2 Gene. *Genes (Basel)* [Internet]. 2019 Oct 12 [cited 2020 Jul 7];10(10):792. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/10/792>
226. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Aug 27];35(11):1978–80. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/11/1978/5146783>
227. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May 8;17(5):405–24.
228. Qi M, Stenson PD, Ball E V., Tainer JA, Bacolla A, Kehrer-Sawatzki H, et al. Distinct sequence features underlie microdeletions and gross deletions in the human genome. *Hum Mutat* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];43(3):328–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34918412/>
229. Kohlmann W, Gruber SB. Lynch Syndrome. *GeneReviews(®)* [Internet]. 2021 Feb 4 [cited 2022 Sep 3]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
230. Dugan KA, Lawrence HS, Hares DR, Fisher CL, Budowle B. An Improved Method for Post-PCR Purification for mtDNA Sequence Analysis. *J Forensic Sci*. 2002 Jul 1;47(4):15459J.
231. Heiner CR, Hunkapiller KL, Chen SM, Glass JI, Chen EY. Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res*. 1998 May 1;8(5):557–61.
232. Voorter CEM, Palusci F, Tilanus MGJ. Sequence-based typing of HLA: An improved group-specific full-length gene sequencing approach. *Methods Mol Biol*. 2014;1109:101–14.
233. Esteves LM, Bulhões SM, Brilhante MJ, Mota-Vieira L. Three multiplex snapshot assays for SNP genotyping in candidate innate immune genes. *BMC Res Notes* [Internet]. 2013 Feb 7 [cited 2020 May 3];6(1):54. Available from: <http://bmcrenotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-6-54>
234. Huang C, Zheng Y, Zhang W, Chen Z, Huang Z, Fang Y. Case Report: A Chinese Family of Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by a Novel Splicing Mutation in the FLNC Gene. *Front Genet* [Internet]. 2022 Jun 20 [cited 2022 Sep 3];13. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35795207/>
235. Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Aug 27];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33618777/>
 236. Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, et al. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell*. 1995 Jul 28;82(2):309–19.
 237. Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2020 Apr 1];16(23):2870–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728321>
 238. Enguita-Marruedo A, Sleddens-Linkels E, Ooms M, de Geus V, Wilke M, Blom E, et al. Meiotic arrest occurs most frequently at metaphase and is often incomplete in azoospermic men. *Fertil Steril*. 2019 Dec 1;112(6):1059-1070.e3.
 239. Terribas E, Bonache S, Garcí'a M, Garcí'a-Aré Valo G, Sa'nchez J, Sa'nchez S, et al. Changes in the Expression Profile of the Meiosis-Involved Mismatch Repair Genes in Impaired Human Spermatogenesis. *J Androl*. 2010;31:346–57.
 240. Hotaling JM, Walsh TJ. Male infertility: A risk factor for testicular cancer [Internet]. Vol. 6, *Nature Reviews Urology*. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2020 Jul 9]. p. 550–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2009.179>
 241. Hotaling JM, Laufer N, Rosenwaks Z. Introduction: Cancer biomarkers and fertility. *Fertil Steril* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Feb 19];109(1):4–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307399/>
 242. 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* [Internet]. 2012 May 17 [cited 2020 Jun 28];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22594646/>
 243. Wei K, Clark AB, Wong E, Kane MF, Mazur DJ, Parris T, et al. Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2022 Feb 19];17(5):603–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12629043/>
 244. 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* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2020 Jun 28];61(4):187–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26086992/>
245. 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* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Feb 19];46(6):451–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31342644/>
 246. Ghieh F, Barbotin AL, Swierkowski-Blanchard N, Leroy C, Fortemps J, Gerault C, et al. Whole-exome sequencing in patients with maturation arrest: a potential additional diagnostic tool for prevention of recurrent negative testicular sperm extraction outcomes. *Hum Reprod* [Internet]. 2022 May 30 [cited 2022 Aug 27];37(6):1334–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35413094/>
 247. Zavodna K, Krivulcik T, Bujalkova MG, Slamka T, Martinicky D, Ilencikova D, et al. Partial loss of heterozygosity events at the mutated gene in tumors from MLH1/MSH2 large genomic rearrangement carriers. *BMC Cancer* [Internet]. 2009 Nov 20 [cited 2022 Feb 19];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19930554/>
 248. Lacey J V., Yang H, Gaudet MM, Dunning A, Lissowska J, Sherman ME, et al. Endometrial cancer and genetic variation in PTEN, PIK3CA, AKT1, MLH1, and MSH2 within a population-based case-control study. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2022 Feb 19];120(2):167–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21093899/>
 249. Langeberg WJ, Kwon EM, Koopmeiners JS, Ostrander EA, Stanford JL. Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Feb 19];19(1):258–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056646/>
 250. Hansen MF, Neckmann U, Lavik LAS, Vold T, Gilde B, Toft RK, et al. A massive parallel sequencing workflow for diagnostic genetic testing of mismatch repair genes. *Mol Genet genomic Med* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2022 Feb 19];2(2):186–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24689082/>
 251. Auclair J, Buisine MP, Navarro C, Ruano E, Montmain G, Desseigne F, et al. Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum Mutat* [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Feb 19];27(2):145–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16395668/>
 252. Savio AJ, Mrkonjic M, Lemire M, Gallinger S, Knight JA, Bapat B. The dynamic DNA

- methylation landscape of the mutL homolog 1 shore is altered by MLH1-93G>A polymorphism in normal tissues and colorectal cancer. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2017 Mar 9 [cited 2022 Feb 19];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28293327/>
253. Hudler P, Voulk K, Liovic M, Repse S, Juvan R, Komel R. Mutations in the hMLH1 gene in Slovenian patients with gastric carcinoma. *Clin Genet* [Internet]. 2004 May [cited 2022 Feb 19];65(5):405–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15099349/>
 254. Fredriksson H, Ikonen T, Autio V, Matikainen MP, Helin HJ, Tammela TLJ, et al. Identification of germline MLH1 alterations in familial prostate cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2006 Nov [cited 2022 Feb 19];42(16):2802–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16963262/>
 255. Tannergård P, Nordenskjöld M, Lindblom A, Frödin JE, Lipford JR, Kolodner R. Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* [Internet]. 1995 Dec 15 [cited 2022 Feb 19];55(24):6092–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8521398/>
 256. Leman R, Tubeuf H, Raad S, Tournier I, Derambure C, Lanos R, et al. Assessment of branch point prediction tools to predict physiological branch points and their alteration by variants. *BMC Genomics* [Internet]. 2020 Jan 28 [cited 2022 Feb 19];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31992191/>
 257. Andersen SD, Liberti SE, Lützen A, Drost M, Bernstein I, Nilbert M, et al. Functional characterization of MLH1 missense variants identified in Lynch syndrome patients. *Hum Mutat* [Internet]. 2012 Dec [cited 2022 Feb 19];33(12):1647–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22753075/>
 258. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lönnqvist KE, et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 [cited 2022 Feb 19];129(2):537–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16083711/>
 259. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, et al. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 19];122(1):211–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11781295/>
 260. Kondo E, Suzuki H, Horii A, Fukushima S. A yeast two-hybrid assay provides a simple way to evaluate the vast majority of hMLH1 germ-line mutations. *Cancer Res* [Internet].

- 2003 Jun 15 [cited 2022 Feb 19];63(12):3302–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12810663/>
261. McVety S, Li L, Gordon PH, Chong G, Foulkes WD. Disruption of an exon splicing enhancer in exon 3 of MLH1 is the cause of HNPCC in a Quebec family. *J Med Genet* [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Feb 19];43(2):153–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15923275/>
 262. Shimodaira H, Filosi N, Shibata H, Suzuki T, Radice P, Kanamaru R, et al. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* [Internet]. 1998 [cited 2022 Feb 19];19(4):384–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9697702/>
 263. Takahashi M, Shimodaira H, Andreutti-Zaugg C, Iggo R, Kolodner RD, Ishioka C. Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. *Cancer Res* [Internet]. 2007 May 15 [cited 2022 Feb 19];67(10):4595–604. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17510385/>
 264. Kim JC, Roh SA, Koo KH, Ka IH, Kim HC, Yu CS, et al. Genotyping possible polymorphic variants of human mismatch repair genes in healthy Korean individuals and sporadic colorectal cancer patients. *Fam Cancer* [Internet]. 2004 [cited 2022 Feb 19];3(2):129–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15340264/>
 265. Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2022 Feb 19];120(7):1548–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17205513/>
 266. Hutter P, Wijnen J, Rey-Berthod C, Thiffault I, Verkuijlen P, Farber D, et al. An MLH1 haplotype is over-represented on chromosomes carrying an HNPCC predisposing mutation in MLH1. *J Med Genet* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 19];39(5):323–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12011148/>
 267. Hutter P, Couturier A, Rey-Berthod C. Two common forms of the human MLH1 gene may be associated with functional differences. *J Med Genet* [Internet]. 2000 [cited 2022 Feb 19];37(10):776–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11015456/>
 268. Campbell PT, Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Velicer CM, et al. Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. *Gut* [Internet]. 2009 May [cited 2022 Feb 19];58(5):661–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18523027/>
 269. Bagnoli S, Putignano AL, Melean G, Baglioni S, Sestini R, Milla M, et al. Susceptibility

- to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2004 Nov [cited 2022 Feb 19];10(6):705–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15626886/>
270. Nejda N, Iglesias D, Moreno Azcoita M, Medina Arana V, González-Aguilera JJ, Fernández-Peralta AM. A MLH1 polymorphism that increases cancer risk is associated with better outcome in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2009 Sep [cited 2022 Feb 19];193(2):71–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19665066/>
 271. Milanizadeh S, Khanyaghma M, Haghighi MM, Mohebbi S, Damavand B, Almasi S, et al. Molecular analysis of imperative polymorphisms of MLH1 gene in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biomark* [Internet]. 2013 [cited 2022 Feb 19];13(6):427–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24595079/>
 272. Zhang Q, Wang YN, Wu XY, Chen XD, Liu PQ, Li XS. Association of Polymorphisms of Mismatch Repair Genes hMLH1 and hMSH2 with Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 19];30(3):253–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32749112/>
 273. Santos LS, Silva SN, Gil OM, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J. Mismatch repair single nucleotide polymorphisms and thyroid cancer susceptibility. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Feb 19];15(5):6715–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616133/>
 274. Tetyana A Andrushchenko, Sergiy V Goncharov, Victor E Dosenko, Konstantin E Ishhejkin. Allelic polymorphisms of dna repair genes and their influence on the formation of resistance to the development of bronchopulmonary pathology under the action of industrial aerosols - PubMed. [cited 2022 Feb 19]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31175773/>
 275. Raptis S, Mrkonjic M, Green RC, Pethe V V., Monga N, Chan YM, et al. MLH1 -93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2007 Mar 21 [cited 2022 Feb 19];99(6):463–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17374836/>
 276. Dominguez-Valentin M, Wernhoff P, Cajal AR, Kalfayan PG, Piñero TA, Gonzalez ML, et al. MLH1 Ile219Val Polymorphism in Argentinean Families with Suspected Lynch Syndrome. *Front Oncol* [Internet]. 2016 Aug 24 [cited 2022 Feb 19];6(AUG). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27606285/>
 277. Chen H, Shen Z, Hu Y, Xiao Q, Bei D, Shen X, et al. Association between MutL

- homolog 1 polymorphisms and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2015 May 19 [cited 2022 Feb 19];141(12):2147–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25986311/>
278. Xiao XQ, Gong W Da, Wang SZ, Zhang ZD, Rui XP, Wu GZ, et al. Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Lett* [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 Feb 19];3(3):591–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22740958/>
 279. Perera S, Mrkonjic M, Rawson JB, Bapat B. Functional effects of the MLH1-93G>A polymorphism on MLH1/EPM2AIP1 promoter activity. *Oncol Rep* [Internet]. 2011 Mar [cited 2022 Feb 19];25(3):809–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21206982/>
 280. Beiner ME, Rosen B, Fyles A, Harley I, Pal T, Siminovitch K, et al. Endometrial cancer risk is associated with variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2006 Sep [cited 2022 Feb 19];15(9):1636–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16985024/>
 281. Harley I, Rosen B, Risch HA, Siminovitch K, Beiner ME, McLaughlin J, et al. Ovarian cancer risk is associated with a common variant in the promoter sequence of the mismatch repair gene MLH1. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Feb 19];109(3):384–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18405947/>
 282. Niu L, Li S, Liang H, Li H. The hMLH1 -93G>A Polymorphism and Risk of Ovarian Cancer in the Chinese Population. *PLoS One* [Internet]. 2015 Aug 14 [cited 2022 Feb 19];10(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26275295/>
 283. Worrillow LJ, Smith AG, Scott K, Andersson M, Ashcroft AJ, Dores GM, et al. Polymorphic MLH1 and risk of cancer after methylating chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *J Med Genet* [Internet]. 2008 Mar [cited 2022 Feb 19];45(3):142–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17959715/>
 284. Park SH, Lee GY, Jeon HS, Lee SJ, Kim KM, Jang SS, et al. -93G-->A polymorphism of hMLH1 and risk of primary lung cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2004 Nov 20 [cited 2022 Feb 19];112(4):678–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15382050/>
 285. Lin LH, Lin MW, Mar K, Lin CS, Ji D Der, Lee WP, et al. The hMLH1 -93G>A promoter polymorphism is associates with outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2014 Oct 31 [cited 2022 Feb 19];21(13):4270–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25047469/>

286. Rodriguez-Hernandez I, Perdomo S, Santos-Briz A, Garcia JL, Gomez-Moreta JA, Cruz JJ, et al. Analysis of DNA repair gene polymorphisms in glioblastoma. *Gene* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2022 Feb 19];536(1):79–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24325908/>
287. Caja F, Vodickova L, Kral J, Vymetalkova V, Naccarati A, Vodicka P. DNA Mismatch Repair Gene Variants in Sporadic Solid Cancers. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Feb 19];21(15):1–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32756484/>
288. Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, Chang GC, Tsai YH, Su WC, et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* [Internet]. 2011 Jun [cited 2022 Feb 19];72(3):280–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21093954/>
289. Halasova E, Matakova T, Skerenova M, Krutakova M, Slovakova P, Dzian A, et al. Polymorphisms of Selected DNA Repair Genes and Lung Cancer in Chromium Exposure. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Feb 19];911:17–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26987333/>
290. Yu JH, Bigler J, Whitton J, Potter JD, Ulrich CM. Mismatch repair polymorphisms and colorectal polyps: hMLH1-93G>A variant modifies risk associated with smoking. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 Feb 19];101(6):1313–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16771955/>
291. Zhu X, Liu W, Qiu X, Wang Z, Tan C, Bei C, et al. Single nucleotide polymorphisms in MLH1 predict poor prognosis of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 19];8(45):80039–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29108386/>
292. Allan JM, Shorto J, Adlard J, Bury J, Coggins R, George R, et al. MLH1 -93G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2008 Nov 15 [cited 2022 Feb 19];123(10):2456–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18712731/>
293. Whiffin N, Broderick P, Lubbe SJ, Pittman AM, Penegar S, Chandler I, et al. MLH1-93G > A is a risk factor for MSI colorectal cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2022 Feb 19];32(8):1157–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21565826/>
294. Pardini B, Corrado A, Paolicchi E, Cugliari G, Berndt SI, Bezieau S, et al. DNA repair and cancer in colon and rectum: Novel players in genetic susceptibility. *Int J cancer*

- [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2022 Feb 19];146(2):363–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31209889/>
295. Ma X, Zhang B, Zheng W. Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Gut* [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 Feb 19];63(2):326–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23946381/>
 296. Huyghe JR, Harrison TA, Bien SA, Hampel H, Figueiredo JC, Schmit SL, et al. Genetic architectures of proximal and distal colorectal cancer are partly distinct. *Gut* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 Feb 19];70(7):1325–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33632709/>
 297. Song H, Ramus SJ, Quaye L, DiCioccio RA, Tyrer J, Lomas E, et al. Common variants in mismatch repair genes and risk of invasive ovarian cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2006 Nov 15 [cited 2022 Feb 19];27(11):2235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16774946/>
 298. Si W, Kang S, Sun H, Chen J, Cao S, Li Y. Genetic polymorphisms in hMSH2 and hMLH1 genes are associated with prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Feb 19];29(7):1148–55. Available from: <https://ijgc.bmj.com/content/29/7/1148>
 299. Khooshemehri P, Jamaldini SH, Ziaei SAM, Afshari M, Sattari M, Narouie B, et al. Genetic Polymorphism of Mismatch Repair Genes and Susceptibility to Prostate Cancer. *Urol J* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Feb 19];17(3):271–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953835/>
 300. He Y, Xu X, Chen H, Wang J, Xiong W, Xu Y, et al. The hMLH1 promoter polymorphisms and cancer susceptibility in Asian populations: a meta-analysis. *Gene* [Internet]. 2013 Jul 10 [cited 2022 Feb 19];523(2):199–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23587910/>
 301. Mik M, Dziki L, Malinowska K, Trzcinski R, Majsterek I, Dziki A. Polymorphism of MSH2 Gly322Asp and MLH1 -93G>A in non-familial colon cancer - a case-controlled study. *Arch Med Sci* [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 19];13(6):1295–302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29181059/>
 302. Martínez-Urueña 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* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Feb 20];15(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23374646/>

303. Muñiz-Mendoza R, Ayala-Madrigal ML, Partida-Pérez M, Peregrina-Sandoval J, Leal-Ugarte E, Macías-Gómez N, et al. MLH1 and XRCC1 polymorphisms in Mexican patients with colorectal cancer. *Genet Mol Res* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 20];11(3):2315–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22843073/>
304. Liu NQ, Ter Huurne M, Nguyen LN, Peng T, Wang SY, Studd JB, et al. The non-coding variant rs1800734 enhances DCLK3 expression through long-range interaction and promotes colorectal cancer progression. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Feb 14 [cited 2022 Feb 19];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28195176/>
305. Fennell LJ, Jamieson S, McKeone D, Corish T, Rohdmann M, Furner T, et al. MLH1-93 G/a polymorphism is associated with MLH1 promoter methylation and protein loss in dysplastic sessile serrated adenomas with BRAF V600E mutation. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 19];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29304767/>
306. Miyakura Y, Tahara M, Lefor AT, Yasuda Y, Sugano K. Haplotype defined by the MLH1-93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. *BMC Res Notes* [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 19];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421847/>
307. Savio AJ, Bapat B. Modulation of transcription factor binding and epigenetic regulation of the MLH1 CpG island and shore by polymorphism rs1800734 in colorectal cancer. *Epigenetics* [Internet]. 2017 Jun 3 [cited 2022 Feb 19];12(6):441–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28304185/>
308. Funck A, Santos JC, Silva-Fernandes IJL, Rabenhorst SHB, Martinez CAR, Ribeiro ML. Effect of MLH1 -93G>A on gene expression in patients with colorectal cancer. *Med Oncol* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Feb 19];31(9):1–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25115745/>
309. Shin A, Lee K-M, Ahn B, Park C-G, Noh S-K, Park D-Y, et al. Genotype-phenotype relationship between DNA repair gene genetic polymorphisms and DNA repair capacity. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 19];9(3):501–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18990028/>
310. Chen H, Taylor NP, Sotamaa KM, Mutch DG, Powell MA, Schmidt AP, et al. Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1. *Int J cancer* [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2022 Feb 20];120(8):1684–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17230510/>
311. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Albertsen H, Sweeney C, Caan BJ, et al. The MLH1

- 93 G>A promoter polymorphism and genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 19];47(10):835–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18615680/>
312. Mrkonjic M, Roslin NM, Greenwood CM, Raptis S, Pollett A, Laird PW, et al. Specific variants in the MLH1 gene region may drive DNA methylation, loss of protein expression, and MSI-H colorectal cancer. *PLoS One* [Internet]. 2010 Oct 13 [cited 2022 Feb 20];5(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20967208/>
 313. Kámory E, Kolacsek O, Ottó S, Csuka O. hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2003 [cited 2022 Feb 20];9(4):236–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14688830/>
 314. Thomas R, Trapani D, Goodyer-Sait L, Tomkova M, Fernandez-Rozadilla C, Sahnane N, et al. The polymorphic variant rs1800734 influences methylation acquisition and allele-specific TFAP4 binding in the MLH1 promoter leading to differential mRNA expression. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Feb 19];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31530880/>
 315. Shrestha KS, Tuominen MM, Kauppi L. Mlh1 heterozygosity and promoter methylation associates with microsatellite instability in mouse sperm. *Mutagenesis* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Feb 20];36(3):237–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33740045/>
 316. 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* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2020 Dec 26];50(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28983945/>
 317. Curia M C, Palmmirotta R, Aceto G, Messerini L, Veri M C, Crognale S, et al. Unbalanced germ-line expression of hMLH1 and hMSH2 alleles in hereditary nonpolyposis colorectal cancer - PubMed. 1999 [cited 2022 Feb 20]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10446963/>
 318. Mao G, Pan X, Gu L. Evidence that a mutation in the MLH1 3'-untranslated region confers a mutator phenotype and mismatch repair deficiency in patients with relapsed leukemia. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Feb 8 [cited 2022 Feb 19];283(6):3211–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18056700/>
 319. Tinat J, Baert-Desurmont S, Latouche JB, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al. The three nucleotide deletion within the 3'untranslated region of MLH1 resulting in gene

- expression reduction is not a causal alteration in Lynch syndrome. *Fam Cancer* [Internet]. 2008 Dec [cited 2022 Feb 19];7(4):339–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18496770/>
320. Steri M, Idda ML, Whalen MB, Orrù V. Genetic variants in mRNA untranslated regions. *Wiley Interdiscip Rev RNA* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Feb 20];9(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29582564/>
 321. Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The changing meanings of “mutation:” A contextualized study of public discourse. *Hum Mutat* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 20];19(1):69–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11754105/>
 322. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* [Internet]. 1999 Jul 8 [cited 2022 Feb 20];234(2):177–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395891/>
 323. Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2022 Feb 20];43(6):853–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925375/>
 324. Lianoglou S, Garg V, Yang JL, Leslie CS, Mayr C. Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression. *Genes Dev* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2022 Feb 20];27(21):2380–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145798/>
 325. Smibert P, Miura P, Westholm JO, Shenker S, May G, Duff MO, et al. Global patterns of tissue-specific alternative polyadenylation in *Drosophila*. *Cell Rep* [Internet]. 2012 Mar 29 [cited 2022 Feb 20];1(3):277–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22685694/>
 326. Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* [Internet]. 2009 Aug 21 [cited 2022 Feb 20];138(4):673–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19703394/>
 327. Rhinn H, Qiang L, Yamashita T, Rhee D, Zolin A, Vanti W, et al. Alternative α -synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology. *Nat Commun* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 20];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23011138/>
 328. Halvorsen M, Martin JS, Broadaway S, Laederach A. Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genet* [Internet]. 2010 Aug [cited 2022 Feb 20];6(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20808897/>
 329. Ghimenti C, Tannergård P, Wahlberg S, Liu T, Giulianotti PG, Mosca F, et al.

- Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumours. *Br J Cancer* [Internet]. 1999 [cited 2022 Feb 20];80(1–2):11–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10389971/>
330. Palicio M, Balmaña J, González S, Blanco I, Marcuello E, Peinado MA, et al. Mismatch repair gene analysis in Catalanian families with colorectal cancer. *J Med Genet* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 20];39(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12070261/>
 331. Arnold S, Buchanan DD, Barker M, Jaskowski L, Walsh MD, Birney G, et al. Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, splicing assays, segregation, and tumor characteristics. *Hum Mutat* [Internet]. 2009 May [cited 2022 Feb 20];30(5):757–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19267393/>
 332. Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, et al. Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variants. *Hum Genet*. 2006 Mar;119(1–2):9–22.
 333. Lastella P, Surdo NC, Resta N, Guanti G, Stella A. In silico and in vivo splicing analysis of MLH1 and MSH2 missense mutations shows exon- and tissue-specific effects. *BMC Genomics* [Internet]. 2006 Sep 22 [cited 2022 Sep 4];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16995940/>
 334. Aretz S, Uhlhaas S, Sun Y, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, et al. Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat* [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 4];24(5):370–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15459959/>
 335. Cravo M, Afonso AJ, Lage P, Albuquerque C, Maia L, Lacerda C, et al. Pathogenicity of missense and splice site mutations in hMSH2 and hMLH1 mismatch repair genes: implications for genetic testing. *Gut* [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 4];50(3):405–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11839723/>
 336. Sharp A, Pichert G, Lucassen A, Eccles D. RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1. *Hum Mutat* [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 4];24(3):272. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15300854/>
 337. Zatkova A, Messiaen L, Vandenbroucke I, Wieser R, Fonatsch C, Krainer AR, et al. Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Hum Mutat* [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 4];24(6):491–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15523642/>

338. Soukarieh O, Gaildrat P, Hamieh M, Drouet A, Baert-Desurmont S, Frébourg T, et al. Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLoS Genet* [Internet]. 2016 [cited 2022 Sep 4];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26761715/>
339. Rhine CL, Cygan KJ, Soemedi R, Maguire S, Murray MF, Monaghan SF, et al. Hereditary cancer genes are highly susceptible to splicing mutations. *PLoS Genet* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Feb 19];14(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29505604/>
340. Morak M, Schaefer K, Steinke-Lange V, Koehler U, Keinath S, Massdorf T, et al. Full-length transcript amplification and sequencing as universal method to test mRNA integrity and biallelic expression in mismatch repair genes. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Feb 19];27(12):1808–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31332305/>
341. Hampel H, Frankel W, Panescu J, Lockman J, Sotamaa K, Fix D, et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2022 Feb 20];66(15):7810–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16885385/>
342. Pastrello C, Pin E, Marroni F, Bedin C, Fornasarig M, Tibiletti MG, et al. Integrated analysis of unclassified variants in mismatch repair genes. *Genet Med* [Internet]. 2011 Feb [cited 2022 Feb 20];13(2):115–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21239990/>
343. Ward R, Meldrum C, Williams R, Mokany E, Scott R, Turner J, et al. Impact of microsatellite testing and mismatch repair protein expression on the clinical interpretation of genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 20];128(8):403–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12200596/>
344. Liu T, Tannergård P, Hackman P, Rubio C, Kressner U, Lindmark G, et al. Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer. *Hum Genet* [Internet]. 1999 [cited 2022 Feb 20];105(5):437–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10598809/>
345. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* [Internet]. 2005 Apr 27 [cited 2022 Feb 20];293(16):1986–94. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15855432/>
346. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2001 [cited 2022 Feb 20];121(4):830–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11606497/>
 347. Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, et al. Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2022 Feb 20];20(5):1203–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870161/>
 348. Wijnen J, Meera Khan P, Vasen H, Van Der Klift H, Mulder A, Van Leeuwen-Cornelisse I, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1997 [cited 2022 Feb 20];61(2):329–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9311737/>
 349. Peltomaki P, Vasen HFA, Bisgaard ML, Buerstedde JM, Friedl W, Grandjouan S, et al. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 1997 [cited 2022 Feb 20];113(4):1146–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9322509/>
 350. Medeiros F, Lindor NM, Couch FJ, Highsmith WE. The germline MLH1 K618A variant and susceptibility to Lynch syndrome-associated tumors. *J Mol Diagn* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Feb 19];14(3):264–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22426235/>
 351. Wahlberg S, Liu T, Lindblom P, Lindblom A. Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1. *Genet Test* [Internet]. 1999 [cited 2022 Feb 20];3(3):259–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10495924/>
 352. Fidalgo P, Almeida MR, West S, Gaspar C, Maia L, Wijnen J, et al. Detection of mutations in mismatch repair genes in Portuguese families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) by a multi-method approach. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2000 Jan [cited 2022 Feb 20];8(1):49–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10713887/>
 353. Scott RJ, McPhillips M, Meldrum CJ, Fitzgerald PE, Adams K, Du Sart D, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities

- between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2001 [cited 2022 Feb 20];68(1):118–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11112663/>
354. Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* [Internet]. 2001 [cited 2022 Feb 20];81(4):535–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11304573/>
 355. Caldes T, Godino J, De La Hoya M, Carbonero IG, Segura PP, Eng C, et al. Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int J cancer* [Internet]. 2002 Apr 10 [cited 2022 Feb 20];98(5):774–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920650/>
 356. Hegde M, Blazo M, Chong B, Prior T, Richards C. Assay validation for identification of hereditary nonpolyposis colon cancer-causing mutations in mismatch repair genes MLH1, MSH2, and MSH6. *J Mol Diagn* [Internet]. 2005 [cited 2022 Feb 20];7(4):525–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16237223/>
 357. Syngal S, Fox EA, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *J Med Genet* [Internet]. 2000 [cited 2022 Feb 20];37(9):641–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10978352/>
 358. Gille JJP, Hogervorst FBL, Pals G, Wijnen JT, Van Schooten RJ, Dommering CJ, et al. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 20];87(8):892–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12373605/>
 359. Wolf B, Henglmüller S, Janschek E, Ilencikova D, Ludwig-Papst C, Bergmann M, et al. Spectrum of germ-line MLH1 and MSH2 mutations in Austrian patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. 2005 Apr [cited 2022 Feb 20];117(7–8):269–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15926618/>
 360. Belvederesi L, Bianchi F, Loretelli C, Gagliardini D, Galizia E, Bracci R, et al. Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2006 Jul [cited 2022 Feb 20];14(7):853–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16724012/>
 361. Castillejo A, Guarinos C, Martinez-Canto A, Barbera VM, Egoavil C, Castillejo MI, et

- al. Evidence for classification of c.1852_1853AA>GC in MLH1 as a neutral variant for Lynch syndrome. *BMC Med Genet* [Internet]. 2011 Jan 19 [cited 2022 Feb 19];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21247423/>
362. Guerrette S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Mar 5 [cited 2022 Feb 19];274(10):6336–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10037723/>
 363. Jäger AC, Rasmussen M, Bisgaard HC, Singh KK, Nielsen FC, Rasmussen LJ. HNPCC mutations in the human DNA mismatch repair gene hMLH1 influence assembly of hMutLalpha and hMLH1-hEXO1 complexes. *Oncogene* [Internet]. 2001 Jun 14 [cited 2022 Feb 20];20(27):3590–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11429708/>
 364. Bianchi F, Galizia E, Bracci R, Belvederesi L, Catalani R, Loretelli C, et al. Effectiveness of the CRCAPRO program in identifying patients suspected for HNPCC. *Clin Genet* [Internet]. 2007 Feb [cited 2022 Feb 20];71(2):158–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17250665/>
 365. Kosinski J, Hinrichsen I, Bujnicki JM, Friedhoff P, Plotz G. Identification of Lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair. *Hum Mutat* [Internet]. 2010 Aug [cited 2022 Feb 19];31(8):975–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20533529/>
 366. Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: Implications for genetic testing. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2007 May 21 [cited 2022 Feb 20];13(19):2727. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17147123/>
 367. Vo AT, Zhu F, Wu X, Yuan F, Gao Y, Gu L, et al. hMRE11 deficiency leads to microsatellite instability and defective DNA mismatch repair. *EMBO Rep* [Internet]. 2005 May [cited 2022 Feb 20];6(5):438–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15864295/>
 368. Hinrichsen I, Brieger A, Trojan J, Zeuzem S, Nilbert M, Plotz G. Expression defect size among unclassified MLH1 variants determines pathogenicity in Lynch syndrome diagnosis. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2022 Feb 19];19(9):2432–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23403630/>
 369. Drost M, Zonneveld JBM, Van Dijk L, Morreau H, Tops CM, Vasen HFA, et al. A cell-free assay for the functional analysis of variants of the mismatch repair protein MLH1. *Hum Mutat* [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Feb 20];31(3):247–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20037723/>

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20020535/>
370. Blasi MF, Ventura I, Aquilina G, Degan P, Bertario L, Bassi C, et al. A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2022 Feb 20];66(18):9036–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16982745/>
 371. Vogelsang M, Comino A, Zupanec N, Hudler P, Komel R. Assessing pathogenicity of MLH1 variants by co-expression of human MLH1 and PMS2 genes in yeast. *BMC Cancer* [Internet]. 2009 Oct 28 [cited 2022 Feb 19];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19863800/>
 372. Abildgaard AB, Stein A, Nielsen S V., Schultz-Knudsen K, Papaleo E, Shrikhande A, et al. Computational and cellular studies reveal structural destabilization and degradation of MLH1 variants in Lynch syndrome. *Elife* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Feb 20];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31697235/>
 373. Gueneau E, Dherin C, Legrand P, Tellier-Lebegue C, Gilquin B, Bonnesoeur P, et al. Structure of the MutL α C-terminal domain reveals how Mlh1 contributes to Pms1 endonuclease site. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Feb 20];20(4):461–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23435383/>
 374. London J, Martín-López J, Yang I, Liu J, Lee JB, Fishel R. Linker domain function predicts pathogenic MLH1 missense variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021 Mar 2 [cited 2022 Feb 19];118(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33619096/>
 375. Perera S, Bapat B. The MLH1 variants p.Arg265Cys and p.Lys618Ala affect protein stability while p.Leu749Gln affects heterodimer formation. *Hum Mutat* [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 19];29(2):332. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18205192/>
 376. Moreno-Ortiz JM, Ayala-Madrigal MDLL, Corona-Rivera JR, Centeno-Flores M, Maciel-Gutiérrez V, Franco-Topete RA, et al. Novel Mutations in MLH1 and MSH2 Genes in Mexican Patients with Lynch Syndrome. *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 20];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27247567/>
 377. Fearnhead NS, Wilding JL, Winney B, Tonks S, Bartlett S, Bicknell DC, et al. Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Nov 9 [cited 2022 Feb 20];101(45):15992–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15520370/>

378. Medeiros F, Lindor NM, Couch FJ, Highsmith WE. The germline MLH1 K618A variant and susceptibility to Lynch syndrome-associated tumors. *J Mol Diagn* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Feb 20];14(3):264–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22426235/>
379. Fornasarig M, Viel A, Valentini M, Capozzi E, Sigon R, De Paoli A, et al. Microsatellite instability and MLH1 and MSH2 germline defects are related to clinicopathological features in sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep* [Internet]. 2000 [cited 2022 Feb 19];7(1):39–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10601588/>
380. Genuardi M, Carrara S, Anti M, Ponz De Leòn M, Viel A. Assessment of pathogenicity criteria for constitutional missense mutations of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer genes MLH1 and MSH2. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 1999 Oct [cited 2022 Feb 19];7(7):778–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10573010/>
381. Ellison AR, Lofing J, Bitter GA. Functional analysis of human MLH1 and MSH2 missense variants and hybrid human-yeast MLH1 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2022 Feb 19];10(18):1889–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555625/>
382. Hardt K, Heick SB, Betz B, Goecke T, Yazdanparast H, Küppers R, et al. Missense variants in hMLH1 identified in patients from the German HNPCC consortium and functional studies. *Fam Cancer* [Internet]. 2011 Jun [cited 2022 Feb 19];10(2):273–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21404117/>
383. Hoffmann ER, Shcherbakova P V, Kunkel TA, Borts RH. MLH1 Mutations Differentially Affect Meiotic Functions in *Saccharomyces cerevisiae* [Internet]. [cited 2020 Apr 1]. Available from: www.groik.com/stahl/
384. Avdievich E, Reiss C, Scherer SJ, Zhang Y, Maier SM, Jin B, et al. Distinct effects of the recurrent Mlh1G67R mutation on MMR functions, cancer, and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4247–52.

EK-1 ACMG SINIFLANDIRMASI ÖZET (226)

A. VARYANTIN PATOJENİTE KRİTERLERİ

1. Patojenite İçin Çok Güçlü Kanıt

PVS1: Fonksiyon kaybının ilgili hastalığın bilinen bir mekanizması olduğu bir gende null varyant olması

- **Null varyantlar:**
 - Nonsense varyant,
 - Çerçeve kayması varyantı,
 - Kanonikal splice bölgesinin +/-1 veya 2 nükleotid yerleşiminde olan varyant,
 - Başlangıç kodonunu etkileyen/başlangıç kaybı varyantı,
 - Tek veya çoklu ekzon delesyonu
- Bu kriteri uygularken dikkat edilmesi gerekenler:
 - Genin hastalığa yol açma mekanizması fonksiyon kaybı mekanizması ile değilse,
 - Genin en uç 3' ucunda yer alan bir varyantsa,
 - Ekzon atlamaya (skipping) yol açtığı ön görülen bir splice varyantı olup kalan proteinin bütünlüğü bozulmuyorsa,
 - Çok sayıda transkript varsa

2. Patojenite İçin Güçlü Kanıt

- **PS1:** Nükleotid değişikliğinden bağımsız olarak, daha önceden bilinen bir patojen varyantla aynı amino asit değişikliğine yol açan varyant.
 - Dikkat edilmesi gereken nokta; bilinen patojenik varyantın amino asit değişikliği ile değil, splicing'i etkileyerek fonksiyonu etkileyen bir varyant olup olmadığıdır.
- **PS2:** Anne ve babanın biyolojik ebeveynler olduğunun kanıtlandığı durumda *de novo* varyant olması ve aile öyküsünün olmaması.
 - Paternitenin teyit edilmesi yeterli değildir. Oosit donasyonu, embriyo transferinde hata, vb. nedenlerle maternite olmayabilir.

- **PS3:** İyi yapılandırılmış *in vitro* veya *in vivo* fonksiyonel çalışmaların varyantın gen veya gen ürünü üzerinde hasar verici etkisi olduğunu desteklemesi
 - En “iyi yapılandırılmış” çalışma, doğrulanmış ve klinik tanısal laboratuvar koşullarında tekrarlanabilir ve etkili olduğu gösterilmiş fonksiyonel çalışmadır.
- **PS4:** Varyantın etkilenmiş bireylerdeki prevalansının kontrollerdeki prevalansa göre anlamlı ölçüde yüksek olması
 - Varyantın çok nadir bir varyant olup vaka-kontrol çalışmalarında istatistiksel anlamlılığa ulaşamadığı durumlarda; varyantın önceden çok sayıda aynı fenotipte, birbirinden bağımsız bireylerde gözlemlenmiş olması ve kontrollerde olmaması orta düzey kanıt olarak kullanılabilir.

3. Patojenite İçin Orta Düzey Kanıt

- **PM1:** Varyantın mutasyonel sıcak noktada ve/veya benign varyasyon içermeyen iyi bilinen fonksiyonel bir ünite (domain) (örneğin enzimin aktif bölgesi) yer alması
- **PM2:** Varyantın Exome Sequencing Project, 1000 Genomes veya ExAC popülasyon veri tabanlarındaki kontrollerde olmaması (ya da resesif kalıtım paterni ise oldukça düşük frekansta olması)
 - İndel varyantlar için popülasyon verisi güvenilir olmayabilir
- **PM3:** Resesif hastalıklar için varyantın patojenik bir varyant ile *trans* konumunda olması
- **PM4:** Tekrar dizisi bölgesinde olmayan ve protein uzunluğunda değişikliğe yol açan çerçeve içi delesyon/insersiyon varyantları veya stop kaybı varyantları
- **PM5:** Daha önceden farklı bir missense değişikliğin patojenik olduğu bilinen bir amino asit rezidüsünde yeni bir missense değişiklik.
 - Amino asit/protein düzeyinde missense varyant olarak etki göstermeyen patojenik varyantlarda dikkatli olunmalı
- **PM6:** Varyantın paternite ve maternite belirlenmeden *de novo* olduğu varsayılması

4. Patojenite İçin Destekleyici Kanıt

- **PP1:** Varyantın hastalık yaptığı kesin olarak bilinen bir gende çok sayıda etkilenmiş aile bireyinde seyrege olması

- **PP2:** Varyantın düşük oranda benign missense varyant içeren bir gende olması ve missense varyantların hastalığın sık bir mekanizması olması
- **PP3:** Çok sayıda bilgisayarimsal kanıtın varyantın gen veya gen ürünü üzerinde zararlı bir etkisi olduğunu desteklemesi (evrimsel korunmuşluk, splicing etkisi, vb.)
- **PP4:** Hastanın fenotipinin veya aile öyküsünün tek bir genetik etiyolojisi olan bir hastalık için oldukça spesifik olması
- **PP5:** Varyantın saygın kaynaklar tarafından patojenik olarak rapor edilmesi; ancak kanıtın bağımsız değerlendirme yapmak için laboratuvar için kullanılabilir olmaması

B. VARYANTIN BENİGN OLMA KRİTERLERİ

1. Benign Etki İçin Tek Başına Yeterli Kanıt

BA1: Varyantın allel frekansının Exome Sequencing Project, 1000 Genomes veya ExAC popülasyon veritabanlarında %5'in üzerinde olması

2. Benign Etki İçin Güçlü Kanıt

- **BS1:** Varyantın allel frekansının o hastalık için beklenenden yüksek olması
- **BS2:** Varyantın, erken yaşta tam penetrans göstermesi beklenen, resesif (homozigot), dominant (heterozigot) veya X'e bağlı (hemizigot) hastalık açısından sağlıklı erişkin bireyde görülmesi.
- **BS3:** İyi yapılandırılmış *in vitro* veya *in vivo* fonksiyonel çalışmaların varyantın protein fonksiyonu veya splicing üzerinde hasar verici etkisinin olmadığını desteklemesi
- **BS4:** Varyantın bir ailenin etkilenmiş bireylerinde segregasyon olmaması
 - Sık görülen fenotipler için (kanser, epilepsi, vb.) fenokopilerin varlığı etkilenmiş bireyler arasında segregasyon yokluğunu taklit edebilir. Ayrıca görünürde segregasyon olmamasını karmaşıklaştıracak şekilde, ailelerde otozomal dominant hastalığa katkıda bulunan birden fazla patojenik varyant olabilir.

3. Benign Etki İçin Destekleyici Kanıt

- **BP1:** Varyantın, hastalık mekanizmasının temel olarak “truncating” varyantlarla olduğu bir gende missense varyant olması
- **BP2:** Varyantın tam penetrans gösteren dominant bir gen/hastalık için patojenik bir varyantla *trans* konumunda olması; veya herhangi bir kalıtım paterninde patojenik bir varyant ile *cis* konumunda yer alması.
- **BP3:** Bilinen bir fonksiyonu olmayan bir tekrar bölgesinde yer alan çerçeve içi delesyon/insersiyon varyantları
- **BP4:** Çok sayıda bilgisayarlı kanıtın varyantın gen veya gen ürünü üzerinde bir etkisi olmadığını göstermesi (evrimsel korunmuşluk, splicing etkisi, vb.)
 - Pek çok *in silico* algoritma, öngörülerinde aynı veya oldukça benzer girdi kullandıkları için her algoritma tek bir bağımsız kriter olarak sayılamaz. BP4 bir varyantın herhangi bir değerlendirmesinde yalnızca bir kez kullanılabilir.
- **BP5:** Varyantın, alternatif bir moleküler mekanizması olan bir hastalığa sahip bir vakada tespit edilmesi
- **BP6:** Varyantın saygın kaynaklar tarafından benign olarak rapor edilmesi; ancak kanıtın bağımsız değerlendirme yapmak için laboratuvar için kullanılabilir olmaması
- **BP7:** Varyantın sinonim (sessiz) bir varyant olup splicing’i öngören algoritmalarda splice konsensus dizisi üzerinde etkisinin olmadığını veya yeni bir splice bölgesi yaratmadığının gösterilmesi VE nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun oldukça yüksek olmaması.

C. SINIFLAMA

Patojenik	Olası Patojenik	Benign	Olası Benign
PVS1 ve aşağıdakilerden birisi:	PVS1 ve 1 orta kriterin (PM1-6) ile birlikte olması	Tek başına BA1	1 güçlü kriter (BS1-4) ve 1 destekleyici kriterin bir arada olması (BP1-7)

• 1 ve üzerinde güçlü (PS1-4) • 2 ve üzerinde orta (PM1-6) birlikte • 1 orta (PM1-6) ve 1 destekleyici (PP1-5) • 2 ve üzerinde destekleyici (PP1-5)			
2 ve üzerinde güçlü (PS1-4)	1 güçlü kriter (PS1-4) ve 1-2 orta kriterin (PM1-6) bir arada olması	2 ve üzerinde güçlü kriterin (BS1-4) olması	2 ve üzerinde destekleyici kriter (BP1-7) olması
1 güçlü (PS1-4) ve aşağıdakilerden birisi: • 3 ve üzerinde orta (PM1-6) kriter ile birlikte • 2 orta (PM1-6) kriter ve 2 ve üzerinde destekleyici kriter (PP1-5) ile birlikte • 1 orta (PM1-6) kriter ve 4	1 güçlü kriter (PS1-4) ile 2 ve üzerinde destekleyici kriterin (PP1-5) bir arada olması		

ve üzerinde destekleyici kriter (PP1-5) ile birlikte			
	3 ve üzerinde orta kriter (PM1-6) olması		
	2 orta kriter (PM1-6) ile 2 ve üzerinde destekleyici kriterin (PP1-5) bir arada olması		
	1 orta kriter (PM1-6) ile 4 ve üzerinde destekleyici kriterin (PP1-5) bir arada olması		

Dr. Yasemin ÜLGER
AÜTF – TIBBİ GENETİK TIPTA UZMANLIK TEZİ (2022)