


SOX9 DELESYONUNUN IN SILICO ANALİZİ

IN SILICO ANALYSIS OF SOX9 DELETION

Neslihan HEKİM ¹¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Samsun, Türkiye

ÖZET

SOX9 geni, embriyonal gelişimde cinsiyetin belirlenmesinde, kondrosit farklılaşması ve iskelet gelişiminde kilit rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. SOX9 ekspresyonundaki azalma sıklıkla cinsiyet gelişim bozukluklarıyla birlikte gözlenen bir iskelet malformasyon sendromu olan kampomelik displaziye yol açar. MiRNA'lar tam ya da kısmi komplementerlikleri sayesinde hedef transkriptlerinin ekspresyonlarını düzenleyen önemli araçlardır. SOX9 geninin delesyonu, bu geni hedefleyen miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde artışa ve dolayısıyla diğer hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalmaya neden olabilir. Bu çalışma SOX9'un delesyonunun potansiyel olarak etkileyebileceği miRNA'ları ve bu miRNA'ların hedef genlerini in silico olarak belirlemeyi amaçladı. Bunun için önce miRWalk veri tabanı kullanılarak makine öğrenimi algoritmasıyla depolanmış verilerden SOX9 genini hedefleyen miRNA'lar arandı. Sonuçlardan 0,95'ten daha büyük skorlu ve en az diğer iki miRNA hedef veri tabanında da (miRTarBase, miRDB, TargetScan) eşleşen dört miRNA belirlendi. Bu miRNA'ların SOX9 transkripti ile olası konformasyonu STarMir ve miRanda veri tabanlarının algoritmaları kullanılarak oluşturuldu. miRDB ile dört miRNA'nın hepsinin birden hedeflediği genler RLIM, MBNL3, ZNF516 ve FZD4 olarak belirlendi. GeneMANIA tahmin sunucusu kullanılarak bu hedef genlerin etkileşimde olduğu 20 diğer gen, protein ve genetik etkileşimleri, yolları, ortak ekspresyon ve lokalizasyonu ile protein domain benzerliklerinin dâhil olduğu asosiasyon verileri kullanarak belirlendi. Belirlenen bu dört hedef genin, protein ve RNA düzeyinde ekspresyonları, moleküler fonksiyonları ve biyolojik süreçlerdeki rolleri, insan proteom verileri ve deneysel çalışmalar ile araştırıldı. Bu çalışmanın sonuçları SOX9 gen delesyonunun miRNA aracılıklı şekilde potansiyel hedef genlerindeki ekspresyon değişikliklerine neden olabilme ihtimalini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, miRWalk, SOX9

ABSTRACT

SOX9 gene is a transcription factor that plays a key role in sex determination, chondrocyte differentiation and skeletal development in embryonic development. Decreased SOX9 expression often leads to campomelic dysplasia, a skeletal malformation syndrome observed with disorders of sex development. With their full or partial complementarity, miRNAs are important mediators that regulate the expression of their target transcripts. Deletion of SOX9 gene may result in increased expression levels of miRNAs targeting this gene and thus decreased expression levels of other target genes. This study aimed to identify miRNAs that deletion of SOX9 could potentially affect and their target genes in silico. For this, miRNAs targeting SOX9 gene were searched from the data stored with the machine learning algorithm using miRWalk database. Four miRNAs with scores greater than 0.95 and at least matching in the other two miRNA target databases (miRTarBase, miRDB, TargetScan) were identified from the results. The possible conformation of these miRNAs with SOX9 transcript was generated using the algorithms of STarMir and miRanda databases. The genes targeted by all four miRNAs were identified as RLIM, MBNL3, ZNF516 and FZD4 using miRDB. Using the GeneMANIA prediction server, 20 other genes with which these target genes interact were determined using association data, including protein and genetic interactions, pathways, co-expression and localization, and protein domain similarities. The expression in protein and RNA levels, molecular functions and roles in biological processes of these four target genes were investigated with human proteome data and experimental studies. The results of this study suggest the possibility that SOX9 gene deletion may cause expression changes in potential target genes via miRNA.

Keywords: miRNA, miRWalk, SOX9**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Neslihan HEKİM, Dr.Öğr. Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Samsun, Türkiye. E-mail: neslihan.taskurt@omu.edu.tr**Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article:** Hekim N. (2023). SOX9 delesyonunun IN SILICO analizi. *Gevher Nesibe Journal of Medical & Health Sciences*, 8(Özel Sayı),826-832. <http://doi.org/10.5281/zenodo.8404309>

*8. Uluslararası Ankara Bilimsel Araştırmalar Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur (9-11 Haziran 2023, Ankara)

GİRİŞ

17q24.3'te bulunan *SOX9* (SRY-box transcription factor 9) geni testis ve kıkırdak başta olmak üzere birkaç dokuda eksprese edilir ve gelişimde önemli yer tutan bir transkripsiyon faktörü kodlar. *SOX* ailesinin diğer üyeleriyle birlikte (A/T)(A/T)CAA(A/T)G dizisi ile fonksiyon gösterir (Gou, Zhang, & Xu, 2015). Enhansörlerindeki belirli bir DNA motifine bağlanarak kondrogenez için önemli olan genlerin ekspresyonunu destekler. Kondrosit farklılaşmasının ardışık adımlarında merkezi bir rol oynar (Lefebvre, Angelozzi, & Haseeb, 2019). Kıkırdak gelişimine ek olarak, epitelyal kök hücrelerde proliferasyon ve farklılaşmanın düzenleyicisi olarak da işlev görür; proliferasyonu ve farklılaşmayı dengeleyerek ve hücre dışı matrisi düzenleyerek dallanma morfogenezi sırasında akciğer epitelinde yer alır (Rockich et al., 2013).

Kıkırdak oluşumundaki rolü ile birlikte *SOX9*, erkek cinsiyet belirlenmesinde önemli rol oynar. *SOX9*, embriyonal gelişimin ilk aşamalarında hem XX hem de XY taşıyan embriyolarda bazal seviyelerde eksprese edilir. Sonrasında *SRY* ekspresyonunun artışı takiben, *SOX9* ekspresyonu da testislerde artar ve böylece *AMH* (anti-Muellerian hormon) geninin transkripsiyonunu düzenleyerek erkek fenotipinin gelişimi aşamasında kilit rol oynar (Parker & Schimmer, 2006). İnsanlarda, heterozigot mutasyonlar, varyasyonlar veya delesyonlardan kaynaklanan *SOX9*'un haployetmezliği, *SOX9* proteininin iskeletin, üreme organlarının ve vücudun diğer bölümlerinin normal gelişimi için gerekli olan genleri uygun şekilde kontrol etmesini engeller. Sonuç olarak bu durum gonadal disgenezis ve nadir otozomal dominant bir hastalık olan uzun kemiklerin kısalması ve eğilmesinin gözlemlendiği kampomelik displaziye (MIM #114290) kadar farklı fenotiplere yol açabilir (Rey & Josso, 2016; Schluth-Bolard, Ottaviani, Gilson, & Magdinier, 2011).

18–22 nükleotid uzunluğunda ve kodlama yapmayan mikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alan önemli araçlardır. MiRNA'lar hedef mRNA'larının çoğunlukla 3'ucunu hedefleyerek, mRNA'nın protein sentezindeki etkinliğini ya da stabilitesini değiştirerek rol oynar (Hekim, Ergün, & Güneş, 2021). MiRNA'ların neredeyse bütün biyolojik süreçlerde önemli roller oynadıkları gösterilmiştir (Hekim et al., 2021). Bu çalışmada delesyon, varyasyon ya da mutasyonlar yüzünden *SOX9*'un ekspresyonunda meydana gelebilecek bir azalmanın, potansiyel olarak etkileyebileceği miRNA'ları ve bu miRNA'ların hedef genlerini *in silico* olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM

miRWalk, miRTarBase, miRDB ve TargetScan veri tabanları kullanılarak *SOX9* genini hedefleyen miRNA'lar *in silico* olarak belirlendi. Bu miRNA'ların *SOX9* transkripti ile olası konformasyonu için STarMir ve miRanda veri tabanlarının algoritmaları kullanıldı. Belirlenen miRNA'ların hedeflerini bir arada görebilmek için miRBD veri bankasından çoklu hedef belirleme özelliği kullanıldı, böylece belirlenen miRNA'ların ortak hedef genleri tarandı. Son olarak GeneMANIA tahmin sunucusunda bu genlerin etkileşimde olduğu diğer genler arandı.

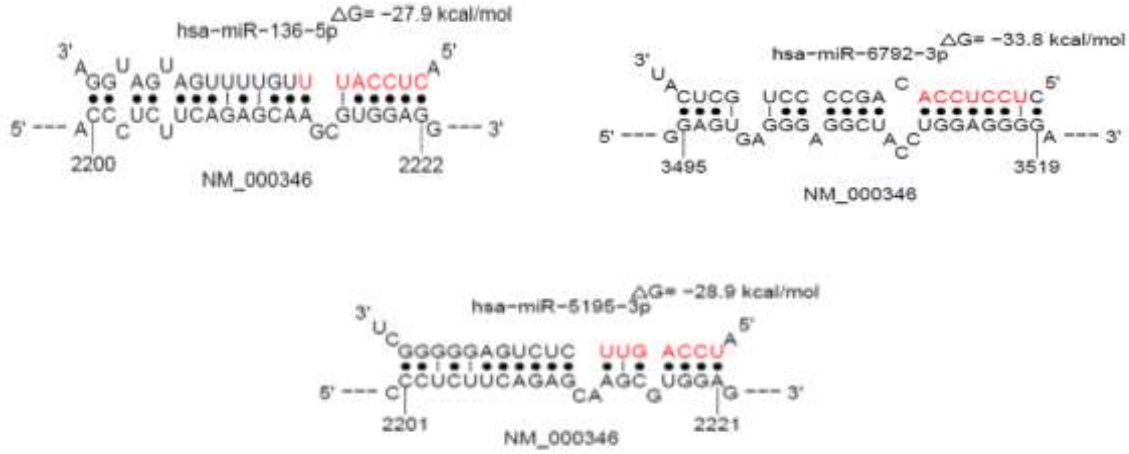
BULGULAR

SOX9 genini hedefleyen miRNA'ların *in silico* olarak belirlenmesi için önce miRWalk veri tabanı kullanılarak makine öğrenimi algoritmasıyla depolanmış verilerden *SOX9* geninin 3'UTR'sini hedefleyen ve skoru 0,95'ten büyük olan (0,96-1,00) miRNA'lar arandı. Sonuçlanan 185 miRNA'dan miRTarBase ve/veya miRDB ve/veya TargetScan miRNA veri tabanlarında da *SOX9* genini hedeflediği belirlenen (en az 2 veri tabanında da ortak olan) dört miRNA; hsa-miR-136-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-6792-3p ve hsa-miR-5195-3p olarak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. *SOX9* Genini Hedeflediği Belirlenen miRNA'lar

| miRNA | Skor | Pozisyon | Bağlandığı Bölge | miRWalk | TargetScan | miRDB | miRTarBase |
|-----------------|------|----------|-------------------------|---------|------------|-------|------------|
| hsa-miR-136-5p | 1.00 | 3UTR | 2199,2223 | ✓ | — | ✓ | ✓ |
| hsa-miR-8485 | 0.96 | 3UTR | 3382,3429 3494,3520- | ✓ | — | ✓ | ✓ |
| hsa-miR-6792-3p | 1.00 | 3UTR | 2208,2225 | ✓ | — | — | ✓ |
| hsa-miR-5195-3p | 1.00 | 3UTR | 2200,2222 | ✓ | ✓ | ✓ | — |

Bu miRNA'ların *SOX9* transkripti (RefSeq ID: NM_000346) ile olası konformasyonları STarMir ve miRanda veri tabanlarının algoritmaları kullanılarak oluşturuldu. Konformasyonlar, miRNA için bir stabilite ölçüsü olarak serbest enerji değerleri (delta G ve MFE) ile kontrol edildi. Hsa-miR-5195-3p'nin *SOX9* transkriptine bağlanması STarMir veri tabanı ile (Şekil 1), hsa-miR-8485'in *SOX9* transkriptine bağlanması ise miRanda veri tabanı ile oluşturuldu (Tablo 2). Hsa-miR-136-5p ve hsa-miR-6792-3p'nin *SOX9* mRNA'sı ile olası konformasyonları hem STarMir hem de miRanda veri tabanlarıyla incelendi.

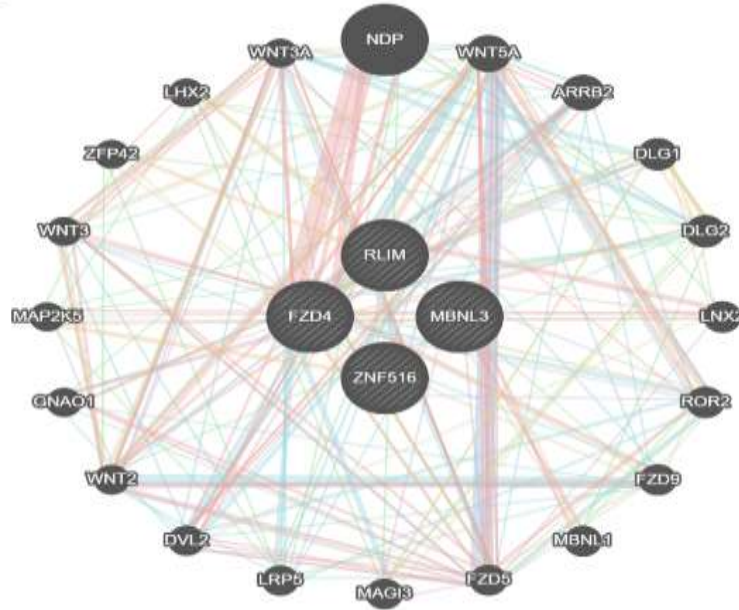


Şekil 1. Hsa-miR-136-5p, hsa-miR-6792-3p ve hsa-miR-5195-3p'nin *SOX9* transkriptine bağlanmalarının şematize edilmiş gösterimi (StarMir veri tabanına göre)

Tablo 2. MiRNA'ların Bağlanma Bölgesinin Şematize Edilmiş Gösterimi (miRanda Veri Tabanına Göre)

| ID | Dupleks Yapısı | Pozisyon | Skor | MFE (Minimum serbest enerji) |
|----------------------------|--|-----------|--------|------------------------------|
| hsa-miR-8485 – NM_000346 | miRNA 3' uaUGCACACACACACACACAc 5' :: Target 5' gtGTGTGTGTGGGTGTGTGTg 3' | 1512-1532 | 179.00 | -29.50 |
| hsa-miR-136-5p– NM_000346 | miRNA 3' aggUAGUAGUUUUGUUUACCUCa 5' : : : : : : Target 5' gcaAGCGTGGAGGATGATGGAGa 3' | 309-331 | 136.00 | -13.00 |
| hsa-mir-6792-3p- NM_000346 | miRNA 3' uaCUCG-UCC--CCGA--CACCUCCUc 5' : : Target 5' tgGAGTGAGGGGAGGCTACCTGGAGGGg 3' | 1591-1617 | 144.00 | -24.90 |

SOX9'u hedeflediği belirlendikten sonra olası konformasyonları da oluşturulan dört miRNA'nın ortak hedeflerini bir arada görebilmek için miRBD veri bankasının çoklu hedefleme özelliği kullanılarak dört miRNA için hedef gen araması yapıldı. Sonuçlarda hsa-miR-136-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-6792-3p ve hsa-miR-5195-3p'nin ortak hedefi olan dört gen *RLIM* (ring finger protein, LIM domain interacting), *MBNL3* (muscleblind like splicing regulator 3), *ZNF516* (zinc finger protein 516), *FZD4* (frizzled class receptor 4) olarak belirlendi. Son olarak GeneMANIA tahmin sunucusunda bu genlerin fiziksel interaksyon, ortak ekspresyon, ortak lokalizasyon, genetik interaksyon, ortak yollar ve ortak protein domainlerini taşımaları açısından etkileşimde olduğu diğer 20 gen belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. GeneMANIA Tahmin Sunucusuna Göre *RLIM*, *MBNL3*, *ZNF516* ve *FZD4* Geninin İlişkide Olduğu Genler

TARTIŞMA

SOX transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olan SOX9, embriyonal gelişimde cinsiyet farklılaşmasında kilit bir rol üstlenerek *SRY* geninin ekspresyonunu takiben embriyoda Sertoli hücrelerinin farklılaşmasını sağlar (Haseeb & Lefebvre, 2019). *SOX9* genindeki haployetmezliğin, kampomelik displaziye yol açabileceği bilinmektedir (Schluth-Bolard et al., 2011). Belirgin yüz ifadeleri, yarı damak, uzun kemiklerin kısalması ve bükülmesi ve çarpık ayaklılık ile karakterize olan bu iskelet displazisinin diğer bulgular arasında, ambigüus genitelyalı veya normal kadın dış genital organları olan 46,XY karyotipli bireyler ve solunum bozukluğu da yer alır (Rey & Josso, 2016; Schluth-Bolard et al., 2011). Bununla birlikte *SOX9*'un *AMH* promotörünün aktivasyonunu etkileyen mutasyonlarının saptandığı hastaların bazılarında testis disgenezisinin tek başına görülebileceği de gösterilmiştir (Hyon et al., 2015; Katoh-Fukui et al., 2015). *SOX9*'u hedefleyen miRNA'ların ortak hedef genlerinden biri olan ve X kromozomu üzerinde bulunan *RLIM* geni bir E3 ubiquitin protein ligaz olan RING-H2 çinko parmak proteinini kodlar. RING-H2 proteini, dişi memelilerin somatik hücrelerinde X kromozomunun rastgele etkisizleştirilmesinin aktivatörü olarak görev yapar (Wang et al., 2021). Hayvan embriyolarındaki maternal *Rlim* geninin delesyonunun, yavrularda erkek yanlı bir cinsiyet oranının ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (Peng, Hou, Wu, Li, & Wu, 2023). Ayrıca *Rlim*'in, testislerde post-mayotik yuvarlak spermatidlerde ve Sertoli hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Wang et al., 2021). Bu sebeple ilk başta sağlıklı olarak gözlenen erkek farelerde *Rlim*'in nakavt edilmesi olgun spermelerin sayısında azalmayla ve sitoplazma hacimlerinin artmasıyla sonuçlanır, bu da sperm motilitesinin ve *in vitro* fertilizasyon oranlarının azalmasına yol açabilmektedir (Wang et al., 2021). Sertoli hücrelerinin spermatozoadaki sitoplazmik azaltmayı düzenlediği bilinmesine rağmen bu çalışmada bu aktiviteye erkek germ hücre hattında eksprese edilen *Rlim*'in aracılık ettiğini düşündürmektedir. MiRNA'ların bir diğer hedefi, *FZD4* geni, 'frizzled' gen ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyeleri transmembran proteinlerini kodlar ve bu reseptörlerin çoğu, *WNT* hedef genlerinin aktivasyonuna yol açan beta-katenin sinyal yoluyla ilişkilidir. Spesifik olarak, *FZD4*, hücrelerin ve dokuların gelişimini etkileyen *WNT* sinyal yoluna katılır. *WNT* genlerinden olan *WNT4*, dişi üreme sisteminin gelişim aşamasında organogenez için gereklidir (Pitzer, Moroney, Nokoff, & Sikora, 2021). *WNT4*, *SRY*'nin bir antagonisti olarak hareket ederek, kadın cinsiyetinin farklılaşmasında ve erkek cinsiyet farklılaşmasının baskılanmasında rol oynar (Ragitha et al., 2023). Farelerde yapılan araştırmalar, *Wnt4*'ün ekspresyonundaki artışın XY hayvanlarında dişileşmeye; benzer şekilde, *Wnt4*'ün delesyonunun ise dişilerde erkekleşmeye yol açtığını göstermiştir (Pitzer et al., 2021; Ragitha et al., 2023).

Cinsiyet belirlemedeki rolü ile birlikte *SOX9*, iskelet progenitörlerinin prekondrositlere dönüştüğü kondrogenezdeki ilk adım olan prekondrosit yoğunlaşması için gereklidir. Prekondrositlerin

daha sonra kondrositlere farklılaşmasında ve devamında kondrositlerin osteoblastik farklılaşmasının önlenmesinde de rol alır (Lefebvre et al., 2019). SOX9'u hedefleyen miRNA'ların ortak hedef genlerinden bir diğeri olan *ZNF516* kahverengi adipoz doku farklılaşmasını destekleyen genlerin transkripsiyonunu aktive eden ve replikasyon stresine hücrel yanıtta da rol oynayabilen bir çinko-parmak proteinidir. SOX9'un kondrogenezdeki görevlerine paralel olarak kemik mineral yoğunluğu azalmış büyük bir kohorttan elde edilen veriler, *ZNF516*'da bulunan tek nukleotid polimorfizmlerinin osteoporoz ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Yang et al., 2013). İlâveten birçok hücre tipinde *RLIM*, yalnızca transkripsiyonel düzenlemede yer alan çeşitli proteinlerin ve protein komplekslerinin seviyelerini ve dinamiklerini değil, aynı zamanda kendi ekspresyonunu da kontrol eder (Wang et al., 2021). Önemli bir post-transkripsiyonel düzenleyici olarak, *RLIM* genindeki mutasyonlar kraniyofasiyal anormallikler, hipogenitalizm ve diyafragma hernisi gibi değişken klinik özelliklerle ilişkili bir hastalık olan Tonne-Kalscheuer Sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Bustos et al., 2021). Ayrıca *FZD4*'ün de, *WNT5a* ve *WNT3a* ile birlikte kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasının düzenlenmesinde yer alarak kemik oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Gu et al., 2018; Kushwaha et al., 2020; J. G. Zhou et al., 2020).

Cinsiyet gelişim bozuklukları gösteren hastalar, başta germ hücreli tümörler dâhil olmak üzere kanser gelişimi açısından yüksek risk altındadır (Kathrins & Kolon, 2016). Bununla birlikte kampomelik dispilaziden etkilenen çocukların da ileri de kanser risk artışı açısından takip edilmesi önerilmektedir (N Antonakopoulos, 2019). Bu çalışma ile *SOX9*'un transkripsiyonundaki azalmanın potansiyel olarak etkileyebilecekleri belirlenen dört genin ekspresyon değişikliklerinin çeşitli kanserlerle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. *MBNL3* geni, miyotonic distrofinin patofizyolojisinde rol oynayabilen 'muscleblind like' protein ailesinin bir üyesini kodlar. Ayrıca pre-mRNA alternatif splayns düzenlemesine aracılık ederek, pre-mRNA hedeflerinde splaynsin etkinleştiricisi veya baskılayıcısı olarak işlev görür. *MBNL3*'ün pankreatik duktal adenokarsinom hücre hattında hücre proliferasyonunu etkilemeden, hücrelerin invazyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Oladimeji, Bakke, Wright, & Chen, 2020). Radyoterapiye dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında *MBNL3* ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Yu et al., 2020). *MBNL3*'ün ekspresyon artışı yumurtalık kanserinde, standart birinci basamak tedavi olan paklitaksel direnci ile pozitif korelasyonlu olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada Nanog'u yukarı doğru düzenleyerek yumurtalık kök benzeri hücrelerde hücre canlılığını artırıp ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Sun, Diao, Zhu, Yin, & Cheng, 2021). *MBNL3*'ün delesyonu, hepatoselüler karsinom oluşumunu neredeyse tamamen ortadan kaldırır (Yuan et al., 2017). *MBNL3* aynı zamanda lncRNA-PXN-AS1'in 4. ekzonunun dâhil edilmesini indükler. Ekzon 4'ün bulunduğu transkript, PXN mRNA'sının 3' UTR bölgesine bağlanır ve böylece PXN ekspresyonu artar. Ayrıca hepatoselüler karsinom hücre hattı çalışmaları ile kanserle ilişkili başka bir lncRNA olan FIRRE'nin *MBNL3*'e özgü olarak bağlanarak PXN'nin ekspresyonunu etkilediği de gösterilmiştir (J. Zhou et al., 2022). Bu çalışmalar *MBNL3*'ün dolaylı olarak da, hepatoselüler karsinom oluşumunda kodlamayan RNA'ların pro-tümörjenik rollerine aracılık ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, *RLIM* ekspresyonunun hepatoselüler karsinom hastalarında azaldığı ve p15 ve p21 ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Huang et al., 2017). Ek olarak, *RLIM* ekspresyonunun artışı hücre büyümesini baskılamış ve hepatoselüler karsinomun hücre döngüsü ilerlemesini durdurmuştur (Huang et al., 2017). Ayrıca *RLIM*'in ekspresyon değişikliklerinin akciğer tümörü oluşumu sırasında da rol oynayabileceği gösterilmiştir (Jin et al., 2021). Bununla birlikte *FZD4*-Wnt etkileşiminin de bazı kanserlerde önemli olabileceği gösterilmiştir. Kutanöz skuamöz hücreli karsinom dokularında ve hücre hatlarında *FZD4* ekspresyonu azalma göstermiş; ayrıca *FZD4*'ün ekspresyonunun artmasının da hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu desteklediği öne sürülmüştür (Zhang, Lv, Li, Jiang, & Fang, 2021). *FZD4*'ün ekspresyonundaki değişikliklerin epitelyal yumurtalık kanser riskinin artışı ve mesane kanseri dokularında hücrelerin göçü ve istilası ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen et al., 2019; X. Zhou, Jiang, & Guo, 2021). Ek olarak, *ZNF516*'nın ekspresyon seviyesinin de, normal kolorektal mukozal hücrelerle karşılaştırıldığında kolorektal kanser dokusunda daha düşük olduğu bulunmuştur (E et al., 2022). İlâveten *ZNF516*'nın meme kanseri hücrelerinin *in vitro* çoğalmasını ve istilasını engellediği ve *in vivo* olarak meme kanseri büyümesini ve metastazını baskıladığı gösterilmiştir (Li et al., 2017). Yine servikal biyopsilerde *ZNF516* ekspresyonu ile servikal lezyon derecesi, proliferasyon belirteçleri ve insan papilloma virüsü varlığı arasında ters bir ilişki gözlenmiştir (Ili et al., 2019). Destekler şekilde *ZNF516* promotörünün, servikal tümörlü dokularda daha metile olduğu gözlenmiştir (Brebti et al., 2014).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu biyoinformatik analiz, *SOX9* transkriptini düzenleyen dört miRNA'yı ve onların diğer dört hedef genini tanımlamıştır. Çalışmanın bulguları, *SOX9* ekspresyonundaki azalmanın, miRNA rekabeti yoluyla da gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlemesini değiştirebileceğini düşündürmektedir. MiRNA'lar arasındaki çapraz konuşma ve çoklu hedefleme, *SOX9* haployetmezliğinin neden olduğu ya da riskini arttırdığı hastalıklardaki bazı fenotipik varyasyonları açıklayabilir. Bununla birlikte *in silico* bulguları doğrulamak için *in vivo* modellerle daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çıkar Çatışması

Araştırma ile ilgili yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek

Bu çalışma için finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Brebi, P., Maldonado, L., Noordhuis, M. G., Ili, C., Leal, P., Garcia, P., . . . Guerrero-Preston, R. (2014). Genome-wide methylation profiling reveals Zinc finger protein 516 (ZNF516) and FK-506-binding protein 6 (FKBP6) promoters frequently methylated in cervical neoplasia, associated with HPV status and ethnicity in a Chilean population. *Epigenetics*, 9(2), 308-317. doi:10.4161/epi.27120
- Bustos, F., Espejo-Serrano, C., Segarra-Fas, A., Toth, R., Eaton, A. J., Kernohan, K. D., . . . Findlay, G. M. (2021). A novel RLIM/RNF12 variant disrupts protein stability and function to cause severe Tonne-Kalscheuer syndrome. *Sci Rep*, 11(1), 9560. doi:10.1038/s41598-021-88911-3
- Chen, L., Long, Y., Han, Z., Yuan, Z., Liu, W., Yang, F., . . . Zhong, Y. (2019). MicroRNA-101 inhibits cell migration and invasion in bladder cancer via targeting FZD4. *Exp Ther Med*, 17(2), 1476-1485. doi:10.3892/etm.2018.7084
- E, J., Kang, Z., Yuan, J., Wang, Z., Tong, D., & Xing, J. (2022). ZNF516 suppresses stem cell-like characteristics by regulating the transcription of Sox2 in colorectal cancer. *Am J Cancer Res*, 12(8), 3745-3759. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36119845>
- Gou, Y., Zhang, T., & Xu, J. (2015). Chapter Fifteen - Transcription Factors in Craniofacial Development: From Receptor Signaling to Transcriptional and Epigenetic Regulation. In Y. Chai (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 115, pp. 377-410): Academic Press.
- Gu, Q., Tian, H., Zhang, K., Chen, D., Chen, D., Wang, X., & Zhao, J. (2018). Wnt5a/FZD4 Mediates the Mechanical Stretch-Induced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*, 48(1), 215-226. doi:10.1159/000491721
- Haseeb, A., & Lefebvre, V. (2019). The SOXE transcription factors-SOX8, SOX9 and SOX10-share a bi-partite transactivation mechanism. *Nucleic Acids Res*, 47(13), 6917-6931. doi:10.1093/nar/gkz523
- Hekim, N., Ergün, S., & Güneş, S. (2021). Role of microRNAs in the pathophysiology of varicocele-related infertility. *Andrology Bulletin*, 23(4), 269-277. doi:10.24898/tandro.2021.76768
- Huang, Y., Nie, M., Li, C., Zhao, Y., Li, J., Zhou, L., & Wang, L. (2017). RLIM suppresses hepatocellular carcinogenesis by up-regulating p15 and p21. *Oncotarget*, 8(47), 83075-83087. doi:10.18632/oncotarget.20904
- Hyon, C., Chantot-Bastarud, S., Harbuz, R., Bhourri, R., Perrot, N., Peycelon, M., . . . Bashamboo, A. (2015). Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular disorders of Sex Development (DSD). *Am J Med Genet A*, 167A(8), 1851-1858. doi:10.1002/ajmg.a.37101
- Ili, C., Lopez, J., Buchegger, K., Riquelme, I., Retamal, J., Zanella, L., . . . Brebi, P. (2019). Loss of ZNF516 protein expression is related with HR-HPV infection and cervical preneoplastic lesions. *Arch Gynecol Obstet*, 299(4), 1099-1108. doi:10.1007/s00404-018-5012-1
- Jin, J. O., Lee, G. D., Nam, S. H., Lee, T. H., Kang, D. H., Yun, J. K., & Lee, P. C. (2021). Sequential ubiquitination of p53 by TRIM28, RLIM, and MDM2 in lung tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 28(6), 1790-1803. doi:10.1038/s41418-020-00701-y
- Kathrins, M., & Kolon, T. F. (2016). Malignancy in disorders of sex development. *Transl Androl Urol*, 5(5), 794-798. doi:10.21037/tau.2016.08.09
- Katoh-Fukui, Y., Igarashi, M., Nagasaki, K., Horikawa, R., Nagai, T., Tsuchiya, T., . . . Fukami, M. (2015). Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9. *Mol Genet Genomic Med*, 3(6), 550-557. doi:10.1002/mgg3.165

- Kushwaha, P., Kim, S., Foxa, G. E., Michalski, M. N., Williams, B. O., Tomlinson, R. E., & Riddle, R. C. (2020). Frizzled-4 is required for normal bone acquisition despite compensation by Frizzled-8. *J Cell Physiol*, 235(10), 6673-6683. doi:10.1002/jcp.29563
- Lefebvre, V., Angelozzi, M., & Haseeb, A. (2019). SOX9 in cartilage development and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 61, 39-47. doi:10.1016/j.ceb.2019.07.008
- Li, L., Liu, X., He, L., Yang, J., Pei, F., Li, W., . . . Sun, L. (2017). ZNF516 suppresses EGFR by targeting the CtBP/LSD1/CoREST complex to chromatin. *Nat Commun*, 8(1), 691. doi:10.1038/s41467-017-00702-5
- N Antonakopoulos, D. V., N Loukas, Ch Christodoulaki, Z Iliodromiti, N Vrachnis. (2019). Campomelic dysplasia: an overview of a rare genetic disorder. *An Obstetrics and Gynecology International Journal*, 18 (3), 67-70.
- Oladimeji, P. O., Bakke, J., Wright, W. C., & Chen, T. (2020). KANSL2 and MBNL3 are regulators of pancreatic ductal adenocarcinoma invasion. *Sci Rep*, 10(1), 1485. doi:10.1038/s41598-020-58448-y
- Parker, K. L., & Schimmer, B. P. (2006). CHAPTER 8 - Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 313-336). St Louis: Academic Press.
- Peng, J., Hou, Y., Wu, S., Li, Z., & Wu, Z. (2023). Knockout of Rlim Results in a Sex Ratio Shift toward Males but Superovulation Cannot Compensate for the Reduced Litter Size. *Animals (Basel)*, 13(6). doi:10.3390/ani13061079
- Pitzer, L. M., Moroney, M. R., Nokoff, N. J., & Sikora, M. J. (2021). WNT4 Balances Development vs Disease in Gynecologic Tissues and Women's Health. *Endocrinology*, 162(7). doi:10.1210/endo/bqab093
- Ragitha, T. S., Sunish, K. S., Gilvaz, S., Daniel, S., Varghese, P. R., Raj, S., . . . Suresh Kumar, R. (2023). Mutation analysis of WNT4 gene in SRY negative 46,XX DSD patients with Mullerian agenesis and/or gonadal dysgenesis- An Indian study. *Gene*, 861, 147236. doi:10.1016/j.gene.2023.147236
- Rey, R. A., & Josso, N. (2016). Chapter 119 - Diagnosis and Treatment of Disorders of Sexual Development*. In J. L. Jameson, L. J. De Groot, D. M. de Kretser, L. C. Giudice, A. B. Grossman, S. Melmed, J. T. Potts, & G. C. Weir (Eds.), *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)* (pp. 2086-2118.e2085). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Rockich, B. E., Hrycaj, S. M., Shih, H. P., Nagy, M. S., Ferguson, M. A. H., Kopp, J. L., . . . Spence, J. R. (2013). Sox9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), E4456-E4464. doi:doi:10.1073/pnas.1311847110
- Schluth-Bolard, C., Ottaviani, A., Gilson, E., & Magdinier, F. (2011). Chapter 6 - Chromosomal Position Effects and Gene Variegation: Impact in Pathologies. In T. Tollefsbol (Ed.), *Handbook of Epigenetics* (pp. 77-105). San Diego: Academic Press.
- Sun, X., Diao, X., Zhu, X., Yin, X., & Cheng, G. (2021). Nanog-mediated stem cell properties are critical for MBNL3-associated paclitaxel resistance of ovarian cancer. *J Biochem*, 169(6), 747-756. doi:10.1093/jb/mvab021
- Wang, F., Gervasi, M. G., Boskovic, A., Sun, F., Rinaldi, V. D., Yu, J., . . . Bach, I. (2021). Deficient spermiogenesis in mice lacking Rlim. *Elife*, 10. doi:10.7554/eLife.63556
- Yang, T. L., Guo, Y., Li, J., Zhang, L., Shen, H., Li, S. M., . . . Deng, H. W. (2013). Gene-gene interaction between RBMS3 and ZNF516 influences bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 28(4), 828-837. doi:10.1002/jbmr.1788
- Yu, Z., Wang, G., Zhang, C., Liu, Y., Chen, W., Wang, H., & Liu, H. (2020). LncRNA SBF2-AS1 affects the radiosensitivity of non-small cell lung cancer via modulating microRNA-302a/MBNL3 axis. *Cell Cycle*, 19(3), 300-316. doi:10.1080/15384101.2019.1708016
- Yuan, J. H., Liu, X. N., Wang, T. T., Pan, W., Tao, Q. F., Zhou, W. P., . . . Sun, S. H. (2017). The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1. *Nat Cell Biol*, 19(7), 820-832. doi:10.1038/ncb3538
- Zhang, K., Lv, Q., Li, L., Jiang, M., & Fang, F. (2021). Discovering the Role of FZD4 Gene in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Indian J Dermatol*, 66(5), 484-489. doi:10.4103/ijd.ijd_1147_20
- Zhou, J., Liu, T., Xu, H., Wang, Y., Yang, T., & Liu, L. (2022). LncRNA FIRRE promotes the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of PXN through interacting with MBNL3. *Biochem Biophys Res Commun*, 625, 188-195. doi:10.1016/j.bbrc.2022.07.099
- Zhou, J. G., Hua, Y., Liu, S. W., Hu, W. Q., Qian, R., & Xiong, L. (2020). MicroRNA-1286 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells to promote the progression of osteoporosis via regulating FZD4 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(1), 1-10. doi:10.26355/eurrev_202001_19889
- Zhou, X., Jiang, J., & Guo, S. (2021). Hsa_circ_0004712 downregulation attenuates ovarian cancer malignant development by targeting the miR-331-3p/FZD4 pathway. *J Ovarian Res*, 14(1), 118. doi:10.1186/s13048-021-00859-0