Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2022;56(3):449-465*/doi: 10.5578/mb.20229706

Geliş Tarihi (Received): 03.03.2022 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.06.2022

Cryptosporidium ile Enfekte Edilmiş İleoçekal Adenokarsinom Hücrelerindeki miRNA Ekspresyon Profili

miRNA Expression Profile in Ileocecal Adenocarcinoma Cells Infected with *Cryptosporidium*

Özlem ULUSAN BAĞCI[1,2](ID), Ayşe CANER[2,3](ID)

[1] Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.
[1] *Katip Celebi University, Ataturk Training and Research Hospital, Laboratory of Microbiology, İzmir,* Türkiye.

[2] Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir.
[2] *Ege University Institute of Health Sciences, Department of Basic Oncology, İzmir,* Türkiye.

[3] Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.
[3] *Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, İzmir,* Türkiye.

**Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırma Koordinatörlüğü tarafından desteklenen proje kapsamında gerçekleştirilmiştir (Proje No: TGA-2019-2102).*

Makale Atıfı: *Ulusan Bağcı Ö, Caner A. Cryptosporidium ile enfekte edilmiş ileoçekal adenokarsinom hücrelerindeki miRNA ekspresyon profili. Mikrobiyol Bul 2022;56(3):449-465.*

ÖZ

Cryptosporidium spp. ookistleri aracılığıyla fekal oral yolla bulaşan fırsatçı bir protozoondur. Hücre içi yerleşimi ve otoenfeksiyon yapabilme özelliği sayesinde özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ağır seyreden enfeksiyon tablosuna neden olabilmektedir. MikroRNA (miRNA)'lar çoğalma, farklılaşma, apoptoz, immün yanıt gibi önemli biyolojik fonksiyonlarda rol alan genlerin ekspresyonlarını düzenleyen yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, translasyona uğramayan endojen RNA moleküleridir. Son çalışmalarda, enfeksiyon hastalıklarında miRNA'ların hastalığın patogenezindeki rolleri ve biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada *Cryptosporidium* spp. ile enfekte insan ileoçekal adenokarsinom hücrelerinde (HCT-8), enfeksiyonun 24. saatindeki miRNA profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada HCT-8 hücre hattı, insan dışkı örneklerinden izole edilen *Cryptosporidium* spp. ookistleriyle enfekte edilmiş ve 24 saat sonra bu hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu işlemin ardından cDNA sentezi gerçekleştirilerek, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak 95 adet insan miRNA'sının ekspresyon düzeyi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar *Cryptosporidium* spp. ile enfekte edilmemiş hücre hatları ile karşılaştırılarak ekspresyon kat seviyeleri (fold change) belirlenmiştir. MiRNA'ların dizi bilgileri ve hedef genleri TargetScanHuman7.1 ve miRDB web siteleri aracılığıyla; hedef genlere ait gen ontoloji (GO) yolak analizleri mirPath v.3 programı ile belirlenmiştir. Araştırılan miRNA'ların 10 tanesinin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre daha yüksek, 11 tanesinin ise daha düşük bulunmuştur. Ekspresyonunda farklılık saptanan bu 21 miRNA'nın başlıca apoptoz, mitotik hücre döngüsü ve immün yanıt ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Hsa-miR-612, hsa-miR-6763-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-4787-3p, hsa-miR-548ab, hsa-miR-3714 ve hsa-

İletişim (Correspondence): *Doç. Dr. Ayşe Caner, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (232) 311 10 10,* ***E-posta (E-mail):*** *ayse.caner@ege.edu.tr*

miR-4803'lerin apoptozla; hsa-miR-612, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-548ab ve hsa-miR4803'lerin mitotik hücre döngüsü ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Proliferasyon ve apoptoz dengesi, enfeksiyon ve kanser gelişiminde oldukça önemli bir unsurdur. MiRNA'ların proliferasyon-apoptoz dengesine etkisinin belirlenmesinin, enfeksiyonların etiyopatogenezi ve prognozu ile ilişkili bilgiler sağlayacağı ve mikroorganizmaların kanserogenezdeki kapasitelerinin belirlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada, ekspresyonu değişen miRNA'ların 12 tanesinin immün yanıtla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu durum, enfeksiyonlardan korunma ve tedavide miRNA'ların rolünü vurgulayabilir. MiRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların giderek artması sonucu enfeksiyon mekanizmasındaki rollerinin belirlenmesi ile miRNA'ların enfeksiyonların tanı, tedavi ve korunmasında kullanılabileceklerini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium; miRNA; HCT-8 hücre; apoptoz; bağışıklık.*

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. is an opportunistic protozoan transmitted by fecal-oral route via oocysts. The agent may cause severe infection especially in individuals with suppressed immune system, due to its intracellular location and ability to cause auto-infection. MicroRNAs (miRNAs) are non-translated endogenous RNA molecules with an average of 22 nucleotides in length that regulate the expression of genes involved in important biological functions such as proliferation, differentiation, apoptosis and immune response. Recent studies have focused on the role of miRNAs in pathogenesis of infectious diseases and their potential to be used as biomarkers. The aim of this study was to determine the miRNA profile of human ileocecal adenocarcinoma (HCT-8) cells at 24 hours of infection with *Cryptosporidium* spp. In the study, the HCT-8 cell line was infected with *Cryptosporidium* spp. that were isolated from infected human stool samples and RNA was isolated from the cells 24 hours after infection. After this process, cDNA synthesis was performed and the expression of 95 human miRNA profiles were investigated by polymerase chain reaction (PCR) method. Fold changes of expression were determined by comparison with *Cryptosporidium* spp. uninfected cell lines. Sequence information of miRNAs and their target genes were performed via TargetScanHuman7.1 and miRDB websites, while gene ontology (GO) pathways of target genes were analyzed with the mirPath v.3 program. It was detected that the expression of 10 miRNAs were upregulated and 11 of them were downregulated compared with the control group. It was observed that, this 21 differentially expressed miRNAs were mainly associated with apoptosis, mitotic cell cycle, and immune response. Hsa-miR-612, hsa-miR-6763-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-let-7e-5p hsa-let-7b-3p, hsa-miR-4787-3p, hsa-miR-548ab, hsa-miR-3714 and hsa-miR-4803 were found to be associated with apoptosis; and hsa-miR-612, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-548ab, and hsa-miR4803 were found to be associated with mitotic cell cycle. The balance of proliferation and apoptosis is very significant in the development of infection and cancer. It is thought that determination of the effect of miRNAs on proliferation-apoptosis balance could provide information related to the etiopathogenesis and prognosis of infections, and on the role of microorganisms in carcinogenesis. In this study, 12 differentially expressed miRNAs were found to be associated with immune response. This may emphasize the role of miRNAs in the prevention and treatment of infections. It was concluded that, miRNAs could be used in the diagnosis, treatment and prevention of infections with the determination of miRNA's role in the infection mechanism as a result of the increasing number of studies.

Keywords: *Cryptosporidium; miRNA; HCT-8 cell; apoptosis; immunity.*

GİRİŞ

Cryptosporidium spp. kontamine su ve gıdalarda bulunan ookistler aracılığıyla bulaşan ve bağırsaklar başta olmak üzere akciğerler, pankreas, safra kesesi gibi birçok organı enfekte edebilen fırsatçı bir paraziter etkendir[1]. Epitel hücrelerinde hücre içi fakat ekstrasitoplazmik yerleşimli parazitofor vakuoller içerisinde vücudun bağışıklık mekanizmalarından korunarak yaşamlarını uzun süre devam ettirebilirler. Yaşam döngüsünün sonunda ortaya çıkan ince duvarlı ookistler otoenfeksiyona neden olurken, kalın duvarlı ookistler

çevrede uzun süre bulaştırıcı olarak kalırlar[2]. *Cryptosporidium* spp. çevrede yaygın olarak bulunur, az sayıda ookist (10-100) bulaş için yeterlidir. Ookistler çevresel yaşam koşullarına oldukça dayanıklıdır, su ve toprakta uygun nem ve sıcaklıkta aylarca canlı kalabilirler. Küçük boyutları nedeniyle havada ve suda uzun mesafeler boyunca taşınabilirler[3]. *Cryptosporidium* spp.'nin zoonotik veya antroponotik olmak üzere yaklaşık 22 türü bulunmaktadır. Etkenin zoonotik türü olan *Cryptosporidium parvum*, hem insanları hem hayvanları enfekte ederken; antroponotik tür *Cryptosporidium hominis* sadece insanların patojenidir[4].

Tüm dünyada *Cryptosporidium* spp.'nin etken olduğu su kaynaklı salgınlar bildirilmiştir. Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (Center for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından bu nedenle kategori B patojen listesine alınmıştır[5]. İçme sularında, yüzme havuzu veya göllerde bulunan ookistler, klorlamaya dirençlidir; sterilizasyon için koagülasyon, filtrasyon, sedimentasyon gibi kimyasal yöntemler kullanılmalıdır[6,7].

MikroRNA (miRNA)'lar çoğalma, farklılaşma, apoptoz, immün yanıt gibi önemli biyolojik işlevlerde rol alan genlerin posttranskripsiyonel ekspresyonlarını düzenleyen, endojen, translasyona uğramayan, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda küçük RNA moleküllerdir[8]. Gen ekspresyonunun negatif düzenleyicileri olan miRNA'ların hücrenin kaderini belirleme ve değiştirme potansiyelleri bulunmaktadır. Memeli hücrelerinde bulunan miRNA'ların ise konakların bakteriyel, viral, paraziter enfeksiyonlara yanıtında önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Bir miRNA'nın aynı anda birden çok biyolojik fonksiyonu olabildiği gibi, tek bir biyolojik fonksiyon da birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilmektedir[9]. MiRNA'ların keşfedilmesinden yaklaşık 10 yıl sonra, miRNA'ların hastalık biyobelirteci olarak kullanılma potansiyeli araştırılmaya başlanmış ve kanser, diyabet, Alzheimer gibi hastalıklarda miRNA'ların rolünü araştıran çalışmalar yapılmıştır. Son zamanlarda, dolaşımdaki miRNA'ların enfeksiyonların tanısında biyobelirteç olabilme potansiyelini araştıran çalışmalar üzerinde yoğunlaşılmaktadır. HIV, tüberküloz, sıtma ve Ebola virüsü enfeksiyonunda miRNA profilinin araştırıldığı çalışmaların yanı sıra, güncel olarak yaşadığımız SARS-CoV-2 pandemisinde ayırıcı tanıda kullanılabilecek miRNA'ların araştırıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur[10].

Apicomplexa takımındaki paraziter enfeksiyonlara karşı konağın miRNA yanıtını araştıran çalışmalar giderek artmaktadır[11]. *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile ilgili çalışmalarda, miRNA'ların etki mekanizmaları ve ekspresyon düzeylerinin enfeksiyon şiddeti ile olan ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır[11,12]. Genel olarak konak-mikroorganizma etkileşimlerinde miRNA'lar hem parazitin patojenitesini etkileyerek hem de konak savunma mekanizmalarını düzenleyerek önemli roller üstlenmektedir. Bunun yanında *Cryptosporidium* spp.'nin en çok enfekte ettiği bağırsak epitelindeki miRNA profilinin araştırıldığı çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu çalışmada *Cryptosporidium* spp. ile in vitro olarak enfekte edilen bağırsak epitel hücre hattında, enfeksiyonun 24. saatindeki miRNA profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 31/10/2019 ve Karar No:19.10.2T/30).

Hücre Kültürü

İnsan ileoçekal adenokarsinom (HCT-8) hücrelerinin, %10 fetal sığır serumu, 4 µmol/L L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin (Sigma Aldrich, ABD) ile takviye edilmiş RPMI 1640 besiyeri (Sigma) ile kültürü gerçekleştirildi. Hücreler konfluent hale gelinceye kadar T-75 (75 cm2) doku flaskında %5 CO2'de nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Enfeksiyondan bir gün önce besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler bir kez fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve 37°C'de % 0.25 Tripsin-EDTA ile beş dakika muamele edildikten sonra toplandı. Besiyeri ortamında yeniden süspanse edildi. Daha sonra HCT-8 hücreleri 1 x 10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğunda olmak üzere altı kuyucuklu plaklara ekildi. Hücrelerin, inkübatör içinde %5 CO_2 ile 37°C'de 24 saat büyümesine izin verildi[13].

Parazit Enfeksiyonu

Cryptosporidium ookistleri, enfekte insan dışkılarından Petry ve arkadaşlarının[14] tarif ettiği yöntemin modifikasyonu ile izole edildi. Dışkılar bir metal elekten geçirildi ve 10 ml su içerisinde yeniden süspanse edildi. Oda sıcaklığında 1600 xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Çökelti, 4 ml PBS ile yeniden süspanse edilerek Ficoll gradiyent yöntemi ile ookistler izole edildi. Daha sonra ookistler iki kere PBS ile yıkandıktan (1600 xg, 5 dakika) sonra %10 sodyum hipoklorit çözeltisinde 4°C'de 10 dakika inkübe edilerek yüzeyleri sterilize edildi. Ardından ookistler soğuk steril PBS ile üç kez yıkandı, hemositometri ile sayıları belirlendi ve saflıkları kontrol edildi. Daha sonra 30 dakika boyunca 37°C'de %1 tripsin içinde inkübasyon ile ekskistasyon gerçekleştirildi. Devamında 1000 xg'de dört dakika santrifüjlendi ve RPMI besiyeri içinde süspanse edildi[14,15]. Monolayer HCT-8 hücreleri, %70 konfluente ulaştıktan sonra *Cryptosporidium* ile enfekte edildi. Her kuyucuğa 200 µl RPMI besiyeri içinde 5x10^5 sporozoit eklendi (yaklaşık 1.2 x 10^5 ookiste eşdeğer) ve 24 saat inkübe edildi[16,17]. Enfeksiyonun kontrolü için, kuyucuk içine yerleştirilmiş bir lamel inkübasyondan sonra PBS ile yıkanarak metanol ile sabitlendi. Devamında hematoksilen eozinle boyandıktan sonra lam üzerine yerleştirilerek mikroskop ile değerlendirildi.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için 200 mg dışkı örneği seramik boncuklu tüplere eklendi ve Magna Lyser ile 5000 x rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Daha sonra dışkı izolasyon kiti (Norgen Biotek Corp., ABD) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak DNA izole edildi ve PCR testine kadar -80°C'de saklandı. DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak A260/A280 absorbans ile değerlendirildi.

RNA İzolasyonu

Enfeksiyondan 24 saat sonra, besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler üç kez PBS ile yıkandı ve her bir kuyucuğa 1 ml Trizol çözeltisi (Invitrogen, ABD) ilave edildi. *Cryptosporidium* ile enfekte olan üç kuyucuk ile enfekte olmayan üç kuyucukta yer alan monolayer hücreler tüp içerisine alındıktan sonra 200 µl kloroform eklendi. Beş dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12000 rpm ve 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst fazdan 500 µl alınarak üzerine 500 µl isopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 12000 rpm ve 4°C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. RNA pellet üzerine 1 ml %75 etanol eklenip, 7500 xg ve 4°C'de beş dakika santrifüj sonrası etanol uzaklaştırıldı. Üzerine 50 µl "Rnase-free" su eklendi. RNA'nın konsantrasyonu ve kalitesi NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ölçüldü[18].

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR), LightCycler® 480 cihazında (Roche, Almanya) "SYBR Green" enzim karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'ye ait spesifik DNA, "*Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)" geni hedeflenerek araştırıldı. Rt-PCR sırasında dışkı kaynaklı inhibisyonu saf dışı bırakmak için, reaksiyon seyreltilmiş bir pozitif kontrol ile test edildi. PCR, 0.4 µM forward (CAA ATT GAT ACC GTT TGT CCT TCT) ve reverse (GGC ATG TCG ATT CTA ATT CAG CT) primerler, 2 x SYBR Green I Master (LightCycler, Roche) ve 5 µl DNA kullanılarak 25 µl'lik bir son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon 95°C'de 10 dakikalık ön inkübasyon ve 40 döngü için 95°C'de 10 saniye denatürasyon aşaması, 60°C'de 10 saniye primer birleşmesi ve 72°C'de 20 saniye uzama olarak programlandı. Tüm döngüler bittiğinde, erime eğrisi analizi yapıldı[19].

MiRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için, total RNA'dan cDNA sentezi miScript II RT kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon için 5x miScript Hiflex çözeltisi ve 1 µg RNA eklenerek 20 µl'lik bir son hacim elde edildi. Karışım, 37°C'de 60 dakika, ardından 95°C'de beş dakika inkübe edildi. Daha sonra, özgül primerler, endojen referans genler (SNORD96A, U6, B-ACTIN ve GAPDH) ve SYBR Green master enzim kiti (myScript SYBR Green PCR kiti, Qiagen) ile PCR uygulandı. Çalışmada 95 insan miRNA profili araştırıldı (Tablo I). Reaksiyon 95°C'de 10 dakika, ardından 40 döngü 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 15 saniye ve son uzama 72°C'de 10 saniye olacak şekilde programlanarak gerçek zamanlı PCR cihazında gerçekleştirildi. Tüm döngüler bittiğinde, erime eğrisi analizi yapıldı. miRNA ekspresyon seviyeleri, referans genlere göre normalize edildi. Sonuçlarda 2-ΔΔCt yöntemi kullanılarak ekspresyon kat seviyeleri (fold change) belirlendi. Ortalama ve standart sapma (M ± SD), üç bağımsız biyolojik denemeden sonra hesaplandı[20].

MiRNA'ların Dizi Bilgileri ve Yolak Analizleri

miRNA'ların dizi bilgileri ve hedef genleri TargetScanHuman7.1 (http://www.targetscan.or g/vert_71/) ve miRDB (http://www.mirdb.org/cgi-bin/ search.cgi) web siteleri kullanılarak araştırıldı[21,22]. Ekspresyon seviyesinde farklılık saptanan miRNA'ların hedef genlerine ait GO yolak analizleri mirPath v.3 programı kullanılarak yapıldı[23].

Tablo I. *Çalışmamızda Cryprosporidium spp. ile Enfekte ve Enfekte Olmayan HCT-8 Hücre Hatlarında Ekspresyonu Araştırılan miRNA'lar*

hsa-miR-612	hsa-miR-6891-3p	hsa-miR-370-3p	hsa-miR-29b-2-5p	hsa-miR-3617-3p
hsa-miR-6763-5p	hsa-miR-4803	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-549a	hsa-miR-663a
hsa-miR-5580-3p	hsa-let-7g-5p	hsa-miR-4674	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-7641
hsa-let-7b-3p	hsa-miR-4473	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-4753-3p	hsa-miR-7110-5p
hsa-miR-188-5p	hsa-miR-340-3p	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-101-3p
hsa-miR-664b-3p	hsa-miR-548aa	hsa-miR-548i	hsa-miR-4419b	hsa-miR-1587
hsa-miR-4787-3p	hsa-miR-6816-5p	hsa-miR-4432	hsa-miR-210-5p	hsa-miR-34a-3p
hsa-miR-7114-5p	hsa-miR-4638-5p	hsa-miR-3679-3p	hsa-miR-3692-5p	hsa-miR-1973
hsa-miR-1281	hsa-miR-373-3p	hsa-let-7i-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-4733-3p
hsa-miR-210-3p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-1	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-1307-3p
hsa-miR-548ab	hsa-miR-4770	hsa-miR-6124	hsa-miR-1306-5p	hsa-miR-629-3p
hsa-miR-6729-3p	hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-762	hsa-miR-4707-5p
hsa-miR-3714	hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-1273g-3p	hsa-miR-4750-5p	hsa-miR-4640-3p
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-877-5p	hsa-miR-4534	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-664a-3p
hsa-miR-7111-5p	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-7847-3p	hsa-miR-222-5p
hsa-miR-6886-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-5089-3p	hsa-miR-4717-3p	hsa-miR-324-3p
hsa-miR-6766-3p	hsa-miR-744-5p	hsa-miR-4530	hsa-miR-5011-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-1275	hsa-miR-503-5p	hsa-miR-6085	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-5006-3p
hsa-miR-4481	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-4493	hsa-miR-346	hsa-miR-6727-3p

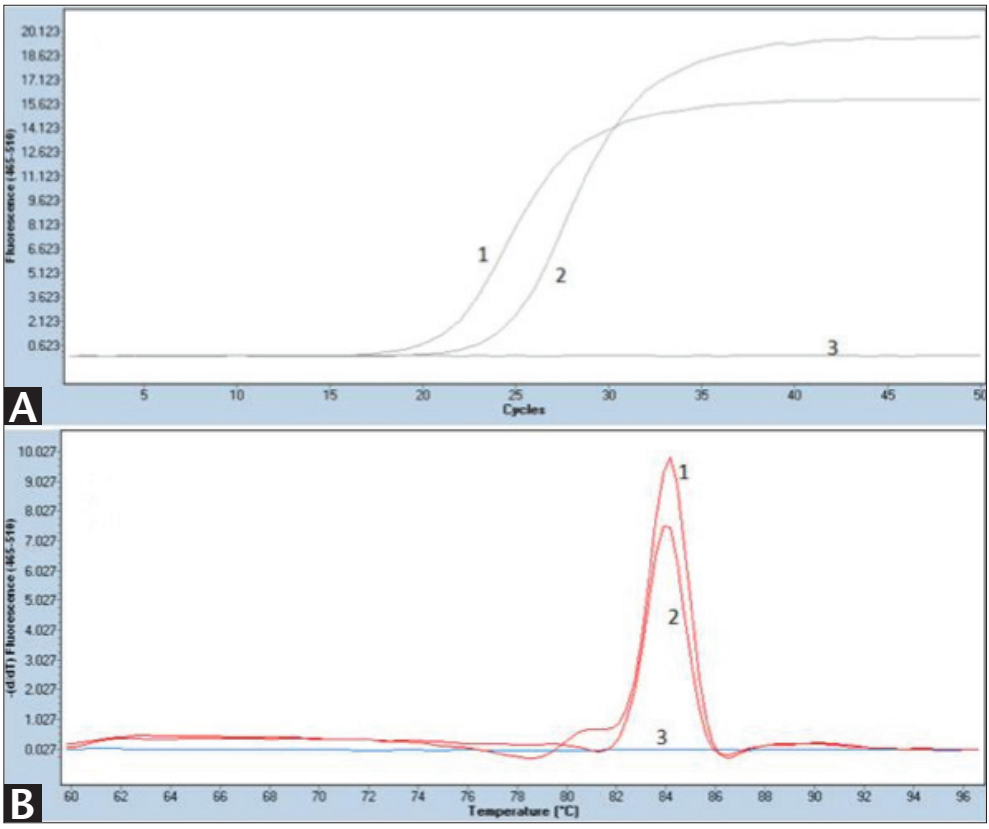
İstastiksel Analiz

Çalışmadaki bütün istatistiksel analizler için Prism programı kullanıldı (GraphPad Software Inc., ABD). İki grup arasındaki ortalamanın standart hata değeri (SEM) ve ortalama için Student's t test, ikiden fazla gruplar için ANOVA testleri kullanıldı. ANOVA testindeki anlamlı seviyedeki değişiklikler Tukey veya Bonferroni posttest ile değerlendirildi. Enfeksiyon ve kontrol grubu arasındaki farklarda p değeri ≤ 0.05 olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. ookistleri insan dışkı örneklerinden elde edilmiştir. Öncelikle dışkı örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra PCR ile *Cryptosporidium* için özgül primer kullanılarak enfeksiyonun varlığı moleküler olarak kanıtlanmıştır. *Cryptosporidium* spp. açısından pozitif saptanan dışkı örneklerinden birine ait PCR analizi sonucu Şekil 1'de gösterilmiştir.

Pozitif dışkı örneklerinden izole edilen ookistlerle bir havuz oluşturulmuştur. Daha sonra ookistlerden ekskiste edilen *Cryptosporidium* spp. sporozoitleri ile HCT-8 hücre hattı enfekte edilmiştir. *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun miRNA profili üzerinde oluşturduğu değişiklikler 95 insan miRNA primeri kullanılarak araştırılmıştır (Tablo I). *Cryptosporidium*

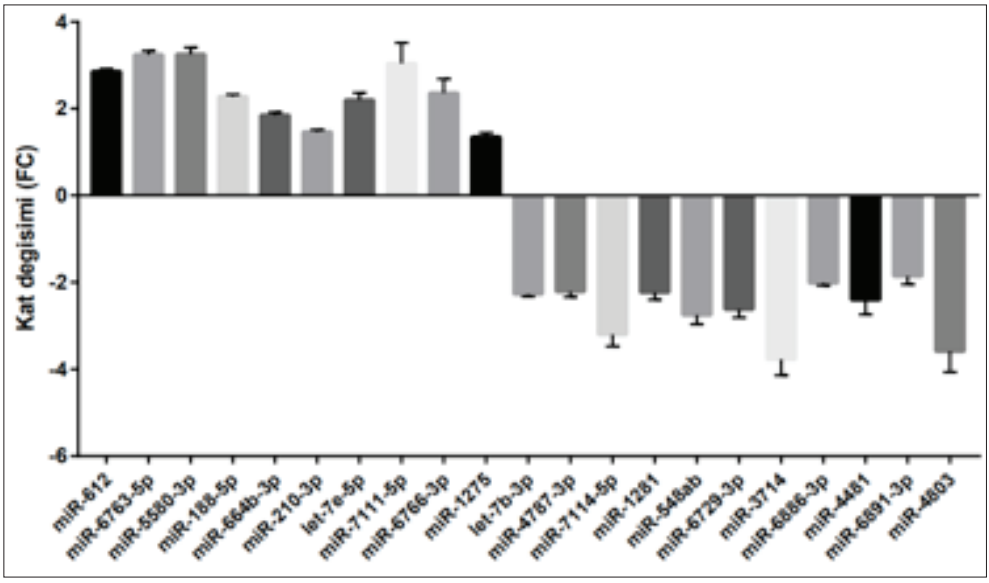


Şekil 1. *Crytosporidium spp. pozitif insan dışkı örneğinin* ***A.*** *amplifikasyon eğrisi,* ***B.*** *erime eğrisi analizi (1. Pozitif kontrol, 2. Pozitif insan dışkı örneği, 3. Negatif kontrol).*

ile enfekte olmuş ve enfekte edilmemiş HCT-8 hücrelerinde eksprese olan miRNA'lar Rt-PCR ile incelenmiştir.

Toplamda 21 miRNA'nın, enfekte HCT-8 hücrelerinde, enfekte olmayan hücrelere kıyasla farklı seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan 10 miRNA'nın ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek (FC: +), 11 miRNA'nın daha düşük olduğu (FC: -) saptanmıştır. İstatiksel olarak anlamlı seviyede farklı eksprese edilen miRNA'lar Grafik 1'de gösterilmiştir.

Farklı seviyede eksprese olan miRNA'ların dizi bilgileri ve hedef genleri TargetScanHuman7.1 ve miRDB web siteleri kullanılarak araştırılmış , bu genler ile ilgili detaylı bilgiler Tablo II'de verilmiştir. Ayrıca ekspresyonunda farklılık saptanan miRNA'ların fonksiyonlarını daha iyi anlamak için hedef genlere ait GO yolak analizleri mirPath v.3 programı kullanılarak yapılmıştır. GO özgül fonksiyonları başlıca biyolojik fonksiyonlar (gen ekspresyonu, apoptoz, transkripsiyon, mitotik siklus, post-translasyonel modifikasyon, TLR sinyal yolakları), hücre bileşenleri (organel, golgi, sitozol, nükleus, membran, lizozom) ve



Grafik 1. *Enfekte HCT-8 hücrelerde miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi.*

metabolik fonksiyonları (iyon bağlanması, katabolizma, biyosentez, ilaç metabolizması) içermektedir. Kontrol grubuna göre ekspresyonu artan miRNA'ların GO yolak analizleri ($p< 0.05$) Tablo III'te, ekspresyonları azalan miRNA'ların analizleri Tablo IV'te verilmiştir.

TARTIŞMA

MiRNA'lar posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu düzenleyerek hücrelerdeki biyolojik fonksiyonları etkileyen ve böylece hastalıkların patogenezinde ve progresyonunda etkisi olan kısa nükleotit dizileridir[24]. Şimdiye kadar non-enfeksiyöz veya enfeksiyoz hastalıkların etiyopatogenezinde miRNA'ların rolünü araştıran çalışmalar yapılmış ve enfeksiyöz hastalıkların etiyopatogenezinde ve klinik seyrinde miRNA'ların rolü olduğu gösterilmiştir. Apicomplexa takımındaki paraziter enfeksiyonlara karşı konağın miRNA yanıtının araştırıldığı çalışmalarda, *C.parvum* enfeksiyonunda miRNA'ların TLR-4 ve NF-κB yolakları üzerinden etki gösterdiği saptanmıştır[11]. Zhou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada[12] *Cryptosporidium* spp.'nin kolanjiyositler üzerine etkisini araştırmış, NF-κB p65 aracılığıyla mir-125b-1, mir-21, mir-30b, and mir-23b-27b-24-1 ekspresyon düzeylerinde artış olduğunu saptamıştır. NF-κB p65 alt ünite aracılı miRNA'ların upregülasyonunun epitel hücrelerinin antimikrobiyal yanıtında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada *C.parvum* ile enfekte biliyer epitel hücrelerde let-7i'deki azalmanın SIRT-1 protein miktarında artışa neden olduğu ve SIRT artışının NF-κB aracılı epitelyal doğal immün yanıtın düzenlenmesinde rolü olduğu saptanmıştır[25]. *Crytosporidium* spp. ile enfekte safra epitel hücrelerinde miRNA'ların ekspresyonunu araştıran çalışmaların çokluğuna rağmen, *Cryptosporidium* spp.'nin en fazla enfekte ettiği organ olan bağırsaklarda miRNA profilinin araştırıldığı sadece bir çalışma bulunmaktadır. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada[16] *C.parvum* ile in vitro enfekte edilen HCT-8 hücrelerinde enfeksiyondan

Tablo II. Anlamlı Seviyede Farklı Eksprese Edilen miRNA'ların Detaylı Özellikleri

hsa-miRNA isimleri	p	FC	CL	Sekans	İlişkili genler
miR-612	0.0016	+2.818	Chr 11	GCU GGG CAG GGC UUC UGA GCU CCU U	AHI1, BTRC, TMEM41B, DAB2IP, FMO5, SIKE1, SAR1A, SEC63, YTHDF1, ARRDC3
miR-6763-5p	0.0019	+3.205	Chr 12	CUG GGG AGU GGC UGG GGA G	CSNK1A1, ELK1, VAT1, FKBP10, SLC16A2, SVIL, HECTD3, CSNK1A1L, RD3, PA2G4
miR-5580-3p	0.0033	+3.215	Chr 14	CAC AUA UGA AGU GAG CCA GCA C	PAX4, ZDHHC21, BTAF1, ANO4, TMEM108, DENR, RASSF8, COL11A1, APOOL, PDE10A
miR-188-5p	0.0079	+2.243	Chr X	CAU CCC UUG CAU GGU GGA GGG	ZNF281, SRSF7, FOXN2, ZFP91, TAPBP, PTEN, SLC22A3, DLG5, C6orf106, BCL9
miR-664b-3p	0.0128	+1.828	Chr X	UUC AUU UGC CUC CCA GCC UAC A	ETNK1, FNDC3A, MDGA2, NECTIN3, SLC10A2, NCKAP5, IQGAP2, CACNB4, MBOAT2, PAK3
miR-210-3p	0.0214	+1.429	Chr 11	CUG UGC GUG UGA CAG CGG CUG A	IGF2, GALR2, ISCU, KMT2D, AIFM3, NDUFA4, FGFRL1, MID1IP1, BDNF, RUNX3
let-7e-5p	0.0284	+2.173	Chr 19	UGA GGU AGG AGG UUG UAU AGU U	STARD13, HMGA2, IGDCC3, IGF2BP1, FIGNL2, PRTG, NR6A1, LIN28B, ARID3B, C14orf28
miR-7111-5p	0.0293	+3.106	Chr 6	UGG GGG AGG AAG GAC AGG CCA U	MECP2, PPP1R9B, WIZ, SLC6A17, NFIX, CASTOR2, NR1D1, SHISAL1, SRF, ELK1
miR-6766-3p	0.0319	+2.32	Chr 15	UGA UUG UCU UCC CCC ACC CUC A	GXYLT1, CLOCK, ZBTB18, LGALSL, CD164, NR2C2, SOX6, PCDH17, SLC16A7
miR-1275	0.0323	+1.316	Chr 6	GUG GGG GAG AGG CUG UC	GATAD2B, MECP2, PPP2R2D, NFIX, CBX6, CASTOR2, ACTB, ZSWIM4, SPRED3, SLC25A42
let-7b-3p	0.0057	-2.227	Chr 22	CUA UAC AAC CUA CUG CCU UCC C	ARID4B, PLAG1, TUT4, RICTOR, HMGXB4, EEA1, CCDC126, PPM1A, DCUN1D4, SOX9
miR-4787-3p	0.0139	-2.42	Chr 3	GAU GCG CCG CCC ACU GCC CCG CGC	HNF4A, COG3, PCBP2, PALM2, TNRC6C, KIDINS220, USP29, ARIH1, IMPAD1, XG
miR-7114-5p	0.0174	-3.158	Chr 9	UCU GUG GAG UGG GGU GCC UGU	ANO1, KIAA1210, IL21, COL1A2, SPPL3, PCDH9, STOX2, JAK1, ZFP36L1
miR-1281	0.0197	-2.17	Chr 22	UCG CCU CCU CCU CUC CC	ERO1A, LDB2, EPO, SLC49A3, PPIF, CXorf66, PDXP, GHRL, CCDC142, C22orf34
miR-548ab	0.0251	-2.743	Chr 3	AAA AGU AAU UGU GGA UUU UGC U	FAM135A, NFAT5, RORA, FIGN, ACAT2, ZDHHC21, STXBP5, IGF2BP3, NEGR1, CCNY
miR-6729-3p	0.0256	-2.575	Chr 1	UCA UCC CCC UCG CCC UCU CAG	ODF2L, LRRC66, SCAMP1, PLEKHS1, SRF, DLG3, PNPLA1, TCFL5, SIRT7, SFMBT1
miR-3714	0.0281	-3.753	Chr 3	GAA GGC AGC AGU GCU CCC CUG U	OSBPL3, TENM1, TFDP2, CD276, ACSL1, CASC4, PIK3C2A, BMP6, SLC50A1, PARP16
miR-6886-3p	0.0311	-1.973	Chr 19	UGC CCU UCU CUC CUC CUG CCU	CREB5, PTCHD1, ZBTB34, IGLON5, FAM84B, MMAB, C14orf28, PDP1, RBFOX3, ADM
miR-4481	0.0436	-2.359	Chr 10	GGA GUG GGC UGG UGG UU	GNG13, PHYHIP, AP1G1, GMEB1, NOVA1, GLUL, GRIK1, EZH1, ITGB1BP1, SCN3B
miR-6891-3p	0.0462	-1.82	Chr 6	CCC UCA UCU UCC CCU CCU UUC	ONECUT2, HIF1AN, RNF168, PTPRT, SEPT4, SMARCAD1, VDAC2, ATRNL1, VWC2, MICU1
miR-4803	0.0486	-3.544	Chr 5	UAA CAU AAU AGU GUG GAU UGA	ARL5A, CEP170, DENND5A, PLPPR5, MKX, ARAF, DOCK4, PRTG, PI15, GABRA4

FC: Ekspresyon kat seviyeleri (fold change), Chr: Kromozom, CL: Kromozom lokalizasyonu.

Tablo III. *Cryptosporidium parvum ile Enfekte HCT-8 Hücrelerinde Kontrol Grubuna göre Ekspresyonları Artan hsa-miRNA'ların GO Yolak Analizleri*

hsa- miRNA	GO Yolağı	İlişkili genler	p
miR-612	Mitotik hücre döngüsünde G2/M geçiş noktası	BTRC, FOXM1, UBA52, BIRC5, CEP192, PLCB1, CSNK1D, KDM8, CENPJ, CCP110	0.0012
	DNA hasarı yanıtı, hücre döngüsünde duraklama ile sonuçlanan p53 sinyal iletimi	UBA52, PSME4, PML, TP53, PSMA5, PIDD1	0.0086
	Mitotik hücre döngüsü	BTRC, FOXM1, UBA52, BIRC5, PSME4, CENPH, CEP192, CSNK1D, CENPJ, NUP155	0.0086
	Apoptoz sinyal yolağı	MCF2, DIDO1, ARHGEF12, UBA52, FASTK, ABR, FGD2	0.0478
	MHC-antijen ile T hücre aktivasyonu	ICAM1, ITGAL	0.0492
miR-6763-5p	Hücre ölümü	ESPL1, SEMA6A, CSNK2A2, CYFIP2, ATN1, YWHAE, DNAJB2, DYNLL1, ZFYVE26, RAF1	0.0041
	TLR1: TLR2 sinyal yolağı	TAB1, PPP2R5D,TIRAP, DUSP3, MAPK1, ELK1	0.0061
	TLR6: TLR2 sinyal yolağı	TAB1, PPP2R5D, TIRAP, DUSP3, MAPK1, ELK1	0.0061
	TLR2 sinyal yolağı	TAB1, PPP2R5D, TIRAP, DUSP3, MAPK1, ELK1	0.0290
	TLR10 sinyal yolağı	TAB1, PPP2R5D, DUSP3, MAPK1, ELK1	0.0359
miR-5580-3p	Biyosentez süreci	ST18, PRLR, ZEB2, HIPK2, DPH6, EPRS, ARGLU1, ELL2, MYLK4, ZNF738	8.9331E-06
	TGF-β'nın hücre dışı matrikte tutulması	FBN1, FBN2, LTBP1	0.0072
miR-188-5p	Fagositozda rol alan Fc-γ reseptör sinyal yolağı	BAIAP2, HSP90AA1, ARPC2, RAC1 SRC	0.0045
	İntrinsik apoptoz sinyal yolağı	DDX3X, TP53, PMAIP1, YWHAZ, XIAP	0.0160
	İmmün sistem süreci	OAS3, ITGB1, BAIAP2, AKIRIN2, AP2B1, HSP90AA1, DDX3X, HDAC4, MAVS, ITGAV	0.0177
	Doğal immün yanıt	BAIAP2, AKIRIN2, HSP90AA1, DDX3X, MAVS, AXL, CD46, ARPC2, NLRP1, RAC1	0.0427
miR-664b-3p	Biyosentez süreci	BMI1, CCNT2, PIK3C3, ESR1, CAMTA1, POU2F1, EAF1, PRLR, ZEB2, HIPK2	1.2367E-17
	Mitotik hücre döngüsü	CLASP2, TPR, PPP1CC, CEP78, KIF2A, LIN9, STAG2, STAG1, RAB1A, CDK6	0.0007
	Hücre ölümü	RTN4, SLK, TNFRSF11B, UBE2Z, PDCD4, TGFBR1, FEM1B, ROCK1, PPP1R9A, SH3KBP1	0.0053
	Sarkoplazmik retikulumda depolanan kalsiyum iyonunun sitozole geçişinin düzenlenmesi	CAMK2D, CALM1, CALM2, PDE4D, PLN, CLIC2, TRDN, AKAP6	0.0343

Tablo III. Cryptosporidium parvum ile Enfekte HCT-8 Hücrelerinde Kontrol Grubuna göre Ekspresyonları Artan hsa-miRNA'ların GO Yolak Analizleri (devamı)

hsa- miRNA	GO Yolağı	İlişkili genler	p
miR-210-3p	Biyosentez süreci	BMI1, CCNT2, PIK3C3, ESR1, CAMTA1, POU2F1, EAF1, PRLR, ZEB2, HIPK2	1.4292E-17
	Mitotik hücre döngüsü	CLASP2, TPR, PPP1CC, CEP78, KIF2A, LIN9, STAG2, STAG1, RAB1A, CDK6	0.0007
	Hücre ölümü	RTN4, SLK, TNFRSF11B, UBE2Z, PDCD4, TGFBR1, FEM1B, ROCK1, PPP1R9A, SH3KBP1	0.0060
	Sarkoplazmik retikulumda depolanan kalsiyum iyonunun sitozole geçişinin düzenlenmesi	CAMK2D, CALM1, CALM2, PDE4D, PLN, CLIC2, TRDN, AKAP6	0.0351
let-7e-5p	Biyosentez süreci	BMI1, CCNT2, PIK3C3, ESR1, CAMTA1, POU2F1, EAF1, PRLR, SFSWAP, ZEB2	6.6709E-25
	Hücre ölümü	RTN4, SLK, TNFRSF11B, DUSP22, UBE2Z, PDCD4, TGFBR1, FEM1B, ROCK1, PPP1R9A	3.2597E-05
	Mitotik hücre döngüsü	SMC1A, CLASP2, E2F2, TPR, PPP1CC, ARPP19, CEP78, KIF2A, LIN9, STAG2	5.4495E-05
	Sarkoplazmik retikulumda depolanan kalsiyum iyonunun sitozole geçişinin düzenlenmesi	CAMK2D, CALM1, CALM2, PDE4D, DMD, PLN, CLIC2, TRDN, AKAP6	0.0374
	İntrinsik apoptoz sinyal yolağı	HIPK2, BID, CUL2, DDX3X, TP53, APAF1, PMAIP1, CUL5, CASP3, MSH6	0.0457
miR-7111-5p	Protein bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi	SOX4, ATXN7L3, ATN1, HMGA1, NAB2, HIF3A, BCL9L, MNT, CRTC1, NOC2L	1.3664E-10
	TLR10 sinyal yolağı	MAP2K3, CREB1, JUN, UBE2N, DUSP7, MAPKAPK2, ELK1	0.0111
	TLR1: TLR2 sinyal yolağı		0.0141
	TLR6:TLR2 sinyal yolağı		0.0141
	TLR5 sinyal yolağı		0.0183
miR-6766-3p	Histon defosforilasyonu	EYA2, EYA1	0.0398
miR-1275	Biyosentez süreci	POLE3, E2F7, NFIX, ABLIM3, CEBPG, TCEB3, IRF4, ZNF32, MED13L, SSR1	3.4790E-06
	Simbiyotik yaşam şekilleri	B2M, CXADR, TCEB3, PACS1, VPS37D, HMGA1, RPL21, SLAMF1, IL2RB, CRTC1	0.0002

Hücre hatlarında ekspresyonu araştırılan miRNA'lar.

Tablo IV. *Cryptosporidium parvum ile Enfekte HCT-8 Hücrelerinde Kontrol Grubuna göre Ekspresyonu Azalan hsa-miRNA'ların GO Yolak Analizleri*

hsa-miRNA	GO Yolağı	İlişkili gen	p
let-7b-3p	Hücre ölümü	FZD5, TGFBR1, HNRNPA1, TTBK2, HIP1, SIX3, PAK2, ITCH, HMGB2, VAPA	0.0055
	Mitotik hücre döngüsü	CENPC, RNF2, CCNA2, NUP153, PAFAH1B1, CEP78, LIN9, CUL1, RAB2A, NUP160	0.0082
	TLR9 sinyal yolağı	PIK3C3, PELI1, ATF2, CREB1, NFKBIA, MEF2C, MAP2K4	0.0087
	TLR10 sinyal yolağı	PELI1, ATF2, CREB1, NFKBIA, MEF2C, MAP2K4	0.0140
	TLR1: TLR2 sinyal yolağı		0.0183
miR-4787-3p	Endonükleaz aktivitesi	PLD6, G3BP1, PPP1R8	0.0132
	Hücre ölümü	FZD5, BAX, DYNC1H1, GAN, EEF2, EIF4G1, MATR3	0.0132
	Nükleobaz içeren bileşiğin katabolik süreci	G3BP1, DYNC1H1, EFTUD2, EEF2, EIF4G1, PPP1R8, EIF3E	0.0132
	BAX kompleksi	BAX	0.0408
	Apoptopik DNA fragmantasyonunun pozitif regülasyonu		0.0408
	B hücre reseptörü apoptoz sinyal yolağı		0.0408
miR-7114-5p	Hücre dışı matriksinin düzenlenmesi	ELF3, LOXL2, JAM2, LAMC3, KIF9, COL1A2,CTSG, AGT	0.0412
miR-1281	Gen ekspresyonu	HNRNPF, HNRNPA0, SMG8, MED1, EIF5, HSPA8, POLR1A, PSMB5	0.0020
	Biyosentez süreci	MORF4L1, CCNL2, SOX11,TEP1, ST3GAL1, ZNF107, PANK3, PURB, MED1, EIF5	0.0242
miR-548ab	Biyosentez süreci	BMI1, CCNT2, ZNF503, ESR1, CAMTA1, POU2F1, PRLR, MPHOSPH8, LIG1, ZEB2	1.7033E-20
	Fc-ε reseptör sinyal yolağı	KL, NFKB1, AGO3, PPP3R1, CHUK, BCL10, AGO4, FGF20, MAP3K1, RICTOR	5.4140E-06
	Hücre ölümü	SLK, NFKB1, PPP1R9A, TTBK2, SLC33A1, DAB2, SBF2, BAX, SNX30, MTPAP	0.0015
	Mitotik hücre döngüsü	LIG1, WAPAL, CCNB1, RNF2, CCNA2, PSMC2, STAG2, WEE1, CENPQ, PRDM5	0.0030
	NIK/NF-κB sinyalinin pozitif regülasyonu	RC3H2, EIF2AK2, RC3H1, SASH1	0.0389

Tablo IV. Cryptosporidium parvum ile Enfekte HCT-8 Hücrelerinde Kontrol Grubuna göre Ekspresyonu Azalan hsa-miRNA'ların GO Yolak Analizleri (devamı)

hsa-miRNA	GO Yolağı	İlişkili gen	p
miR-6729-3p	Fc-ε reseptör sinyal yolağı	IRS2, PHLPP2, ERBB2, TAB3, PTPN11, UBE2N, ITPR2	0.0269
miR-3714	Biyosentez süreci	TRIB3, AK2, PRLR, NFIX, ARG2, CSNK2A2, MMS19, TGFBR1, TROVE2, PHF8	5.4007
	Fagositozda rol alan Fc-γ reseptör sinyal yolağı	ARPC5, WIPF2, CRK, WASF2, PLCG2, ELMO1, MYO10, NCKAP1, ITPR3	0.0003
	Hücre ölümü	PDK3, CSNK2A2, FZD5, TGFBR1, PSMD5, ROCK1, SORL1, TTBK2, APC, BAX	0.0007
	Apoptoz sinyal yolağı	SOS2,CAV1, DIDO1,BAX, SQSTM1, KALRN, ARHGEF2, CFLAR, SOS1, PLEKHG2	0.0234
	Sitozole kalsiyum iyonu geçişi	JPH3, SLC8A1, JPH1, ITPR3	0.0291
	İmmün sistem süreci	ARPC5, TRIB3, PRLR, WIPF2, FZD5, ITGB1, IL18BP, PSMD5, ROCK1, TENM1	0.0351
miR-6886-3p	Doymamış yağ asiti sentezi	TECR	3.1654E-06
miR-4481	TRP kanallarının inflamatuvar medyatör regülasyonu	BDKRB2, PLA2G4F, TRPV4, PLCB2	0.0132
miR-6891-3p	Kimyasal karsinogenez	CYP1B1	0.0214
miR-4803	TGF-β sinyal yolağı	TGFBR1, BMPR1B, INHBA, ZFYVE16, SMAD4, ACVR1C, PPP2CB, LTBP1, SMAD7, TNF	0.0207
miR-4803	PI3K-Akt sinyal yolağı	PRLR, FGF12, PPP2R5E, MET, ATF2, PPP2R2C, CREB5, CCND2, ITGB6, GNG12	0.0371
	Kanserdeki yolaklar	FGF12, FZD5, TGFBR1, MET, STK4, HHIP, ROCK2, GNG12, CDKN1B, GNAI3	0.0371

dört ve 12 saat sonra mikrodizileme yöntemiyle miRNA ekspresyonları araştırılmış; dört miRNA'nın ekspresyonunda artış ve 16 miRNA'nın ekspresyonunda azalma saptanmıştır. MiRNA'ların çoğunun ekspresyonunda farklılık bulunmamıştır. Ekspresyonunda anlamlı düzeyde farklılık saptanan miRNA'ların apoptoz, immün yanıt, esansiyel hücre bileşenleri ve metabolik fonksiyonlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yani konak-mikroorganizma etkileşimlerinde miRNA'lar hem etken patojenitesini etkileyerek hem de konak savunma mekanizmalarını düzenleyerek önemli roller üstlenmektedir.

Çalışmamız *Crytosporidium* spp. ile enfekte HCT-8 hücrelerinde enfeksiyonun 24. saatinde 95 adet miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin gerçek zamanlı PCR yöntemiyle değerlendirildiği ve enfeksiyondan 24 saat sonraki miRNA ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Toplam 21 adet miRNA'nın ekspresyon düzeyinde farklılık saptanmış olup; miRNA'ların 10 tanesinin ekspresyonunda artış, 11 tanesinin ekspresyonunda azalma görülmüştür. MiRNA'ların hedef genleri miRDB ve TargetScan programlarıyla araştırılmış ve hedef genlerin fonksiyonları GO analizleriyle incelenmiştir.

Apoptoz parazitin vücutta yayılmasını önleyen en önemli antiparaziter savunma mekanizmalarından biri olarak bilinmektedir. Ancak apoptoz sistemik bir immün yanıt olmayıp, enfekte eden türe bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bazı mikroorganizmalar apoptozu baskılayarak, bağışıklık mekanizmalarından etkilenmeden hücre içinde yaşamlarını uzun süre devam ettirebilmekte; bazılarında ise vücut buna imkan tanımadan enfekte hücreyi çeşitli mekanizmalarla apoptoza götürerek enfeksiyonu kısa sürede sınırlandırmaya çalışmaktadır[26,27]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, miRNA'ların apoptoz sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada GO yolak analizinde ekpresyonu artan miRNA'lardan hsa-miR-612, hsa-miR-6763-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-let-7e-5p ve ekspresyonu azalan miRNA'lardan hsa-let-7b-3p, hsa-miR-4787-3p, hsa-miR-548ab, hsa-miR-3714, ve hsa-miR-4803'ler apoptoz ile ilişkili bulunmuştur. MiRNA'lar ya doğrudan Ca++'un sarkoplazmik retikulumdan sitoplazmaya salınması, DNA fragmantasyonu, BAX kompleksi veya endonükleazlar gibi apoptoz yolağının önemli parametreleri aracılığıyla ya da TGF-β ve PI3K-Akt sinyal yolakları ile dolaylı olarak[28,29] apoptoz veya hücre ölümünü etkilemektedir (Tablo III, IV).

Kontrol grubuna göre ekspresyonunda farklılık saptanan mi-RNA'ların ortak fonksiyonlarından bir tanesi de mitotik hücre döngüsüdür. Ekspresyonu artan mi-RNA'lardan hsa-miR-612, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-let-7e-5p; ekspresyonu azalan miRNA'lardan hsa-let-7b-3p ve hsa-miR-548ab mitotik hücre döngüsünü doğrudan etkilemektedir. Ekspresyonu azalan hsa-miR4803 hücre çoğalması üzerine etkisini PI3K-Akt sinyal yolağı üzerinden dolaylı olarak göstermektedir[29]. Proliferasyon ve apoptoz dengesi, enfeksiyon ve kanser gelişiminde oldukça önemli bir unsurdur[30]. MiRNA'ların proliferasyon-apoptoz dengesindeki rollerinin daha iyi tanımlanabilmesi için bu alanda yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmakta olup, bu çalışmalardan elde edilecek verilerin enfeksiyon ve kanser etiyopatogenezi ve prognozuna faydalı bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

Parazitlerle mücadelenin diğer bir önemli komponenti de immün yanıttır. Bağışıklığı sağlam kişilerde kendiliğinden sınırlanabilen hafif bir ishal tablosuna, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise ölümle sonuçlanabilecek ağır bir kliniğe neden olan *Crytosporidium* spp. enfeksiyonunun şiddetinde konak bağışıklık sistemi oldukça önemlidir. Çalışmamızda bu durumla uyumlu olarak ekspresyonunda farklılık saptanan miRNA'lardan 12 tanesi (hsa-miR-612, hsa-miR-6763-5p, hsa-miR-5580-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-7111-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-4787-3p, hsa-miR-548ab, hsa-miR-6729-3p, hsa-miR-3714, hsa-miR-4481, hsa-miR-4803) immün savunma mekanizmaları ile ilişkili bulunmuştur. MiRNA'lar T hücrelerine antijen sunumunu artırarak (hsa-miR-612), TLR (Toll like receptor)'ler aracılığıyla[31] (hsa-miR-6763-5p, hsa-miR-7111-5p, hsa-let-7b-3p), TGF-β sinyal yolağı üzerinden[28] (hsa-miR-5580-3p, hsa-miR-4803), B hücre reseptörü repertuvarını şekillendirerek (hsa-miR-4787-3p), Fcε-Fcγ reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla[32,33] (hsa-miR-188-5p, hsa-miR-548ab, hsa-miR-6729-3p, hsa-miR-3714), NF-κB aracılığıyla[34] (hsa-miR-548ab) ve TRP kanalları ile enflamatuvar mediyatörlerin salınımını düzenleyerek[35] (miR-4481) doğrudan ya da dolaylı olarak bağışıklık mekanizmalarına etki etmektedir (Tablo III, IV). Daha önce safra kanalı epitelinde yapılan çalışmalara benzer olarak, çalışmamızda da miRNA'ların NF-κB aracılı bağışıklık mekanizmalarını düzenlediği saptanmıştır[11,12,25]. Kontrol grubuna göre farklı düzeyde eksprese olan miRNA'ların çoğunluğunun immün yanıtta rol alması, vücudu *Cryptosporidium* spp.'ye karşı korumada veya enfeksiyonun sınırlandırılmasında miRNA'ların oldukça önemli roller üstlenebileceğini göstermektedir. MiRNA'ların bu özellikleri açısından *Crytosporidium* spp. enfeksiyonunu önlemede veya tedavide faydalı olabileceklerini düşünmekteyiz. Ancak bunun için miRNA'ların hastalık ve sağlık durumlarındaki düzeylerini, hedeflediği genleri, biyolojik, metabolik ve hücresel fonksiyonlarını araştıran daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 31/10/2019 ve Karar No: 19.10.2T/30).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Laksemi DA, Suwanti LT, Mufasirin M, Suastika K, Sudarmaja M. Opportunistic Parasitic Infections in Patients with Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome: A Review. Vet World 2019; 13(4): 716-25. https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.716-725.
2. Wang P, Li S, Zou Y, Du ZC, Song DP, Wang P, et al. The Infection and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Diarrheic Pigs in Southern China. Microb Pathog 2022; 165: 105459. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105459.
3. Vanathy K, Parija SC, Mandal J, Hamide A, Krishnamurthy S. Cryptosporidiosis: A mini review. Trop Parasitol 2017; 7(2): 72-80. https://doi.org/10.4103/tp.TP_25_17.

4. Cacciò SM, Putignani L. Epidemiology of human Cryptosporidiosis, pp: 43-79. In: Cacciò SM, Widmer G (eds), *Cryptosporidium* Parasite and Disease. 2014. Springer, Vienna.
5. Tin D, Sabeti P, Ciottonea GR. Bioterrorism: An Analysis of Biological Agents Used in Terrorist Events. Am J Emerg Med 2022; 54: 117-121. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2022.01.056.
6. Sudradjat A, Sandhyana Angga M, Barlian K, Nastiti A. Assessing Log Reduction Values of Conventional Water Treatment Plants with Microbially Highly Polluted Raw Water Sources. J Eng Technol Sci 2022; 54(1): 220101. https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2022.54.1.1.
7. Fayer R. *Cryptosporidium*: A Water-borne Zoonotic Parasite. Vet Parasitol 2004; 126(1-2): 37-56.
8. Alkan AH, Akgül B. Endogenous miRNA Sponges, pp: 91-104. In: Allmer J, Yousef M (eds), miRNomics Methods in Molecular Biology. 2022. Humana, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_5
9. Kedde M, Agami R. Interplay Between microRNAs and RNA-binding Proteins Determines Developmental Processes. Cell Cycle 2008; 7(7): 899-903.
10. Tribolet L, Kerr E, Cowled C, Bean AGD, Stewart CR, Dearnley M, et al. MicroRNA Biomarkers for Infectious Diseases: From Basic Research to Biosensing. Front Microbiol 2020; 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01197
11. Judice CC, Bourgard C, Kayano ACAV, Letusa A, Costa FTM. MicroRNAs in the Host-Apicomplexan Parasites Interactions: A Review of Immunopathological Aspects. Front Cell Infect Microbiol 2016; 6. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00005.
12. Zhou R, Hu G, Liu J, Gong AY, Drescher KM, Chen XM. NF-κB p65-dependent Transactivation of miRNA Genes Following *Cryptosporidium* parvum Infection Stimulates Epithelial Cell Immune Responses. PLoS Pathog 2009; 5: e1000681. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000681
13. Yu JR, Choi SD, Kim YW. In Vitro Infection of *Cryptosporidium* parvum to Four Different Cell Lines. Korean J Parasitol 2000; 38(2): 59-64. https://doi.org/10.3347/kjp.2000.38.2.59.
14. Petry F, Robinson HA, McDonald V. Murine Infection Model for Maintenance and Amplification of *Cryptosporidium* parvum Oocysts. J Clin Microbiol 1995; 33(7): 1922-4. https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1922-1924.1995
15. Morada M, Pendyala L, Wu G, Merali S, Yarlett N. *Cryptosporidium* parvum Induces An Endoplasmic Stress Response in the Intestinal Adenocarcinoma HCT-8 Cell Line. J Biol Chem 2013; 288(42): 30356-30364. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459735.
16. Wang C, Liu L, Zhu H, Zhang L, Wang R, Zhang Z, et al. MicroRNA Expression Profile of HCT-8 Cells in the Early Phase of *Cryptosporidium* parvum Infection. BMC Genomics 2019; 20(1): 37. https://doi.org/10.1186/s12864-018-5410-6.
17. Verdon R, Keusch GT, Tzipori S, Grubman SA, Jefferson DM, Ward HD. An in vitro Model of Infection of Human Biliary Epithelial Cells by *Cryptosporidium* parvum. J Infect Dis 1997;175(5): 1268-72.
18. Eldh M, Lötvall J, Malmhäll C, Ekström K. Importance of RNA Isolation Methods for Analysis of Exosomal RNA: Evaluation of Different Methods. Mol Immunol 2012; 50(4): 278-86. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.02.001.
19. Caner A, Zorbozan O, Tunalı V, Kantar M, Aydoğdu S, Aksoylar S, et al. Intestinal Protozoan Parasitic Infections in Immunocompromised Child Patients with Diarrhea. Jpn J Infect Dis 2020; 73(3): 187-92. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.054.
20. Ulusan Bağcı Ö, Sadıqova A, Caner A. Comparative Gene Expression Profiles of Leishmania major and Leishmania infantum Promastigotes. Turkiye Parazitol Derg 2021; 45(2): 88-94. https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.66375.
21. Agarwal V, Bell GW, Nam J, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. Elife 2015; 4:e05005.
22. Wong N, Wang X. miRDB: An Online Resource for microRNA Target Prediction and Functional Annotations. Nucleic Acids Res 2015; 43: 146-52.

23. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3. 0: Deciphering microRNA Function with Experimental Support. Nucleic Acids Res 2015; gkv403.
24. Li J, Tan S, Kooger R, Zhang C, Zhang Y. MicroRNAs as novel biological targets for detection and regulation. Chem Soc Rev 2014; 43(2): 506-17.
25. Xie H, Lei N, Gong AY, Chen X-M, Hu G. *Cryptosporidium* parvum Induces SIRT1 Expression in Host Epithelial Cells Through Downregulating let-7i. Hum Immunol 2014; 75(8): 760-65. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.05.007.
26. Minguez L, Brulé N, Sohm B, Devin S, Giambérini L. Involvement of Apoptosis in Host-Parasite Interactions in the Zebra Mussel. PLoS ONE 2013; 8(6): e65822. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065822.
27. Kvansakul M. Viral Infection and Apoptosis. Viruses 2017; 9(12): 356. https://doi.org/10.3390/v9120356.
28. Lia X, Wangc J, Wua C, Lu X, Huang J. MicroRNAs Involved in the TGF-β Signaling Pathway in Atherosclerosis. Biomed Pharmacother 2022; 146: 112499. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112499.
29. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. Ann Med 2014; 46(6): 372-83.
30. Gücin Z, Çakmak T, Bayyurt N, Salih B. Helicobacter pylori Infection and Relationship with Gastric Epithelial Cell Proliferation and Apoptosis. Turk J Med Sci 2013; 43: 739-746. https://doi.org/10.3906/sag-1207-12.
31. Takumi K, Taro K. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Front Immunol 2014; 5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461.
32. Nimmerjahn F, Ravetch J. Fcγ Receptors as Regulators of Immune Responses. Nat Rev Immunol 2008; 8: 34-47. https://doi.org/10.1038/nri2206.
33. Ben Mkaddem S, Benhamou M, Monteiro RC. Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. Front Immunol 2019; 10. https://doi.org/doi: 10.3389/fimmu.2019.00811.
34. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB Signaling in Inflammation. Sig Transduct Target Ther 2 2017; 17023. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23.
35. Parenti A, De Logu F, Geppetti P, Benemei S. What is the Evidence for the Role of TRP Channels in Inflammatory and Immune Cells? Br J Pharmacol 2016; 173(6): 953-69. https://doi.org/10.1111/bph.13392.