

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HELICOBACTER PYLORI'DE CAGA ANTİKORU'NUN SERUMDAN *İN VİTRO*
TESPİTİ İÇİN REKOMBİNANT BİR CAGA ANTİJENİNİN ÜRETİLMESİ

MİRAY AKGÜÇ

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

ANKARA
2011

İÇİNDEKİLER

Özet	v
Abstract	vi
Teşekkür	vii
Şekiller dizini	ix
Çizelgeler dizini	x
Simgeler dizini	xi
1.KURAMSAL TEMELLER	1
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tarihçesi	1
1.2 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Sınıflandırılması	2
1.3 16s rRNA ile <i>Helicobacter</i> Türlerinin Taksonomisi	2
1.4 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Mikrobiyolojisi	3
1.5 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Epidemiyolojisi	4
1.6 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Mideye Yerleşimi	5
1.7 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Genomu	6
1.8 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Çeşitliliği ve Evrimi	6
1.9 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Virülensi ve Patojenitesi.....	7
1.10 Cag Patojenite Adası ve Tip IV Sekresyon Sistemi.....	8
1.11 CagA	9
1.12 EPIYA Motifleri (TPM).....	11
1.13 CagA ve Gastrik Kanser.....	12
1.14 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Transmisyonu	15
1.15 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tanısı	16
1.15.1 İnvaziv Yöntemler	16
1.15.2 İnvaziv Olmayan Yöntemler	17
1.16 <i>Helicobacter pylori</i> Tedavisi	18
1.17 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Antibiyotik Duyarlılığı	20
1.18 'Champion' Pet Ekspresyon Sistemi ve pet 151/D plazmiti	20
1.18.1 Topoizomeraz I	21
1.18.2 Yönlü Topo Klonlama.....	21
1.18.3 T7 düzenlemeli ekspresyon'un temelleri	22
1.18.3.1 T7 RNA polimerazın regülasyonu	22

2. MATERYAL ve YÖNTEM	25
2.1 Materyal	25
2.1.1 Gereçler	25
2.1.2 Hastalar.....	25
2.1.3 Kimyasal Maddeler	25
2.1.4 Tampon ve Çözeltiler	27
2.1.5 Kullanılan Cihazlar	30
2.1.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri.....	31
2.1.7 Kullanılan Kitler.....	31
2.2 Yöntem	31
2.2.1 Bakteri Kültürü ve Saklanması	31
2.2.2. Kültür'den Bakteri Genomik DNA İzolasyonu	32
2.2.3 Biyopsi Örneklerinin Saklanması.....	33
2.2.4 Biyopsi Örneğinden Bakteri Genomik DNA Ekstraksiyonu	34
2.2.5 PZR ile Genomik DNA Varlığının Doğrulanması.....	34
2.2.6. PZR ile CagA Pozitifliğinin Saptanması.....	36
2.2.7 PZR ile EPIYA Motiflerinin Saptanması.....	37
2.2.8 Klonlanacak bölge için gerekli primerlerin tasarlanması ve PZR ile Çoğaltılması	39
2.2.9. Klonlanacak Bölgenin Jelden Ekstraksiyonu	41
2.2.10 Ekspresyon Vektörüne Klonlama.....	41
2.2.11 Kimyasal Kompetent Hücrelere Transformasyon.....	42
2.2.12 Düşük Kopya Plazmit İzolasyonu	43
2.2.13 Plazmitlerden Pozitif Klonların Seçimi ve Sekanslanması	44
2.2.14 Plazmitin BL21(DE3) Star Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu	44
2.2.15 Ekspresyon	45
2.2.16 SDS Page Analizleri.....	45
2.2.17 Western Blot Analizleri.....	47
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
3.1 Bakteri Kültürü ve İzolasyon	52
3.2 PZR ile Genomik DNA Varlığının Doğrulanması.....	52
3.3 PZR ile CagA Pozitifliğinin Saptanması.....	52
3.4 PZR ile EPIYA Motiflerinin Saptanması.....	53
3.5 Klonlanacak Bölgenin PZR ile Çoğaltılması	54

3.6 Klonlama ve Klonlamanın Doğrulanması.....	54
3.6. 1 Düşük Kopya Plazmit Ekstraksiyonu.....	54
3.6.2 Klonlanmanın Doğrulanması	55
3.7 Plazmitlerin Sekans Analizleri	56
3.8 BL21(DE3) ve BL21(DE3) <i>Star</i> Suşlarına Transformasyon	58
3.9 SDS Page Analizleri.....	58
3.10 Western Blot Analizleri.....	59
TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1994 yılında *Helicobacter pylori*'yi birinci grup gastrik kanserojen olarak ilan etti. Dünyadaki *Helicobacter pylori* enfeksiyonu frekansı çok yüksektir ve buna paralel olarak mide kanserinden de ölüm dünyada çok sık görülmektedir. *Helicobacter pylori* spiral, gram negatif, tek kutbunda birden fazla flagella ya sahip kronik atrofik gastrit, peptik ülser, gastrik ülser, gastrik lenfoma gibi birçok gastrik hastalığın etkeni olarak görülen bir bakteridir.

H. pylori'nin neden olduğu kronik gastritin prekanseröz bir patolojisi olduğu bilinmektedir. Kansere giden yolda bu bakteriye ait bazı özelliklerin rolü üzerinde önemle durulmaktadır. *H. pylori* 'nin gastrik kanser gelişiminde rolü olabileceği öngörülen en önemli faktör cagA genotipidir. CagA antijeni çoğu klinik izolatta bulunan 128 kDa'luk hidrofilik bir proteindir. CagA proteini epitelyal hücrelere tutunmakta ve farklı suşlarda sayıca değişiklik gösteren tirozin bölgelerindeki EPIYA motiflerinden fosforilasyona uğramaktadır(Tirozin fosforilasyon motifleri). Bu tekrar dizilerini yüksek rakamlarda bulunduran suşlar gastrik kanser ile daha yakından ilişkilendirilmektedir.

Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda cagA pozitif suşların gastrik kanser geliştirme oranının önemli oranlarda olduğu gösterildi. CagA pozitifliği üzerinde yapılacak araştırma sonuçları mide kanseri gelişme riski olanların önceden saptanmasına olanak verecektir. Şu ana kadar bu tarz çalışmalar yapılmış ve cagA pozitifliğinin saptanması amacı ile çeşitli kitler geliştirilmiştir ancak bu kitlerin maliyetlerinin çok yüksek olması kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu çalışma ile oluşturacağımız rekombinant bir cagA proteini kendi ülkemize ait olup Türkiye'de özgül elisa testlerinde kullanılabilir maliyeti düşük çalışmalar ve araştırmalar yapabilmemize olanak sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: cagA, rekombinant protein ekspresyonu, *Helicobacter pylori*, Gastrik kanser, ELİSA

ABSTRACT

World Health Organization classified *Helicobacter pylori* as a first class carcinogen in 1994. Today *Helicobacter pylori* infection frequency and deaths associated with gastric cancer is very high in the world. *Helicobacter pylori* is a spiral, gram negative bacteria which seems to be responsible of several gastric diseases including peptic ulcer, gastric ulcer and Malt lenfoma.

Results of recent studies demonstrated that *cagA* was closely associated with *H.pylori* pathogenity. CagA is a 128kDa hydrophilic protein which holds on to epithelial stomach cells and phosphorilated on it's EPIYA regions. Those EPIYA regions are higly various and associated with higher risk of developing gastric cancer than those infected with *cagA* negative strains.

The aim of this study is to construct a prokaryotic expression system of *Helicobacter pylori* *cagA* gene fragment to improve an Enzyme linked immunosorbant assay. Such studies will lead us to *cagA* genotype serum samples earlier to determine the risk rate of *Helicobacter pylori* infection on the way to gastric cancer.

Key Words: *cagA*, *Helicobacter pylori*, recombinant protein expression, gastric cancer, ELISA

TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsünde bulunduğum sürece her türlü bilgi ve desteğini benden sakınmayan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mithat Bozdayı'ya,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom birimi üyelerine ve tezimin tamamlanmasına olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Duygu Demiralp Özel'e ,

Fransa'da bulunduğun süre içerisinde danışmanlığımı yürüten Prof. Dr. Francis Megraud'a ve Victor Segalen II Üniversitesi Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Tez sürecinde bilgi birikimi ile yanımda olan Uzmanımız Ersin Karataylı'ya , bu süreci benimle paylaşan ve destekleyen sevgili arkadaşlarım Esra Çelik, Duygu Koyuncu ve İnci Çelik'e ,

Hem maddi hem manevi yönden beni sabırla destekleyen güzel aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Miray Akgüç

TEŞEKKÜR

Anneme;

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 : 16S rRNA sekansına dayanarak hazırlanan, geçerli 19 <i>Helicobacter</i> türünü ve 9 geçici türün filogenetik ağacı	3
Şekil 1.2 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin üreaz enziminin midedeki aktivitesi.....	5
Şekil 1.3: Fosfotirozillenmiş <i>cagA</i> 'nın konak hücrede hücre fenotipi, proliferasyon ve apoptozu içeren çeşitli sinyal yolları ile etkileşimi	10
Şekil 1.4: Batı tipi ve Doğu tipi <i>cagA</i> 'nın tirozin fosforilasyon motifleri	11
Şekil 1.5 : Topo izomeras kesimi ile yönlü klonlanma mekanizması.....	21
Şekil 1.6: pET 151/D TOPO Plazmitinin yapısı	22
Şekil 2.1 Pet 151/D plazmitinin sekans analizi	39
Şekil 2.2 AntiHisG antikörünün tanıyarak bağlanma gösterdiği epitopun lokasyonu	49
Şekil 2.3 . Membran, jel ve filtre kağıdının sandviç yöntemiyle hazırlanması ve transfer aparatına yerleştirilmesi	51
Şekil 3.1 23s rRNA PZR reaksiyonu agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 3.2 PZR ile <i>cagA</i> pozitifliğinin belirlenmesi	53
Şekil 3.3 : PZR ile EPIYA motiflerinin saptanması.....	53
Şekil 3.4 Klonlanacak bölgenin PZR ile amplifikasyonu	54
Şekil 3.5: Plazmit izolasyonunun %1'lik agaroz jel elektroforezinde doğrulanması	55
Şekil 3.6 Klonlanma sonucunda elde edilen klonların PZR'de doğrulanması.....	55
Şekil 3.7 Fragment no:4 'ün sekans analizi.....	56
Şekil 3.8 Fragment no:17'nin sekans analizi	56
Şekil 3.9: 4 ve 17 nolu fragmentlerin aminoasit ve EPIYA motif analizleri	57
Şekil 3.10: BL21(DE3) <i>Star</i> hücre hattında <i>e.coli</i> SDS page profili	58
Şekil 3.11: BL21(DE3) hücre hattında <i>e.coli</i> SDS page profili	59
Şekil 3.12: BL21(DE3) Hücre hattında Western Blot Analizleri.....	60
Şekil 3.13: BL21(DE3) <i>Star</i> Hücre Hattında Western Blot Analizleri	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 : Pet topo 151/D vektörünün yapısal özellikleri.....	24
Çizelge 2.1 : PZR'de 23S RNA bölgesini çoğaltan ZGE23 ileri ve DP1 geri primerlerinin sekansları.....	35
Çizelge 2.2 23s rRNA PZR reaksiyon karışımı	35
Çizelge 2.3 23s rRNA PZR reaksiyon koşulları	35
Çizelge 2.4: F1-468 ve R1-496 primerlerinin dizisi	36
Çizelge 2.5 'Empty Site' PZR reaksiyon karışımı	36
Çizelge 2.6 'Empty Site' PZR reaksiyon koşulları	37
Çizelge 2.7 : EPIYA motiflerini belirlemek amacıyla kullanılan primerlerin dizileri.....	37
Çizelge 2.8 EPIYA motiflerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun bileşenleri	38
Çizelge 2.9 EPIYA motiflerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun koşulları.....	38
Çizelge 2.10: F2 ve R8 primerlerinin dizileri	39
Çizelge 2.11 Klonlanacak bölgenin PZR reaksiyon bileşenleri.....	40
Çizelge 2.12 Klonlanacak bölgenin F1 ve R8 primerleri ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonun koşulları.....	40
Çizelge 2.13 Klonlama reaksiyonu	42
Çizelge 2.14: SDS-page jel bileşenleri.....	46
Çizelge 4.1: Yıllara göre cagA pozitifliğini saptamak için yapılan ELISA çalışmaları	62

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

Açıklama

DNA	Deoksiribonükleikasit
rRNA	Ribozomal ribonükleikasit
Mb	Megabaz
Kb	Kilobaz
HCV	Hepatit C Virüsü
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Kda	Kilodalton
TPM	Tirozin fosforilasyon motifleri
HPV	Human Papilloma Virüs
PCR	Polimeraz chain reaction
CO ₂	Karbon di oksit
IgG, IgA, vb.	Immunoglobülin çeşitleri
NSAID	Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar
PPI	Proton Pompa İnhibitörü
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
µl	mikrolitre
E.coli	Escherichia coli
S.O.C	Super Optimal Catabolit Repressor
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
LB	Luria Broth

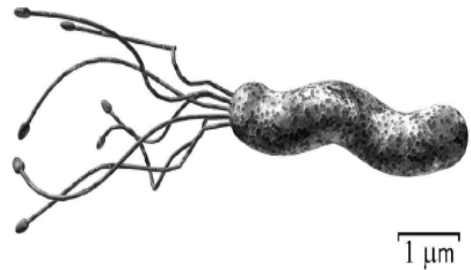
1. KURAMSAL TEMELLER

1.1 *Helicobacter pylori*'nin Tarihçesi

Gastrik mukoza üzerinde görülen spiral organizmalar son yüzyılda çoğu kez vurgulanmıştır. İtalyan anatomist Giulio Bizzozero bu konudaki araştırmalarını bilim dünyası ile *Helicobacter pylori*'nin kültüre edilmesinden 100 yıl önce paylaşmıştır (Bizzozero 1893). 1950'lerde çalışmaların insana dayalı hale gelmesine kadar çeşitli araştırmacılar üreazın, kedi ve köpek gibi çeşitli karnivorların midesinde çoğunlukla var olduğunu saptadı (Luck et al. 1924, Fitzgerald et al. 1950). Araştırmacılar ilk başlarda bunların birbirinden bağımsız gelişmeler olduğunu ve gastrik üreazın mide epitel hücreleri tarafından salgılandığını düşündüler taaki Charles Lieber üreaz salgılanmasının tetrasiklin ile baskılabileceğini ve Delluvanin germ-free hayvanların gastrik üreaz salgılamadığı gösteren çalışmalarına kadar (Lieber et al. 1959 ve Delluva et al. 1968). 1975'de Steer ve Colin-Jones gastrik mukozada bulunan gram negatif bakterileri gastrit ile ilişkilendirdi (Steer et al. 1975). Fakat organizmayı kültür etmekteki başarısızlıkları buluşlarının gözardı edilmesi ile sonuçlanmıştır. 1983 yılında Warren ve Marshall'ın gastrik mukozadaki organizmalarla erişkinlerdeki antral gastriti ilişkilendiren raporlarının ardından ise konu tekrar gündeme taşındı (Warren et al. 1983). Marshall ve Warren'in klinik örneklerden *Helicobacter Pylori*'yi ilk kez izole etmeleri gastroenteroloji ve mikrobiyolojide büyük bir devrim yarattı (Blaser 1994). Bu bakteri ilk başlarda *Campylobacter jejuni*'ye olan morfolojik benzerliği yüzünden *Campylobacter* olarak anıldı. 1984 de başarılı olarak kültüre edildikten sonra ise *Campylobacter pyloridis* olarak isimlendirildi ancak daha sonra gramer nedenleri yüzünden *Campylobacter pylori* olarak değiştirildi. Son zamanlara doğru ise 'Campylobacter' cinsinden çıkartılıp, 'Helicobacter' adlı yeni bir cinse dahil edildi (Goodwin et al. 1989). Şu günlerde *Helicobacter Pylori* olarak adlandırılan bu bakteri uzun süredir peptik ülser üzerine yapılan çalışmalarda başrolü oynamaktadır.

Son olarak 3 ekim 2005 tarihinde, Warren ve Marshall *H. pylori*'yi keşfettikleri ve bu bakterinin

gastrit ve peptik ülserdeki rolünü gösterdikleri için tıp alanında NOBEL ödülünü kazandılar.



Helicobacter pylori'nin şu anda dünya nüfusunun en az yarısını enfekte ettiği tahmin edilmekte. 1984de Marshall ve Warren tarafından rapor edildiğinden beri kronik atrofik gastrit ve peptik ülser gibi gastrik hastalıkların etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir (Hatakeyama et al. 2005). Son zamanlarda deney hayvanları üzerinde yapılan epidemiyolojik ve enfeksiyon çalışmaları midedeki kronik *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun gastrik adenokarsinom gelişmesi üzerinde de anahtar bir rol oynadığını göstermiştir (Nomura et al. 1991, Uemura et al. 2001).

1.2 *Helicobacter pylori*'nin Sınıflandırılması

Kültüre edilen ilk *Helicobacter* türü *H. Muradium*'dur. *H.muradium* fare çekum kriptlerinde yaşayan kommensal bir organizmadır (Lee et al. 1992). Zamanla yeni *Helicobacter* türleri keşfedildi ve şu anda bazıları insan patojeni olarak kabul edilmektedir (Windsor et al. 2000).

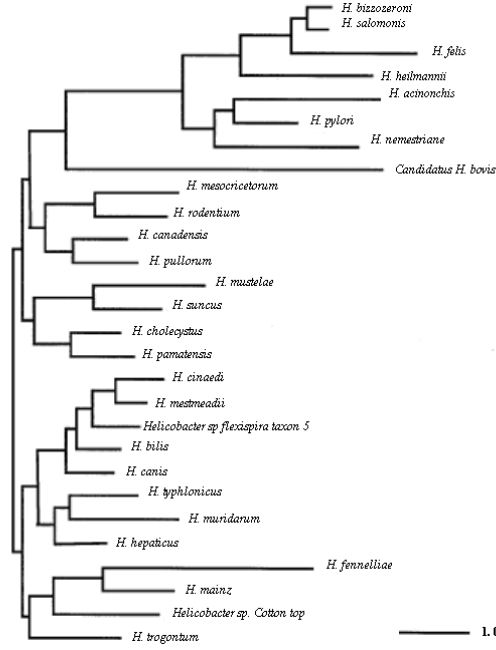
Helicobacter türüne ait bazı temel özellikler (i) kılıflı flagella ile hücre hareketliliği; (ii) sıvı besiyerinde salgılanan eksternal glikokaliks; (iii) menakinon-6 (MK-6) başlıca izoprenoid kinon olarak; ve (iv) %35-44 arası bir G+C yoğunluğuna sahip bir kromozomal DNA'dır (Owen 1998).

1.3 16s rRNA ile *Helicobacter* türlerinin taksonomisi

Helicobacter cinsi şu anda 28 geçerli isimlendirilmiş tür içermekte ve gastrik ve enterohepatik *helicobacter*ler olmak üzere iki büyük altgruba ayrılır (Josenhans et al. 2007).

Helicobacter genusunun midede (*H. Pylori*, *H. Heilmannii*, *H. Mustelae*) ve farede, karaciğerde (*H. Bilis*, *H. Hepaticus*) kolonize olabilme ve inflamasyon yaratabilme kapasitesi vardır (Marshall 2001).

% farklılık



Şekil 1.1 : 16S rRNA sekansına dayanarak hazırlanan, geçerli 19 *Helicobacter* türünü ve 9 geçici türün filogenetik ağacı

1.4 *Helicobacter pylori*'nin Mikrobiyolojisi

Helicobacter pylori adını sahip olduğu helical şekilden alır. *Helicobacter pylori* spiral ya da çubuk şeklinde, Gram negatif, yediye kadar varabilen unipolar kılıflı flagellaya sahip hareketli bir organizmadır (Westblom et al. 1991). Yüksek oranda üreazın yanısıra katalaz ve oksidaz pozitifdir (Goodwin et al. 1986,1989). *H. pylori* aerobik ya da anaerobik ortamların aksine azaltılmış oksijen içeren ortamlarda başarılı bir şekilde kültüre edilebilir (Goodwin et al. 1989). Gelişimi optimum 37°C de gerçekleşir. Primer kültürlerde 5-7 gün arasında değişen uzun bir inkübasyon süresi vardır (Goodwin et al. 1989). Koloni morfolojisi görünüşde dairesel konveks ve yarısaydamdır. In vitro kanlı agar besiyerinde spor formunda bulunmaz. Kanlı agarda kolonilerin etrafında hafif grimsi bir hemoliz

görünür. Bazı asılı damla kolonilerinde hücreler hareketsiz gibi görünse de aktif olarak hareketlidirler (Owen 1998)

Helicobacter pylori'nin flagellası bakteri hücre duvarının devamı olan dış membran komponentlerinden oluşan bir kılıfla çevrilmiştir. Bazı flagellaların ucunda işlevi tam olarak anlaşılamayan ampul benzeri şişlikler bulunmaktadır. Elektron mikroskopisi çalışmaları aynı zamanda flagelladaki hücre membranının üzerinde 40 nm kalınlığında glikokaliks ya da kapsül benzeri polisakkaritçe zengin bir tabakanın varlığını göstermiştir (Owen 1998).

Helicobacter pylori uzun süreli kültürlerde, besin yetersizliği, artan oksijen miktarı, alkali pH, yüksek sıcaklık, farklı antibiyotiklere maruz kalma gibi durumlarda kokoid forma döner. Kokoid formlar metabolik olarak aktiftir ancak invitro ortamda kültürü yapılamaz (Brenniaglia et al. 2000).

1.5 *Helicobacter pylori*'nin Epidemiyolojisi

Helicobacter pylori omurgalıların midesindeki zor koşullarda yaşamayı başaran ve uyum sağlayabilen ilgili bakterilerin içindeki en büyük bakteri ailelerinden biridir. Görünüşe göre *Helicobacter pylori* insan midesine insan, daha insan formunu almadan önceki zamanlarda yerleşmiştir (Blaser et al. 1997). Her ne kadar *Helicobacter pylori*'nin kedilerde bulunduğu saptanmış ise de dünyadaki yaygın görüş hala enfeksiyon kaynağının insan olduğu yönündedir (Bourke et al. 1996).

Son yüzyılda gelişmiş ülkelerde primatlar ve insan popülasyonu üzerinde yapılan çalışmalar insan popülasyonunun neredeyse tümünün midesinde *Helicobacter pylori* ya da ilişkili bir bakteriyi taşıdığı ve bu bakteri ile çocuk yaşlarda enfekte olup daha sonra ömür boyu taşıdığını göstermiştir. Bu da *Helicobacter pylori*'nin bir endojen faktör yani insan mide florasının bir parçası olduğu yönündeki kanıtları arttırmıştır (Blaser 1998).

Bugün dünya nüfusunun yaklaşık %50'si *Helicobacter pylori* ile enfektedir. Enfekte olanların ise hemen hemen hepsinde kronik gastrit, %10-15'nde ise peptik ülser, malt lenfoma ve bir kaçında ise şu anda gastroenterolojide en büyük tehdit olarak görülen gastrik kanser görülmektedir (Peek ve Blaser 2002, Sepulveda ve Graham 2002, Suerbaum ve Josenhans 2007).

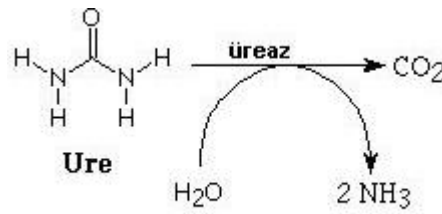
Ülkemizde yapılan bir çalışmada 2 yaşındaki çocukların %14'ünün, 7 yaşındakilerin %76'sının, 22 yaşındakilerin, % 72'sinin, yetişkinlerin ise %85-90'ının *H. pylori* ile enfekte olduğu görülmüştür (Özden et al. 1992).

1.6 *Helicobacter pylori*'nin Mideye Yerleşimi

Helicobacter pylori'nin dış yüzeyi gastrik epitel hücrelerindeki özel reseptörlere tutunabilen adhesyon molekülleri ile kaplıdır (Marshall 2001). Bu yüzden de bakteriyi sadece mide epiteli olan bölgelere tutunabilir (Goodwin 1997). *Helicobacter pylori* gastrik mukusun altında mideyi saran mukus salgılayan epitel hücrelere tutunarak yaşar.

Midedeki asidik ortam virüs, bakteri ve diğer mikroorganizmaların midede hayatta kalmasını çoğunlukla engeller. Ancak *H. Pylori* bu ağır koşullarda yaşayabilecek şekilde gelişmiş tek organizmadır.

H. pylori midedeki üreyi amonyağa çevirerek mide asiditesini nötralize eden ve böylece kendisine hayatta kalmak için daha uygun bir pH sağlayan üreaz adında özel bir enzime sahiptir (Hatakeyama 2009).



Şekil 1.2: *Helicobacter pylori*'nin üreaz enziminin midedeki aktivitesi

Normal koşullarda bakteriyi tanıyarak yok etmesi gereken konak immün hücreleri kan damarlarından mide epitel mukozasına geçemez bu durumda immün hücreleri enfeksiyon bölgesine devamlı bir şekilde tepki gösterirken aynı zamanda ölürek gastrik patojene besin kaynağı haline gelirler (Hatekeyama 2009).

1.7 *Helicobacter pylori*'nin Genomu

Helicobacter pylori genom sekansı yayınlanan yedinci bakteri türüdür (Tomb et al. 1997) ve iki bağımsız izolatin (J99 ve 26695) tüm genom sekanslarının karşılaştırmasının yayınlandığı ilk türdür (Alm et al. 1999).

Helicobacter cinsinin *H. pylori* dışındaki diğer üyelerinden ise sadece ikisi *Helicobacter hepaticus* (Suerbaum et al. 2003) ve *Helicobacter acinonychis*'in (Eppinger et al. 2006) genom sekansı yayınlanmıştır.

H. pylori yüksek çeşitlilik gösteren neredeyse her izolatinın birbirinden farklı olduğu 4kilobazlık genom içinde 1400den fazla polimorfik bölge içeren bir genoma sahiptir (Achtman et al. 1999, Falush et al. 2003). Restriksiyon enzim kesim profili ise neredeyse her bireyde farklı bir patern göstermektedir. Ancak bu çeşitlilik kodonların son aminoasidinde rasgele olarak meydana gelmekte ve sessiz mutasyona neden olmaktadır. Buda protein yapısında bir değişiklik meydana getirmemektedir (Marshall 2002).

H. pylori genomu yaklaşık 1.7 Mb boyundadır ve 1500 den fazla gen bulundurmaktadır. Bütün izolatlarda korunmuş olan kor genom ise tahminen 1111 genden oluşmaktadır (Josenhans et al. 2007). *H.pylori*'nin genlerinin %40'nın işlevi henüz bilinmemektedir ancak bir şekilde asit salgılayan insan midesinde hayatta kalmakla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.

1.8 *Helicobacter pylori*'nin Çeşitliliği ve Evrimi

Helicobacter pylori çeşitliliği tipik olarak endojen mutasyonlardan ve rekombinasyondan kaynaklanır. *H. pylori*'nin bu değişimlerden her ikisi içinde ayrı mekanizmaları vardır. Bunun sonucunda *Helicobacter pylori* de dahil çoğu bakteri popülasyonu çeşitli nokta mutasyonlar ve rekombinasyonlar sonucunda tek klon halinde bulunmaz. *Helicobacter pylori* yüksek mutasyon ve rekombinasyon oranı ile bu durumun en önemli örneklerinden biridir. Bu yüzden çoğu konak genellikle 'quasispecies' diye tabir edilen süreklilik arz eden rna viruslarında (HCV ve HIV) gözleendiği gibi tek bir klondan ziyade bir birbiriyle ilişkili organizmalar topluluğu ile kolonizedir. Bu durumun da bakteriye konağın seçici baskılamasından sonra dahi tekrar ortaya çıkabilmesini sağlayan hipermutatör bir fenotip kazandırabileceği düşünülmektedir (Bjorkholm et al. 2001). *Helicobacter pylori*'nin aktif

adaptif nokta mutasyonlarının iyi bir örneği ise bakteriyel popülasyonda yaygın kullanılan antibiyotiklerden biri olan klaritromisin direncinin hızlı gelişimidir (Blaser ve Atherton 2004).

Bu mikrobiyal varyasyon aynı zamanda konak hücreye gönderilen sinyalleri belirler. Bu yüzden her konak seleksiyon ile oluşmuş baskın genotipde bakteriyel bir gen havuzu kolonizasyonuna sahiptir.

Sonuç olarak bu tarz yüksek esnekliğe sahip popülasyonların konak seleksiyonuna karşı gelebilmesi konsepti *Helicobacter pylori*'nin bireysel konaklarda farklı suşların yanısıra farklı varyantlar halinde varlığını sürdürmesini ve insan türünün yüksek çeşitliliğine rağmen neredeyse her insana kolonize olabileme yeteneğini açıklar.

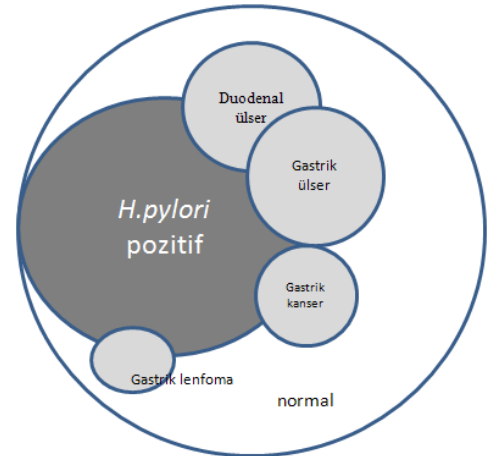
1.9 *Helicobacter pylori*'nin Virülensi ve Patojenitesi

Helicobacter pylori bir kere gastrik epitel hücrelere tutunduktan sonra ürettiği amonyak ile zarara yol açabilir. Aynı zamanda epitel hücrelerinde vakuol oluşumuna yol açarak da zarara yol açabilir. Bu vakuoller vakuol oluşturan bir sitotoksinin VacA'nın (Vacuolating cytotoxin A) ürünüdür. VacA epitel hücreleri tarafından endosite edilerek, içeride bir endozom-lizozom füzyonu (vakuol) meydana getiren bir proteindir (Ge Z et al. 1999).

Üretilen sitotoksin varyantlarının artmasının peptik ülserle ilişkili daha agresif formların görülmesi olasılığını arttırmada muhtemeldir.

Bir diğer önemli patojenik faktör ise sitotoksin ilişkili gen A (cagA)'dır. CagA proteini birkez hücreye girdikten sonra tirozin fosforillenir ve bir büyüme faktörü sinyali meydana getirilmesine neden olur. Buda epitel hücrelerinin normal hücre yapısını korumasına engel olur (Segal et al. 1999).

H. pylori BabA, SabA ve AlpA/B gibi hücre temasını güçlendiren ve hatta hücre saldırısını kontrol edebilen çeşitli adhezinler de eksprese etmektedir (Dubois ve Borren 2007).



1.10 Cag Patojenite Adası ve Tip IV Sekresyon Sistemi

18 yıldan daha fazla bir süre önce Cover ve arkadaşları *cagA*'ya verilen serolojik yanıt ile peptik ülser arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu rapor ettiler (Cover et al. 1990). Birbirinden bağımsız çeşitli araştırmalar *cagA*'nın klonlanması (Tummuru et al. 1993, Covacci et al. 1993) ve içinde bulunduğu *cag* patojenite adasındaki genlerin inflamasyondaki rolünün tanımlanması ile sürmüştür (Tummuru et al. 1995). Bu genlerden biri olan *picB(cagE)*'nin ise *Bordetella* da toksin salgılamada rol alan bir proteine homolog bir protein kodladığı farkedilmiştir. Bu gelişme *H. pylori*'de *cag* PAI'nın da henüz tanımlanmamış ürünlerin sekresyonunda rol alabileceği fikrini akla getirmiştir (Tummuru et al. 1995).

Birkaç yıl içinde *Cag* patojenite adasının *H. pylori*'nin çeşitli suşlarından tüm genom sekansının yapılması ile 32'ye yakın gen taşıyan 40kb'lık bir DNA insersiyon elementi olduğu ve henüz bilinmeyen bir atadan yatay transfer ile kromozomal glutamat rasemaz genine entegre olduğu bulunmuştur. *CagA* geni virü lent suşlarda bulunan ancak avirü lent izolatlarda bulunmayan *cagPAI* için bir belirteç görevi görmektedir (Censini et al. 1996, Akopyanz et al. 1998). Batı ülkelerindeki *H. pylori* suşlarının yaklaşık %60'ı *cag* PAI pozitif iken Doğu Asya ülkelerinde bu oran neredeyse %100 e yakındır (Hatakeyama 2005).

CagA çalışmalarında önemli bir atılım birbirinden bağımsız beş grubun *cagPAI*'nin *cagA*'yı konak hücreye enjekte eden fonksiyonel bir 'Tip IV sekresyon sistemini' kodladığını rapor etmesiyle meydana geldi (Covacci ve Rappuoli 2000). *CagPAI* *cagA*'yı da içeren 27-31 civarında genden oluşmaktadır. Bu genlerden en az 18'inin kodladığı proteinler tip VI sekresyon sisteminin yapıtaşlarını meydana getirir.

Tip IV sekresyon sistemleri genellikle gram negatif bakterilerde görülen muhtemelen atasal konjugasyon sistemleri ile ilişli geniş bir transfer makineleri grubudurlar. Tip IV sekresyon sistemi başlarda kamçı benzeri bir işlev için kullanılan bir yapıdan türemiştir ve başta *cagA* olmak üzere protein ve nükleoprotein komplekslerini membranlar arasında aktarmak için kullanılan bir şırınga yapısındadır (Covacci et al. 1999). Tip IV sekresyon sistemi *H. pylori*'nin yanısıra *Agrobacterium*, *Legionella*, *Bartonella*, *Bordetella* ve diğer patojenlerde de bulunmaktadır (Cascales ve Christie 2003). Tip IV sekresyon sistemleri tipik olarak 11 *virB* proteini ve birde bağlantı proteininden (*VirD4*) oluşur. Yukarıda da

bahsettiğimiz gibi *H. pylori*'de cagPAI, virB ve virD4 proteinleri ile beraber çeşitli yardımcı faktörleride içeren 32 gen kodlamaktadır (Fisher et al. 2001).

Farklı patojenlerin çoğunun T4SS (Tip IV sekresyon sistemi)'leri efektörlerini kültür süpernatantına transloke etmezler (Cascales ve Christie 2003). Buda akla bu tarz sistemlerin fonksiyonel aktivitesinin konak hücrede bir sinyale ihtiyaç duyduğunu gösterir, örneğin, özel bir reseptör ile etkileşim gibi. Son zamanlarda konak hücre integrinlerinin *H.pylori* cagL proteini ile direk etkileşimi gösterilmiştir ve bunlar şimdiye dek tanımlanmış tek T4SS reseptörüdürler (Kwok et al. 2007). CagL proteinin integrinlere bağlanması lokal membran büzülmesini uyarır ve buda T4SS'nin genel membran dinamikleri ve konak hücre üzerindeki ilk etkisidir.

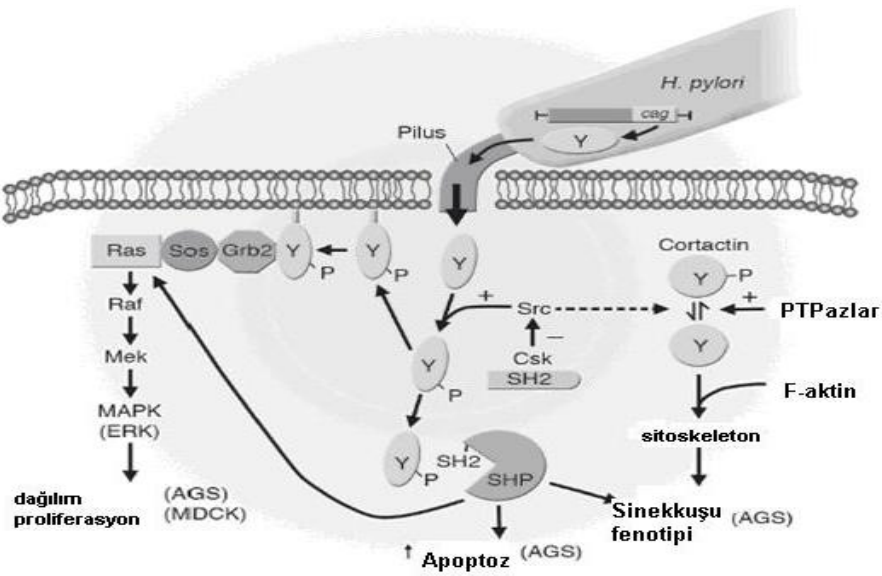
1.11 CagA

1989 yılında şu anda peptik ülser ve gastrik kanser için bir belirteç olarak kabul edilen suş-spesifik bir *H. pylori* geni, cagA tanımlandı (Cover et al. 1990). Bu süreç Cover ve arkadaşlarının cagA'ya verilen serolojik yanıt ile peptik ülser arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu rapor etmesiyle devam etti. CagA geni 1990 lı yılların başlarında Martin Blaser, Jean Crabtree ve Antonello Covacci'nin birbirinden bağımsız çalışmalarında keşfedilmiştir (Cover et al. 1990, Crabtree et al. 1991, Covacci et al. 1993) . *Helicobacter pylori* sitotoksin ilişkili gen cagA'nın varlığına ya da yokluğuna göre cagA-pozitif ve cagA-negatif suşlar olarak ikiye ayrılır. 120-135-Kda luk immünodominant bir protein olan cagA proteinini kodlayan cagA geni, cagA patojenite adasının bir ucuna lokalize olmuştur.

Yakın zamanlarda dünyadaki çalışmalar cagA geni üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun sebebi ise cagA negatif değil ancak pozitif suşların çeşitli gastrik hastalıkların gelişmesi ile ilişkilendirilmesidir. Son zamanlarda hayvanlar ve hücre kültür modelleri üzerinde yapılan çalışmalar da cagA ve cag patojenite adasının *H. pylori* patogenezindeki önemini destekler nitelikte veriler sunmuştur (Covacci ve Rappuoli 2000, Ogura et al. 2000, Rieder et al. 2005, Backert ve Meyer 2006, Hatakeyama 2008).

CagA yaklaşık 30 genden oluşan CagA Patojenite Adası'nın içinde bulunmaktadır. CagA Patojenite Adası'ndaki genlerin çoğu 'Tip IV Sekresyon Sistemi' olarak adlandırdığımız yapının parçasıdır.

Gastrik epitel hücrelere tutunmanın ardından cagA pozitif suşlar cagA proteinini tip IV sekresyon sistemi vasıtası ile konak doku hücreleri içerisine enjekte eder (Segal et al. 1999, Stein et al. 2000). Transloke olan protein plazma membranının iç yüzeyine lokalize olur. Protein burada c-Src, Fyn, Lyn ve Yes veya Ab1 gibi src ailesi kinazları (SFKs) tarafından tirozin fosforilasyonuna uğrayacaktır (Selbach et al. 2002, Poppe et al. 2007). CagA bir kere fosforillendikten sonra bir tirozin fosfataz olan SHP-2 ile etkileşir ve epitel hücrelerinin adezyonu ve migrasyonuna neden olur. Bu durum mide epitel hücrelerinde sinekkuşu ‘humming bird’ fenotipi diye adlandırılan bir morfolojik değişime sebep olur (Segal et al. 1999).



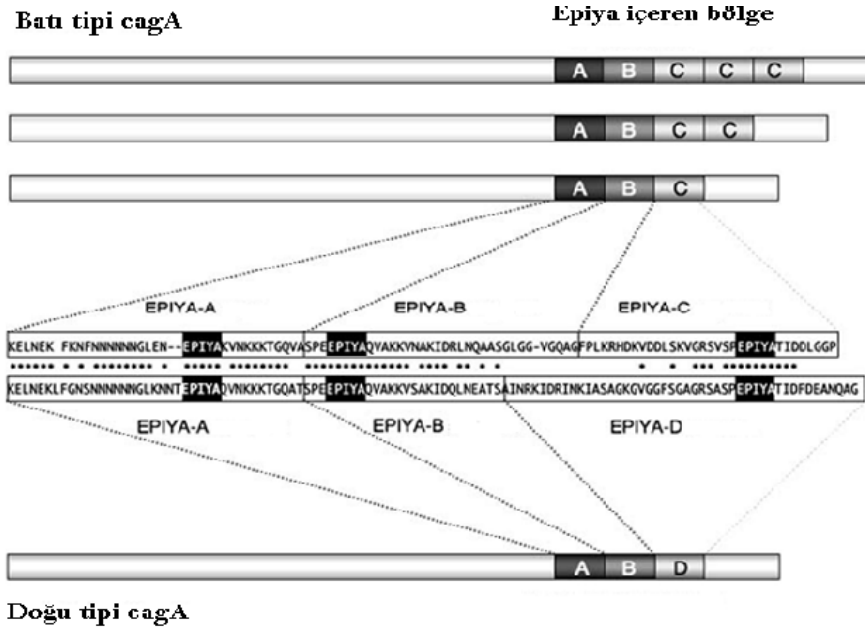
Şekil 1.3: Fosfotirozillenmiş cagA'nın konak hücrede hücre fenotipi proliferasyon ve apoptozu içeren çeşitli sinyal yolları ile etkileşimi.

Tirozin fosforilasyonu genel olarak hücre içi büyüme sinyallerinin iletiminde, memeli hücrelerinin hareketi ve farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak hücreye giren bakteriyel proteinlerin sinyal transdüksiyonunu bozması bu yolla hücresel disfonksiyonu uyararak hücre transformasyonuna neden olması ihtimalide önem kazanmaktadır.

Son yıllarda *H. pylori*'nin konak hücelere zarar vermek için kullandığı hüresel ve moleküler sinyal mekanizmaları yoğun şekilde araştırılmaktadır.

1.12 EPIYA Motifleri (TPM)

CagA'nın tirozin fosforilasyon bölgesinin karakteristik özelliği proteinin karboksil polimorfik bölgesinde (EPIYA tekrar bölgesi) çeşitli tekrarlarla bulunan Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifinin varlığıdır (Higashi et al. 2002). Bu tirozin fosforilasyon motiflerini çevreleyen sekanslar incelendiğinde herbiri birer EPIYA motifi içeren EPIYA -A,-B,-C ve -D olmak üzere dört farklı EPIYA tipi bulunduğu görülmektedir (Higashi et al. 2002, 2005).



Şekil 1.4: Batı tipi ve Doğu tipi cagA'nın tirozin fosforilasyon motifleri

Batılı *H. pylori* izolatlarında bulunan cagA profili EPIYA-A,-B ve -C'nin bir birlikteliği halindedir. Batılı cagA tiplerinde 34 aminoasit rezidüsünden oluşan EPIYA-C motifi ilgi çekici bir şekilde bir ila üçlü tekrarlar halinde bulunmaktadır. Doğu-Asyadaki *H. pylori* izolatlarında bulunan cagA suşlarının ise EPIYA-A ve -B motiflerini bulundururken EPIYA-C motifini bulundurmadığı bunun yerine EPIYA-D adı verilen ve Doğu-Asya'ya özgü olan farklı bir EPIYA yapısına sahip olduğu görülmüştür (Higashi et al. 2002). Batılı cagA'larındaki EPIYA-C motifindeki tirozin rezidüsü gastrik epitel hücrelerindeki SFK'lar

tarafından fosforile edilen başlıca bölge iken EPIYA-A ve EPIYA-B motifleri zayıf fosforilasyona uğramaktadır (Higashi et al. 2002).

CagA pozitif *Helicobacter pylori* suşları ile enfeksiyon ileri dereceli gastrik mukozal inflamasyon, ağır atrofik gastrit ile ilişkilendirilmiştir (Blaser et al. 1995, Parsonnet et al. 1997). Yapılan çalışmalar yüksek tekrarlarda EPIYA motiflerini bulunduran cagA proteinlerinin tirozin fosforilasyonunu ve sinek kuşu fenotipini bunların yanısıra gastrik kanser geliştirme ihtimalini de arttırdığını göstermiştir (Argent ve Atherton 2004). Bu düşünce ilerleyen zamanlarda cagA pozitif suşlardaki gastrik kanser riskinin cagA negatif suşlardaki kanser riskine göre iki kat daha fazla olduğunu gösteren 16 farklı çalışmanın ortak analizleri ile de desteklenmiştir (Huang et al. 2003).

1.13 CagA ve Gastrik Kanser

Yaklaşık 150 yıl önce Rudolf Virchow kronik inflamasyon süreçlerinin kanserin başlangıcını yansıtan tümör oluşumlarını gizleyebileceği tahminini yürütmüştür (Virchow 1863, Balkwill F and Mantovani 2001). Yara iyileşmesi ve kanserin kronik inflamasyonu benzer olmasına rağmen malignant trasformasyonun kronik inflamasyonu hakkında bilinenler henüz çok fazla değildir (Dvorak 1986). Bilinen çoğu kanser türü çok uzun süren bir inflamasyonun sonucu olarak doğmaktadır. Sigara içmenin genellikle inflamasyon yarattığı akciğer kanseri ve yıllar süren gastroözofageal reflünün uzun süreli inflamasyonunun sonucunda ortaya çıkan adenokanser gibi.

Bu inflamasyon ilişkili kanserlerin çoğu için başlatıcı etken hala belirsizdir ancak diğerleri için enfektif etiyolojiler tanımlanmıştır. *Helicobacter pylori*'nin midede kolonizasyonu gastrik kanser ve lenfomaya neden olabilir. Benzer şekilde hepatit B virüsünün ve hepatit C virüsünün viral kolonizasyonu hepatoselüler kansere ve HPV'nin bazı subtiplerinde servikal kansere neden olabilmektedir (Moss ve Blaser 2005).

Epitel içinde veya yakınındaki mikrobiyal varlık kan akışındaki inflamasyon hücrelerinin aktive edilmesi ve yeniden üretilmeye başlanması için bir uyarıcı görevi görür. Sitokinler, kemokinler ve serbest radikaller inflamatuvar yanıtı başlatır ve devamlılığını sağlar. İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonu serbest radikallerin yayılmasına neden olan bir respiratuar patlamaya neden olur. Serbest radikaller proteinleri kimyasal ve post-

translasyonel modifikasyonlar ile değiştirilebilen; lipidlerin peroksidasyonu ve genetik mutasyonların uyarılması ile malignant transformasyona katkı sağırlar. Epitel hücrelerin maruz kaldığı bu zarar apoptik hücre ölümünü ve epitelyal hücrelerin çoğalmasını uyarır. Buda daha fazla mutasyonların oluşmasına neden olur (Preston-Martin *et al.* 1990). Konak düzenleyici genlerinde zamanla çoğalan mutasyonlar genellikle hücre fenotipinde değişikliğe neden olurlar. Bu aşamada inflamasyon başlatıcılarının eliminasyonu ve inflamasyonun ortadan kaldırılması dahi kansere giden süreci engelleyememektedir (Hahn ve Weinberg 2002).

Gastrik kanser her yıl yaklaşık 930.000 yeni tanımlanmış vaka ile dünya üzerinde en sık görülen dördüncü, kanser ilişkili ölümlerde ise ikinci sırada yer alan kanser tipidir (Parkin et al. 2005). Gastrik kanser genellikle yıllar süren bir inflamasyon sonucunda oluşmaktadır (Correa P et al. 1975). Gastrik kansere dönüşen kronik inflamasyonun etiolojisi konusundaki ilk ipucu 1982 yılında *Helicobacter pylori*'nin ilk kez izole edilmesi ile ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar antral gastrit ile ilişkisi bulunan bu bakterinin diğer henüz anlaşılamamış mide hastalıklarında da açıklayıcı rol oynayabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (Warren ve Marshall 1983).

Yapılan seroepidemiyolojik çalışmaların meta-analizleri midede *Helicobacter pylori*'nin varlığının gastrik kanser suptiplerinin gelişmesi olasılığını 2 ila 5 kat arttırdığını (Huang J-Q et al, *Helicobacter and Cancer Collaborative Group* (2001)) daha hassas suç spesifik deneylerde ise bu olasılığın 20 kata kadar artabildiği gözlenmiştir (Ekstrom AM et al. 2001). Bu yüzden *Helicobacter pylori* gastrik kanser gelişimi için diyet, sosyoekonomik statü veya meslek gibi diğer çevresel etkilerden daha önemli bir risk faktörüdür (Neugut AI et al.).

Helicobacter pylori genellikle erken çocuklukta kazanılır ve kronik bir inflamasyona sebep olmasına rağmen çoğu vakalarda semptomlara sebep olmaz. Buna rağmen taşıyıcıların %5'inin altında bir kesiminde sürekli hale gelen kolonizasyonun 50 yıl veya fazlasında bir süreç sonucunda malignant doku geliştirdikleri gözlenmiştir. *Helicobacter pylori*'de cagA'nın yanı sıra gastrik kanser gelişimi riskini arttıran diğer virülens faktörler şunlardır:

vacA genindeki bölgesel polimorfizimler; Epitel hücreleri içerisinde endozomal vakuoller oluşturan multimerik proteinler kodlayan bölge.

babA; Epitel hücrelerindeki fukosillenmiş lewis B antijenlerine bağlanan bir adezin proteini kodlayan gen bölgesi.

Gastrik adenokarsinomun gelişimi onkogen ve tümör supressor genlerinin ekspresyonundaki yıllar içinde gelişen kalitatif ve aynı zamanda kantitatif değişimlere ihtiyaç duyar. CagA pozitif *H.pylori* enfeksiyonunda gastrik epitel hücreleri bakteriden sürekli olarak cagA enjeksiyonuna maruz kalırlar. Enjekte edilen cagA SHP-2 ve diğer sinyal moleküllerine bağlanıp onları tekrar düzenleyerek hücre gelişimi ve hareketini yeniden yapılandırır. CagA aynı zamanda hücre-hücre bağlantı yapılarını da tahrip eder ve böylece epitel yapıyı bozar. CagA'nın hücre fonksiyonu bozan çeşitli aktiviteleri içerisinde SHP-2'nin deregülasyonu gastrik karsinogenezde özellikle önem arz etmektedir çünkü insan SHP-2'sini kodlayan PTPN11 genindeki mutasyonlar yakın bir zamanda insan malignansilerinde tanımlanmışlardır (Tartaglia et al. 2003, Bentires et al. 2004). Son zamanlardaki bir çalışmanın interlökin-b ailesinde SHP-2 bağlanma bölgesini (koreseptör gp-130) ifade etmeyen transgenik farelerin intestinal tip adenokarsinomu çok yüksek sıklıkla geliştirdiğini göstermesi SHP-2'nin gastrik adenokarsinom gelişmesindeki potansiyel rolünü desteklemiştir (Judd et al. 2004).

Hücre gelişimi, hücre-hücre kontaktı ve hücre göçünü deregüle eden cagA kaynaklı anormal sinyaller epitel hücre döngüsünü etkileyebilir buda hücre proliferasyonu ve devamında apoptoza neden olabilir. Burdan yola çıkılarak *H. pylori* enfekte fareler kullanılarak gerçekleştirilen son araştırmalar gastrik adenokarsinomun şaşırtıcı olarak gastrik dokuya ait kök hücrelerden değil dolaşımdaki kemik iliği kökenli hücrelerden (BMDC) orjin aldığı şaşırtıcı sonucunu ortaya koymuştur (Houghton et al. 2004). Eğer bu durum insanlarda da geçerli ise cagA pozitif *H. pylori*'nin midedeki kronik mukozal enfeksiyonu gastrik kök hücreleri yenilenmeye iterek tüketiyor olabilir. Bunun sonucunda da gastrik dokuya kemik iliğinden hücre nakli yapılıyor olabilir. Tüm bu düşüncelere rağmen bu konu doğrulanması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Tüm bu araştırmalar göstermektedirki *H. pylori* neoplazi ile ilişkilendirilmiş bakteri-indüklü epitel hücre yolaklarını çalışmak için mükemmel bir modeldir.

1.14 *Helicobacter pylori*'nin Transmisyonu

Fekal-Oral Transmisyon

Helicobacter pylori bulaşının en yaygın olarak gerçekleştiği yol fekal-oral transmisyondur ve bu kontamine sularla ilişkilendirilmiştir (Hulten et al. 1996). Araştırmacılar *H. pylori*'yi bir çok kez feçesde tanımlayabilmiştir ancak kültüre edememiştir. Organizmanın feçesden kültüre edilememesi bu yolla bulaş olmayacağı anlamına gelmez aksine bunun nedeni feçesde gelişen diğer organizmaların *H. pylori*'yi baskılaması olabilir (Axon 2006).

Oral-oral transmisyon

H. pylori'nin oral-oral transmisyonu ile ilgili kesin bir kanıt henüz yoktur. Her ne kadar bazı bireylerin ağızdan (dental plakta) alınan örneklerinde bakteri DNA'sı PZR yöntemi ile dedekte edilmiş olsada bu sonuç tek başına ağızda canlı bir yaşam olduğunu kanıtlanamamaktadır (Li et al. 1996). Bu çeşit bir transmisyon bakterinin mideden reflü ya da transmigrasyon ile özofagusa göçünü gerektirir. Bakteriyi bireylerin ağızlarından alınan örneklerden kültüre etmek şu ana kadar başaramadığı için bu çeşit bir transmisyon çok muhtemel görülmemektedir (Axon 2006).

Gastro-oral transmisyon

Son bir ihtimal ise organizmanın gastro-oral yani kusma yolu ile transmisyonudur (Axon 1995, ve Luxa et al. 2000). *H. pylori* enfeksiyonu genellikle nötral pH'da bir mukusdan oluşan kusmaya neden olan dispeptik bir hastalığa sebebiyet verir. Çocuklar ise kusma konusunda yetişkinlerden daha dayanıksızdırlar ve kusma anında kusma materyali ile temasdan kaçınmak konusunda daha başarısızdırlar.

Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda gastrik asit sekresyonu ve intragastrik pH ölçümlerinin yapılması esnasında kullanılan nasogastrik ekipmanların iki muayene arasında düzenli sterilize edilmemesiyle transmisyon gerçekleştiği gösterilmiştir. Aynı durum yeterli sterilizasyonun sağlanmadığı endoskoplarda da gözlenmiştir (Axon 2006).

Bu çalışmaların yanı sıra bu tip transmisyonun genel bulaş yolu olduğu henüz kesin olarak gösterilememiştir.

1.15 *Helicobacter pylori*'nin Tanısı

1.15.1 İnvaziv yöntemler

Hızlı üreaz testi

Endoskopi ile alınan antral biyopsi örneklerinden uygulanan hızlı üreaz testi hem ucuz hem de kolay bir tekniktir. *H. pylori* üreaz aktivitesi ile ortamın pH'sını yükselterek pH indikatörü ile ortamın rengini değiştirir. Pozitif sonuçların %90'ı ilk yarım saatte görülür ve geri kalanlarda ertesi gün okumayı gerektirir (Dunn et al. 1997). Ticari veya laboratuvarında hazırlanmış hızlı üreaz testleri bulunmaktadır.

Kültür

H. pylori'nin tanısı için altın standart kültür uygulamasıdır (Makristathis et al. 2004). *H. pylori* kültürünün başarısı biyopsi örneğinin alımıyla ekimi arasındaki süreye ve oksijenle temasına bağlıdır. *H. pylori* seçici (antibiyotik içeren) ve seçici olmayan besiyerlerinde, mikroaerofilik ortamda 3-10 günde üretilmektedir.

%5-10 yalancı negatif sonuç alınmaktadır (Dunn et.al. 1997). Kültürde üretilen *H. pylori*'ye antibiyotik duyarlılık testi uygulanabilir, tiplendirme yapılabilir. Uygulanacak antimikrobiyal duyarlılık testleri "The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)" onaylı olan agar dilüsyon ve ülkemizde ve Avrupa ülkelerinde kullanılan E-testtir. Bu testler rutin testler değildirler, belirli aralıklarla antibiyotik duyarlılık paternini tanımlamak amacıyla yapılmalıdır.

Histopatolojik inceleme

Antral biyopsi örneklerinin, rutinde kullanılan hematoksilen-eozinle veya özgülüğün arttığı Warthin-Starry gümüşleme, akridin-oranj ve modifiye Giemsa ile boyandıktan sonra histopatolojik değerlendirilmesi oldukça iyi sonuçlar vermektedir (el-Zimaity et.al. 1996 ve Genta et al. 1994). Histopatolojik inceleme ile gastroduodenal patolojinin seviyesi ve premalign oluşumlar saptanabilir.

Moleküler tanı yöntemleri

Özellikle son yıllarda *H. Pylori* ve diğer *Helicobacter* türlerinin saptanmasında moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaya başlandı (Makristathis et al. 2004). Bu yöntemler tiplendirmede, antibiyotik duyarlılık saptamada ve virülans faktörlerinin belirlenmesinde önem kazanmıştır. Moleküler yöntemler mide biyopsi örnekleri dışındaki örneklerden de *H. pylori* ve/veya diğer *Helicobacter* türlerini saptamak için kullanılabilir. Ancak moleküler bir yöntemle gösterilen *Helicobacter*'in canlı olup olmadığı saptanamaz. Seçilecek DNA ekstraksiyon yöntemi bu testlerin duyarlılığında çok önem taşır. DNA ekstraksiyonunda inhibitörlerin uzaklaştırılması gerekmektedir, doğru yöntem seçilmezse yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir.

1.15.2 İnvaziv olmayan yöntemler

Üre nefes testi

Bu test oral yoldan C13 veya C14 (radyoaktif karbon) işaretli üre alımını takiben, 20-30 dakika sonra solunan hava örneklerinin toplanması ve sonrasında spektrometrik olarak veya sintilasyon cihazlarında sayılması temeline dayanır. İşaretli üre *H. pylori* ile infekte kişilerde bakterinin üreaz enzimi ile parçalanır. Solunum esnasında oluşan CO₂de radyoaktif işaretli karbonlar saptanır.

Serolojik yöntemler

Serolojik yöntemler *H. pylori* tanısında kullanılan yaygın yöntemlerden biridir. Enzim işaretli immünassay (ELISA) yöntemi en sık kullanılan serolojik yöntemdir. *H. pylori* enfeksiyonu antikor yanıtına sebep olur. Özgül IgM antikorlar kısa süreli olarak yükselir, IgG ve IgA enfeksiyon süresince artar ve tedavi edilmedikçe yüksek kalır. Tedaviyi izleyen aylarda tedavi sağlandıysa IgG ve IgA düzeyleri düşer ancak IgG düzeyi hiçbir zaman tamamen negatifleşmez.

Bu testlerde kullanılacak antijenler çok önemlidir. Genellikle üç tip antijen kullanılmaktadır;

1. Tam hücreler ve tam hücre parçaları gibi ham antijenler,
2. Glisin ekstraktları ve ısı değişken olmayan antijenler gibi hücre parçacıkları,

3. Üreaz ve 128 kDa antijen (cagA) gibi zenginleştirilmiş antijenler

“Western Blot”, immüno-blotlama, bakterinin çeşitli bölümlerine karşı oluşan immün yanıtı saptamada kullanılan oldukça duyarlı ve özgül bir yöntemdir (Herbrink et al. 2000).

Dışkı örnekleri için kullanılan tanı yöntemleri

Dışkı kültürü: Dışkı safra asitlerini yüksek oranda bulduran ve birçok bakteriden oluşan zengin bir ortam olduğu için dışkı kültüründe *H.pylori*'yi üretmek oldukça zordur.

Dışkı antijen testleri: Ticari olarak hazırlanmış poliklonal ve monoklonal antikor testleri bulunmaktadır.

Dışkı polimeraz zincir reaksiyonu(PCR): Dışkı PZR inhibitörleri açısından çok zengindir. Bu nedenle uygulanacak DNA ekstraksiyon yöntemi ve inhibitör uzaklaştırılması dışkıda PZR uygulamasında çok önemlidir. Dışkıdan *H. pylori* saptanması için PZR yöntemi kullanılacağı zaman en az iki set primer kullanılması önerilmektedir. Ayrıca, reamplifikasyon, nested PZR yöntemleri dışkıda *H. pylori* saptanmasında testin duyarlılığını arttıracaktır.

1.16 Helicobacter pylori'nin Tedavisi

H. pylori, aktif kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik kanser gelişmesinde önemli etiyolojik rolü olan bir patojendir. *H. pylori* aynı zamanda MALT'a (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) neden olur (Sipponen, 1991; Marshall, 1994). İlk defa 1994'de IARC (International Agency for Research on Cancer) tarafından *H. pylori*, 1.sınıf karsinojen olarak açıklanmıştır. Bu nedenlerden dolayı *H. pylori* tedavisi önem taşımaktadır.

H. pylori'nin eradikasyonunun, peptik ülser nüks oranını düşürdüğü gözlenmiştir (NIH Consensus Conference, 1994). Eradikasyon tanımı ilk defa 1989'da Rauws tarafından yapıldı. Buna göre eradikasyon; tedavinin bitiminden en az 4 hafta sonra bakterinin aynı tanı yöntemleri ile (en az 2 yöntem) görülmemesidir. Klirens ise; tedavinin bitiminden hemen sonra mikroorganizmanın histolojik veya mikrobiyolojik olarak gösterilememesidir.

Bazı araştırmacılar semptomu olsun ya da olmasın, *H. pylori* ile enfekte tüm bireylerin tedavi edilmesi gerektiğini öngörmektedir. Ancak *H. pylori* ile enfekte tüm insanların sadece %20'sinde klinik semptomlara rastlanmaktadır. Bu nedenle *H. pylori* ile enfekte olan bazı bireylerin (peptik ülser hastalığı ve gastrik MALToma'sı olanlar) kesin olarak

tedavisi önerilmiş, bazı bireylerin (aile öyküsünde mide kanseri olanlar uzun süreli asit baskılayıcı tedavi başlamadan önce, NSAID ilaçların uzun süreli kullanımına başlamadan önce, kronik atrofik gastritte, gastrik mukozal displazide) ise kesin olmamakla birlikte tedavisi önerilmiştir (NIH Consensus Conference, 1994).

H. pylori enfeksiyonunda, geniş spektrumlu penisilin türevleri (amoksisilin, ampisillin), nitrofuran türevleri (furazolidon, nitrofuantoin), tetrasiklinler (doksisklin, tetrasiklin), nitroimidazoller (metranidazol, tinidazol, ornidazol) makrolid ve linkosaminler (eritromisin, klaritromisin, roksitromisin) gibi pek çok antibiyotik seçeneği bulunmasına karşın en sık kullanılan antibiyotikler amoksisilin, tetrasiklin, metranidazol ve klaritromisindir. Ancak antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında eradikasyon oranları oldukça düşük olmaktadır. Bu nedenle bizmut tuzları, H₂ antagonistleri (ranitidin, ebrotidin vb.), proton pompa inhibitörleri kullanılır. Proton pompa inhibitörlerinin (omeprazol, pantoprazol, lansoprazol) *H. pylori*'ye karşı; diğer antibiyotiklerle sinerjizm, amonyağın nötralize olmaması (ototoksite), artmış lokal antimikrobiyal konsantrasyon, pH'ın yükselmesi ile antibiyotiğin optimal etkisi, direkt antimikrobiyal etki (MIC omperazol: 50mg/l), güçlü anti-ürezaz etki, konak immüniteye etki, bakteri metabolizmasının ve göçünün engellenmesi gibi etkilere sahiptir (Tygat, 1995). Bizmut tuzları (Kolloidaz Bizmut subsitrat, Bizmut Subsalisilat, Bizmut Subnitrat, Bizmut Galat, Bizmut Subkarbonat) *H. pylori*'nin epitel hücrelere adezyonunu bloke eder, bakteri membranının iç ve dış yüzeyinde birikerek bakterinin mukusdan ayrılıp lizisine neden olur, ürezazı inhibe eder, mukozal proteinlere olan affinitelerinden dolayı oluşan polimer glikoprotein kompleksi, ülserli dokuyu kaplayarak asit pepsin aktivitesine karşı korur, HCO₃ sekresyonunu artırır, prostoglandin sentezler. *H. pylori*'de en sık olarak kolloidaz bizmut subsitrat, daha az olarak bizmut subsalisilat kullanılmaktadır. Diğer bizmut tuzları *invitro* olarak etkili olmalarına rağmen, *invivo* ortamda yeterli eradikasyonu sağlayamamaktadır. Monoterapi ve ikili terapinin başarısızlığından dolayı üçlü tedavi kullanılmaktadır. Üçlü tedavide 2 antibiyotik ve anti-ülser bileşiği kullanılır. Günümüzde tüm dünya da geçerliliği olan en uygun tedavi amoksisilin, klaritromisin ve ranitidin bizmut sitrat veya proton pompa inhibitörlerinden oluşan üçlü tedavidir. Ancak FDA tarafından onaylanan ideal bir tedavi yoktur (Pounder *et al.* 1997).

Birçok antibiyotik *invitro* koşullarda bakteriyi en küçük miktarlarda (minimal inhibitor concentration=MIC) baskıladığı halde *invivo* koşullarda tam bir eradikasyon sağlanamamaktadır.

1.17 *Helicobacter pylori* 'nin Antibiyotik Duyarlılığı

Helicobacter pylori in vitro ortamda çoğu antibiyotiğe duyarlı olmasına rağmen sadece birkaçı klinik olarak efektifdir. *H.pylori* tek kullanıldığı zaman metranidazol, tinidazol ve klaritromisine kısa sürede direnç geliştirebilmektedir. *H.pylori* izolatlarının neredeyse %50'sinin metranidazol direnci göstermesi bu antibiyotiği tedavi için neredeyse kullanılamaz hale getirmiştir. Bu yüksek direncin kesin olmamakla birlikte metranidazolün giardiasis ve amebiasis gibi parazitik enfeksiyonların tedavisinde çok sık kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünölmektedir (Frenck ve Clemens, 2003). Metranidazol ve klaritromisin direncinin sonucu olan başarız tedavi süreçleri düşünöldüğünde başka bir antimikrobiyal ya da PPI artı bizmut artı iki farklı antimikrobiyal kullanımı mantıklı gelmektedir (Goodwin et al., 1997).

Antibiyotik duyarlılığı tedavi sürecinde direnç gelişebileceği için *in vitro*'da güvenilir bir taksonomik özellik değildir. Örneğin aynı suşun farklı izolatlarının metranidazol ve klaritromisin duyarlılıkları farklılık gösterebilmektedir. Polimixin B aktivitesinin *Helicobacter* ve *Campylobacter* cinslerinin ayırımını yapmak için taksonomik bir belirteç olarak kullanılması mümkündür. Çünkü çoğu (%95) *H.pylori* polimixin B'ye direnç göstermektedir. *H.pylori*'nin büyük bir çoğunluğu (%86) nalidiksik asite dirençlidir ve sefalotine de duyarlıdır (Owen, 1998).

1.18 'Champion' pET Ekspresyon Sistemi ve pET 151/D Plazmiti

Champion PET ekspresyon sistemi Studier ve arkadaşları tarafından geliştirilen vektörlerden temel alınmıştır ve bakteriyofaj T7 RNA polimerazının yüksek aktivitesini ve spesifitesini kullanarak regüle edilmiş heterolog genlerin *e.coli*'de ekspresyonuna olanak vermektedir (Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990).

1.18.1 Topoizomeraz I

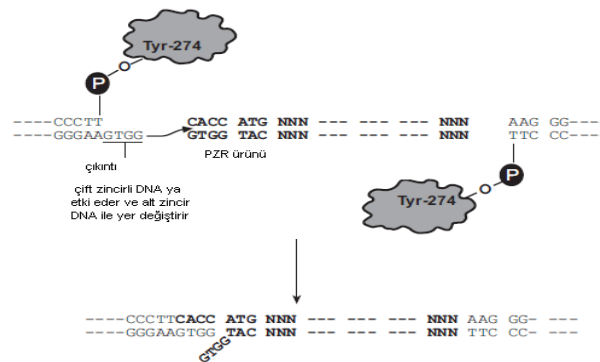
Vaccinia virusundan elde edilen Topoizomeraz I enzimi ikili sarmal DNAya özel noktalardan bağlanarak fosfodiester bağıını 5'-CCCTT dizisinden sonra tek zincirden kırarak ayırır(Shuman, 1991). Kırılan fosfodiester bağından açığa çıkan enerji kırılan zincirin 3' ucundaki fosfat ile topoizomeraz I in bir tirozil rezidüsü(Tyr-274) arasında korunur. Akabinde enzim ile DNA arasında oluşan fosfo-tirozil bağı kırılan orjinal zincirdeki 5' hidroksilin atağına maruz kalır. Buda reaksiyonu tersine çevirir ve topoizomeraz I salınır(Shuman 1994).

TOPO klonlama efektif klonlama için bu reaksiyonu kullanır.

1.18.2 Yönlü Topo Klonlama

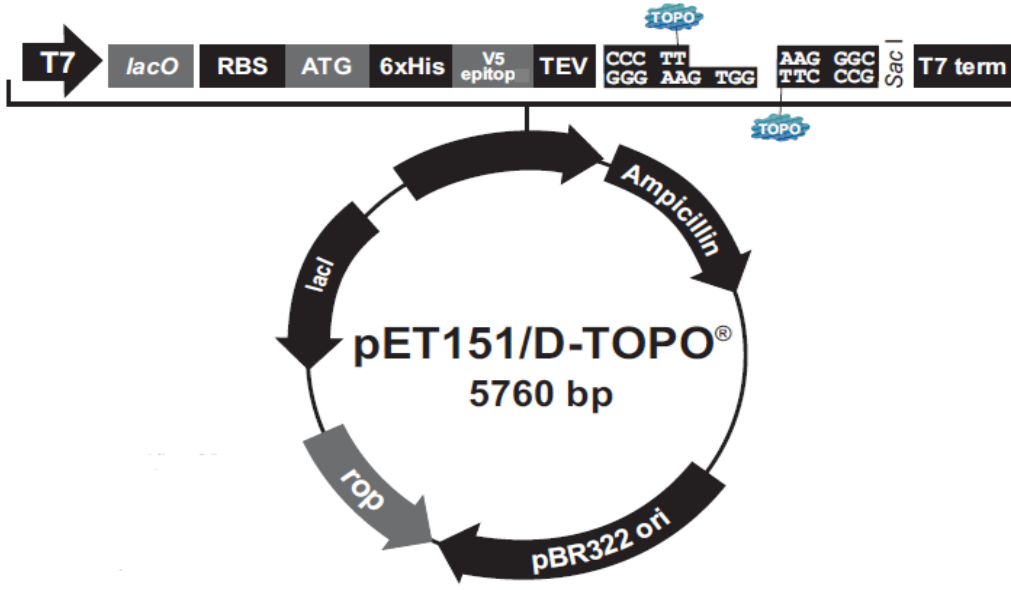
Eklenecek DNA nın TOPO yüklü oligonükleotitler ile yönlü olarak klonlanması eklenecek DNAya 3' tek zincirli bir çıkıntı eklenmesi ile sağlanır(Cheng ve Shuman, 2000). Bu tek zincirli çıkıntı 5' ucundaki Topo yüklü DNA ile komplementerdir. Invitrogen'de bu fikir topo yüklü DNAya 4 nükleotitlik bir çıkıntı eklenerek tüm vektör formatına adapte edilmiştir.

Bu sistemde PZR ürünleri ileri primere 4 baz eklenerek yönlü klonlanmaktadır. Klonlama vektöründeki çıkıntı (GTGG) PZR ürününün 5' ucuna etki eder, PZR ürününe eklenen bazlara bağlanır ve PZR ürününü doğru yönde stabilize eder.



Şekil 1.5: Topo izomeraz kesimi ile yönlü klonlanma mekanizması.

1.18.3 T7 düzenlemeli ekspresyon'un temelleri



Şekil 1.6: pET 151/D TOPO Plazmitinin yapısı

T7 temelli ekspresyon sistemi heterolog genlerin kontrolünü sağlamak için T7 bakteriyofajının lac operonu içerecek şekilde modifiye edilmiş güçlü promotörünü kullanır. Yeterli T7 RNA polimeraz üretildiği zaman polimeraz enzimi T7 promotörüne bağlanır ve ilgilenilen geni eksprese eder.

1.18.3.1 T7 RNA polimerazın regülasyonu

BL21(DE3) hücreleri T7 ekspresyon sistemleri ile spesifik olarak birlikte kullanılırlar. Bunun sebebi ise bu suşun DE3 bakteriyofaj lambda lizojenini bulundurmasıdır. Bu λDE3 lizojeni ise aşağıdaki elementlerden oluşan bir lac yapısına sahiptir.

- Lac repressörünü kodlayan bir lacI geni
- lacUV5 promotörünün kontrolü altındaki T7 RNA polimeraz geni
- lacZ geninin bir bölümü

LacI geni tarafından kodlanan lac repressörü T7 RNA polimerazın ifadesini baskılar. Ortama uyarıcı bir molekülün (izopropil β-D-thiogalaktoz: IPTG) eklenmesi ile lac

repressörü promotordan çekilerek T7 RNA polimerazın lacUV5 promotorundan ifadesine izin verir.

- **Rne131 mutasyonu:** BL21(DE3) hücreleri aynı zamanda rne 131 mutasyonuna sahiptirler. Rne geni 1061 aminoasitden oluşan RNaz E enzimini kodlamaktadır. Bu enzim e.coli nin rRNA olgunlaşmasında ve mRNA degradasyonunda rol alan degradozom isimli kompleksinin bir parçasıdır (Grunberg-Manago, 1999; Lopez et al., 1999). Yapılan çeşitli araştırmalar bu enzimin N-terminalinin rRNA işlenmesi ve hücre döngüsünde rol aldığını, C-terminalinin ise mRNA degradasyonunda rol aldığını göstermiştir (Kido et al., 1996; Lopez et al., 1999). BL21(DE3) hücrelerinde bulunan rne131 mutasyonu ise RNaz E bölgesinin C-terminalini bulundurmayan tamamlanmamış bir RNaz E enzimi kodlarlar. Bu durum da ifade edilen m-RNA ların diğer BL21 hücrelerine kıyasla daha kararlı olmasını sağlar.

Bizim çalışmamızın amacı ise ‘Champion PET Ekspresyon Sistemi’ni kullanarak ileride Türkiye’de özgül ELISA testlerinde kullanılabilen bir rekombinant cagA proteini üretmektir.

Çizelge 1.1: Pet topo 151/D vektörünün yapısal özellikleri

Pet topo 151/D vektörünün yapısal özellikleri	Bulunma amacı
T7 promotörü	Sentezlenecek rekombinant proteinin T7 RNA polimeraz sentezleyen e.coli hücreleri tarafından yüksek düzey IPTG ile uyarılabilir ifadesini sağlar.
T7 ileri bağlanma bölgesi	Anlamli zincirin sekansına olanak sağlar.
<i>Lac</i> operatörü (<i>LacO</i>)	Rekombinant proteinin bazal ekspresyonunu baskılayan <i>Lac</i> repressörünün bağlanma bölgesi.
Ribozom bağlanma bölgesi	Etkin translasyon için topo klonlama bölgesinden uygun uzaklıktadır.
N-terminal 6xhis eki	Rekombinant proteinin metal-rezin çelati ile saflastırılmasına olanak verir. Bunun yanısıra rekombinant proteinin Anti-hisG antikorları ile tespit edilmesini sağlar.
V5 epitopu	Füzyon proteinin Anti-V5 antikorları ile tespit edilmesini sağlar(Southern et al. 1991).
Tev tanıma bölgesi	N-terminal bölgesindeki eklerin TEV proteaz enzimi ile rekombinant proteinden uzaklaştırılmasını sağlar(Carrington ve Dougherty, 1988; Dougherty et al., 1988).
Topo klonlama bölgesi (yönlü)	E.colide ifade edilecek PZR ürününün hızlı klonlanmasına olanak verir.
T7 geri bağlanma bölgesi	Klonlanan bölgenin sekanslanmasına olanak verir.
T7 transkripsiyon sonlanma bölgesi	T7 bakteriyofajından alınan etkin transkripsiyon sonlanmasını sağlayan sekans dizisi.
<i>Bla</i> promotörü	Ampisilin direnç geninin ifadesini sağlar.
Ampisilin direnç geni (β -laktamaz)	E.colide plazmid seçimine olanak verir.
pBR322 replikasyon başlangıç noktası(<i>ori</i>)	E.coli hücresinin replikasyonunu ve devamını sağlar.
<i>ROP</i> açık okuma çerçevesi	pBR322 replikasyon başlangıç noktası ile etkileşerek düşük kopya replikasyonu sağlar.
<i>lacI</i> açık okuma çerçevesi	İlgili genin bazal transkripsiyonunu önlemek için T7lac promotörüne ve T7 RNA polimerazın transkripsiyonunu önlemek için konak kromozomundaki lacUV5 promotörüne bağlanan lac represörünü kodlar.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Gereçler

2.1.2 Hastalar

Bu çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsü'ne gastrik yakınmaları sebebiyle başvuran ve endoskopi ünitesinde endoskopik incelemeleri yapılan 112 hastanın mide biyopsi örnekleri dâhil edildi.

2.1.3 Kimyasal Maddeler

Kimyasal madde	Üretici firma
Agar	Vivantis, Malezya
Tris hcl	Sigma, ABD
Akrilamid	Sigma, Almanya
Bis-akrilamid	Quantum, ABD
Sds	Sigma, Almanya
Amonyun per sülfat (Aps)	Applichem, Almanya
IPTG	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Temed	Bio-Rad, ABD
Lizozim	Boehringer Mannheim, Almanya
Proteinaz-k	Sigma, Almanya
Tris base	Vivantis, Malezya
Glycine	Sigma, Almanya

Metanol	Merck, Almanya
Asetik asit	Riedel De Haen, Almanya
Coomassie blue R-250	Applichem, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Fenol	Applichem, Almanya
Kloroform	Applichem, Almanya
Mutlak Alkol	Kimetsan, Türkiye
Gliserin	Sigma, ABD
Brain heart infüzyon agar	Lab M, UK
Amfisilin	Applichem, Almanya
Luria Broth	Applichem, Almanya
Yeast extract	Difco, ABD
KCl	Sigma, ABD
CaCl ₂	Merck, Almanya
KOH	Horasan Kimya, Türkiye
MnCl ₂	Amresco, ABD
Gene ruler 1kb plus DNA ladder	Fermentas, Litvanya
Gene ruler 50 bp ladder	Fermentas, Litvanya
Etidium Bromide	Sigma, Almanya
Gas Generating Kit	Oxoid, UK

2.1.4 Tampon ve Çözeltiler

TE tamponu

100mM TrisHCl

1 mM EDTA

pH= 8'e ayarlanır.

%10'luk SDS

5g SDS

50 ml'ye dH₂O ile tamamladı.

Comassie Boyama Solusyonu

%50 Metanol

%10 Asetik asit

%40 H₂O

% 0,25 coomassie

1X SDS Buffer

0.5 M Tris-HCl,pH 6.8 1.25 ml

Gliserol (100%) 1.0 ml

β -merkaptoetanol 0.2 ml

Bromofenol Blue 0.01 g

SDS 0.2 g

Bileşenler karıştırılıp toplam hacim dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı ve -20'de muhafaza edildi.

Destain (Durulama) Çözeltisi

%5 Metanol

%7,5 Asetik asit

%87,5 dH₂O

Akrilamid (%40'lık) (37,5:1)

2.6 g bis-akrilamid

97,4 g akrilamid

dH₂O ile 250 ml ye tamamlandı.

SDS-page Tamponu (10X)

30.3 g Tris-Base

144g Glisin

10g SDS

dH₂O ile 1 lt ye tamamlandı.

1.5M Tris-HCl pH: 8,8

181,5 g Tris Base 900ml saf suda çözüldü. HCl ile pH'ı ayarlandı. Saf su ile 1 lt'ye tamamlandı.

0,5M Tris-HCl pH:6.8

12,1g Tris-Base 150 ml dH₂O'da çözüldü.

HCl ile pH'ı 6,8'e ayarlandı.

Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Semidry Transfer Tamponu (5 X)

29 g Tris

14.5 g Glycine

1.85 g SDS

1 L için

pH 8,3'e ayarlanır.

(1 X için 16 ml 5X, 20 ml metanol, 100 ml ye su ile tamamla)

10X TBS stok (1 litre için)

24.23 g Trizma-HCl

80.06 g NaCl

Çözeltinin pH'ı 7.6 civarı olmaktadır. (+4°C'de saklanır)

TBST

10X'lik TBS stoğu 1X'e seyreltilir ve içine son hacim oranı %0.05 (v/v) olacak şekilde Tween 20 koyulur (Ör: 10 ml 10X stok + 89.95 ml ultra saf su + 50 µl Tween 20). (+4°C'de saklanır)

Bloklama Tamponu

TBST içine %5 (w/v) oranında BSA koyulur (Ör: 5 g BSA tartılıp 100 ml'ye TBST ile tamamlanır).

2.1.5 Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj Hettich Zantrifugen Mikro 200R, Almanya

Su banyosu, Memmert

Thermal cycler cihazı, Applied Biosystems Gene Amp. PCR System 9700, ABD

Thermal cycler cihazı (Eppendorf Mastercycler Personal), Almanya

Hassas terazi Sartorius 110g-0,0001 g, Türkiye

Kuru blok Techne DB.2D, İngiltere

Etüv N-500 Nüve, Türkiye

Jel görüntüleme sistemi, UVP Jel Dökümantasyon Sistemleri, Olympus 40X kamerası, Japonya

Otoklav Transmedikal, Türkiye

Manyetik karıştırıcı Boeco/ MSH 300, Almanya

Dikey Jel Elektroforezi Thermo Scientific(Owl), Amerika

Shaker Isıtıcılı Heidolph unimax 1010 / inkübatör 1000, Almanya

UVP, UV CL-1000 ultraviolet crosslinker, Amerika

PH metre Mettler Toledo mp220, İsviçre

Nanodrop ACTGene Asp-2680, Amerika

Vorteks Nüve, Türkiye

Yatay jel elektroforezi Hu13 SCIE Plas, İngiltere

Distile su cihazı GFL 2002, Almanya

-80 buzdolabı Sanyo CFC-Free, İngiltere

Sıvı azot tankı International cryogenics Inc. IC 20D, Amerika

2.1.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri

Taq DNA Polimeraz (5 ünite) (MBI Fermentas, Litvanya)

10X Tampon (750 mM Tris-HCl, 200mM (NH₄)₂SO₄, % 0.1

25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, Litvanya)

dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, dTTP) (Fermentas, Litvanya)

0,2 ml'lik PZR tüpleri (Grenier Bioone, Avusturya)

2.1.7 Kullanılan Kitler

Invitrogen 'Champion pET 151/D Directional Topo' Ekspresyon Vektörü

Invitrogen One Shot Kompotent Hücreleri

Invitrogen BL21(DE3) Star Kompotent Hücreleri

Macherey- Nagel'in NükleoSpin Extract II

Macherey- Nagel'in NükleoSpin Plasmid

Invitrogen Anti-HisG HRP Antikor

2.2 Yöntem

2.2.1 Bakteri Kültürü ve Saklanması

Toplam 112 hastadan, endoskopi ünitesinde alınan mide biyopsi örneklerinin 72'si , steril serum fizyolojik içinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra en geç dört saat içinde kültürünün yapılması için işleme alındı. Ardından, steril öze ile % 7 oranında taze, defibrine at kanı ve beyin-kalp infüzyon agar (brain- heart infusion agar) içeren plaklara ekim yapıldı. Beyin-kalp infüzyon agar ise üretici firmanın önerisi doğrultusunda 500 ml distile suya 26 gram eklenerek önce kaynar su banyosunda 30 dakika eritildi ve daha sonra da otoklavlanarak hazırlandı. Agar 45-50°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra, daha önceden hazırlanan 5mg/l 'lik Ampfoterisin B ve 10 mg/l 'lik Vankomisin çözeltilerinden 1'er mg pozitif mikroorganizmalar ve fungusların üremesini önlemek amacıyla besiyerine kondu. Daha sonra hızla, taze defibrine at kanından 35 ml karışıma eklendi, karıştırıldı ve

plaklara 20'şer ml dağıtıldı. Dağıtıldıktan sonra besiyerindeki hava kabarcıklarını patlatmak ve kontaminasyonu engellemek amacıyla plakların üzerinde bek alevi gezdirildi. Besiyerinin donması için oda sıcaklığında beklendikten sonra plaklar +4°C'ye kaldırıldı. Daha sonra *H. pylori*'nin üremesi için uygun atmosfer ortamını (%5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂) sağlamak amacıyla anaerob kavanoza 'Gas Generating Kit' (Oxoid, İngiltere) ve nemli ortam sağlamak için de nemli bez kondu. Üremenin olması için 37°C 'lik etüvde 4 ila 7 gün inkübe edildi.

Üreaz testi: Hastalardan alınan biyopsi örnekleri 'üre broth base' içeren besiyerinde 2 saat 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kırmızı renk oluşması halinde test pozitif olarak değerlendirildi.

Her 2 uygulama (kültür ve üreaz test) sonucu pozitif olarak sonuçlanan biyopsi örnekleri *Helicobacter pylori* pozitif olarak değerlendirildi ve genomik DNA ekstraksiyonu yapılmak üzere -80°C'de saklandı.

Suşlar, %15 gliserol içeren Brucella Broth ile hazırlanan saklama solüsyonunda saklandı. Saklama solüsyonu, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 2.81 gr brucella broth tartılıp, 100 ml distile suda kaynar su banyosunda eritildikten sonra, otoklavlanarak hazırlandı. Agarın 45- 50°C 'ye soğuması beklendikten sonra 75 ml brucella broth'a 15 ml gliserol eklenerek, %15 gliserol içeren brucella broth saklama solüsyonunu hazırlanmış oldu. Üreyen koloniler öze yardımıyla bu karışımdan 1ml içeren 'cryo-vial' lere hızla aktarıldıktan sonra, vakit kaybetmeden -80°C'lik derin donduruculara kondu. Besiyerine ekilen 72 örnekten üreyen 46 örnek bu yöntemle saklandı.

2.2.2 Kültür'den Bakteri Genomik DNA İzolasyonu

1. Üreyen örneklerdeki koloniler 750 µl TE tamponu içeren ependorf tüplere steril öze ile aktarıldı.
2. Bakteri pelletinin çökmesi için 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonunda bakteri pelleti, 400 µl TE tamponu ile yıkandı ve bakteri duvarını parçalamak amacıyla 100µl, 10 mg/ml' lik lizozim eklendi ve 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyonu yapıldı.

4. Süre bitiminde hücre zarını parçalamak için, % 10'luk SDS'den 50 µl eklenerek yine 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyonu yapıldı.
5. Daha sonra, proteinleri parçalamak amacıyla, 10mg/ml 'lik proteinaz K'dan 5 µl eklenerek 56°C'lik su banyosunda 1 saat inkübasyonu yapıldı.
6. İnkübasyon sonunda, tüpteki karışıma eşit hacimde fenol eklenip 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonunda DNA içeren üst faz temiz tüpe aktarılarak bir kez daha eşit hacimde fenol eklendi ve 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
8. Üst faz temiz tüpe alınarak karışımın hacmiyle eşit hacimde kloroform eklendi ve 10.000 rpm'de santrifüj yapıldı.
9. Üst faz temiz tüpe alındı ve DNA'yı çöktürmek amacıyla, 20 µl 3M'lik sodyum asetat ve karışımla eşit hacimde mutlak alkol eklenerek -20°C'de bir gece bekletildi. Böylece etanolün DNA'yı çöktürmesi sağlandı.
10. Bir gece sonra -20°C'den alınıp 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı.
11. Santrifüj sonunda üst faz döküldükten sonra, 1ml, %70'lik etanolle pellet yıkandı ve tekrar 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz pipet yardımıyla alınarak pellet oda sıcaklığında 10 dakika kurumaya bırakıldı.
12. Son olarak da 100 µl distile su ile pellet çözülüp 56°C'ye ayarlanmış ısıtıcıda 2 dakika beklendi. Elde edilen DNA solüsyonu daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.2.3 Biyopsi Örneklerinin Saklanması

Endoskopi sırasında alınan mide biyopsi örnekleri (ortalama 1–10 mg ağırlığında), %20'lik dekstroz çözeltisi içinde laboratuara ulaştırıldıktan sonra -80 °C'de, vidalı kapaklı tüpler içinde saklandı.

2.2.4 Biyopsi Örneğinden Bakteri Genomik DNA Ekstraksiyonu

Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü ve Gastroenteroloji Araştırma Laboratuvarına gelen, toplam 40 mide biyopsi örneğinden *H. pylori* DNA ekstraksiyonunda sırasıyla şu basamaklar izlendi;

1. Çalışmadan önce örnekler -80°C'den çıkarıldı ve oda sıcaklığında eritildikten sonra 400 µl steril %0,085'lik (wt/vol) NaCl çözeltisinde doku homojenizatöründe 10 sn parçalandı (ya da cam havanda ezildi).
2. Ardından mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 13 000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
3. Santrifüj sonunda üst faz atıldı ve pellet 300 µl, TrisHCl (ph=8) tamponunda çözüldü.
4. 10 mg/ml'lik proteinaz K'dan 15µl eklendi.
5. 15 sn vorteks yapıldı.
6. 56°C'de kuru blokta 1 saat inkübasyon yapıldı.
7. 100 °C'de 10 dk daha inkübe edilerek proteinaz K'nın inaktivasyonu sağlandı.

2.2.5 PZR ile Genomik DNA Varlığının Doğrulanması

Genomik dna izolasyonu yapılan toplam 86 hastanın biyopsi ve kültür örneklerinden elde edilen DNA'ların *Helicobacter pylori* pozitif olduğunu ve izolasyonun başarılı olduğunu saptamak için konvansiyonel PZR yapıldı. PZR'de 23S RNA bölgesini çoğaltan ZGE23 ileri ve DP1 geri primerleri kullanıldı.

PZR reaksiyonu aşağıda verilen koşullarda gerçekleştirildi ve sonuçlar etidyum bromür ile muamele edilmiş %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV altında gözlemlendi

Çizelge 2.1: PZR'de 23S RNA bölgesini çoğaltan ZGE23 ileri ve DP1 geri primerlerinin sekansları.

İleri Primer DP1	5' ACGGCGGCCGTA ACTATA 3'
Geri Primer ZGE23	5' ACAGGCCAGTTAGCTA 3'

Çizelge 2.2 23s rRNA PZR reaksiyon karışımı

dH ₂ O	29.5µl
dNTP (2mM)	5µl
Tampon (10X)	5µl
MgCl ₂ (25 mM)	3µl
İleri primer (ZGE23) 10pmol	1µl
Geri primer (DP1) 10pmol	1µl
Taq polimeraz(5u)	0.5µl
DNA	5µl
Toplam hacim	50µl

Çizelge 2.3 23s rRNA PZR reaksiyon koşulları

95°C	5 dk
95 °C 1 dk	
50 °C 1 dk (30 Döngü)	
72 °C 2 dk	
72 °C	7 dk

2.2.6 PZR ile CagA Pozitifliğinin Saptanması

Bu çalışmada cagA pozitifliğini saptamak amacıyla Empty Site(Boş Bölge) PZR methodu kullanıldı. ‘Boş Bölge’ elimizdeki DNA örneklerinde cagA gen bölgesinin olup olmadığını görmemize imkan sağlayan bir PZR methodudur. Ancak bunu cagA bölgesini değil cagA’ya komşu bölgeleri çoğaltarak sağlamaktadır. Bu da beklenenin aksine pozitif değil negatif suşlarda bant görmemizi sağlamaktadır. Bu PZRde 468 ileri ve 496 geri primerleri kullanılarak 324 bp’lik bir bölge çoğaltıldı ve sonuçlar etidyum bromür ile muamele edilmiş %2 lik agaroz jelde görüntülendi.

Çizelge 2.4: F1-468 ve R1-496 primerlerinin dizisi

İleri primer F1-468 HP519	5’ gct tgc ttg tat tgg cct tg 3’
Geri Primer R1-496 HP549	5’ gca tgc aca ttc cct aaa gt 3’

Çizelge 2.5 ‘Empty Site’ PZR reaksiyon karışımı

dH ₂ O	28.6 µl
Tampon (10X)	5 µl
dNTP (2mM)	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
İleri primer 468 (10 pmol)	1.5 µl
Geri primer 496 (10 pmol)	1.5 µl
Taq DNA polimeraz(5u)	0.4 µl
DNA	5 µl
Toplam Hacim	50 µl

Çizelge 2.6 ‘Empty Site’ PZR reaksiyon koşulları

95°C	2 dk
95°C	30 sn
57 °C	30 sn (40 Döngü)
72 °C	20 sn
72 °C	5 dk

2.2.7 PZR ile EPIYA Motiflerinin Saptanması

CagA pozitif olduğu saptanan suşların içerdikleri EPIYA motiflerini gözlemlemek amacıyla PZR gerçekleştirildi (Argent et. al 2005). CagA gen bölgesinde 3 farklı tirozin fosforilasyon motifi gözlemlendiğinden 3 farklı primer çifti ile 3 farklı reaksiyon karışımı hazırlandı. PZR için cagA28F, cagAP1C, cagAP3E, cagAP2GC ve cagAP2TA primerleri kullanıldı. Sonuçlar etidyum bromür ile muamele edilmiş %2’lik agaroz jelde UV altında kontrol edildi.

Çizelge 2.7: EPIYA motiflerini belirlemek amacıyla kullanılan primerlerin dizileri

İleri Primer: cagA28F	5' TTCTCAAAGGAGCAATTGGC 3'
Geri Primer: cagA-P1C	5' GTCCTGCTTCTTTTTATTAACCTKAGC 3'
Geri Primer: cagA-P2GC	5' TTTAGCAACTTGAGCGTAAATGGG 3'
Geri Primer: cagA-P2TA	5' TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG 3'
Geri Primer: cagA-P3E	5' ATCAATTGTAGCGTAAATGGG 3'

Çizelge 2.8 EPIYA motiflerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun bileşenleri

P1 motifi		P2 motifi		P3 motifi	
dH ₂ O	29.6 µl	dH ₂ O	28.6 µl	dH ₂ O	29.6 µl
Tampon 10X	5 µl	Tampon 10X	5 µl	Tampon 10X	5 µl
dNTP 2mM	5 µl	dNTP 2mM	5 µl	dNTP 2mM	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl	MgCl ₂ (25mM)	3 µl	MgCl ₂ (25mM)	3 µl
İleri primer: cagA28F	1 µl	İleri primer: cagA28F	1 µl	İleri primer: cagA28F	1 µl
Geri primer: cagAP1C	1 µl	Geri primer: cagAP2GC	1 µl	Geri primer: cagAP3E	1 µl
-	-	Geri primer: cagAP2TA	1 µl	-	-
Taq polimeraz(5u)	0.4 µl	Taq polimeraz(5u)	0.4 µl	Taq polimeraz(5u)	0.4 µl
DNA	5 µl	DNA	5 µl	DNA	5 µl
Toplam hacim	50 µl	Toplam hacim	50 µl	Toplam hacim	50 µl

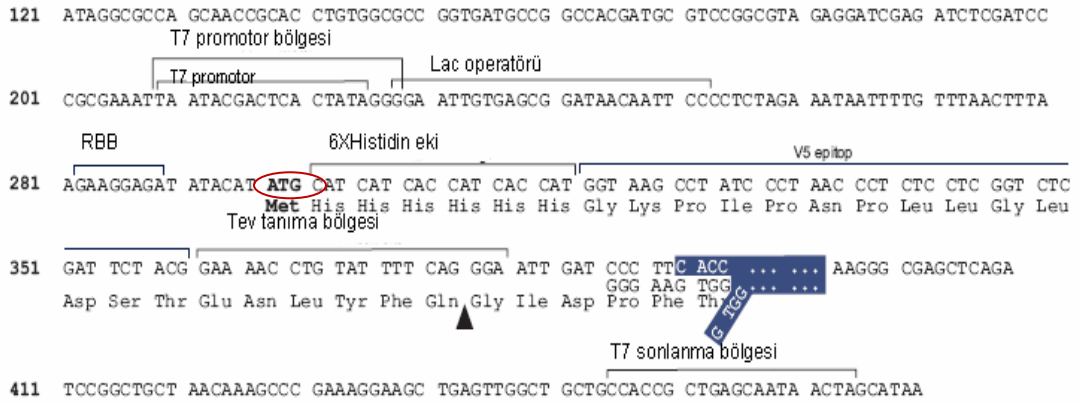
Çizelge 2.9 EPIYA motiflerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun koşulları

95°C	2 dk
95 °C	30sn
57 °C	30sn (35 Döngü)
72 °C	50sn
72 °C	5dk

2.2.8 Klonlanacak bölge için gerekli primerlerin tasarlanması ve PZR ile çoğaltılması

Klonlanacak bölgeyi çoğaltmak için kullanılacak primerler çoğunlukla Avrupa'da hakim olan *Helicobacter pylori* referans sekanslarının hizalanarak *cagA* genindeki antijenitesi ve korunmuşluğu en yüksek bölgelerin seçilmesi ile yapıldı. Primer tasarlanması herhangi bir primer tasarlama programı kullanılmaksızın yapıldı.

Tasarlanan primerler klonlanma işleminden sonra pet plazmitinin okuma çerçevesine uyum sağlayacak şekilde düzenlendi ve yönlü klonlanmanın sağlanabilmesi için ileri primerin 5' ucuna CACC dizisi eklendi. Etkin transkripsiyon sonlanmasını sağlayabilmek amacı ile geri primere sonlanma kodonu olarak TAATAA dizisi eklendi.



Şekil 2.1 Pet 151/D plazmitinin sekans analizi. T7 promotor, klonlanma, sonlanma, 6Xhistidin ve TEV tanıma bölgeleri. ATG: Başlangıç kodonu RBB: Ribozom bağlanma bölgesi

Çizelge 2.10: F2 ve R8 primerlerinin dizileri

F2-İleri primeri	5' CACC GAA TTC AAA AAT GGC AAA AA 3'
R8-Geri primeri	5' TTA TTA ACC TGC TTT AGC TTC TGA TAC CG 3'

Çizelge 2.11 Klonlanacak bölgenin PZR reaksiyon bileşenleri

dH ₂ O	12.75 µl
Tampon 10X	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 µl
dNTP(10 mM)	0.5 µl
F1-cagA(10 pmol)	1.25 µl
R8-cagA(10 pmol)	1.25 µl
Taq (5u)	0.5 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	25 µl

Çizelge 2.12 Klonlanacak bölgenin F2 ve R8 primerleri ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonun koşulları

95° C	2 dk
95° C	30sn
59° C	30sn (40 Döngü)
74° C	1.5 dk
74° C	5 dk

2.2.9 Klonlanacak Bölgenin Jelden Ekstraksiyonu

Jelden ekstraksiyon işlemi Macherey- Nagel'in NükleoSpin Extract II kiti ile gerçekleştirildi.

1. %1'lik jelde yürütülen pcr ürünleri jel ultraviyole ışığa en az şekilde maruz bırakılarak neşter yardımı ile kesilerek alındı.
2. Alınan jel parçası 500 µl NT tamponu içinde 56°C dereceli su banyosunda çözülene dek 5–10 dk beklendi.
3. Çözelti daha sonra filtreli tüplere aktarıldı ve 11.000g de 1dk çevirildi.
4. Alt tüp atılarak yenilendi ve filtre üzerine 600 µl NT3 tamponu eklendi.
5. 11.000g de 1 dk çevirildi.
6. Alt tüp değiştirildi ve içerideki alkolü uçurmak için boş olarak tekrar 2 dk çevirildi.
7. Filtre ependorf içine alındı ve üzerine 15–50 µl arasında distile su eklendi.
8. Oda sıcaklığında 1 dk beklendi.
9. 11.000g de son kez 1 dk çevirildi ve alt tüp alınarak DNA ürünü muhafaza edildi.

2.2.10 Ekspresyon Vektörüne Klonlama

Ekspresyon vektörüne klonlama gerçekleştirilirken PZR ürünü: TOPO vektör molar oranının 0.5:1 den 2:1 e kadar olmasına dikkat edildi.

Çizelge 2.13 Klonlama reaksiyonu

Ürünler	Kimyasal kompetent <i>e.coli</i>
PZR ürünü	2 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	2 µl
TOPO vektör	1 µl
Toplam hacim	6 µl

1. Reaksiyon nazikçe karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi (22-23°C).
2. Reaksiyon buz üstüne alındı ve transformasyon aşamasına geçildi.

2.2.11 Kimyasal Kompotent Hücelere Transformasyon

1. Bir tüp OneShot TOP10 kimyasal kompetent hücresi bir önceki aşamada hazırlanan 3µl klonlama ürünü ile karıştırıldı. Pipet ile al ver yapmamaya özen gösterildi!
2. Buz üzerinde 5 ila 30 dk arası inkübe edildi.
3. Hücreler 30 sn 42°Cde su banyosunda bekletilerek ısı şoku uygulandı.
4. Ardından hemen tekrar buza geçirildi.
5. Hücrelerin üzerine 250 µl oda sıcaklığında S.O.C besiyeri eklendi.
6. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı ve yatay vaziyette 1 saat 200rpm'de 37°C de çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. Hücre ürünleri biri az biri çok hücre içerecek şekilde iki agar plağa dağıtıldı ve geceboyu 37°C etüvde inkübe edildi.

8. Ertesi gün her örnekten 5'er koloni alınarak sıvı besiyerine ekildi ve bir gece daha 37°C etüvde inkübe edildikten sonra plazmit izolasyonuna geçildi.

2.2.12 Düşük Kopya Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu Macherey- Nagel'in NükleoSpin Plasmid kiti ile gerçekleştirildi.

1. Bir gece önceden seçici antibiyotik içeren sıvı LB de büyütülen yaklaşık 6ml hücre 20 dk 11.000g'de satrifüjlenerek çökertildi. Üzerindeki besiyeri atılarak bakteri peleti elde edildi.
2. Bakteri peleti 250 µl +4 derecede muhafaza edilen A1 tamponu içinde iyice çözülerek pellet 2ml lik ependorflara alındı.
3. Üzerine 250 µl A2 tamponu eklendi. Hücrelerin A2 tamponu(Lizis tampon) içerisinde bekletme sürelerinin 5dk'yı geçmemesine özen gösterildi.
4. Tam 5 dk sonra A3 tamponundan(Nötralize edici tampon) 300 µl eklendi ve e.coli hücrelerinin patladığı gözlemlendi.
5. Patlayan hücreler 5-10 dk 11.000 g de çevirildi.
6. Supernatant üretici firmanın sağladığı silika filtreli tüplere alındı. Tekrar 1 dk 11.000g de çevirildi.
7. Üstteki filtre yeni tüpe alındı ve üzerine 600 µl A4 tamponu (Yıkama tamponu) eklendi. Tekrar 1 dk 11.000 g de çevirildi.
8. Filtre temiz tüpe alındı ve 2 dk boş olarak çevirildi ve alkolün uçması sağlandı.
9. Son olarak 50 µl distile su filtreler üzerine eklendi, oda sıcaklığında 1 dk beklendi ve 1 dk 11.000 g de çevirildi.
10. Filtreler atıldı ve bu sefer altdaki tüpler muhafaza edildi.

İzolasyon ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek gözlemlendi.

2.2.13 Plazmitlerden Pozitif Klonların Seçimi ve Sekanslanması

Seçilen klonlardan izole edilen plazmitlerin içerisindeki fragmentlerin doğrulanması amacı ile klonlanacak bölgenin çoğaltıldığı F1 ve R8 primerleri ile tekrar bir PZR reaksiyonu gerçekleştirildi ve klonların hedef bölgeyi içerip içermediği gözlemlendi.

PZR reaksiyonu sonucunda pozitif olduğu doğrulanan plazmitlerin sekanslanma işlemleri ise Perkin Elmer Genetic Analyzer ABI Prism 3100 cihazında T7 promotör ve geri primerleri ile gerçekleştirildi. Primer yoğunlukları 3.2 pmol'e indirildi.

2.2.14 Plazmitlerin Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu

1. Transformasyon başına bir tüp BL21(DE3) Star kompetent hücresi çözüldü.
2. Her tüpe 1-5 µl hacim içerisinde 5-10 ng plazmit eklendi ve hücreler pipet ucu ile nazikçe karıştırıldı. Hücrelere pipetleme yapılmadı.
3. Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
4. Hücreler sallanmadan 42 °C derecede 30 sn ısı şokuna maruz bırakıldı.
5. Hızlı bir şekilde buza tekrar alındı.
6. 250 µl oda sıcaklığında S.O.C besiyeri eklendi.
7. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak yan bir şekilde 30 dk 37 dereceli inkübatörde 200 rpm de çalkalanarak inkübe edildi.
8. Tüm transformasyon ürünü seçici antibiyotik içeren sıvı veya katı LB ye ekilerek gece boyu inkübasyona bırakıldı.
9. Ekspresyon aşamasına geçildi.

2.2.15 Ekspresyon

1. Gece boyu büyütülen kültürden 500 µl alınarak 10 ml LB ye inoküle edildi.
2. OD 0.5-0.8 arasına ulaşınca dek 37° C li çalkalayıcı inkübatörde büyütülmeye devam edildi.
3. Bakteri yoğunluğu beklenen düzeye ulaşınca kültür iki tane 5 ml lik tüplere ayrıldı. Kültürlerden birine son konsantrasyonu 0.5-1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. Diğer kültüre ise hiçbirşey eklenmeden kontrol olarak bırakıldı.
4. Hücreler 37° C de büyütülmeye devam edildi. 4-6 saat sonrasında örneklerden 2'şer ml SDS-Page de gözlemlenmek üzere mikrosantrifüjde maksimum hızda 30 sn çevirildi. Supernatant atılarak bakteri peleti -20 °C derecede saklandı.

2.2.16 SDS Page Analizleri

SDS-page hesaplamaları Prof. Dr. Nilgün Halloran'ın <http://proteomics.awardspace.info/Chemistry%20calculator.html> linkindeki Biochemist's Reference Calculator programı aracılığı ile yapıldı.

Çizelge 2.14: SDS-page jel bileşenleri.

	'Running jel'	'Stacking jel'
Hacim hesaplamalarında % 15'lik pipetleme hatası eklenmiştir.		
Son yüzde	%12	%4
Jel özellikleri	Jel sayısı: 1	
	Jel yüksekliği: 7 cm	Jel yüksekliği: 3 cm
	Jel eni: 9 cm Jel derinliği: 1mm	
Toplam hacim	8 ml	4 ml
1.5 M Tris HCl, pH 8.8	2ml	–
0.5 M Tris HCl, pH 6.8	–	1ml
%40 T/2.6% C (37.5:1) Akrilamid / Bisakrilamid	2.4ml	400 µl
% 10'luk SDS	80 µl	40 µl
Ultra saf su (Tip I, 18MΩ)	3.476ml	2.536ml
% 10'luk amonyum per sülfat	40 µl	20 µl
TEMED	4 µl	4 µl
*Amonyum sülfatı taze hazırlanmalı:	70 µl distile su içerisinde 7 mg APS	

SDS-Page analizlerinde 10x10 cm'lik jel kalıpları kullanıldı. 'Running' ve 'Stacking' olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı. Jel bileşenleri TEMED ve APS hariç sırasıyla iki jel karışımına da eklendi. Temed ve Aps akrilamid ve bis-acrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için jel dökülmeden hemen önce eklenerek jeller

hızlı bir şekilde döküldü. Önce running jel döküldü. Bunun hemen ardından running jelin üst yüzeyinde herhangi bir pürüzlü yapı ve hava kabarcığı kalmaması için jel üzerine %20'lik izopropanol eklendi ve jelin polimerize olması beklendi running jelin polimerize olduğu gözlemlendikten sonra stacking jele de TEMED ve APS eklenerek bu jelde running jelin üzerine döküldü ve jel üzerine 10'lu taraklar yerleştirildi. Stacking jelinde polimerize olduğu gözlemlendikten sonra jel hemen kullanılmayacaksa hava almayacak şekilde sarılarak +4 dereceye kaldırıldı. Hemen kullanılacaksa dikey jel elektroforezi sistemine yerleştirildi ve tank 1X SDS tampon çözeltisi ile dolduruldu. Önceden hazırlanan bakteri pelletleri 80 µl 1X SDS tamponu içinde çözüldü. 5 dakika 100 °C derecede inkübe edildi ve en fazla 20 µl olacak şekilde yüklendi. Protein yükleme işlemi tamamlanan jeller 75 ila 100 V arasında 1.5-3 saat yürütüldü. SDS jellerin yürümesi de tamamlandıktan sonra jeller comassie blue boya içerisinde alınarak gece boyu boyama işlemine bırakıldı. Ertesi gün destain (durulama) çözeltisi ile berrak hale gelinceye kadar muamele edilen jeller daha sonra uygun ışıklar altında analiz edildi.

2.2.17 Western Blot Analizleri

Herhangi bir örnekten elde edilen ve çok sayıda protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak için moleküler biyolojide en yaygın olarak kullanılan yöntem Western Blot yöntemidir. Bu şekilde ilgilenilen bir proteinin örnekte bulunup bulunmadığı ve bulunuyorsa göreceli olarak (yarı kantitatif) farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir. Uygulanan protokol ve kullanılan boyaya göre değişmekle birlikte, bu yöntemle membran üzerinde bulunan 5 ng gibi az miktardaki proteinler dahi tespit edilebilir.

Western blot işlemi birbirini takip edecek şekilde, (1) proteinlerin membrana aktarımı, (2) bloklama, (3) birincil antikor uygulanması, (4) ikincil antikor uygulanması ve (5) görüntüleme olmak üzere temel olarak beş basamaktan oluşur.

İlk aşamada, jelde ayrılan proteinler membrana aktarılır ve diğer tüm işlemler bu membran üzerinde gerçekleştirilir.

Proteinlerin membrana aktarımı pasif (kapiler) emdirim ve elektro-emdirim (electro-blotting) olmak üzere temelde iki yöntemden biriyle yapılabilir. Pasif emdirimde membran ile jel üst üste koyulur ve aktarma tamponuyla ıslatılmış kalın filtre kağıtları arasına yerleştirilir. Daha sonra bunların üzerine ağırlık koyularak jeldeki bantların, ıslak filtre kâğıtlarındaki tamponun kılcal etkisiyle membran tarafından emilmesi sağlanır. Ancak bu işlem birkaç gün sürdüğünden genellikle daha hızlı ve etkin olan elektro-emdirim yöntemi kullanılır.

Elektro emdirim ıslak (wet blotting, tank aktarım sistemiyle) veya yarı kuru (semi-dry blotting, uygun cihazlarla) olarak yapılabilir. Islak emdirimde yine jel ve membran üst üste koyulur ve filtre kağıtlarıyla sandviç şeklinde hazırlanıp anot ve katot taraflarına dikkat ederek içinde transfer tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilir. Bu işlem 45 dk-1 sa gibi çok kısa bir sürede tamamlanır.

Yarı kuru emdirimde ise yine sandviç şeklinde hazırlanmış jel ve membran uygun cihazlarla yatay olarak elektrik akımı verilir.

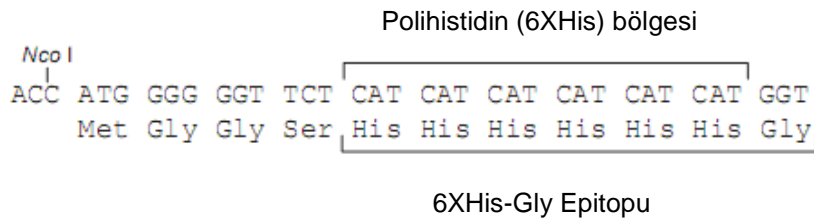
Western blot yönteminde ikinci basamak olan bloklama işleminde amaç membrana aktarılan proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılmasıdır (özellikle proteinlerin saptanmasında antikor gibi immünolojik etkileşimler kullanılacaksa). Bu sayede yine protein yapısında olan antikorların membranın boş kısımlarına bağlanması en aza indirgenmiş olur ve proteinlere bağlanma oranı da en üst seviyeye çıkarılır. Bu amaçla, kullanılan membranın özelliğine ve uygulanan protokole göre çeşitli bloklama tamponları/çözeltileri kullanılabilir. Bloklama için genellikle protein ajanlar tercih edilir. Bunlardan en çok kullanılanlar sığır serum albümini (BSA), yağsız süt tozu ve jelatindir (genelde tercih edilmez). Tween-20, NP-40 ve Triton X-100 (genelde tercih edilmez) gibi iyonik olmayan deterjanlar ve polivinilpirolidon (PVP-40) gibi bazı diğer maddeler de kullanılabilir.

Bu aşamadan sonra membran öncelikle, ilgilenilen proteine özgü birincil antikor (IgG) ile muamele edilir ve membrandaki proteinlerin antikor ile reaksiyona girmesi sağlanır. Birincil antikor seçilirken hedeflenen proteine karşı üretilmiş ve üzerinde çalışılan organizmaya uygun olmasına dikkat edilmelidir. Ancak herhangi bir organizmada üretilen bir antikor diğer canlılarda da çapraz reaksiyon göstererek çalışabilir. Bu bilgiler antikorların sağlandığı ticari firmaların bilgi kağıtlarında yer almaktadır.

Daha sonra da, renkli bir ürün oluşturabilen bir enzim [alkalin fosfataz ya da yabanturpu peroksidazı (HRP)] bağlı veya radyoaktif işaretli ikincil antikor (anti-IgG) ile muamele ederek ikincil antikorun, hedef proteine bağlanmış olan birincil antikorlarla etkileşime girmesi sağlanır.

Son olarak da membran görüntülenir ve ardından bilgisayar ortamında kaydedilir veya film olarak basılır. İkincil antikora bağlanmış enzimler için geliştirilen kemilüminesans özellikteki substratlar (luminol gibi) duyarlılığı önemli ölçüde arttırmaktadır. Saptama radyoaktif işaretleme ile de sağlanabilmektedir. Bunların dışında daha farklı saptama yöntemleri de vardır.

Anti-HisG-HRP Antikoru (Fare Monoklonal) : Bu çalışmada üretilmek istenen hedef rekombinant protein daha önce de bahsettiğimiz gibi ekspresyon vektörümüzde hazır olarak bulunan bir 6 tane Histidin aminoasiti ve bir tane Glisin aminoasiti eki eklenerek üretiliyor. Bu yüzden daha sonraki yapılacak Western Blot analizlerinde kullanılmak üzere Anti-His özellikteki bir antikor seçildi. Bizim bu çalışma için kullanacağımız Anti-HisG-HRP Antikoru diğer antikorlardan farklı olarak bir birincil ve ikincil antikorların füzyon halinde bulunduğu bir antikordur. Birincil Anti-His Antikoru ile onu tanıyarak bağlanan ikincil Anti-IgG-HRP (Horse Radish Peroxidase) antikorunun tek antikor olarak birleştirilmiş halidir. Bu yüzden Western Blot analizlerinde iki farklı antikor yerine tek antikor kullanıldı.



Şekil 2.2 AntiHisG antikorunun tanıyarak bağlanma gösterdiği epitopun lokasyonu.

WESTERN BLOT PROTOKOLÜ

Öncelikle kullanılacak örnekten uygun olan bir yöntemle protein eldeki yapılır.

Örnekler birbirlerine yakın miktarlarda protein içerecek şekilde SDS poliakrilamid jele yüklenir ve yürütülür. Transferin başarılı olup olmadığını kontrol edebilmek için marker olarak “prestained FERMENTAS SM1811” kullanıldı

PVDF membran jelin boyutuna uygun olarak kesilir ve 10 dak. %100 metanolle çalkalayıcıda muamele edilir.

Membran ve yürütmesi tamamlanan jel 15 dk. 1X semidry transfer tamponuyla çalkalayıcıda muamele edilir.

1. Membran ve jel sandviç yöntemiyle western blot transfer aparatına (thermo 88217 fast semidry blotter) yerleştirilir. Bu işlem için sünger 1X semidry transfer tamponuyla ıslatılır. Üzerine bir adet kalın transfer kağıdı transfer tamponuyla ıslatılıp koyulur. Onun üzerine jel koyulur. Jelin üzerine membran düzgün bir şekilde yerleştirilir ve yine sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış kağıt ve sünger koyulur. Hava kabarcığı kalmaması için silindirik bir malzemeyle üstünden bastırılır. Daha sonra sıkıştırma aparatına jel tarafı siyah tarafa gelecek şekilde koyulur ve sıkıştırılır. Transfer aparatına yine siyah taraf siyah tarafa gelecek şekilde yerleştirilir.

1X semidry transfer tamponuyla 25 V’de 10 dk transfer işlemi gerçekleştirilir.

Proteinlerin transfer olduğu membran %5 BSA’lı (w/v) TBST içinde (bloklama tamponu) 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanır.

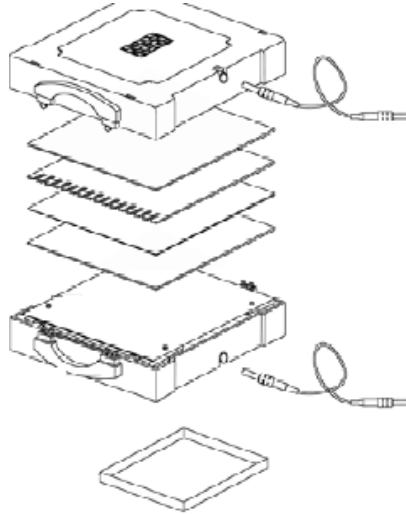
Bloklama tamponu dökülür ve membran 3 kere 10’ar dakika TBST ile yıkanır (Her seferinde bir önceki dökülür).

Bloklama tamponunun içinde rekombinant proteinimize özgün “AntiHisG-HRP” (birincil ve ikincil birleşik antikoru) 1:5000 oranında seyreltilerek 12-16 saat çalkalayıcıda +4°C’de çalkalandı.

Membran 5’er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda muamele edilir (Her seferinde bir önceki dökülür).

Kitin içindeki SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution ve SuperSignal West Femto Stable Peroxide Solution reaktiflerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla “çalışma çözeltisi elde edilir. Elde edilen “çalışma çözeltisi” içinde membran 5 dak. oda sıcaklığında çalkalayıcıda muamele edilir ve görüntülenir. Çalışma çözeltisi ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlıkta gerçekleştirilmelidir. Substrat olarak Thermo Scientific firmasının #34095 katalog no.lu SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate isimli kiti kullanıldı

Sonuçlar ‘Kodak 4000 MM Image Station’ cihazında görüntülendi.



Şekil 2.3 Membran, jel ve filtre kâğıdının sandviç yöntemiyle hazırlanması ve transfer aparatına yerleştirilmesi.

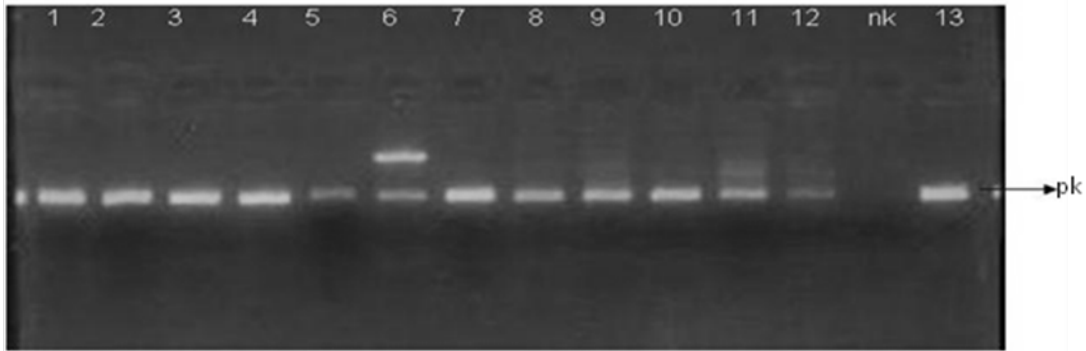
3.ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 Bakteri Kültürü ve İzolasyon

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsüne başvuran hastalardan endoskopi ile alınan 112 biyopsi örneğinden 72'si bakteri kültürüne alındı. 72 örnekten 46'sı başarılı bir şekilde çoğaltıldı. 112 örnekten 40'ı ise biyopsiden genomik DNA izolasyonu methodu ile izole edildi.

3.2 PZR ile Genomik DNA Varlığının Doğrulanması

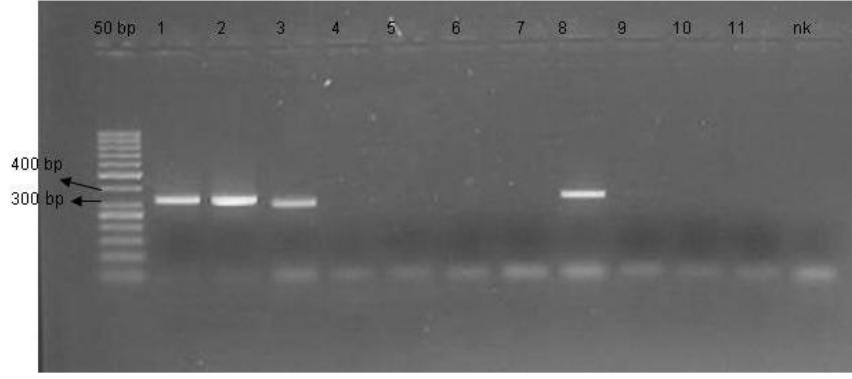
Bakteri kültüründen ve endoskopi ile alınan mide biyopsi örneklerinden *H.pylori* izolasyonu sonucunda elde edilen 86 *Helicobacter pylori* DNA'sı ile 23S RNA PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. 86 örnek içerisinde 57'sinde *H.pylori* DNAsı başarılı bir şekilde amplifiye edildi.



Şekil 3.1 23s rRNA PZR reaksiyonu agaroz jel görüntüsü nk: negatif kontrol pk: pozitif kontrol

3.3 PZR ile CagA Pozitifliğinin Saptanması

PZR ile *H.pylori* DNAsı içerdiği doğrulanan 57 örneğin cagA pozitifliğini saptamak için 'Empty site(Boş bölge)' PZR reaksiyonu yapıldı. 57 örnek içerisinde 35 tanesinde bant gözlemlenemedi. 'Boş bölge' PZR reaksiyonu negatif örnekleri çoğaltabildiği için bu 35 örneğin cagA pozitif olduğuna karar verildi. Agaroz jelde 324 bç'lik bantlar gözlemlendi.

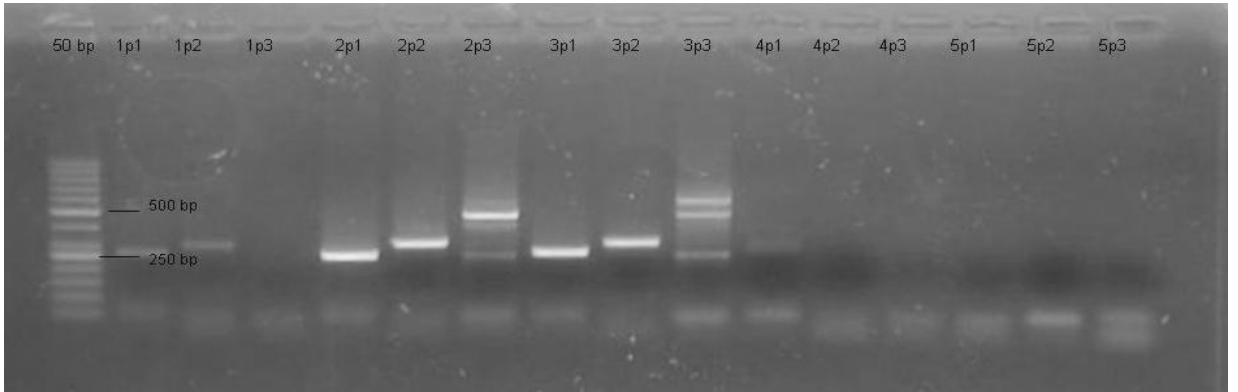


Şekil 3.2 kuyu 1: PZR ile cagA pozitifliğinin belirlenmesi

Gene Ruler 50bp Marker kuyu 1-11: PZR örnekleri NK: negatif kontrol

3.4 PZR ile EPIYA Motiflerinin Saptanması

Tirozin fosforilasyon motiflerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen PZR reaksiyonu sonucunda agaroz jelde fosforilasyon motifi 1(P1) için 264 bç'lik bantlar, fosforilasyon motifi 2 (P2) için 309 bç'lik bantlar, fosforilasyon motifi 3 (P3) için ise 468, 570 ve 672 bç'lik bantlar gözlemlendi. Daha önceki PZR reaksiyonlarında cagA pozitif oldukları saptanan 35 örnekten 15 tanesinde P1, P2 ve P3 motiflerinin her üçüde başarılı bir şekilde çoğaltıldı. 8 örnekte sadece P1 ve P2 motifleri, 2 örnekte sadece P1 motifi çoğaltılabilirken diğer 12 örnekte herhangi bir fosforilasyon motifi çoğaltılamadı.

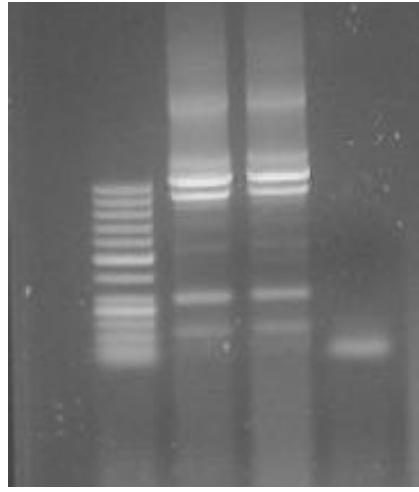


Şekil 3.3 : PZR ile EPIYA motiflerinin saptanması

50 bp gene ruler marker, 1 nolu örnek p1 ve p2 pozitif, 2 nolu örnek p1, p2 ve p3 pozitif, 3 nolu örnek ise birer tane p1 ve p2 motifi içerirken 2 tane p3 motifi içermekte.

3.5 Klonlanacak Bölgenin PZR ile Çoğaltılması

Kullanılan F2 ileri primeri *Helicobacter pylori*'deki yüksek tekrar dizilerinin varlığı dolayısıyla 2 ayrı bölgeye bağlanma gösterdi ve bu yüzden PZR reaksiyonu sonucunda bir büyük birde küçük olmak üzere 2 amplikon oluştu. Klonlanacak bölgenin seçiminde bir önceki aşamada tirozin fosforilasyon motiflerinin yüksek tekrarlarda olduğu örneklerin seçilmesine özen gösterildi.

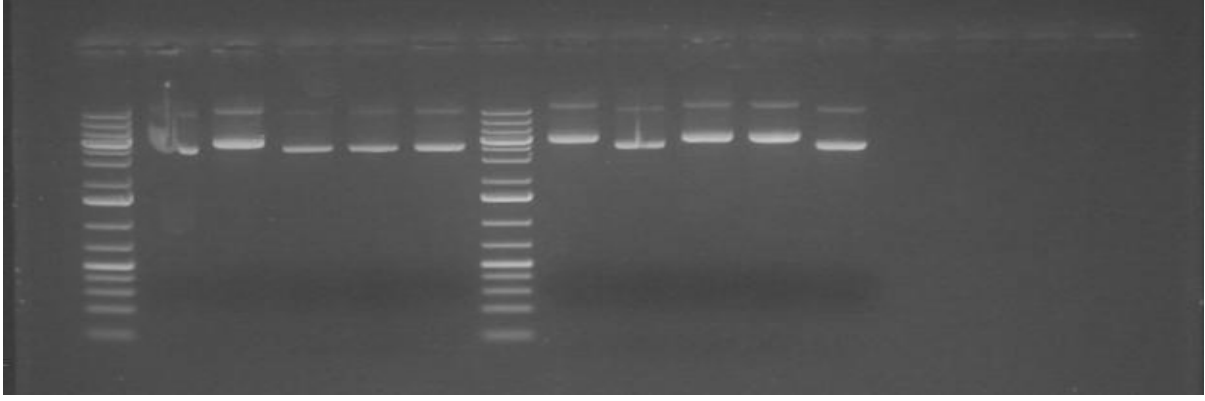


Şekil 3.4 Klonlanacak bölgenin PZR ile amplifikasyonu

3.6 Klonlama ve Klonlamanın Doğrulanması

3.6.1 Düşük Kopya Plazmit İzolasyonu

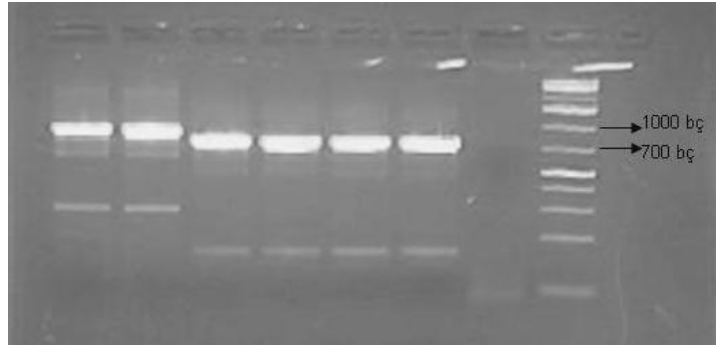
Invitrogen'den ticari olarak sağlanan vektör düşük kopya çoğaltılan bir plazmit olduğu için kullanılan izolasyon kitinde üretici firmanın düşük kopya plazmitlere özel önerilerine uyuldu. Kullanılan bakteri kültürü normal şartlardan %10 daha fazla alındı. En son aşamada plazmitleri silika membrandan elde etmek için kullanılan su 56°C derecede ısıtılarak kullanıldı. Elde edilen plazmit yoğunluğunu arttırmak için kullanılan elusyon çözeltisi 50 µl yerine 35 µl'ye düşürüldü.



Şekil 3.5: Plazmit izolasyonununun %1'lik agaroz jel elektroforezinde doğrulanması.

3.6.2 Klonlanmanın Doğrulanması

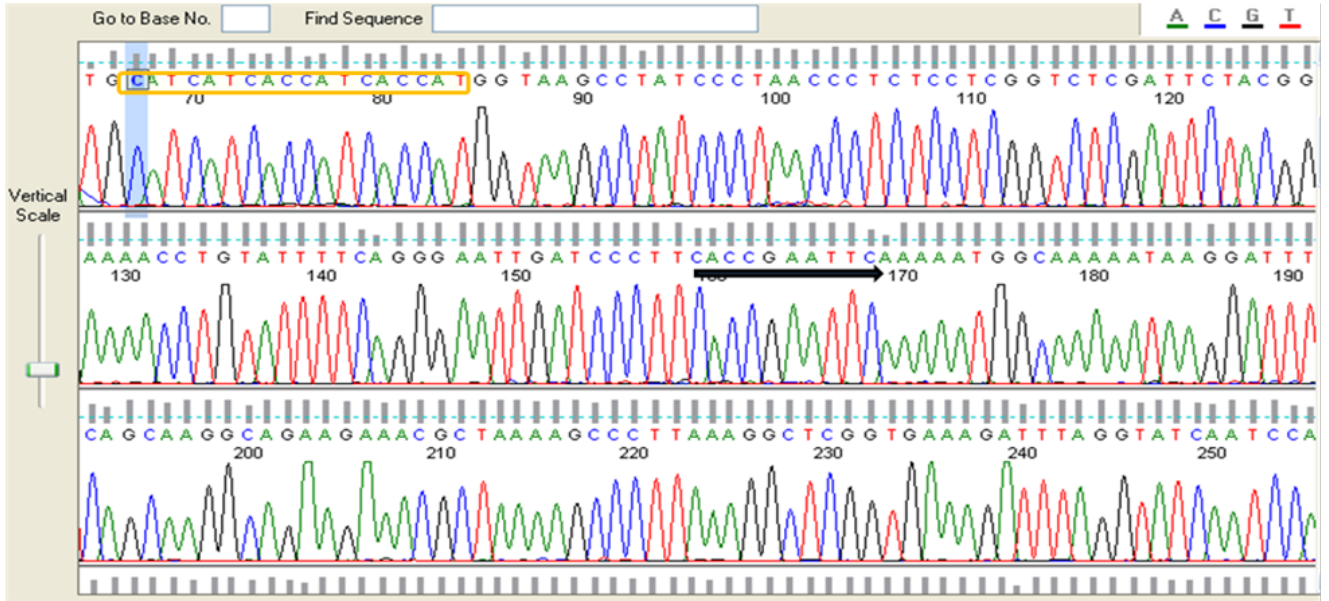
4, 17 ve 30 nolu klonların BL21(DE3) ve BL21(DE3) Star suşlarından elde edilen plazmitleri ile tekrar PZR reaksiyonu gerçekleştirildi ve sonuçlar %2'lik agaroz jelde görüntülendi.



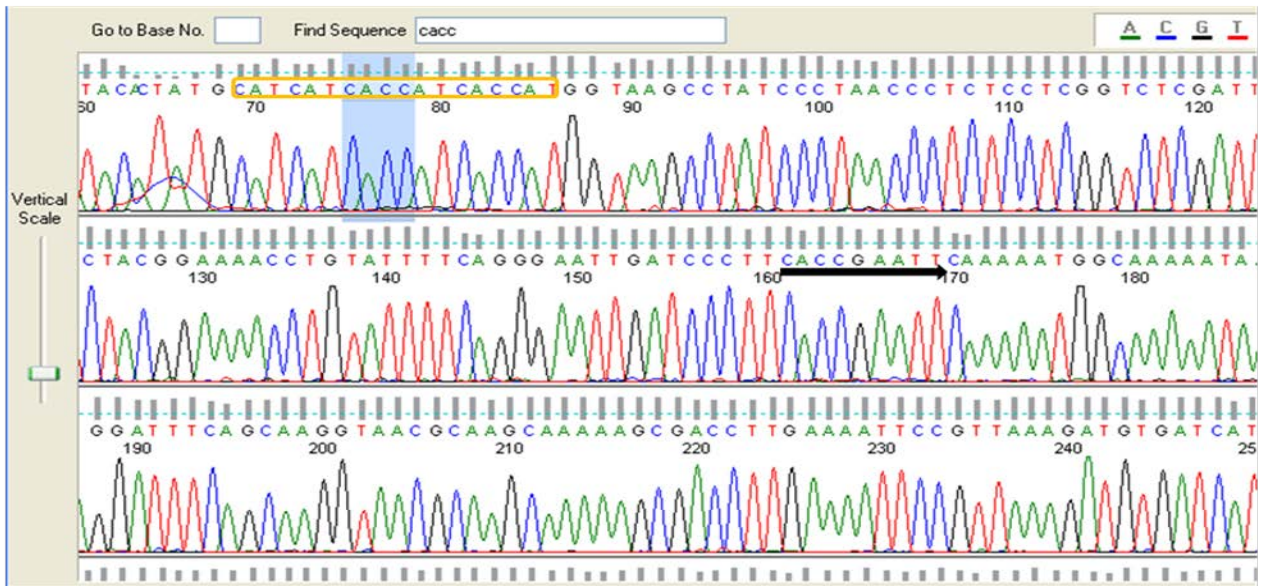
Şekil 3.6 Klonlanma sonucunda elde edilen klonların F1 ve R8 primerleri ile PZR'de doğrulanması. Örnek sıralaması: 4 nolu klon (BL21(DE3)), 4 nolu klon (BL21(DE3) Star), 17 nolu klon (BL21(DE3)), 17 nolu klon (BL21(DE3) Star), 30 nolu klon (BL21(DE3)), 30 nolu klon (BL21(DE3) Star) son kuyu: negatif kontrol ve 1kb marker

3.7 Plazmitlerin Sekans Analizleri

Pozitif klonlardan izole edilen plazmitler Sanger Di Deoksi yöntemi ile T7 ileri ve geri primerleri ile sekanslandı ve okuma çerçevesi analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucunda 4 nolu klonun içerisinde 939 bç'lik uzun fragmentin olduğu 17 nolu klonun içerisinde ise 804 bç'lik kısa fragmentin olduğu saptandı. Klonların okuma çevreleri ve klonlanma yönleri kontrol edildi. Herhangi bir kaymaya ve mutasyona rastlanmadı.



Şekil 3.7: Fragment no:4 'ün sekans analizi



Şekil 3.8: Fragment no:17'nin sekans analizi

Elde edilen 4 ve 17 nolu klonların sekans analizlerinden yola çıkılarak aminoasit dizileri elde edildi ve beklenen protein ağırlıkları çeşitli veri tabanlarında hesaplandı. Bu ağırlıklar 4 nolu klon için 37.6 kD, 17 nolu klon için ise 32.6 kD olarak saptandı. Bu hesaplamalar pet 151/D plazmitinden gelecek ek bölgelerinin +4 kD ağırlığıda eklenerek yapıldı. Elde edilen aminoasit dizileri BLAST veritabanında araştırıldı ve *Helicobacter pylori*'de cagA genine ait bir bölge olduğu doğrulandı. Sekans analizleri yapılan 2 bölgenin üç ayrı fosforilasyon motifinden 3'ünde bulundurduğu da bu yolla doğrulanmış oldu. İki fragment arasında bir aminoasitlik farklılık gözlemlendi.

4 nolu klon (311 amino asit)

EFKNGKNKDFSKAEETLKALGKSVKDLGINPEWISKVENLNAALNEFKNGKNKDFSKVTQAKSDLENSVKDVIIN
QKVTDKVDNLNQAVSVAKATGDFSKVEQALADLKNFSKEQLAQQAKNEDFNTGKNSALYQSVKNGVNGTL
VGNGLSKAEATTLNFSKDFSDIKKELNAKLGNFNNNNGLKNEPIYAKVNKKKAGQAASPEEPIYTQVAKKVNAKI
DQLNQVASGLGGVGGQAGFPLKRHDKVDDLSKVGLSASP EPIYATIDDLGGPFPLKRRDKVDDLSKVGRSRNQE
LAQKIDNLNQAVSEAKAG..

33.6 kD

17 nolu klon (266 aminoasit)

EFKNGKNKDFSKVTQAKSDLENSVKDVIINQKVTDKVDNLNQAVSVAKATGDFSKVEQALADLKNFSKEQLAQ
QAQKNEFNTGKNSALYQSVKNGVNGTLVGNGLSKAEATTLNFSKDFSDIKKELNAKLGNFNNNNGLKNEPIYA
KVNKKKAGQAASPEEPIYTQVAKKVNAKIDQLNQVASGLGGVGGQAGFPLKRHDKVDDLSKVGLSASP EPIYAT
IDDLGGPFPLKRHDKVDDLSKVGRSRNQELAQKIDNLNQAVSEAKAG..

28.6 kD

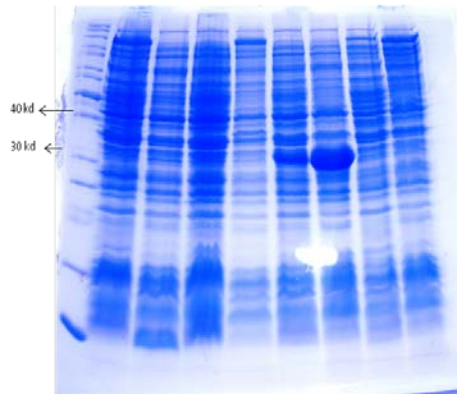
Şekil 3.9: 4 ve 17 nolu fragmentlerin aminoasit ve EPIYA motif analizleri.

3.8 BL21(DE3) ve BL21(DE3) *Star* Suşlarına Transformasyon

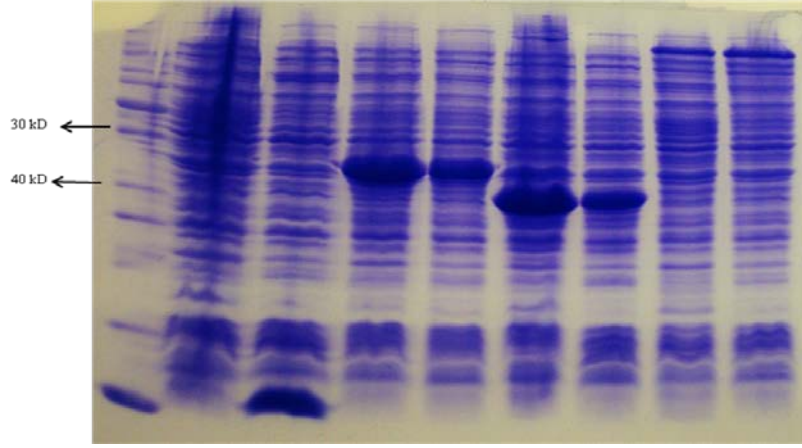
Seçici antibiyotikli besiyerinde gece boyu inkübasyon sonunda üreyebilen koloniler pozitif kabul edildi ve plazmit ekstraksiyonu için sıvı besiyerinde büyümeye alındı.

3.9 SDS Page Analizleri

Pozitif olarak saptanan klonların arasından ekspresyon amaçlı seçilen 4 ve 17 nolu klonlar IPTG ile uyarıldıktan sonra 1.5'er ml besiyerinden bakteri peleti ayrılarak -20 derecede saklandı. SDS page jeline kontrol amaçlı hem boş plazmit içeren e.coli hücre hattı hemde ticari firmanın sağladığı 120 kD ağırlığındaki beta-galaktozidaz proteinini sentezleyen kontrol plazmiti (*lacZ*) ile transfekte edilen hücre hattı yüklendi.



Şekil 3.10: BL21(DE3) *Star* hücre hattında e.coli SDS page profili. Örnek sıralaması: kuyu1 protein ladder kuyu2 boş vektör -IPTG, kuyu3 boş vektör + IPTG , kuyu 4 4 nolu klon - IPTG, kuyu5 4 nolu klon + IPTG, kuyu6 17 nolu klon - IPTG, kuyu7 17 nolu klon + IPTG, kuyu8 kontrol plazmiti -IPTG, kuyu9 kontrol plazmiti + IPTG



Şekil 3.11: BL21(DE3) hücre hattında e.coli SDS page profili. Örnek sıralaması: kuyu 1: protein ladder, kuyu 2: boş vektör – IPTG, kuyu 3: boş vektör + IPTG, kuyu 4: 4 nolu klon + IPTG, kuyu 5: 4 nolu klon – IPTG, kuyu 6: 17 nolu klon + IPTG, kuyu7 17 nolu klon – IPTG, kuyu 8: kontrol plazmiti – IPTG, kontrol plazmiti + IPTG

SDS page analizleri sonucunda BL21(DE3) *Star* hücre hattında 17 nolu klonda IPTG'nin eklenmesinin ardından beklenen boyutta bir ekspresyon artışı gözlenirken 4 nolu klonda rekombinant proteinin ekspresyonu gözlemlenemedi. 120 kD ağırlığındaki B-galaktozidaz proteinini sentezleyen kontrol plazmitini içeren hücrelerde beklenen boyda ekspresyon görülürken boş vektör içeren hücre hattında ise beklendiği üzere herhangi bir ekspresyon değişimi görülmedi.

BL21(DE3) hücre hattında ise 17 ve 4 nolu klonlarda IPTG eklenmesinin ardından beklenen boyutta belirgin bir ekspresyon artışı gözlemlendi. Kontrol örneklerinde boş vektörde herhangi bir ekspresyon değişimi görülmezken lacZ plazmitinde B-galaktozidaz proteini başarılı bir şekilde eksprese oldu.

3.10 Western Blot Analizleri

Western Blot analizleri sonucunda BL21(DE3) hücre hattında 4 ve 17 nolu rekombinant proteinlerin varlığı doğrulandı. BL21(DE3) *Star* hücre hattında ise sadece 17 nolu rekombinant proteinin varlığı doğrulanabildi.



Şekil 3.12: BL21(DE3) Hücre hattında Western Blot Analizleri

Örnek Sıralaması: 17 nolu klon – IPTG, 17 nolu klon + IPTG, 4 nolu klon – IPTG, 4 nolu klon + IPTG, Boş vektör – IPTG, Boş vektör + IPTG

Son iki örnek: B-galaktozidaz – IPTG, B- galaktozidaz + IPTG

(Bütün örnekler Anti-HisG-HRP antikoru ile tespit edildi.)



Şekil 3.13: BL21(DE3) Star Hücre Hattında Western Blot Analizleri

Örnek Sıralaması: 17 nolu klon – IPTG, 17 nolu klon + IPTG, 4 nolu klon – IPTG, 4 nolu klon + IPTG, Son iki örnek: Boş vektör – IPTG, Boş vektör + IPTG

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Helicobacter pylori'de 120-140 kD ağırlıkları arasında yüksek immünojenik bir proteinin varlığı 1993 yılında Covacci ve arkadaşlarının da içinde olduğu birkaç farklı araştırma grubu tarafından fark edilmiş, aynı anda klonlanmış ve ekspresyon analizleri yapılmıştır. Ancak bu farklı araştırma gruplarında analiz edilen proteinlerin gösterdiği ağırlık farklılıkları bu durumun laboratuvarlar arası deneysel farklılıklardan mı kaynaklandığı yoksa saptanan proteinlerin birbirinden farklı proteinler mi olduğu konusunda araştırmacılarda soru işaretlerine yol açmıştı. Son olarak saptanan proteinlerin yüksek sitotoksin ilişkili olduğunun doğrulanması ile bu proteinin yüksek çeşitlilik gösteren bir tek proteine ait olduğu doğrulandı ve bu proteinin 'Sitotoksin ilişkili gen A(cagA)' olarak adlandırılması uygun görüldü. Bu gelişmelerin ardından 1995 yılında Timothy ve arkadaşları tüm cagA genini başarılı bir şekilde klonlamış, eksprese etmiş ve saflaştırarak bir ELISA testi geliştirmiştir. Geliştirdikleri bu sistemle diğer tanı yöntemleri ile serolojik yöntemleri karşılaştırmış ve serolojik tespitin yüksek güvenilirliğini göstermiştir. 2004 yılında Jia Yan ve arkadaşları ve Ke-Xia Wang ve arkadaşları farklı iki cagA fragmentini klonlayarak ekspresyon ve ELISA çalışmalarını yapmışlardır. 2008 yılında Angelini ve arkadaşları bir cagA gen fragmentleri kütüphanesi oluşturarak çeşitli fragmentlerin eksprese olabilme düzeylerini analiz etmişlerdir. Son olarak 2010 yılında Klimovich ve arkadaşları cagA pozitif *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının tanısı için çeşitli immün belirteçler ürettiler ve aktivitelerini araştırdılar.

Helicobacter pylori'de cagA pozitif ve negatif suşların tanımlanmasına yönelik bu çalışmaların yanı sıra birçok çalışma yapılmıştır. Bunlar ilk başlarda genelde cagA geninin PZR ile genotiplenmesi şeklinde olduysa da ilerleyen yıllarda CagA geninin tanımlanmasına yönelik ticari ELİSA testleri de geliştirilmiştir ancak bunların çoğu immunoblot yapıda, sınırlı sayıda olup maliyeti yüksek testlerdir. Bu testlerde ifade edilmek amacıyla seçilen fragmentlerin güvenilirliği üretilen proteinin antijenitesiyle doğru orantılı olarak artmaktadır ve üretilecek testin kullanılacağı coğrafya da bu konuda önem kazanmaktadır. *Helicobacter pylori* rekombinasyon ve mutasyon oranı çok yüksek bir bakteri olduğu için çeşitli coğrafyalarda görülen genotip yoğunlukları da farklılık göstermektedir. Özellikle Orta Asya ve Avrupa genotipleri cagA yapıları ve EPIYA

motifleri bakımından yüksek farklılıklar göstermektedirler. Bu yüzden geliştirilecek rekombinant proteinlerin de bu genotip farklılıkları gözle alınarak yapılması gerekmektedir.

Çizelge 4.1: Yıllara göre *cagA* pozitifliğini saptamak için yapılan ELISA çalışmaları

CagA(128kD protein)'nin ilk kez tanımlanması klonlanması ve ekspresyonu	Antonello Covacci,Stefano Censini,	1993
rCagA <i>Helicobacter pylori</i> fragmenti ile enfeksiyonun serolojik olarak saptanması	Timothy L. Cover, Martin J. Blaser	1995
CagA geninin 2.148 bç lik fragmentinin ekspresyon sisteminin oluşturulması ve <i>cagA</i> geninin, <i>cagA</i> proteinin saptanması, hasta serumlarında <i>cagA</i> antikorunun saptanması	Jie Yan, Yuan Wang	2004
Cocoid formdaki <i>Helicobacter pylori</i> den bir <i>cagA</i> fragmentinin klonlanması ve sekans analizleri	Ke-Xia Wang, Xue-Feng Wang	2004
<i>Helicobacter pylori</i> <i>cagA</i> domainlerinin kütüphane tabanlı taranması ve ekspresyonu	Alessandro Angelini, Tommaso Tosi	2008
CagA pozitif <i>Helicobacter pylori</i> suşlarının saptanabilmesi için immün belirteçlerin geliştirilmesi	Alexander V. Klimovich	2010

Türkiye’de genel olarak rastlanan *Helicobacter pylori* genotipi Avrupa ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle biz bu çalışmamızda çeşitli primerler ve ifade edilmek üzere bir *cagA* bölgesi seçerken Avrupa ve Türkiye’ye yakın özellik gösteren sekans analizlerini kullandık ve bunların içinden korunmuşluğu ve fosforilasyon motifleri en yüksek olanların seçilmesine özen gösterdik.

Çalışmamızda izole ettiğimiz 57 örnekten 22si *cagA* negatif, 35i *cagA* pozitif olarak saptandı. CagA pozitif örneklerin EPIYA motif analizleri yapıldı ve klonlama için en yüksek rakamda EPIYA motifi içeren örneklerden biri tercih edildi. Klonlayacağımız

bölgeyi çoğaltmak için gerçekleştirdiğimiz pzt reaksiyonunda ileri primerin iki farklı bölgeye bağlanması sebebiyle *Helicobacter pylori*'de 2 ampikon oluştu. Bu iki ampikon bir arada klonlandı ve sonuç olarak biri büyük(4 nolu klon) biri küçük(17 nolu klon) boyda olmak üzere iki farklı klon elde edildi. Elde edilen klonlar 37°C derecede 1mM IPTG ile uyarıldı ve ekspresyon analizleri BL21(DE3) ve BL21(DE3) *Star* olmak üzere iki farklı hücre hattında analiz edildi. Bunlardan 17 nolu klon her iki hücre hattında da başarılı bir şekilde üretilirken 4 nolu klon sadece BL21(DE3) hücrelerinde üretilirdi. Üretilen proteinlerin hedef proteinler oldukları anti-histidin antikorları ile Western Blot deneyinde doğrulandı.

Bu çalışmada ifade etmeyi başardığımız iki farklı rekombinant cagA proteini pet151/D plazmitinin kendi yapısında bulunan 6 histidin aminoasiti ve V5 epitopu ile bir aradadır. V5 epitopu bize anti-histidin antikorlarının yanı sıra anti-V5 antikorları ile protein varlığını saptayabileceğimiz bir bölge daha sağlar. İfade ettiğimiz bu rekombinant proteinler ile bir ELISA sistemi kurulmak istendiğinde hedef proteinin antikor oluşumunu uyarabilme niteliği hibridoma teknolojisi ile araştırılmalıdır. Gerekirse tasarlanması muhtemel bir ELISA kitinde ikincil antikor olarak kullanılmak üzere monoklonal anti-rekombinant cagA üretim çalışmaları yapılmalıdır. Bu araştırma için ise hedef protein öncelikle saflaştırılmalı daha sonra 6Xhistidin eki ve V5 epitopundan ayrılarak özgül bir hale getirilmelidir. Bu çalışmada üretilen rekombinant proteinler reçine bazlı affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılabilir niteliktedir. Reçine 6XHistidin aminoasidine karşı yüksek ilgi ve seçicilik gösteren yapıda bir moleküldür. Pet 151/D vektörü aynı zamanda bu ekleri ayırarak saf cagA proteini elde etmemizi sağlayacak olan TEV proteaz bölgesi ile bir aradadır. Elde ettiğimiz bu proteinler TEV proteaz enzimi ile muamele edilerek bu ek bölgelerinden ayrılabilir niteliğine sahiptir. Ancak hedef proteine herhangi bir 6XHistidin tabanlı saflaştırma işlemi uygulanacaksa bu işlem saflaştırmadan sonraya bırakılmalıdır.

Helicobacter pylori'ye yönelik ELISA testleri ilk başlarda çoğunlukla tüm hücre lizatının antijen olarak kullanılması prensibi ile oluşturulmuştur. Rekombinant protein üretimi ise tanıya yönelik alanlardaki saf antijen ihtiyacını karşılamıştır. Saf cagA antijenlerinin eksikliğinde total *H.pylori* proteinlerinin kullanılması anti-cagA antikorlarının geliştirilmesini ve hibridoma çalışmalarında tek klon eldesini zorlaştırmakta ve karmaşıklştırmaktadır.

Helicobacter pylori enfeksiyonunda çoğu enfekte birey asemptomatik iken bazı durumlarda enfeksiyon akut, kronik gastrite neden olmakta ve peptik ülser ve gastrik adenokarsinoma gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalar cagA pozitifliğinin peptik ülserli hastalarda gastritli hastalara oranla önemli oranlarda yüksek olduğunu göstermiştir(Peek et. al, 1997). CagA pozitif hastalarda cagA'nın yüksek antijenitesi antikor oluşumunu uyarmaktadır ve bu antikor *H.pylori* enfeksiyonunda özel klinik bir belirteç olarak kabul edilmiştir. *H.pylori*'de cagA ya yönelik geliştirilen ELISA testleri gen havuzundaki yoğunluğuna bakmaksızın tek bir *H.pylori* izolatına yönelik geliştirilmiş antikor cevabını tespit edilebilmesini sağlarken aynı zamanda cagA'nın gastrik kanser başta olmak üzere çeşitli gastrik hastalıklara yol açma mekanizmasını anlamakta ve tedavi stratejisi geliştirmekte de önem teşkil etmektedir. Her ne kadar CagA'nın başta gastrik kanser olmak üzere birçok gastrik hastalıkla olan ilişkisi daha fazla araştırma ile doğrulanmaya gerek duysa da dispeptik hastaların cagA pozitif olup olmadığının önceden saptanması ve bu hastaların antimikrobiyal terapi uygulaması için seçilmesi klinik açıdan yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito Y., Morelli, G., Pan Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A., van Doorn, L.J., 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographic regions. *Mol Microbiol.* May;32(3):459-70.

Achtman, M., Schuster, S.C., 2006. Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet.*;2(7):e120.

Akopyanz, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, C.A., et al. 1998. Apr, Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*;28(1):37-53.

Alm, RA, Ling, LS, Moir, DT, King, BL, et al. 1999. Jan, Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 14;397(6715):176-80.

Argent, RH., Zhang, Y., Atherton, JC. 2005. Feb, Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *J Clin Microbiol.*;43(2):791-5.

Backert, S., Churin, Y., and Meyer, T.F. 2002. Dec, *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signalling and vaccine development. *Keio J Med.*;51 Suppl 2:6-14.

Balkwill, F and Mantovani, 2001. Dec, A Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 17;357(9255):539-45.

Bjorkholm, B., et al. 2001. Dec Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4;98(25):14607-12.

.Bentires-Alj, M., Paez, JG., David, FS. et al. 2004. Dec, Activating mutations of the Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 15;64(24):8816-20.

- Bizzozero, G. 1893. Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel der schleimhaut. *Arch f mikr Anat*; 42:82
- Blaser, M., Atherton, J.. 2004. Feb *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease the journal of clinical investigation *J Clin Invest.*;113(3):321-33
- Blaser, M. J. 1992. Sep *Helicobacter pylori*: it's role in disease. *Clin. Infect. Dis.*;15(3):386-91.
- Blaser, M. J. 1997. Apr Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: Should all be eliminated? *Lancet* 5;349(9057):1020-2.
- Blaser, MJ., Perez-Perez, GI., Kleanthous H et al. 1995. May Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 15;55(10):2111-5.
- Bourke, B., Jones, N., Sherman, P. 1996.; Jan *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in children. *Pediatr Inf Dis J*;15(1):1-13.
- Brenciaglia, 2000. *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms *Int J Antimicrob Agents.*;13(4):237-41.
- Cascales, E., and Christie, P.J. 2003. Nov, The versatile bacterial type-IV-secretion systems. *Nat Rev Microbiol.*;1(2):137-49.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., et al. 1996. Dec *Cag*, a pathogenicity island of *H. pylori*, encodes typeI-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10;93(25):14648-53.
- Cheng, C., and Shuman, S. 2000. Recombinogenic Flap Ligation Pathway for Intrinsic Repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8059-8068
- Correa, P. et al. 1975. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 2: 58–60
- Covacci, A. and Rappuoli, R. 2000. Feb Tyrosinephosphorylated bacterial proteins: trojan horses for the host cell. *J Exp Med.* 21;191(4):587-92.

- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., et al. 1993. Jun, Molecular characterization of the 128-kDa-immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;90(12):5791-5.
- Cover, T.L., Dooley, C.P., and Blaser, M.J. 1990. Mar, Characterization and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun.*;58(3):603-10.
- Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S., and Rathbone, B.J. 1991. Aug, Mucosal IgA-recognition of *Helicobacter* 120kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet*. 10;338(8763):332-5.
- Delluva, AM., Markley, K., Davies, RE. 1968. The absence of gastric urease in germ-free animals. *Biochim Biophys Acta*;151:646–50.
- Dubois, A., and Borén, T. 2007. May, *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol Cell Microbiol.*;9(5):1108-16.
- Dunn, BE.,Cohen, H.,Blaser, MJ. 1997. Oct, *Helicobacter pylori*.*Clin Microbiol rev*;10(4):720-41.
- Dvorak, HF. 1986. Dec, Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 25;315(26):1650-9.
- Ekstrom, AM. et al. 2001. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 121: 784–791
- el-Zimaity, HM., Graham, DY., al-Assi, MT., et al. 1996. Interobserver variation in the histopathologic assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. *Human Pathol*; 27:35-41.
- Eppinger, M., Baar, C., Linz, B., Raddatz, G., Lanz,C., Keller, H., Morelli, G., Gressmann, H., Falush, D., Wirth, T., et. al 2003. Mar Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 7;299(5612):1582-5.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., and Haas, R. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes

for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol.* Dec;42(5):1337-48.

Fitzgerald, O., Murphy, P., 1950. Studies on the physiological chemistry and clinical significance of urease and urea with special reference to the stomach. *Ir J Med Sci*;292:97–159.

Frenck RW Jr, Clemens J. Helicobacter in the developing world. *Microbes Infect.* 2003 Jul;5(8):705-13.

Ge, Z., Taylor, DE., 1994. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. Review. *Annu Rev Microbiol.* x;53:353-87.

Genta, RM., Graham, DY., 1994. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *H. pylori* density and distribution. *Gastrointest*; 40:342-5.

Goodwin, CS., Armstrong, JA., Chilvers, T., et al. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen nov as *Helicobacter pylori* comb nov and *Helicobacter mustelae* com nov, respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* .

Goodwin, CS., Armstrong, JA., Marshall, BJ. 1986. Apr, *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration.;39(4):353-65. Review.

Goodwin, CS., Mendall, M., Northfield, T., 1997. Jan, *Helicobacter pylori* infection, *Lancet.* 25;349(9047):265-9.

Grunberg-Manago, M. 1999. Messenger RNA Stability and its Role in Control of Gene Expression in Bacteria and Phages. *Annu. Rev. Genet.* 33, 193-227

Helicobacter and Cancer Collaborative Group (2001) Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 49: 347–353

Herbrink, P., Van Doorn, LJ. 2000. Mar, Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*;19(3):164-73.

- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A. *et al.* 2002. Oct, Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29;99(22):14428-33.
- Huang, J-Q. *et al.* 1998. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 114: 1169–1179
- Houghton, J. Stoicov, C. Nomura, S. *et al.* 2004. Nov, Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science.* 26;306(5701):1568-71.
- Josenhans, C., Beier, D., Linz, B., Thomas, F. Meyerc, Sebastian, Suerbaum., 2007. Nov, Pathogenomics of *Helicobacter*, *International journal of medical microbiology Int J Med Microbiol.*;297(7-8):589-600.
- Judd, LM., Alderman, BM., Howlett, M. *et al.* 2004. Jan; Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. *Gastroenterology.* 126(1):196-207.
- Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T., and Hiraga, S. 1996. RNase E Polypeptides Lacking a Carboxyl-terminal Half Suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 3917-3925
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., *et al.* 2007. Oct, *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation *Nature.* 18;449(7164):862-6.
- Lee, L., Phillips, MW., O'Rourke, JL., Paster, BJ., *et al.* 1992, *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol*; 42 (1992), 27-36.
- Lieber, CS., Lefevre, A. 1924. Ammonia as a source of gastric hypo-acidity in patients with uraemia. *J Clin Invest.* x;38(8):1271-7.
- Lopez, P. J., Marchand, I., Joyce, S. A., and Dreyfus, M. .1999. The C-terminal Half of RNase E, Which Organizes the *Escherichia coli* Degradosome, Participates in mRNA Degradation but not rRNA Processing *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 33, 188-199
- Luck, JM., Seth, TN. 1924. Gastric urease. *Biochem J*;18:1227–31.

- Hahn, WC. and Weinberg, RA. 2002. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* Nov 14;347(20):1593-603.
- Hatakeyama, M. Higashi, H. 2005. Dec, *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis *Cancer Sci.*;96(12):835-43.
- Hatakeyama, M. 2008. SagA of *Helicobacter pylori* CagA. *Curr Opin Microbiol.* Feb;11(1):30-7.
- Hatakeyama, M. 2009. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol.*;44(4):239-48.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama M. 2002. Jan, SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *H. pylori* Caga Protein. *Science.* 25;295(5555):683-6.
- Huang, JQ., Zheng, GF., Sumanac, K., Irvine, EJ., Hunt, RH. 2003. Metaanalysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology.* Dec;125(6):1636-44.
- Makristathis, A., Hirschl, AM., Lehours, P., Megraud, F., 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.*;9 Suppl 1:7-14.
- Neugut, AI., et al. 1996. Epidemiology of gastric cancer. *Semin Oncol* 23: 281–291
- Nomura, A., Stemmermann, GN., Chyou, PH., Kato, I., Perez, GI, Blaser, MJ., 1991. Oct, *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med.* 17;325(16):1132.
- Owen, R.J. 1998. *Helicobacter*-Species classification and identification, *Br Med Bull.*;54(1):17-30. Review.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., et al. 2000. Dec , Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med.* 4;192(11):1601-10.
- Marshall, B. J. 1994. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol*, 89: 116-118.
- Marshall, B. 2002. Mar-Apr , *Helicobacter pylori* 20 years on, *Clin Med.*;2(2):147-52.

Marshall, B.J. (ed). 2000. *Gastroenterology Clinics of North America*. Sydney: Sep, WB Saunders Company, *Gastroenterol Clin North Am.*;29(3):633-48.

Panayotopoulou, E.G., Sgouras, D.N., et. al 2006. Feb, Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.*;45(2):488-95.

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., Vogelman, H. 1997. Mar, Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.*;40(3):297-301.

Peek, R.M. Jr., Moss, S.F., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Wang, S., Miller, G.G., Atherton, J.C., Holt, P.R., Blaser, M.J., 1997. *Helicobacter pylori cagA+* strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst*; 89: 863-868.

Peek, Jr., R.M., Blaser, M.J.. 2002. Jan, *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.*;2(1):28-37.

Poppe, M., Feller, S.M., Römer, G., and Wessler, S. 2007. May, Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene.* 24;26(24):3462-72.

Pounder R. E. 1997. New developments in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Scand J Gastroenterol*, 32(Suppl 223): 43-45.

Rieder, G., Fischer, W., and Haas, R. 2005. Interaction of *H. pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr Opin Microbiol.*;8(1):67-73.

Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, F., Tompkins, L.S. 1999. Dec, Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;96(25):14559-64.

Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. 2002. Mar, Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1;277(9):6775-8.

Sepulveda, A.R ve Graham, D.Y , 2002. Jun, Role of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *Gastroenterol Clin North Am.*;31(2):517-35.

Sipponen, P. 1991. *Helicobacter pylori* and chronic gastritis: an increased risk of peptic ulcer? *Scand J Gastroenterol*, 26:6-10.

Suerbaum, S., Josenhans, C., et. al, 2003. Jun, The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24;100(13):7901-6.

Tomb, JF., White, O., Kerlavage, AR., Clayton, RA., et al. 1997 Aug, The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 7;388(6642):539-47.

Tummuru M.K.R., Cover T.L., and Blaser M.J. 1993 May , Cloning and expression of a high molecular weight major antigen of *H. pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun.*;61(5):1799-809.

Tummuru, M.K.R., Sharma, S.A., and Blaser, M.J. 1995. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol*. Dec;18(5):867-76.

TYGAT, G. J. N. 1995. No *Helicobacter pylori* associated peptic ulcer disease. *Aliment Phar Ther*, 89:42-47.

Steven, F Moss and Martin, J Blaser 2005. Mechanisms of Disease: inflammation and the origins of cancer *Nat Clin Pract Oncol*. Feb;2(2):90-7.;

Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier, F. W. 1987. Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. *Gene* 56, 125-135

Preston-Martin, S. et al. 1990., Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res*. Dec 1;50(23):7415-21.

Segal, ED., Cha, J, Lo J, Falkow, F., Tompkins, LS. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated Caga in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 7;96(25):14559-64.

Shuman, S. 1994. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem*. 269, 32678-32684

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. 1990. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Meth. Enzymol.* 185, 60-89

Ster, HW. Colin-Jones, DG. 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut*;16:590–7.

Tartaglia, M. Niemeyer, CM. Fragale, A. et al. 2003. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* Jun;34(2):148-50.

Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S. et al. 2001. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* N Engl J Med. Sep 13;345(11):784-9.

Westblom, TU., Madan, E., Midkiff, BR., 1991. ,Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of Helicobacter pylori. *J Clin Microbiol.* Apr;29(4):819-21.

Virchow, R. 1858. ,Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology. Philadelphia: JB Lippincott Nutr Rev. Jan;47(1):23-5.

Yılmaz, Y. A. , 2004. Helicobacter pylori: Mikrobiyolojik tanı yöntemleri Hacettepe Tıp Dergisi; 35:182-186.

Warren JR and Marshall B 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273–1275.

Windsor, HM., O'Rourke, J. 2000. Sep, Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am.*;29(3):633-48.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Miray Akgüç
Doğum Tarihi : 02.08.1986
Doğum Yeri : Ankara
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

Lise: Çağrıbey Anadolu Lisesi (1998-2004)

Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2.88) (2004—2008)

Lisansüstü: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (3.38-86.69) (2008-2011)

Yabancı dil:

İngilizce: Okuma: Çok iyi Yazma: İyi Konuşma: İyi

Yayınları:

- *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda cagA ve Gastrik Kanser ilişkisi, Güncel Gastroenteroloji Haziran 2011 Miray Akgüç, Ali Özden, A. Mithat Bozdayı (Yayın Aşamasında)
- Hepatit delta virüsü için hücre kültür sisteminin kurulması. (Poster sunumu) Ulusal Hepatoloji Kongresi 2011. İnci Çelik, Ersin Karataylı , Senem Ceren Karataylı, Duygu Koyuncu, Miray Akgüç, S. Gökçe K. Alagöz, Esra Çelik, Tuğba Öztürk, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı

Stajlar:

- INSERM-U853 Bakteriyoloji Laboratuvarı Hopital Pellegrin- Bordo/Fransa (2 ay) Temmuz 2009- Eylül 2009