



بررسی فراوانی پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 در مردان نابارور مبتلا به آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت

حسین پاشائی فر^۱، محمد حسن شیخها*^۲، سید مهدی کلانتر^۳، طاهره جهانی نژاد^۴، محمدعلی زعیمی^۵

۱-۵،۴- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
 ۲- دانشیار گروه ژنتیک، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
 ۳- استاد گروه ژنتیک، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۴

چکیده

مقدمه: حدود نیمی از موارد ناباروری زوجین به علت عوامل مردانه است. آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت که در نتیجه تغییرات ژنتیکی حاصل می‌شود، بخش مهمی از ناباروری مردان را تشکیل می‌دهد. یک مرحله مهم در فرآیند اسپرماتوژنیزس وقایع کراسینگ اور در حین نوترکیبی هومولوگ در تقسیم میوز است. پروتئین MLH3 نقش اساسی در فرآیند نوترکیبی و اسپرماتوژنیزس دارد. این مطالعه به بررسی رابطه یک پلی مورفیسم عملکردی در ژن MLH3 (C2531T) و خطر ناباروری در مردان به ارزیابی پروتئین MLH3 پرداخته است.

روش بررسی: این مطالعه به صورت مورد - شاهد و بر روی ۱۱۰ مرد نابارور مبتلا به آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت به عنوان گروه مورد و ۱۱۰ مرد بارور و نرمواسپرم به عنوان گروه کنترل انجام شد. پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 به وسیله روش tetra- ARMS- PCR (tetra- Amplification Refractory Mutation System- PCR) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT در ژن MLH3 به ترتیب برابر ۱۳/۶٪، ۵۹/۱٪ و ۲۷/۳٪ در مردان مبتلا به آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت و ۳۷/۳٪، ۵۶/۶٪ و ۹/۱٪ در گروه کنترل بود ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 می‌تواند با خطر ناباروری در مردان همراه باشد. همچنین حضور آلل T باعث ایجاد یک خطر افزایش یافته ۲/۳۵ برابری ($p > 0.001$ ، $OR = 2.35$ ، $CI = 1.57 - 3.51$) برای ایجاد ناباروری در مقابل گروه کنترل نرمال می‌شود. بنابراین پلی مورفیسم در ژن MLH3 می‌تواند یک عامل تعیین‌کننده ژنتیکی برای ایجاد اسپرماتوژنیزس معیوب در انسان باشد.

واژه‌های کلیدی: آزواسپرمی، اولیگواسپرمی، پلی مورفیسم، ناباروری مردان، ژن MLH3

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۴۷۰۸۵، پست الکترونیکی: sheikhha@yahoo.com

- این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

مقدمه

ناباروری به عنوان عدم موفقیت در ایجاد حاملگی بعد از یک سال رابطه جنسی بدون استفاده از عوامل بازدارنده حاملگی، تعریف می‌شود. حدوداً ۸ تا ۱۰ درصد از زوجین با نوعی مشکل ناباروری روبرو هستند. حدود نیمی از موارد ناباروری به علت عوامل مردانه است. آرواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت که به علت تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شود بخش مهمی از ناباروری مردان را تشکیل می‌دهند (۱،۲). در حین اسپرماتوژنیزس در پستانداران از جمله انسان، سلول‌های پیش‌ساز جنسی مردان دچار تکثیر میتوزی، تقسیم میتوز و تمایز می‌شوند تا اسپرم‌های بالغ و هاپلوئید را جهت تولید مثل جنسی ایجاد نمایند. یک مرحله کلیدی در اسپرماتوژنیزس در انسان وقایع کراسینگ اور در حین نوترکیبی هومولوگ در حین میوز است.

اختلال در میوز در حین اسپرماتوژنیزس علتی شناخته شده برای آرواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید است. با این حال مکانیسم‌هایی که باعث ایجاد اختلال در میوز می‌شوند هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند.

پروتئین‌های دخیل در ترمیم جفت ناجور DNA شامل پروتئین‌های خانواده MutS و MutL در ارگانیزم‌های یوکاریوت دارای نقش تعریف شده در ترمیم DNA بعد از خطاهای همانندسازی هستند. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بعضی از اعضای این خانواده‌های پروتئینی دارای نقش حیاتی در پدیده نوترکیبی میوزی نیز می‌باشند (۳،۴). MLH1، MLH3 و PMS2 هومولوگ‌های اصلی MutL هستند که در فرآیند نوترکیبی میوزی در پستانداران نقش دارند (۵).

مطالعات پیشین ثابت کرده‌اند که عدم فعالیت پروتئین MLH3 در هر دو جنس موش‌های ناک اوت شده از نظر ژن MLH3، با وجود این که از رفتار تولید مثلی نرمالی برخوردار هستند، نابارور می‌باشد (۶). اندازه بیضه‌ها در موش‌های نر MLH3 کوچک‌تر از انواع وحشی بوده و این موش‌ها دچار آرواسپرمی می‌باشند. در این موش‌های نر تخلیه ژنی شده از نظر ژن MLH3 تمایز سلول‌های پیش‌ساز جنسی در مرحله

پاکیتن از تقسیم میوز متوقف شده و اسپرم‌های بالغ تولید نمی‌شود و تا مرحله متافاز اسپرماتوسیس‌ها دچار اختلال در تفکیک کروموزوم‌ها و در نتیجه آنیوپلوئیدی شده که در برخی موارد باعث آپوپتوز آنها می‌شود (۶). مطالعات اخیر به وسیله غربالگری جهش‌های MLH3 در بافت گنادی افراد مبتلا به ناباروری چهار نوع جهش بدمعنی و هشت نوع تنوع در مناطق انترونی را در این ژن مشخص نموده است (۷). بنابراین این یک ادعای منطقی است که جهش‌ها در ژن MLH3 ممکن است باعث نقص در اسپرماتوژنیزس و ناباروری در مردان شود.

در مطالعه حاضر، فراوانی یک SNP شایع (C2531T) را در ژن MLH3 در بین ۱۱۰ مرد نابارور مبتلا به آرواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت بررسی گردیده و نتایج با فراوانی این SNP در ۱۱۰ فرد نرمال مقایسه شده است. به عبارت دیگر این مطالعه به بررسی همراهی بین این تنوع در ژن MLH3 و ناباروری در مردان پرداخته است.

روش بررسی

این مطالعه به صورت مورد - شاهد انجام شد و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و توان ۸۰٪ و فراوانی آلل T که بر اساس متون گزارش شده در بیماران ۲۵٪ و در گروه کنترل ۱۱٪ و حداقل تفاوت ۱۴٪ حجم نمونه در هر گروه ۱۱۰ نفر تعیین شد. بر این اساس تعداد ۱۱۰ مرد مبتلا به ناباروری شامل ۵۰ مرد مبتلا به آرواسپرمی بدون علت و ۶۰ مرد مبتلا به الیگواسپرمی شدید (تعداد اسپرم کمتر از 2×10^6 در میلی لیتر) با رده سنی ۲۳ تا ۴۷ سال در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بیماران نابارور که دارای سابقه orchitis، پایین نیامدن بیضه، واریکوسل و انسداد مجاری واژدیفران بودند از مطالعه کنار گذاشته شدند. تمام بیماران از نظر کاربوتایپ به وسیله روش G-binding و ریزحذف‌های AZF به وسیله روش‌های مولکولی بر اساس مطالعات قبلی بررسی شدند و دارای نتایج نرمال بودند (۸). همه بیماران مطابق با دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی حداقل دو بار مورد آزمایش

[5'GGGTCATAGGACTTTCTCTCAAACGAA 3']

بود (۱۰).

واکنش 4P-ARMS-PCR در حجم نهایی $25 \mu\text{L}$ شامل بافر و $2/5 \text{ mm}$, 1X Mgc12, 5 pmol از پرایمرهای MLH3F1 و MLH3R1 و 20 pmol از پرایمرهای MLH3F2 و MLH3R2 و $0/1 \text{ mM}$ از هر dNTP و 1U پلیمرز (Invitrogen) و 200 ng از DNA استخراج شد، انجام شد.

PCR با استفاده از روش تکثیر Touch-Down تحت چنین شرایط دمایی انجام شد. یک مرحله ذوب (Denaturation) ابتدایی 94°C برای مدت ۵ دقیقه و در ادامه 20 چرخه شامل شرایط دمایی 94°C برای مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال (Annealing) که از دمای 65°C برای مدت ۳۰ ثانیه شروع شد و در هر سیکل $5/5^\circ\text{C}$ کاهش می‌یافت و دمای 72°C برای مدت ۳۰ ثانیه به منظور گسترش (Extension) انجام شد. این مرحله با 10 سیکل شامل 94°C برای مدت ۳۰ ثانیه، 55°C برای مدت ۳۰ ثانیه و 72°C برای مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد و در نهایت یک مرحله تکثیر نهایی در دمای 72°C برای مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز 3% حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و مورد بررسی قرار گرفت.

آلل C یک باند 178 bp و آلل T یک باند 220 bp ایجاد کردند؛ در حالی که هر دو آلل یک باند 320 bp مشترک که محصول تکثیر به وسیله پرایمرهای خارجی (R1, F1) بود را نیز ایجاد می‌کردند (شکل ۱).

فراوانی‌های آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در هر دو گروه مورد و کنترل مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی بین گروه بیماران و گروه افراد کنترل و همچنین ارزیابی تعادل هاردی-واینبرگ از آزمون کای اسکوئر استفاده شد. بررسی‌های آماری و تجزیه و تحلیل χ^2 با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. اختلاف فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی برای پلی‌مورفیسم C2531T در ژن MLH3 بین گروه مورد و کنترل به وسیله آزمون کای اسکوئر به همراه نسبت احتمالات (Odds Ratio: OR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

اسپرماتوگرام بعد از ۳-۵ روز خودداری از رابطه جنسی قرار گرفتند. همچنین ۱۱۰ مرد نرمواسپرم که رده سنی بین ۲۳-۴۷ سال قرار داشتند و تمام شاخص‌های اسپرموگرام آنها نرمال بوده و باروری آنها به وسیله داشتن یک فرزند در ۲ سال اخیر ثابت شده بود، به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعه توسط کمیته اخلاق مورد تأیید قرار گرفت و رضایت نامه کتبی از هر دو گروه مورد و کنترل جهت شرکت در طرح پژوهشی دریافت شد.

DNA ژنومی از نمونه خون محیطی افراد به وسیله روش استاندارد استخراج نمکی (Salting-Out) استخراج شد. پلی‌مورفیسم C2531T در ژن MLH3 به وسیله روش tetra- Amplification Refractory 4P- ARMS- PCR (Mutation System- PCR) مورد بررسی قرار گرفت (۹). در این روش از دو پرایمر خارجی استفاده می‌شود که برای هر دو آلل T و C مشترک است و ایجاد یک محصول مشترک با طول 320 جفت باز می‌کند و همچنین در این روش از دو پرایمر داخلی استفاده می‌شود که این پرایمرها برای هر آلل اختصاصی هستند و برای آلل T یک محصول 220 جفت بازی و برای آلل C یک محصول 178 جفت بازی ایجاد می‌کند. و در واقع این محصولات PCR حاصل از این دو پرایمر است که تمایز بین دو آلل را امکان‌پذیر می‌کند. در این روش احتیاجی به استفاده از آنزیم محدود کننده نمی‌باشد.

پرایمرهای مورد استفاده در روش 4P-ARMS-PCR شامل یک جفت پرایمر خارجی

MLH3 F1

[5'ACCAATCTCAGTCTTCAAGTTGAACCTG3']

MLH3 R1

[5'ATCATCCCCATTGTTTGAGTTTCTCTTT3']

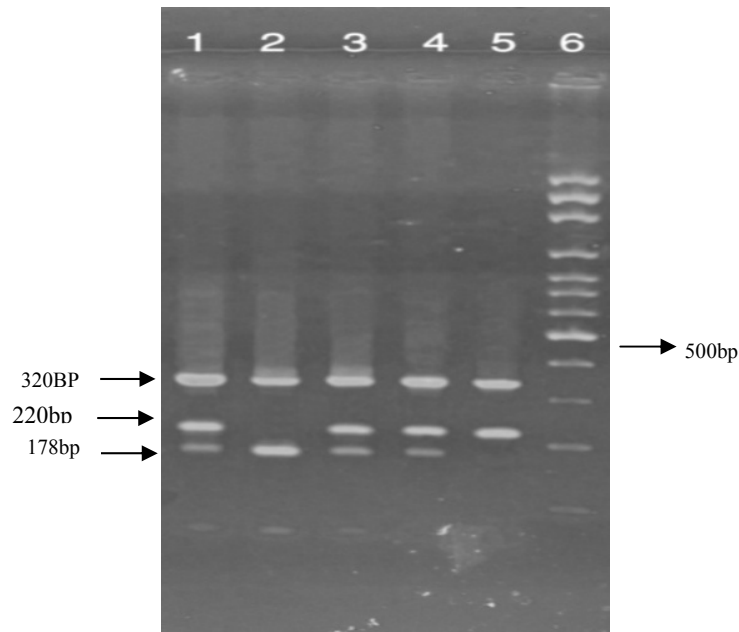
و یک جفت پرایمر داخلی:

MLH3 F2

[5'GGATGAAGATTGTTTAGAACAACAGATTC

C 3']

MLH3 R2



شکل ۱: نتیجه ژل الکتروفورز محصولات (4P-ARMS-PCR) برای پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 و ۱ و ۳ و ۴ دارای ژنوتیپ CT و ۲ دارای ژنوتیپ CC و ۵ دارای ژنوتیپ TT هستند.

نتایج

در ژن MLH3 برابر $۱۳/۶\%$ و $۳۷/۳\%$ فراوانی ژنوتیپ CT (pro 844 leu) به ترتیب برابر $۵۹/۱\%$ و $۵۳/۶\%$ و فراوانی ژنوتیپ TT (leu 844 leu) به ترتیب $۲۷/۳\%$ و $۹/۱\%$ بود. در این مطالعه از نظر توزیع آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 اختلاف معنی دار بین گروه مردان نابارور در مقایسه با گروه مردان کنترل نرمال وجود داشت ($p < ۰/۰۰۱$) که این امر نشان دهنده این مطلب است که احتمالاً این پلی مورفیسم با خطر ناباروری در مردان مرتبط است. در حقیقت با توجه به اطلاعات به دست آمده در این پژوهش حضور آلل T ایجاد کننده یک خطر افزایش یافته $۲/۳۵$ برابری برای ایجاد ناباروری نسبت به گروه کنترل است (جدول ۱).

فراوانی های آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 در جدول ۱ نشان داده شده اند. فراوانی آلل C, T در بین گروه بیماران نابارور به ترتیب $۴۳/۲\%$ و $۵۶/۸\%$ و در بین گروه کنترل به ترتیب $۶۴/۱\%$ و $۳۵/۹\%$ بود. آزمون تعادل هاردی واینبرگ برای SNP مورد مطالعه انجام شد و فرضیه صفر تعادل هاردی واینبرگ رد نشد ($\chi^2=۲/۴۹, p>۰/۰۵$). فراوانی های ژنوتیپی پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 در افراد مورد مطالعه به طور معنی داری در بین گروه بیماران مبتلا به آزو اسپرمی و یا الیگواسپرمی شدید و گروه کنترل نرمال متفاوت بود ($p < ۰/۰۰۱$). به طور ویژه در بین گروه بیمار و گروه کنترل به ترتیب فراوانی ژنوتیپ CC (pro 844 pro) برای پلی مورفیسم C2531T

جدول ۱: فراوانی های آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 در میان گروه بیماران مبتلا به آزو اسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و گروه کنترل نابارور

P value	OR (95% CI)	گروه کنترل (n=110) تعداد (درصد)	بیماران نابارور (n=110) تعداد (درصد)	ژنوتیپ ها و آلل ها
		۴۱ (۳۷/۳)	۱۵ (۱۳/۶)	CC
		۵۹ (۵۳/۶)	۶۵ (۵۹/۱)	CT
		۱۰ (۹/۱)	۳۰ (۲۷/۳)	TT
$< ۰/۰۰۱$	$۲/۳۵(۱/۵۷-۳/۵۱)$	۷۹ (۵۳/۹)	۱۲۵ (۵۶/۸)	T
		۱۴۱ (۶۴/۱)	۹۵ (۴۳/۲)	C

بحث و نتیجه گیری

بررسی ۱۱۰ بیمار مبتلا به آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت به عنوان گروه مورد و ۱۱۰ مرد بارور نرمال به عنوان گروه کنترل نشانگر ارتباط پلی مورفیسم C2531T در ژن MLH3 با خطر افزایش ناباروری در مردان است. این نتایج فرضیه اولیه پژوهش را مبنی بر این که تنوع‌های ژنتیکی در ژن MLH3 احتمالاً با استعداد ناباروری مردان در ایران همراهی داشته باشد تأیید می‌کند.

ژن MLH3 در انسان برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ میلادی تعیین شد. این ژن یکی از اعضای خانواده پروتئینی دخیل در تصحیح جفت باز ناجور در DNA است که به طور طبیعی در دامنه وسیعی از بافت‌های جنینی و بالغین بیان می‌شود (۱۱). در موش نر رونوشت و پروتئین MLH3 در مراحل زیگوتن و پاکیتن در حین اسپرماتوژنیز مشاهده می‌شود (۱۲). در انسان ژن MLH3 در بازوی بلند کروموزوم 14 (14q24.3) قرار دارد. طول منطقه کد کننده این ژن ۴/۳kb و شامل ۱۲ اگزون است که اگزون یک آن طول حدود ۳/۳kb دارد و ۷۵٪ آن را در برمی‌گیرد (۱۱).

در ژن MLH3 انسانی در مجموع ۲۲ نوع تنوع در توالی رمزکننده مشخص شده است که در مجموع ۱۲ مورد از آنها بدمعنی (Missense) هستند که شامل موارد زیر می‌باشند (۱۳):
K231Q-V420I-F390I-R797H-Y720C-E828D-R647C-P551S-H823Y-N826D- P844L-T942I.

با کمک الگوریتم SIFT مشخص شده است که ۴ نوع از این تنوعات توالی بر عملکرد پروتئین تأثیر می‌گذارند که شامل این موارد هستند (۱۴): T942I, P844L, R647C, E828D.

در مطالعه اخیر نشان داده است که غربالگری تنوع‌های MLH3 در بافت بیضه ۱۳ بیمار با توقف در اسپرماتوژنیز نشان دهنده ۴ تنوع بدمعنی و ۸ نوع تنوع در مناطق انترونی است که دو مورد از آنها شامل این موارد می‌باشد: T2896C و C2531T. مورد اول در یکی از ۱۳ بیمار و دومی در ۳ بیمار از ۱۳ بیمار مشاهده شده است (۷). طرح تحقیقاتی صورت گرفته توسط Guixiang و همکارانش در سال ۲۰۱۲، بیست و یک

SNP تعیین ژنوتیپ شده در ۵ ژن سیستم MMR (MLH1, MLH3, PMS2, MSH4, MSH5) در یک مطالعه مورد - شاهد مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۶۵۷ مرد نابارور با شاخص‌های اسپرموگرام غیرطبیعی به عنوان گروه مورد و ۴۸۰ مرد بارور به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که یک SNP انترونی در ژن MLH1، یک SNP غیرمترادف در ژن PMS2 (Ser775Asn) و همچنین پلی مورفیسم Pro29Ser در ژن MSH5 می‌توانند عوامل خطر ژنتیکی برای گسترش آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید در مردان نابارور باشند (۱۵).

در این مطالعه مشاهده شد، یک همراهی بین واریانت C2531T (P844L) در ژن MLH3 و ناباروری در مردان به علت آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت در نمونه خون محیطی وجود دارد که این یافته‌ها پیشنهاد کننده این مطلب است که این جهش ممکن است یک عامل خطر ژنتیکی برای ناباروری در مردان در ایران باشد.

سیستم ترمیم جفت باز ناجور DNA به علت نقش اساسی خود در حفظ یکپارچگی ژنوم در تمام ارگانیسم‌ها از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. این سیستم از پروتئین‌های حفاظت شده‌ای تشکیل شده است که عملکرد آنها در ترمیم جفت بازهای ناجور بعد از همانندسازی کاملاً مشخص شده است. با این حال عملکردهای چندگانه‌ای علاوه بر ترمیم جفت بازهای ناجور DNA بعد از همانندسازی مانند تقویت وقایع کراسینگ اور حین تقسیم میوز به این پروتئین‌ها نسبت داده شده است (۱۸-۱۶).

اطلاعات اخیر ثابت می‌کند که چهار نوع از پروتئین‌های دخیل در سیستم ترمیم جفت بازهای ناجور در DNA شامل MLH1 -MLH3 -MLH4 -MLH5 با همکاری یکدیگر به صورت یک کمپلکس در پیشبرد فرآیند کراسینگ‌اور در حین تقسیم میوز نقش اساسی دارند که در این فرآیند کمپلکس MLH4 -MLH5 در مرحله زیگوتن از پروفاز I آغاز می‌شود و با به خدمت گرفتن هتروداایمر MLH1 -MLH3 در

به هتروداایمر MLH1-MLH3 در پدیده نوترکیبی همولوگ از نظر زمانی زودتر وارد عمل می‌شود (۲۲، ۲۱، ۱۲). این یافته‌ها تأییدکننده این مطلب است که هتروداایمر MLH4-MLH5 برای پایداری Holliday Junction مورد نیاز است و هتروداایمر MLH1-MLH3 یک عامل پایین دست ناشناخته را فعال می‌کند که با تجزیه Holliday junction، باعث پیشرفت کراسینگ اور می‌شود (۲۳). در نتیجه مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مسیر MLH1-MLH3 نقشی اساسی را در پیشبرد فرآیند کراسینگ اور در حین تقسیم میوز در پستانداران بر عهده دارد. مطالعات بیشتر برای ایجاد شواهد جدیدتری نسبت به نقش MLH3 انسانی در پاتوژنز ناباروری در مردان نیاز است.

سپاسگزاری

از کلیه کسانی که در انجام این مطالعه مشارکت و همراهی داشته‌اند از جمله جناب آقای دکتر عبدلی مدیریت محترم مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد و کارشناسان محترم آزمایشگاه ژنتیک مرکز، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References:

- 1- Rucker GB, Mielnik A, King P, Goldstein M, Schlegel PN. *Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction*. J Urol 1998; 160(6 Pt 1): 2068-71.
- 2- Cram DS, O'Bryan MK, de Kretser DM. *Male infertility genetics the future*. J Androl 2001; 22(5):738-46.
- 3- Kolas NK, Cohen PE. *Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination*. Cytogenet Genome Res 2004; 107(3-4): 216-31.
- 4- Surtees JA, Argueso JL, Alani E. *Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination*. Cytogenet Genome Res 2004; 107(3-4):146-59.
- 5- Svetlanov A, Cohen PE. *Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis*. Exp Cell Res 2004; 296(1): 71-9.
- 6- Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajan D, Gilgeous A, et al. *Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice*. Nat Genet 2002; 31(4): 385-90.
- 7- Ferrás C, Zhou XL, Sousa M, Lindblom A, Barros A. *DNA mismatch repair gene hMLH3 variants in meiotic arrest*. Fertil Steril 2007; 88(6): 1681-4.
- 8- Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, et al. *Laboratory guidelines for molecula*

مرحله پاکتین ادامه می‌یابد (۱۹). بیشتر دانش موجود از وقایع نوترکیبی در میوز از مطالعات بر روی قارچ‌ها به دست آمده است. نوترکیبی همولوگ در حین میوز وقتی شروع می‌شود که پروتئین SPO11 یک شکست دو رشته‌ای در DNA ایجاد می‌کند و هتروداایمرهای MLH4-MLH5 و MLH1-MLH3 را احتمالاً در مسیرهای یکسان Holliday junction resolvase هدایت و فعال می‌کنند (۲۰).

میوز در پستانداران اندکی نسبت به میوز در یوکاریوت‌های پست‌تر متفاوت است. مکانیسم شرکت پروتئین‌های سیستم ترمیم جفت باز ناجور DNA در فرآیند نوترکیبی میوزی تاحدی ناشناخته است.

بر اساس نقش‌هایی که قبلاً برای پروتئین‌های سیستم ترمیم جفت باز ناجور DNA در حین نوترکیبی میوزی تعیین شده‌اند یافته‌های حاصل از این مطالعه از نظر بیولوژیک قابل توجه می‌باشند.

مطالعات ژنتیکی، بیوشیمیایی و سلولی در مخمرها و موش‌ها نشان می‌دهد که هتروداایمر MLH4-MLH5 نسبت

- diagnosis of Y-chromosomal microdeletions.* Int J Androl 1999; 22(5): 292-9.
- 9- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms.* Nucleic Acids Res 2001; 29(17): E88-8.
- 10- Keqian Xu, Tingting Lu, Hui Zhou, Lihong Bai, Yaoyun Xiang. *The role of MSH5 C85T and MLH3C2531T polymorphisms in the risk of male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia.* clin chim Acta 2010; 411(1-2): 49-52.
- 11- Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevisnis AD, Lynch HT, et al. *MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability.* Nat Genet 2000; 24(1): 27-35.
- 12- Santucci-Darmanin S, Neyton S, Lespinasse F, Saunieres 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 2002; 11(15): 1697-706.
- 13- Taylor NP, Powell MA, Gibb RK, Rader JS, Huettner PC, Thibodeau SN, et al. *MLH3 mutation in endometrial cancer.* Cancer Res 2006; 66(15): 7502-8.
- 14- Ng PC, Henikoff S. *Predicting deleterious amino acid substitutions.* Genome Res 2001; 11(5): 863-74.
- 15- Ji G, Long Y, Zhou Y, Huang C, Gu A, Wang X. *Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and male infertility.* BMC Med 2012; 10(1): 49.
- 16- Kunkel TA, Erie DA. *DNA mismatch repair.* Annu Rev Biochem 2005; 74: 681-710.
- 17- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. *DNA mismatch repair: functions and mechanisms.* Chem Rev 2006; 106(2): 302-23.
- 18- Jiricny J. *The multifaceted mismatch-repair system.* Nature Rev Mol Cell Biol 2006; 7(5): 335-46.
- 19- Kolas NK, Svetlanov A, Lenzi ML, Macaluso FP, Lipkin SM, Liskay RM, et al. *Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I.* J Cell Biol. 2005; 171(3): 447-58.
- 20- Whitby MC. *Making crossovers during meiosis.* Biochem Soc Trans 2005; 33(Pt 6):1451-5.
- 21- Woods LM, Hodges CA, Baart E, Baker SM, Liskay M, Hunt PA. *Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice.* J Cell Biol 1999; 145(7): 1395-406.
- 22- Argueso JL, Wanat J, Gemici Z, Alani E. *Competing crossover pathways act during meiosis in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics 2004; 168(4): 1805-16.
- 23- Nishant KT, Plys AJ, Alani E. *A mutation in the putative MLH3 endonuclease domain confers a defect in both mismatch repair and meiosis in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics 2008; 179(2): 747-55.

Analysis of MLH3 C2531T Polymorphism in Infertile Men with Idiopathic Azoospermia or Severe Oligozoospermia

*Pashaiefar H(MSc)¹, Sheikhha MH(PhD)^{*2}, Kalantar M(PhD)³, Jahaninejad T(MSc)⁴, Zaimy MA(MSc)⁵*

^{1,4,5} *Department of Medical Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

^{2,3} *Department of Medical Genetics, Research and Clinical Centre for Infertility, Shahid Sadoughi Medical Sciences University, Yazd, Iran*

Received: 29 Nov 2012

Accepted: 9 Feb 2013

Abstract

Introduction: Infertility is described as the inability to get pregnant after one year of unprotected intercourse. About half of infertility cases are because of male factors. Idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia caused by genetic alterations is a significant part of male infertility. A key step of spermatogenesis is crossover events during meiotic reciprocal recombination. MLH3 protein has a crucial role in meiotic recombination and in spermatogenesis. We evaluated this function of MLH3 protein by examining the contribution of functional polymorphism in MLH3 (C2531T) to the risk of male infertility.

Methods: We studied this polymorphism in 110 infertile male with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia, and 110 fertile men with normozoospermia as a control group. MLH3 C2531T polymorphism was analyzed using the tetra-amplification refractory mutation system-PCR (4P-ARMS-PCR) method.

Results: Genotypes CC, CT and TT of the MLH3 gene presented frequencies of 13.6%, 59.1% and 27.3%, respectively, in the men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia and 37.3%, 53.6% and 9.1% in the control group ($p < 0.001$).

Conclusion: The data suggest that the MLH3 C2531T polymorphism can be associated with risk of male infertility. The research data showed that presence of the polymorphic allele T leads to an increased risk of 2.35 times (OR = 2.35, 95% CI = 1.57-3.51; $p < 0.001$) to develop infertility in relation to the normal control group. Therefore, the MLH3 gene polymorphism may be genetic determinant for defective spermatogenesis in the humans.

Keywords: Azoospermia; Male infertility; MLH3; Oligozoospermia; Polymorphism

This paper should be cited as:

Pashaiefar H, Sheikhha MH, Kalantar M, Jahaninejad T, Zaimy MA. *Analysis of MLH3 C2531T polymorphism in infertile men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(1): 62-69.

***Corresponding author: Tel: + 98 351 8247085, Email: sheikhha@yahoo.com**