

PAPER DETAILS

TITLE: Erkek Üreme Sisteminde SARS-CoV-2 RNA'sini Hedefleyen miRNA'ların ve Potansiyel Hedef Genlerinin In Silico Olarak Belirlenmesi

AUTHORS: Neslihan Hekim, Sezgin Günes, Sercan Ergün

PAGES: 59-64

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/3866413>

Erkek Üreme Sisteminde SARS-CoV-2 RNA'sını Hedefleyen miRNA'ların ve Potansiyel Hedef Genlerinin İn Silico Olarak Belirlenmesi

Neslihan HEKİM^{1,2}, Sezgin GÜNEŞ^{1,2}, Sercan ERGÜN^{1,2}

ÖZ

Amaç: Dünya genelinde milyonlarca mortalite ve morbiditeye neden olan SARS-CoV-2 enfeksiyonu insanlarda moleküler düzeyde çok sayıda farklı patolojiye sebep olmuştur. Yapılan çalışmalar bu virüsün erkek üreme hücreleri üzerine etkili olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun miRNA'lar aracılığı ile infertiliteye nasıl sebep olabileceğinin in silico araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Sağlıklı testis dokusunda en yüksek oranda ifade edilen miRNA'lar Tissue Atlas'tan elde edildi. Bu miRNA'lar arasından COVID-19 RNA'sını hedeflediği belirlenen miRNA'lar miRDB veri tabanından listelendi. Elde edilen liste makine öğrenimi algoritmasını kullanan miRWalk veri tabanı ile karşılaştırıldı. Ortak hedefler deneysel olarak doğrulanmış miRNA-hedef etkileşimleri veri tabanı olan miRTarBase ve sonrasında TargetScan ile eşleştirildi.

Bulgular: COVID-19 RNA dizisini hedefleyen ve in silico olarak endojen seviyelerinin etkilendiği tespit edilen testis dokusuna özgü miRNA'lar belirlendi. Bunlardan hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-497-5p ve hsa-miR-424-5p'nin mir-15/16 ailesinin, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30a-5p'nin ise mir-30 ailesinin üyeleri olduğu ortaya çıkarıldı. Bu miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin arasında hücre döngüsü başta olmak üzere, DNA hasarı, apoptoz, spermatogenez ve viral cevapla ilgili olan *ABL2*, *BCL2*, *PLEKHA1*, *WNK3*, *CCNT2*, *DICER1*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* ve *WEE1* genlerinin olduğu gösterildi.

Sonuç: Bu çalışma SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile beraber testis dokusuna özgü miRNA'ların ve potansiyel hedef genlerinin ifadesinin değişebileceğini göstermektedir, böylece SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erkeklerde testis üzerine etkisini moleküler olarak açıklamaya yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19; hücre siklusu; mikroRNA; testis.

In Silico Identification of miRNAs and Their Potential Target Genes Targeting SARS-CoV-2 RNA in the Male Reproductive System

ABSTRACT

Aim: SARS-CoV-2 infection, which causes millions of deaths and morbidities worldwide, has caused many different pathologies at the molecular level in humans. Studies have shown that this virus can affect male reproductive cells. This study aimed to investigate in silico how SARS-CoV-2 infection may cause infertility through miRNAs.

Material and Methods: The most expressed miRNAs in healthy testicular tissue were obtained from Tissue Atlas. Among these miRNAs, miRNAs determined to target COVID-19 RNA were listed in the miRDB database. The resulting list was compared with the miRWalk database which uses the machine learning algorithm. Common targets were matched using miRTarBase, a database of experimentally validated miRNA-target interactions, and subsequently TargetScan.

Results: Testicular tissue-specific miRNAs that target the COVID-19 RNA sequence and whose endogenous levels were found to be affected in silico were identified. Of these, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-497-5p and hsa-miR-424-5p were determined to be members of the mir-15/16 family, and hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30a-5p were revealed to be members of the mir-30 family. It was also shown that the potential target genes of these miRNAs include *ABL2*, *BCL2*, *PLEKHA1*, *WNK3*, *CCNT2*, *DICER1*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* and *WEE1*, which are related to cell cycle, DNA damage, apoptosis, spermatogenesis and viral response.

Conclusion: This study shows that the expression of testicular tissue-specific miRNAs and potential target genes may change with SARS-CoV-2 infection, thus it may help to molecularly explain the effect of SARS-CoV-2 infection on the testis in men.

Keywords: COVID-19; cell cycle; microRNA; testis.

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

2 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Samsun

Sorumlu Yazar / Corresponding Author Neslihan HEKİM, e-mail: neslihan.taskurt@omu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 16.04.2024, Kabul Tarihi / Accepted: 04.11.2024

GİRİŞ

Küresel bir pandemi olan koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19), tek sarmallı bir RNA virüsü olan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'den (SARS-CoV-2) kaynaklanmaktadır (1). İlk olarak Aralık 2019'da Wuhan'da bildirilen bu enfeksiyonun başlangıçta akciğeri etkileyerek, şiddetli solunum semptomları oluşturduğu bildirildi. Ancak, daha sonraki araştırmalar ve vaka sunumları, COVID-19'un erkek üreme sistemi üzerinde de etkili olabileceğini ortaya koydu (2-6). Bu vaka raporlarından birinde, 37 yaşında, önceden sağlıklı olan bir erkek hastada, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile COVID-19 tanısı konulduktan 15 gün sonra testislerinde sıcaklık, rahatsızlık, ateş, ağrı şikâyetleri sonrası bilateral orşit geliştiği kaydedilmiştir (2). Orşit raporlarıyla birlikte COVID-19 hastalarında sperm konsantrasyonunun azaldığı ve apoptotik hücrelerin arttığı belirtildi (6). Ayrıca, burun içi sürüntüden PCR sonucu pozitif olarak belirlenen erkeklerin seminal plazmalarında sağlıklı kontrollere kıyasla semen parametrelerinde sapma olduğu bildirilmiştir (5). Bununla birlikte, yeni yapılan bir meta-analiz COVID-19 enfeksiyonunun steroidogenezi değiştirip, spermatogenez üzerine olumsuz etki göstererek, primer testis hasarı oluşturabildiğini ortaya koymuştur (4). Ancak, bu bulguların çoğu üreme sistemi hasarının altında yatan moleküler değişiklikleri ortaya çıkarmada yetersiz kalmıştır.

İnfertilite, en az bir yıl korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen çiftlerin gebelik elde edemediği üreme sağlığı problemidir. Dünya genelinde yaklaşık 186 milyon insanı etkilemektedir (7). Erkek infertilitesi heterojen ve multifaktöriyel etiyojili bir bozukluktur (8). Epigenetik değişiklikler, erkek fertilitésine etki eden önemli faktörler arasında yer almaktadır (9, 10). Bunların arasında mikroRNA'lar (miRNA'lar), uzunlukları 18-22 nükleotid olan protein kodlamayan ve endojen olarak sentezlenen RNA'lardır. miRNA'lar, hedef mRNA'nın protein sentezleme etkinliğini ya da stabilitesini değiştirerek gen ifadesini sustururlar. Bir miRNA, birden fazla mRNA ile eşleşme gösterebilir. Böylece, tek miRNA birçok mRNA'nın ya da transkriptin ifadesini düzenleyebileceği gibi bir mRNA'nın ifadesi de birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (11). Daha önce yapılan çalışmalarla COVID-19 RNA dizisinin hücre içinde ifade edildikten sonra endojen miRNA'larla etkileşime girebildiği gösterilmiştir (1, 12). Bu durum COVID-19 RNA'sını hedef alan özellikle dokuya özgü ifade edilen, miRNA'ların potansiyel hedeflerinin ifadelerinde değişimlere yol açabilir. Böylece bu ifade değişiklikleri hastalığın testiste hasar yaratmasında rol oynayabilir. Bu çalışmada, testis dokusunda en fazla ifade edilen ve COVID-19 RNA'sını potansiyel olarak hedefleyen miRNA'lar ve bu miRNA'ların diğer hedeflerinin in silico olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece COVID-19'un testis dokusu üzerine etkisinin altında yatan moleküler değişiklikler açıklanmaya çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

miRNA İfade Profili

Sağlıklı testis dokusu ifade profilleri Tissue Atlas'tan (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas2>) elde edildi (13). Dört farklı bireyin testis dokularından yeni

nesil dizilemeyle elde edilen verilerden, testiste en fazla ifade edilen ilk 100 miRNA belirlendi. Belirlenen bu miRNA'lar ve ifade seviyeleri Tablo S1'de verildi.

miRNA Hedef Tahmini

SARS-CoV-2'nin NC_045512.2 numaralı referans dizisi Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information; NCBI) Virus veri tabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) elde edildi. Bunun için taksonomik tanımlayıcı olarak 2697049 girildikten sonra tamamlanan genom dizileri filtre edildi. Sonuç olarak 29.903 bp'lik ssRNA dizisini hedefleyen miRNA'lar miRDB (<https://mirdb.org/>) veri tabanında arandı (14).

Belirlenen miRNA'ların olası diğer hedeflerini belirlemek için önce makine öğrenimi algoritmasını kullanan miRWalk veri tabanı (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) kullanıldı (15). miRWalk'ta skorlaması 0,95'ten büyük ve hedef genin 3' translyona uğramayan bölgesine bağlanan miRNA'lar belirlendi. Belirlenen hedef genler deneysel olarak doğrulanmış miRNA-hedef etkileşimleri veri tabanı olan miRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php) ile eşleştirildi (15). Filtrelenen sonuçlar, miRNA'ların hedef ve işlev tahminleri için çevrimiçi veri tabanları olan miRDB ve TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) veri tabanlarında arandı (15). Tablo S2, seçilen miRNA'ların ayrı ayrı hedef genlerinin listesini içermektedir. Sonuç olarak, toplam dört veri tabanında da bu miRNA'ların hedefleri olarak eşleşen genler belirlendi.

Fonksiyonel Yolak Tahmini

Dört ayrı veri tabanından miRNA hedef tahmin analizleri sonrası elde edilen sonuçlarda, en azından iki miRNA tarafından hedeflendiği belirlenen genler belirlendi. Testis ifade düzeylerine ve rol aldıkları yollara NCBI/Gene/General gene information/Gene Ontology veri tabanından ulaşıldı. COVID-19 RNA dizisini hedeflediği belirlenen miRNA'ların bağlanma potansiyeli olan hedef genler ile ilgili NCBI PubMed literatür taraması yapıldı.

BULGULAR

Testis Dokusuna Özgü ve SARS-CoV-2 Viral Genomunu Hedeflediği Tahmin Edilen miRNA'lar

miRDB analiz sonucuna göre SARS-CoV-2 viral genomu üzerinde bağlanma bölgesi bulunduğu filtrelenen 900 miRNA tespit edildi. Bu miRNA'lar testiste en fazla ifade edilen miRNA listesi (Tablo 1) ile karşılaştırıldı. Sonuçlar arasında hem testiste ifade seviyesi yüksek olan hem de miRDB veritabanı sonuçlarında COVID-19 RNA dizisini hedefleme skorlaması 95 puanın üzerinde olan miRNA'lar belirlendi. En son elde edilen 9 miRNA Tablo 1'de verildi. Bu 9 miRNA'dan hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-497-5p ve hsa-miR-424-5p'nin mir-15/16 ve hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30a-5p'nin ise mir-30 miRNA ailesine ait olduğu belirlendi.

SARS-CoV-2 RNA ile Rekabet Eden Testis mRNA'ları
COVID-19 RNA dizisini hedefleyen ve enfeksiyonun endojen seviyelerini etkilediği in silico olarak belirlenen hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-

30c-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30a-5p'nin hedefleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. miRDB'ye göre SARS-CoV-2'ü hedefleyen testis miRNA'ları

Hedef Genom	Testisteki Hedefleyen miRNA'lar
RefSeq NC_045512.2	hsa-miR-195-5p hsa-miR-16-5p hsa-miR-15a-5p hsa-miR-15b-5p hsa-miR-497-5p hsa-miR-424-5p hsa-miR-30c-5p hsa-miR-30b-5p hsa-miR-30a-5p

Tablo 2. mir-15/16 ve mir-30 ailelerinin ortak hedef genleri

miRNA'lar	Ortak Hedef Genler
mir-15/16 Ailesi (hsa-miR-195-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-424-5p)	<i>ATXN7L3B</i>
	<i>AVL9</i>
	<i>ABL2</i>
	<i>ACVR2A</i>
	<i>ANLN</i>
	<i>BCL2</i>
	<i>CCNT2</i>
	<i>CDC37L1</i>
	<i>CDV3</i>
	<i>CHEK1</i>
	<i>CPEB2</i>
	<i>CPEB3</i>
	<i>CCND1</i>
	<i>CCND2</i>
	<i>CCND3</i>
	<i>CDK6</i>
	<i>CLSPN</i>
	<i>CAPZA2</i>
	<i>CDC25A</i>
	<i>DICER1</i>
	<i>DMTF1</i>
	<i>E2F3</i>
	<i>ETNK1</i>
	<i>FBXL20</i>
	<i>LUZP1</i>
	<i>MAFK</i>
	<i>NAA25</i>
	<i>MIB1</i>
	<i>PLEKHA1</i>
	<i>PAG1</i>
mir-30 Ailesi (hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30a-5p)	<i>B4GALT5</i>
	<i>EED</i>
	<i>IKZF2</i>
	<i>RAP1B</i>
	<i>STRIP1</i>
	<i>ZNF264</i>

Her bir miRNA için belirlenen genlerin testis ifadeleri ve görev aldıkları yollar NCBI/Gene/General gene information/Gene Ontology üzerinden belirlendi. Belirlenen 9 miRNA'dan iki ya da daha fazlasının hedefi olarak belirlenen genler Tablo 2'de verildi. Bu genlerin otofaji, apoptoz, hücre döngüsü, hipoksi, oksidatif stres, DNA hasarına ve virüs enfeksiyonuna hücrel yanıt ve spermatogenez süreçlerinde rol aldığı görüldü.

TARTIŞMA

Bir RNA virüsü olan COVID-19 hücre içinde ifade edilmeye başladıktan sonra konağın endojen RNA mekanizmalarıyla etkileşime girer (1, 12, 16). COVID-19 enfeksiyonu geçiren erkeklerin seminal plazmalarında viral RNA'nın tespit edilmemesi, virüsün testiste miRNA ağı aracılığıyla etkileşime girdiği düşüncesini kuvvetlendirmektedir (3-5). Aktif koronavirüs enfeksiyonu geçiren kişilerin monositlerinde virüse cevapta rol oynayan uzun kodlamayan RNA'ların ifade seviyelerinin anlamlı bir şekilde değiştiği bildirilmiştir (16). Bununla birlikte in silico analizlerle SARS-CoV-2'nin testiste ifade edilen özgün hedeflerinden olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (*ACE2*) ve serin proteaz *TMPRSS2*'ye bağlanan miRNA'ların ve testise özgü uzun kodlamayan RNA'ların ifadelerini değiştirebileceği öne sürülmüştür (1). Bu çalışmalar COVID-19 RNA'sının bir miRNA süngerisi gibi davranarak, kendisini hedefleyen miRNA'ların ifadelerini değiştirebileceğini ortaya koymaktadır (12). Bu çalışmada testiste ifade oranı yüksek olan miRNA'lardan bazılarının materyal ve metotta belirtildiği şekilde COVID-19 RNA'sına bağlanabildiği in silico olarak gösterildi. Bu miRNA'lar aynı çekirdek dizilerini paylaşan ve terapötik öneme sahip iki miRNA ailesine aitti. Bunlardan biri olan mir-15/16 ailesi üyelerinin prostat, meme ve yumurtalık kanseri de dâhil birçok malignitede ifadelerinin değiştiği bildirilmiştir (17, 18). miRNA-30 ailesinin de bir tümör baskılayıcı gibi görev alarak özellikle prostat kanseri patogenezinde önemli düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir (19-21). Bu miRNA'ların COVID-19 hastalarında ifadelerinin azalabileceğini, böylece diğer hedef genlerinin ifadelerinin artabileceğini öngörmekteyiz. Belirlediğimiz bu hedef genlerin otofaji, apoptoz, hücre döngüsü, hipoksi, oksidatif stres, DNA hasarına cevapta, hücrel virüs enfeksiyonuna cevap ve spermatogenez süreçlerinde rol aldığı görüldü.

Bu çalışmada aynı zamanda proto-onkogen olan iki önemli genin *ABL2* (ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase) ve *BCL2* (BCL2 apoptosis regulator)'nin COVID enfeksiyonu sonrasında ifadelerinin etkilenebileceği belirlendi. *BCL2*, apoptozu engelleyen, erkek gonad gelişiminde intrinsik apoptotik sinyal yolunun negatif düzenlenmesinde ve otofajide görev alan bir dış mitokondriyal membran proteini kodlar (22). Anormal semen parametrelerine sahip infertil erkeklerde seminal *BCL2* ifadesinin arttığı bildirilmiştir (23). Mikrotübül bağlama dizileri aracılığıyla hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol oynayan *ABL2* ise sperm kapasitasyonu ve hareketliliğinde görev alır (24). Potansiyel hedef genlerden bir diğeri, *ARHGDI* (Rho GDP dissociation inhibitor alpha) geni, Rho GTPazlar yoluyla sinyalizasyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynayan ve apoptotik sürecin negatif düzenlenmesinde yer alan bir proteini kodlar. İmmüno Floresan çalışmalar, Rho

GDI alfanın sperm akrozomunda bulunduğunu ve kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda rol aldığı bildirilmiştir (25). Bununla birlikte, *Rho GDI alfa*^{-/-} erkek farelerin testislerinde seminifer tübüllerin, vakuolar dejenerasyonu ile birlikte spermatogenezin bozulduğu ve sonuçta infertil oldukları gözlenmiştir (26). FBXL20 (F-box and leucine rich repeat protein 20) F-kutusu protein ailesinin üyelerinden biridir ve bu aile ubiquitin ligaz kompleksi oluşturur. Bu ailenin üyelerinin işlev kaybı mutasyonları, yetişkin farelerde seminifer tübül dejenerasyonuna ve spermatogoniada senesens belirteçlerinin ifadelerinin artmasına yol açar (27). *PLEKHA1* (pleckstrin homology domain containing A1), Leydig hücre farklılaşmasında, androjenlerin metabolik sürecinde ve spermatogenezde rol oynar. Bu gen, plekstrin homoloji bölgesi içeren bir adaptör protein kodlar. Çeşitli kanıtlar, plekstrin homoloji bölgesi içeren proteinlerin spermatogonik hücrelerde ısı şokunun neden olduğu hücre ölümünün desteklenmesinde ve DNA çift zincir kırıklarının cinsiyet kromozomlarının psödozomal bölgelerine hedeflenmesinde rol oynadığını göstermektedir (28, 29). En yüksek oranda testiste ifade edilen *WNK3* (WNK lysine deficient protein kinase 3) kaspaz-3'e bağlı olan yolakta hücre sağ kalımının artmasında rol oynar (30). Akraba olan infertil bireylerin kan örneklerinden gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme çalışması ile non-obstrüktif azoospermili bireylerde *WNK3* delesyonu olduğu gösterilmiştir (31). SEPTIN2 (septin 2), hücre iskeleti ve spermatozoanın orta kısmında septin kompleksinin bir parçası olarak bulunur. Sperm fonksiyonu açısından oldukça büyük öneme sahip olan bu kompleksin üyelerindeki işlev kaybı mutasyonları, septin filament yapısının bozulmasına yol açarak sperm hareketi ve sayısında azalmaya ve morfoloji bozukluklarına neden olurlar (32-34).

Bu çalışmada hücre döngüsünü düzenleyerek spermatogenezde önemli rol oynayan birçok genin COVID-19 enfeksiyonu sonrası ifadelerinin değişebileceği in silico olarak ortaya çıkarıldı. Erkeklerin fertilitelerinin hayatları boyunca devamlılığı, progenitor hücreler olan gonositlerden spermatogonial kök hücre havuzunun oluşturulmasına ve bu spermatogonial kök hücrelerin yenilenmesi ile farklılaşmasının dengelenmesine bağlıdır (35). Hücre döngüsünün hassas bir şekilde düzenlenmesi de bu denge için çok önemlidir. Canlılar arasında yüksek oranda korunan siklinler, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerdir ve bu ailenin üyeleri hücre döngüsü boyunca periyodik olarak ifade edilir. Siklin ailesinden biri olan ve hedef genlerden biri olarak belirlenen *CCNT2* (cyclin T2)'nin, testiste ifadesinin oldukça yüksek olduğu görüldü. Önceki çalışmalar, *Ccnt2*'nin erkek farelerde premayotik germ hücrelerinde ifadesinin değiştiği belirlenen miR-15a'nın doğrudan hedefi olduğunu gösterdi (36). *CCNT2*'nin ifadesinin artışının, bazı kanserleri indükleyici olduğu, ifadesinin azalmasının ise kanser ilerlemesini baskıladığı, ayrıca hipoksik miyositlerde apoptoza neden olduğu görülmüştür (37). *CCNT2* ayrıca, COVID-19 gibi bir RNA virüsü olan, bulaşma ve hastalığın ilerlemesi sırasında ortak moleküler mekanizmalar kullanan insan bağışıklık yetersizliği virüsü tip-1 (HIV-1)'in negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (38). Bununla birlikte koronavirüs enfeksiyonu sonrası insan alveolar epitellerinde *CCNT2*'nin ifade seviyesinin

arttığı deneysel hücre hattı çalışmalarıyla da gösterilmiştir (39). Benzer şekilde bu çalışma COVID-19 RNA'sının ifadesini arttırdığını in silico olarak ortaya koyduğu genlerden biri de *DICER1*'dir. Çalışma *DICER1*'in mir15/16 aile üyelerinin ortak bir hedefi olduğunu göstermektedir (Tablo S1). *DICER1*, bir ribonükleazdır ve gen ifadesini baskılayan RNA interferensi ve küçük temporal RNA yolağında görev yapar. Bu durum bu proteinin RNA virüslerine karşı aktivite gösteren güçlü bir antiviral ajan olduğu düşünüldüğünde beklenen bir sonuçtur (40). Bununla birlikte *DICER1*'in testisteki ifadesi yüksektir ve yapılan birçok çalışma bu proteinin spermatogenez için gerekliliğini ortaya koymaktadır (41, 42).

Siklinlerin başka bir alt grubu olan *CCND1*, *CCND2* ve *CCND3*'ün de bu çalışmada potansiyel hedef olabileceği görüldü. *CCND1* (cyclin D1), hücre döngüsünün G1/S geçişi için gerekli olan ve yine başka bir potansiyel hedef olduğu belirlenen *CDK6* (cyclin dependent kinase 6)'nın düzenleyici alt birimidir. Siklin bağımlı kinazlar spermatogenezin mitotik ve mayotik bölünmelerini yönetmeleri açısından önemlidir. İmmunohistokimyasal çalışmalar spermatogenezin farklı evrelerindeki hücrelerinde, ifade farklılıkları gösterdiklerini ortaya koymuştur (43). Çalışmada hedef olarak belirlenen *CLSPN* (claspin), *CDC25A* (cell division cycle 25A), *E2F3* (E2F transcription factor 3), *TSC22D2* (TSC22 domain family member 2) ve *WEE1* (WEE1 G2 checkpoint kinase) de hücre döngüsünde görev alan proteinleri kodlarlar. Bunlardan testiste yüksek oranda ifade edilen *CLSPN*, hücre döngüsünde önemli bir düzenleyicidir ve replikasyon sırasında oluşan strese veya DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün kontrol noktasında durmasını tetikler (44). Bu protein ayrıca hücre döngüsünün S fazı sırasında DNA replikasyonunun hatasız ilerlemesi için de gereklidir (44). Yine testisteki ifadesi yüksek bir onkogen olan *CDC25A*, DNA hasarına yanıtta görev alır (45). *E2F3*, spermatogonia ve preleptoten spermatositlerde az seviyede ifade edilir (46). Transgenik fare modelleri *E2F3*'ün inhibisyonunun, Sertoli hücrelerinin fonksiyonel olarak olgunlaşması ve hücre döngüsünden çıkışları için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (46). Hücre döngüsünün negatif düzenlenmesinde görev alan *TSC22D2*'nin spermatogonia sitozolünde lokalize olduğu belirlenmiştir (47). *TSC22D* ailesinin üyeleri farklılaşmamış spermatogoninin büyüme faktörlerine mTORC1 aracılı tepkisinin oluşturulmasında önemli bir rol oynadığı göstermiştir (47). In vitro çalışmalar, *WEE1* tarafından katalizlenen fosforilasyonun *CDK* aktivitesini ve dolayısıyla hücre döngüsünün ilerlemesini negatif olarak düzenlediğini göstermiştir (35). Dolayısıyla, *WEE1* spermatogonial kök hücrelerin proliferasyonu ve/veya farklılaşması üzerinde etkilidir (35). İlâveten DNA hasarına cevap sinyalizasyonunda rol oynayan *TAOK1* (TAO kinase 1) ve *FBXL20* (F-box and leucine rich repeat protein 20) de COVID-19 RNA'sının etkileyebileceği hedefler olarak belirlenmiştir. Bu protein ailelerinin üyelerinin eksikliği spermatogonial kök hücrelerde senesens belirteçlerinin artışı ve seminifer tübüllerinin dejenerasyonuna neden olmaktadır (27). *CPEB* (cytoplasmic polyadenylation element binding protein) ailesinin üyeleri olan *CPEB2* ve *CPEB3* spermatogenezde mRNA'nın sitoplazmik

poliadenilasyonunu düzenleyen bir trans faktör olarak görev alırlar. Cpeb2 proteini transkripsiyonel olarak aktif olmayan haploid spermatidlerde bulunur ve infertil erkeklerin sperm DNA'sında hipometile olduğu bildirilmiştir (48).

SONUÇ

Bu çalışma COVID-19 RNA'sının testislerde endojen mir15/16 ve mir 30 aile üyelerini çekerek ifade seviyelerini azalttığını, devamında da bu miRNA'ların potansiyel diğer hedeflerinin ifadelerinde artışa neden olabileceğini ortaya çıkardı. Ortak hedef genlerin özellikle hücre döngüsü, apoptoz, DNA onarımı ve hasar sinyalizasyonu, spermatogenez ve konak viral cevabıyla ilişkili olduğu belirlendi. Bu genlerin ifade seviyelerindeki değişikliğin özellikle spermatogonial kök hücreler başta olmak üzere tüm spermatogonik hücrelerin sağ kalımına etki edebileceği öngörülebilir. In silico çalışmalar, hastalıkların moleküler etkilerini değerlendirmek için sağladığı araçlar sayesinde hesaplamaya dayalı analiz imkânı sunar. Bununla birlikte bilindiği üzere bu çalışma modeli, özellikle infertilite gibi multifaktöriyel hastalıkları analiz etmek için dar kapsamlı kalabilmektedir. Bu sebeple bu çalışmadan elde edilen sonuçların ileride hücre kültürü ve vaka-kontrol çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir.

Yazarların Katkıları: Fikir/Kavram: N.H., S.E.; Tasarım: N.H., S.G.; Veri Toplama ve/veya İşleme: N.H., S.E.; Analiz ve/veya Yorum: N.H., S.G.; Literatür Taraması: N.H., S.E.; Makale Yazımı: N.H.; Eleştirel İnceleme: S.G.

KAYNAKLAR

1. Sabetian S, Castiglioni I, Jahromi BN, Mousavi P, Cava C. In silico identification of mirna-lncrna interactions in male reproductive disorder associated with COVID-19 infection. *Cells*. 2021; 10(6): 1480.
2. Bridwell RE, Merrill DR, Griffith SA, Wray J, Oliver JJ. A coronavirus disease 2019 (COVID-19) patient with bilateral orchitis. *Am J Emerg Med*. 2021; 42: 260.e3- 260.e5.
3. Alvarez G, Molina M, Castilla JA, Clavero A, Gonzalvo MC, Sampedro A, et al. Study of SARS-CoV-2 in semen from asymptomatic donors with the presence of virus in nasopharyngeal swabs. *Reprod Biomed Online*. 2023; 47(6): 103321.
4. Cannarella R, Marino M, Crafa A, Bagnara V, La Vignera S, Condorelli RA, et al. Impact of COVID-19 on testicular function: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine*. 2024; 85(1): 44-66.
5. Holtmann N, Edimiris P, Andree M, Doehmen C, Baston-Buest D, Adams O, et al. Assessment of SARS-CoV-2 in human semen-a cohort study. *Fertil Steril*. 2020; 114(2): 233-8.
6. Li H, Xiao X, Zhang J, Zafar MI, Wu C, Long Y, et al. Impaired spermatogenesis in COVID-19 patients. *EClinicalMedicine*. 2020; 28: 100604.
7. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018; 62: 2-10.
8. Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia*. 2021; 53(1): e13586.

9. Hekim N, Ergün S, Güneş S. Role of microRNAs in the pathophysiology of varicocele-related infertility. 2021; 23(4): 269-77.
10. Hekim N, Gunes S, Asci R, Henkel R, Abur U. Semiquantitative promoter methylation of MLH1 and MSH2 genes and their impact on sperm DNA fragmentation and chromatin condensation in infertile men. *Andrologia*. 2021; 53(1): e13827.
11. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*. 2010; 11(7): 537-61.
12. Bertolazzi G, Cipollina C, Benos PV, Tumminello M, Coronello C. miR-1207-5p can contribute to dysregulation of inflammatory response in COVID-19 via targeting SARS-CoV-2 RNA. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 586592.
13. Fehlmann T, Ludwig N, Backes C, Meese E, Keller A. Distribution of microRNA biomarker candidates in solid tissues and body fluids. *RNA Biol*. 2016; 13(11): 1084-8.
14. Huang R, Chen J, Dong X, Zhang X, Luo W. Transcriptome data revealed the circRNA-miRNA-mRNA regulatory network during the proliferation and differentiation of myoblasts in shitou goose. *Animals (Basel)*. 2024; 14(4): 576.
15. Rai B, Pande A, Tiwari S. TRAIL and EGFR Pathways targeting microRNAs are predominantly regulated in human diabetic nephropathy. *Microna*. 2023; 12(2): 143-55.
16. Firoozi Z, Mohammadisoleimani E, Bagheri F, Taheri A, Pezeshki B, Naghizadeh MM, et al. Evaluation of the expression of infection-related long noncoding RNAs among COVID-19 patients: A case-control study. *Genet Res (Camb)*. 2024; 2024: 3391054.
17. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ*. 2015; 22(1): 6-11.
18. Zidan HE, Abdul-Maksoud RS, Elsayed WSH, Desoky EAM. Diagnostic and prognostic value of serum miR-15a and miR-16-1 expression among egyptian patients with prostate cancer. *IUBMB Life*. 2018; 70(5): 437-44.
19. Kao CJ, Martiniez A, Shi XB, Yang J, Evans CP, Dobi A, et al. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT. *Oncogene*. 2014; 33(19): 2495-503.
20. Kumar B, Khaleghzadegan S, Mears B, Hatano K, Kudrolli TA, Chowdhury WH, et al. Identification of miR-30b-3p and miR-30d-5p as direct regulators of androgen receptor signaling in prostate cancer by complementary functional microRNA library screening. *Oncotarget*. 2016; 7(45): 72593-607.
21. Zhang Y, Li Y. Long non-coding RNA NORAD contributes to the proliferation, invasion and EMT progression of prostate cancer via the miR-30a-5p/RAB11A/WNT/beta-catenin pathway. *Cancer Cell Int*. 2020; 20(1): 571.
22. Sharma P, Kaushal N, Saleth LR, Ghavami S, Dhingra S, Kaur P. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023; 1869(6): 166742.

23. Afsari M, Talebi AR, Tafti FD, Makki M, Fesahat F. Differential apoptotic gene expression in the male partners of infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. *JBRA Assist Reprod*. 2022; 26(4): 606-11.
24. Liu J, Mochida K, Hasegawa A, Inoue K, Ogura A. Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of mouse spermatozoa to cryopreservation. *J Reprod Dev*. 2018; 64(2): 117-27.
25. Shi ZH, Zhao C, Wu H, Liu XM. Expression of RhoGDI alpha in human testes and sperm and its correlation with the success rate of IVF. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2011; 17(4): 325-9.
26. Togawa A, Miyoshi J, Ishizaki H, Tanaka M, Takakura A, Nishioka H, et al. Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDIalpha. *Oncogene*. 1999; 18(39): 5373-80.
27. Ozawa M, Fukuda T, Sakamoto R, Honda H, Yoshida N. The histone demethylase FBXL10 regulates the proliferation of spermatogonia and ensures long-term sustainable spermatogenesis in mice. *Biol Reprod*. 2016; 94(4): 92.
28. Boekhout M, Karasu ME, Wang J, Acquaviva L, Pratto F, Brick K, et al. REC114 partner ANKRD31 controls number, timing, and location of meiotic DNA breaks. *Mol Cell*. 2019; 74(5): 1053-68 e8.
29. Liu F, Xu ZL, Qian XJ, Qiu WY, Huang H. Expression of Hsf1, Hsf2, and Phlda1 in cells undergoing cryptorchid-induced apoptosis in rat testes. *Mol Reprod Dev*. 2011; 78(4): 283-91.
30. Verissimo F, Silva E, Morris JD, Pepperkok R, Jordan P. Protein kinase WNK3 increases cell survival in a caspase-3-dependent pathway. *Oncogene*. 2006; 25(30): 4172-82.
31. Fakhro KA, Elbardisi H, Arafa M, Robay A, Rodriguez-Flores JL, Al-Shakaki A, et al. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet Med*. 2018; 20(11): 1365-73.
32. Kuo YC, Lin YH, Chen HI, Wang YY, Chiou YW, Lin HH, et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum Mutat*. 2012; 33(4): 710-9.
33. Vahabi Barzi N, Kakavand K, Sodeifi N, Ghezelayagh Z, Sabbaghian M. Expression and localization of Septin 14 gene and protein in infertile men testis. *Reprod Biol*. 2020; 20(2): 164-8.
34. Lin CH, Shen YR, Wang HY, Chiang CW, Wang CY, Kuo PL. Regulation of septin phosphorylation: SEPT12 phosphorylation in sperm septin assembly. Cytoskeleton (Hoboken). 2019; 76(1): 137-42.
35. Singh P, Patel RK, Palmer N, Grenier JK, Paduch D, Kaldis P, et al. CDK2 kinase activity is a regulator of male germ cell fate. *Development*. 2019; 146(21): dev180273.
36. Teng Y, Wang Y, Fu J, Cheng X, Miao S, Wang L. Cyclin T2: a novel miR-15a target gene involved in early spermatogenesis. *FEBS Lett*. 2011; 585(15): 2493-500.
37. Tian R, Guan X, Qian H, Wang L, Shen Z, Fang L, et al. Restoration of NRF2 attenuates myocardial ischemia reperfusion injury through mediating microRNA-29a-3p/CCNT2 axis. *Biofactors*. 2021; 47(3): 414-26.
38. Dutta D, Liu J, Xiong H. The impact of COVID-19 on people living with HIV-1 and HIV-1-associated neurological complications. *Viruses*. 2023; 15(5): 1117.
39. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Moller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*. 2020; 181(5): 1036-45 e9.
40. Han Q, Chen G, Wang J, Jee D, Li WX, Lai EC, et al. Mechanism and function of antiviral RNA interference in mice. *mBio*. 2020; 11(4): e03278-19.
41. Walker WH. Regulation of mammalian spermatogenesis by miRNAs. *Semin Cell Dev Biol*. 2022; 121: 24-31.
42. Korhonen HM, Meikar O, Yadav RP, Papaioannou MD, Romero Y, Da Ros M, et al. Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24821.
43. Zindy F, den Besten W, Chen B, Rehg JE, Latres E, Barbacid M, et al. Control of spermatogenesis in mice by the cyclin D-dependent kinase inhibitors p18(Ink4c) and p19(Ink4d). *Mol Cell Biol*. 2001; 21(9): 3244-55.
44. Lee TH, Choi JY, Park JM, Kang TH. Posttranscriptional control of the replication stress response via TTP-mediated Claspin mRNA stabilization. *Oncogene*. 2020; 39(16): 3245-57.
45. Sadeghi H, Golalipour M, Yamchi A, Farazmandfar T, Shahbazi M. CDC25A pathway toward tumorigenesis: Molecular targets of CDC25A in cell-cycle regulation. *J Cell Biochem*. 2019; 120(3): 2919-28.
46. Makela JA, Toppari J. Retinoblastoma-E2F transcription factor interplay is essential for testicular development and male fertility. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 903684.
47. La HM, Chan AL, Legrand JMD, Rossello FJ, Gangemi CG, Papa A, et al. GILZ-dependent modulation of mTORC1 regulates spermatogonial maintenance. *Development*. 2018; 145(18): dev165324.
48. Sujit KM, Sarkar S, Singh V, Pandey R, Agrawal NK, Trivedi S, et al. Genome-wide differential methylation analyses identifies methylation signatures of male infertility. *Hum Reprod*. 2018; 33(12): 2256-67.