

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

**MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK *HELICOBACTER*
PYLORI CagA GENOTİPLERİNDE MIR-200a-3p, MIR-
223-5p ve MIR-29a-3p EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Meyrem OSUM**

**Danışman
Doç Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2018

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

**MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK *HELICOBACTER
PYLORI* CagA GENOTİPLERİNDE MIR-200a-3p, MIR-
223-5p ve MIR-29a-3p EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Meyrem OSUM**

**Danışman
Doç Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

İstanbul – 2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Meyrem OSUM tarafından hazırlanan “**Mide Kanserinde Polimorfik Helicobacter Pylori CagA Genotiplerinde Mir-200a-3p, Mir-223-5p ve Mir-29a-3p Ekspresyon Analizi**” adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.01.2018

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
: Haliç Üniv./Danışmanı

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Emel BOZKAYA
: Haliç Üniv./ Üye

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN
: İstanbul Aydın Üniv./ Üye

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr Temel SAVASKAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Vekil Müdür

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Meyrem Osum tez 28.12.17.docx (D34228672)
Submitted: 12/28/2017 11:10:00 AM
Submitted By: burcuyazicioglu@halic.edu.tr
Significance: 3 %

Sources included in the report:

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dramatic-increase-in-SHP2-binding-activity-of-Helicobacter-pylori-Western-CagA-by-EPIYA-C-srep15749-s4.ogv>
http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2011-01/html/2011-45-01-011-020.htm
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489429/>
<http://guncel.tgv.org.tr/journal/37/pdf/100012.pdf>
<http://europepmc.org/articles/PMC4623810>
<http://mbio.asm.org/content/7/1/e01869-15.full>
http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_03_s3/pdf/23_12_03_s3_article.pdf

Instances where selected sources appear:

21

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın belirlenip yürütülmesinde her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç Dr. M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu'na sonuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Anıl Cebeci'ye, aynı zamanda proje arkadaşlarım Arş. Gör. Şafak Şener, Ferhat Erdoğan'a ve diğer yüksek lisans arkadaşlarım Özge Barım, Gizem Sümer, Feyza Nur Argüç ve Pınar Aydındağ'a teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca hem maddi hem de manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2018

Meyrem Osum

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Mide Kanseri	1
1.1.1. Mide Kanserinin Epidemiyolojisi	2
1.1.2. Mide Kanserinin Etiyolojisi	3
1.2. <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.2.1. <i>Helicobacter pylori</i> Tarihçesi.....	4
1.2.2. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Morfolojisi	5
1.2.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Epidemiyolojisi	6
1.2.4. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Mide Kanseriyle İlişkisi	7
1.2.5. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Genomu	9
1.2.6. <i>Helicobacter pylori</i> Çeşitliliğinin Mide Kanseri Riskine Etkisi	10
1.2.7. Cag PAI.....	10
1.2.8. CagA.....	11
1.2.9. CagA Dizisi ve Ekspresyonundaki Varyasyonlar	15
1.3. MikroRNA'lar	17
1.3.1 MikroRNA Biyogenezi	17
1.3.2. MikroRNA ve Kanseri İlişkisi	19
1.3.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin MikroRNA İfadesine Etkisi.....	20
1.3.4. Mide Kanseri MikroR-200a-3p	21
1.3.5. Mide Kanseri MikroR-29a-3p.....	22
1.3.6. Mide Kanseri MikroR-223-5p	24
2. AMAÇ	26
3. MATERYAL	27
3.1. Biyolojik Malzemeler	27
3.2. Dokuların Saklanması İçin Kullanılan Solüsyonlar	27
3.3. DNA ve RNA İzolasyonunda Kit Harici Gereklilik Kimyasallar	27
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) Bileşenleri.....	27
3.5. Primerler.....	28
3.6. Elektroferez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar.....	29
3.7. Hücre Kültürü Besiyeri ve Solüsyonlar	30

3.8. Cihazlar	30
3.9. Sarf Mazlemeler	32
3.10. Kullanılan Kitler	32
4.YÖNTEM	33
4.1. Kanserli Mide Dokularının Saklanması.....	33
4.2. Kanserli Mide Dokularından Bakteri Genomik DNA İzolasyonu.....	33
4.3. PZR ile CagA 3' Değişken Bölge ve Dizi Varyasyonlarının Saptanması	33
4.4. Hücre Kültürü	36
4.4.1. Hücre Hatlarının Çözülmesi	36
4.4.2. Hücre Hattının Pasajlanması.....	36
4.4.3. Hücre Hattının Dondurulması.....	37
4.5. Total RNA İzolasyonu	37
4.6. cDNA Sentezi	38
4.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Olgun MiRNA İfadesinin Analizi	39
5.BULGULAR	43
5.1 PZR ile CagA 3' Değişken Bölge ve Dizi Varyasyonlarının Saptanması	43
5.2 Kanserli Mide Dokularında Olgun MiRNA İfade Değişimlerinin Belirlenmesi. 46	
6. TARTIŞMA	51
7. KAYNAKLAR	55
8.ÖZGEÇMİŞ	65

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Bileşik Devletleri
AGS	: İnsan Kafkasya gastrik adenokarsinoması
Ago2	: Argonaute 2
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BabA2	: Kan grubu antijen bağlayıcı adhezin
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2
Bç	: Baz çifti
CagA	: Sitotoksin ilişkili gen A
Cag7	: Sitotoksin ilişkili gen 7
Cag PAI	: Sitotoksin ilişkili gen Patojenite Adası
CCN	: Siklin
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CHK2	: Kontrol noktası kinaz 2
<i>C. pylori</i>	: <i>Campylobacter pylori</i>
CO₂	: Karbon dioksit
CSK	: C-terminal SRC kinaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DNMT3A	: DNA metiltransferaz 3A
dNTP	: Deoksiribonükleotitfosfat
DMEM/ F-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 Nutrient Karışım (Ham)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DGCR8	: DiGeorge sendrom kritik bölge 8
ECM	: Ekstraselüler matrikse
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
EPB41L3	: Protein 4.1B/akciğer-1 adenokarsinomunda farklı şekilde ifade edilen (Dal-1)),
EPIYA	: Glutamik asit -Prolin-Izolosin-Tirozin-Alanin
Erk	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz

EtBr	: Etidyum Bromid
FBS	: Fetal Sığır Serum
FBXW7	: F-kutu ve WD tekrar domain içeren 7
Foxa1	: Çatal başı kutu protein A 1
G+C	: Guanin+sitozin
H₂	: Hidrojen
<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
HEPES	: N-2-Hidroksietil Piperazin-N-2-Etan Sülfonik Asit
hTERT	: İnsan telomeraz ters transkriptaz
IS	: Insertion dizisi
IL-8	: Interlökin 8
ITGB1	: Integrin B1
ITGA6	: Integrin alfa 6 prekürsör
Kb	: Kilobaz
KDa	: Kilodalton
MALT	: Mukoza ilişkili lenfoid doku
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinaz
Mcl-1	: Myeloid hücre lösemi-1
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz 9
MRE	: miRNA tepki elementi
mRNA	: Mesajcı RNA
MiRNA	: mikroRNA
NF-KB	: Nükleer Faktör kappa B
NKRF	: NF-KB baskılayıcı faktör
NH₃	: Amonyak
PPP2ca	: Protein fosfataz 2 katalitik altbirim alfa
PBS	: Tampon fosfat salin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
pre-miRNA	: Prekürsör miRNA
pri-miRNA	: Primer-miRNA
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAN-GTP	: Ras ilişkili nükleer protein- Guanozin-5'-Trifosfat
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
RNA	: Ribo nükleik asit
RISC	: RNA indüklü bir susturma kompleksine

SCF	: Skp, Cullin, F-kutusu içeren kompleks
SHP2	: Src homoloji 2 (SH2) içeren protein-tirozin fosfataz-2
STMN1	: Stathmin 1
TBE	: Tris - Borik asit- EDTA
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
T4SS	: Tip IV salgılama sistemi
TnpA	: Transpozaz A
TnpB	: Transpozaz B
TRBP	: Trans-aktivasyon tepkisi RNA-bağlayıcı protein
UTR	: Translasyona uğramayan bölge
VacA	: Vakuolizasyon sitotoksin A
VEGF-A	: Vasküler endotelial büyüme faktör A
ZEB1/ZEB2	: Çinko parmak E-kutu bağlama homeobox 1/2

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. Mide anatomik alt bölümleri.....	1
Şekil 1.2. Mide mukozasından kültürlenmiş <i>H. pylori</i> spiral bakterilerin negatif boyanmış preparasyonu.....	6
Şekil 1.3. A. Spiral hücreler; B-F. Kokoid hücreler	6
Şekil 1.4. Intestinal tip mide adenokarsinoma gelişimi.....	8
Şekil 1.5. <i>H. pylori</i> 26695 kromozomunun dairesel temsili.....	9
Şekil 1.6. Cag PAI yapısı.....	11
Şekil 1.7. CagA pozitif <i>H. pylori</i> 'nin mide epitel hücrelerle etkileşimi ve cagA' nın hücrelere aktarımı.....	12
Şekil 1.8. CagA-SHP2 kompleksinin MAPK yolağını indüklemesi.....	13
Şekil 1.9. CagA-SHP-2 sinyalinin Csk tarafından düzenlenmesi.....	13
Şekil 1.10. CagA' nın TGF-B yolağındaki etkisi.....	14
Şekil 1.11. CagA 3' bölgedeki farklı tekrar bölgelerinin sayısındaki varyasyonlara bağlı oluşan dört farklı primer gen yapısı.....	15
Şekil 1.12. CagA karboksil terminal bölgedeki EPIYA motif tipi ve miktarı.....	16
Şekil 1.13. MiRNA Biyogenezi.....	18
Şekil 1.14. MiR-200a' nın, ZEB1/ZEB2 kompleksini ve β -katenini hedefleyerek EMT' i regüle etmesi.....	22
Şekil 4.1. CagA P1(A), P2(B) ve P3 (C) motiflerinin saptanmasında kullanılan primer çiftlerinin pozisyonu ve oluşturdukları ürün boyutları.....	35
Şekil 4.2. Gerçek Zamanlı PZR fazları.....	40
Şekil 5.1. PZR ile cagA 3' değişken bölgenin ve R1, R2, R3 gibi farklı tekrarları kapsayan bölgenin saptanması.....	44
Şekil 5.2. PZR ile EPIYA motiflerinin saptanması.....	45
Şekil 5.3. <i>H. pylori</i> vacA m2 bölgeleri.....	46
Şekil 5.4. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-200a-3p ifadesinin değişimi.....	47
Şekil 5.5. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-29a-3p ifadesinin değişimi.....	48
Şekil 5.6. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-223-5p ifadesinin değişimi.....	49

TABLULAR

Sayfa No

Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda kullanılan primer çiftlerinin dizisi ve uzunlukları.....	28
Çizelge 3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR’da kullanılan olgun miRNA primer dizileri.....	29
Çizelge 4.1. TBE tampon, agaroz jel ve DNA uzunluk belirteci.....	35
Çizelge 4.2. PZR reaktifleri ve miktarları.....	35
Çizelge 4.3. PZR reaksiyon koşulları.....	35
Çizelge 4.4. RNA konsantrasyonu ve cDNA sentezinde kullanılan RNA miktarları.....	38
Çizelge 4.5. Poli (A) kuyruk ekleme reaktifleri.....	38
Çizelge 4.6. İlk-zincir cDNA sentez reaktifleri.....	39
Çizelge 4.7. cDNA sentez ürünlerinin seyreltilmesi.....	39
Çizelge 4.8. Gerçek zamanlı-PZR’da kullanılacak reaktifler.....	42
Çizelge 4.9. Gerçek zamanlı-PZR reaksiyon koşulları.....	42
Çizelge 5.1. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-200a-3p ifadesinin değişimi.....	47
Çizelge 5.2. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-29a-3p ifadesinin değişimi.....	48
Çizelge 5.3. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-223-5p ifadesinin değişimi.....	49
Çizelge 5.4. MiR-200-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadesinin kat değişimi.....	50

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Meyrem OSUM
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ocak 2018

ÖZET

MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK *HELICOBACTER PYLORİ* CagA GENOTİPLERİNDE MIR-200a-3p, MIR-223-5p ve MIR-29a-3p EKSPRESYON ANALİZİ

Mide kanseri, dünyada en yaygın beşinci malignite olup kansere bağlı ölümlerin önde gelen üçüncü nedenidir. *Helicobacter pylori*, mide kanser gelişimiyle ilişkili cagA virülans faktörü içermektedir. CagA geninin 3' değişken bölgesindeki dizi varyasyonlarının (A, B, C EPIYA motiflerinin sayısı ve R1, R2, R3 bölgelerinin organizasyonu ile oluşan A, B, C ve D cagA yapısı) mide kanser riskini etkilediği saptanmıştır. Özellikle birden fazla EPIYA-C motifi içeren C-tipi cagA'ya sahip suşların, mide kanser riskini artırdığı gösterilmiştir. *Helicobacter pylori* virülans faktör cagA'nın, let-7 dahil birçok miRNA ifadesini değiştirdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada kanserli mide dokularından izole edilen *Helicobacter pylori* suşlarının cagA geninin 3' değişken bölgesindeki dizi varyasyonlarını saptamak üzere PZR analizi yapıldı. *Helicobacter pylori* enfekte kanserli mide dokularında, miR-200a-3p, miR-223-5p ve miR-29a-3p miRNA'larının ifade değişimi kantitatif gerçek zamanlı PZR ile analiz edildi. CagA 3' değişken bölgedeki dizi varyasyonlarına (ABC EPIYA motifli A-tipi cagA ve AB-ABC EPIYA motifli A ve C tipi cagA) sahip suşlarla enfekte dokularda, miR-29a-3p ve miR-200a-3p ifadesinin azaldığı, miR-223-5p ifadesinin ise arttığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, polimorfik cagA, miRNA, mide kanseri

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Meyrem OSUM
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Degree Awarded and Date : Master of Science – January 2018

ABSTRACT

EXPRESSION ANALYSIS of MIR-200a-3p, MIR-223-5p and MIR-29a-3p in POLYMORPHIC *HELICOBACTER PYLORI* CagA GENOTYPES in GASTRIC CANCER

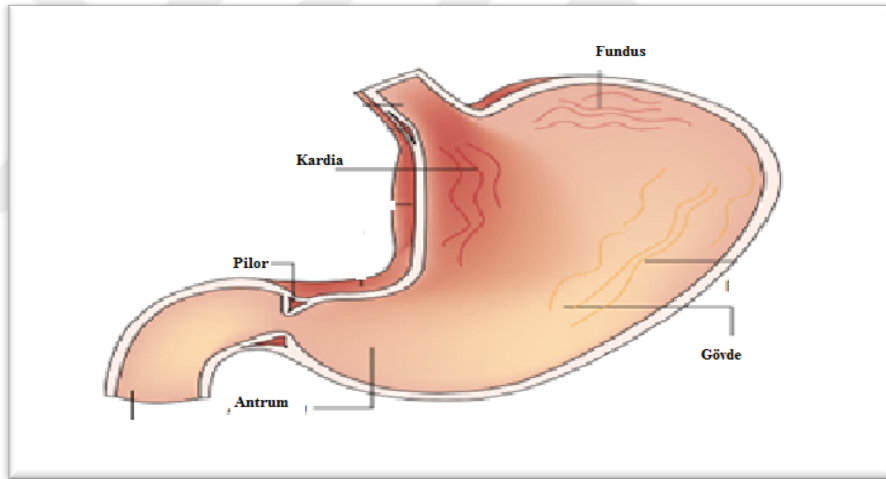
Gastric cancer is the fifth most common malignancy in the world and is the leading third cause of cancer-related deaths. *Helicobacter pylori* contains cagA virulence factor, which is associated with gastric cancer development. It has been determined that sequence variations in the 3' variable region of the cagA gene (number of A, B, C EPIYA motifs and A,B,C and D cagA structure formed by the organization of R1, R2, R3 regions) affects gastric cancer risk. In particular, it has been shown that strains with C-type cagA containing more than one EPIYA-C motif increases gastric cancer risk. It has been detected that *Helicobacter pylori* virulence factor cagA, alters many miRNA expressions, including let-7. In this study, PCR analysis was performed to detect sequence variations in the 3' variable region of the cagA gene of *Helicobacter pylori* strains isolated from cancerous stomach tissues. Expression changes of miR-200a-3p, miR-223-5p and miR-29a-3p miRNAs in cancerous stomach tissues infected with *Helicobacter pylori* were analyzed by quantitative real-time PCR. There was observed that a decrease in miR-200a-3p, miR-29a-3p expressions and a increase in miR-223-5p expression in infected tissues with strains with sequence variations in the 3' variable region (ABC EPIYA motif A type cagA and AB-ABC EPIYA motifs A and C type cagA).

Keywords: *Helicobacter pylori*, polymorphic cagA, miRNA, gastric cancer

1. GİRİŞ

1.1. Mide Kanseri

Mide, anatomik sınır ve histolojik farklılıklara göre kardia, fundus, gövde, pilor ve antrum şeklinde anatomik alt bölümlerden oluşmaktadır (Şekil 1.1) (Karimi ve diğ., 2014).



Şekil 1.1. Mide anatomik alt bölümleri (Peek ve Blaser, 2002)

Mide kanserlerinin yaklaşık %90'ı, midenin mukozasından veya midenin yüzeysel bezlerinden gelişen adenokarsinomlardır. Mukoza çevresindeki kaslardan gelişen leiomyosarkoma ve midenin lenfoid dokularından gelişen mukoza-ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomalar, mide kanserlerinin geri kalan yüzdesini oluşturmaktadır (Karimi ve diğ., 2014).

Lauren kriterlerine göre mide karsinomunun diffüz ve intestinal olmak üzere iki histolojik tipi mevcuttur. Diffüz ve intestinal tip adenokarsinomalar yapısal farklılıklar içermekte ve farklı etiyolojik faktörlere bağlı gelişmektedir (Lauren, 1965).

İntestinal tip tümör hücreler adezyon özelliğine sahipken; diffüz tip tümör hücreler bu özellikten yoksun olup tek hücreler veya küçük alt gruplar şeklinde bulunmaktadır. Diffüz tip karsinoma hücrelerine kıyasla intestinal tip karsinoma hücreler daha büyük ve morfolojik olarak fazla değişkenlik göstermektedir. İntestinal tip karsinomlarda çekirdek büyük, değişken şekilli, hiperkromatik olup çoğunlukla mitotik figürler sergilemektedir. Diffüz tip karsinomlarda ise çekirdek daha küçük, daha düzenli, hafif hiperkromatik olup mitotik figürlerin oluşturulması imkansızdır. İntestinal tip karsinoma hücrelerine kıyasla diffüz tip karsinoma hücreler daha fazla mukus salgılamaktadır. İntestinal tip karsinomada kronik gastrit ve intestinal metaplazi mevcutken; diffüz tip karsinomada çoğunlukla bulunmamaktadır (Lauren, 1965). İntestinal-tip mide karsinoma, en çok yaşlı erkeklerde görülmekte, yavaş progresyon ve daha iyi prognoz sergilemektedir. Diffüz tip mide karsinoması ise daha yaygın bir şekilde genç bireylerde görülmekte, hızlı progresyon ve kötü prognoz göstermektedir (Qiu ve diğ., 2013).

1.1.1. Mide Kanserinin Epidemiyolojisi

Mide kanseri, en yaygın 5. malignite olup (akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanserinden sonra) kansere bağlı ölümlerin önde gelen 3. nedenidir (Ferlay ve diğ., 2015).

Mide kanser insidansı, gelişmekte olan ülkelerde ve kadınlara kıyasla erkeklerde (2 kat) daha yüksektir (Ferlay ve diğ., 2015). En yüksek mide kanser insidansı, Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika; en düşük mide kanser insidansı, Kuzey Amerika ve Afrika' nın birçok bölgesinde gözlenmektedir (Karimi ve diğ., 2014). Mısır, İsrail, ABD ve diğer Akdeniz ülkelerine kıyasla Türkiye' nin mide kanser insidansı daha yüksektir. Türkiye' nin batı ve güney bölgelerinin, düşük mide kanser insidansına; doğu bölgesinin ise yüksek mide kanser insidansına sahip olduğu bildirilmiştir (Eser ve diğ., 2010).

Dünyanın birçok bölgesinde mide kanser insidans oranındaki düşüşe rağmen kardial mide kanser oranının, Batı ülkelerinde arttığı bildirilmiştir (Powell ve McConkey, 1990).

1.1.2. Mide Kanserinin Etiyolojisi

Mide kanseri, hem genetik hem de çevresel faktörlere bağlı gelişen multifaktöriyel bir hastalıktır (Karimi ve diğ., 2014). Ülkeler ve nesiller arasındaki mide kanser oranındaki farklılıklar, mide kanser gelişiminde çevresel faktörlerin daha fazla rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (Zheng ve diğ., 2004).

Mide kanser patogenezinde, genetik olarak DNA metilasyonu, histon modifikasyonları vs., gibi mekanizmalar yer almaktadır (Cong H ve diğ.,2016, Yun J ve diğ., 2012). *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) enfeksiyonu, sigara tüketimi, tuzlu/füme gıda alımı, az meyve/sebze tüketimi, düşük sosyo-ekonomik durum, yaş vs., mide kanseri için çevresel risk faktörlerini oluşturmaktadır (Karimi ve diğ., 2014).

Midenin kardial ve non-kardial bölgelerinde gelişen kanserler için ortak ve farklı risk faktörleri mevcuttur. Ortak risk faktörlerini ileri yaş, erkek cinsiyeti, tütün, radyasyon ve aile hikayesi oluşturmaktadır. Kardial ile ilişkili faktörler obezite, gastroözofageal reflü hastalığı; non-kardial ile ilişkilendirilenler ise *H. pylori* enfeksiyonu, düşük sosyo-ekonomik durum, az meyve/sebze tüketimi ve yüksek tuz/füme gıda alımı sayılabilmektedir (Karimi ve diğ., 2014).

Batı ülkelerindeki kardial kanser oranındaki artış, Doğu Asya ülkelerinde saptanmamıştır. Çin'de yapılan bir çalışma, *H. pylori*'yle tetiklenen kronik inflamasyonun, kardial kanser gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Wang ve diğ., 2014).

1.2. *Helicobacter pylori*

1.2.1. *Helicobacter pylori* Tarihçesi

Birçok araştırmacı, insan ve hayvanların mide mukozasındaki spiral organizmaların varlığını bildirseler de, bu organizmaların kültür edilmesindeki başarısızlıktan dolayı klinik önemi göz ardı edilmiştir. (Konturek, 2003, Kidd ve Modlin,1998). Ancak Royal Perth Hastanesinde patolog olan Robin Warren, 135 mide biyopsi örneğinde tespit ettiği küçük kavisli ve S- şeklindeki basillerin, aktif kronik gastritte hemen hemen mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Bu bakterinin mikroskopta görüntülenebilecek kadar yeterli sayıda olduğunu ve *Campylobacter jejuni*'ye benzediğini bildirmiştir (Warren ve Marshall, 1983). Bu organizmayı tanımlayabilmek için Warren ve Marshall, *Campylobacter*'inin aynı kültür tekniklerini kullanarak mide biyopsilerini kltrlemeye çalıştılar. İlk 34 kültürün negatif olduğunu tespit ettiler. Ancak Paskalya tatilinde 6 gün boyunca yanlışlıkla mikroaerobik kültür kabininde unutulanan 35. kültürün, pozitif olduğunu saptadılar. Biyopsi örneklerinden kültürlenen bu bakterilerin gram-negatif, flagellalı ve mikroaerofilik olup *Campylobacter* cinsiyle ilişkili yeni bir tür olabileceğini bildirdiler. Ayrıca bu bakteriyi, aktif kronik gastrit, duodenal ülser, gastrit ülserli hastalarda tespit ederek bu hastalıkların gelişmesinde önemli bir faktör olabileceğini ileri sürdüler (Marshall ve Warren, 1984). Bunu kanıtlamak için Marshall kendini kobay olarak kabul ederek gerçekleştirdiği bir çalışmayla belli bir süre sonunda akut gastrit geliştirdi ve ardından kendini tedavi edebildi (Marshall ve diğ., 1985).

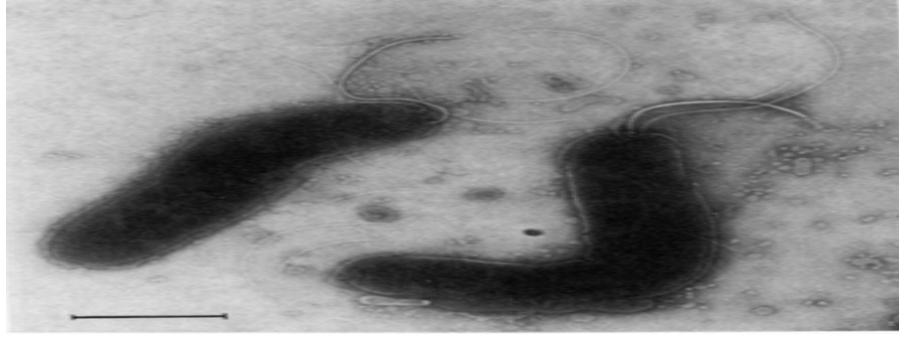
1984'de Warren ve Marshall, *Campylobacter* cinsinin bazı özelliklerine sahip bu bakteriyi *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırsa da 1987'de tür ismi '*pylori*' olarak değiştirildi (Goodwin ve diğ., 1989, Marshall ve Goodwin, 1987).

Campylobacter pylori' nin (C.pylori), antibiyotik duyarlılıkları, hücresel yağ asitleri ve 5S/16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) dizisi bakımından diğer *Campylobacter*lerden farklı olduğu bildirilmiştir (Goodwin ve diğ., 1985, Goodwin ve diğ., 1986, Goodwin ve diğ., 1986a, Lau ve diğ., 1987). Ayrıca rRNA dizisine bağlı olarak *C. pylori' nin*, *Wolinella* cinsine ait olabileceği ileri sürülse de *C. pylori' nin*, morfolojisi, hücresel yağ asitleri, büyüme karakteristikleri ve enzim kabiliyetleri bakımından *Wolinella* cinsinden büyük farklılıklar içerdiği gösterilmiştir. Böylece *C. pylori' nin* cins ismi *Helicobacter* olarak değiştirilerek *Helicobacter pylori* olarak adlandırılmıştır (Goodwin ve diğ., 1989).

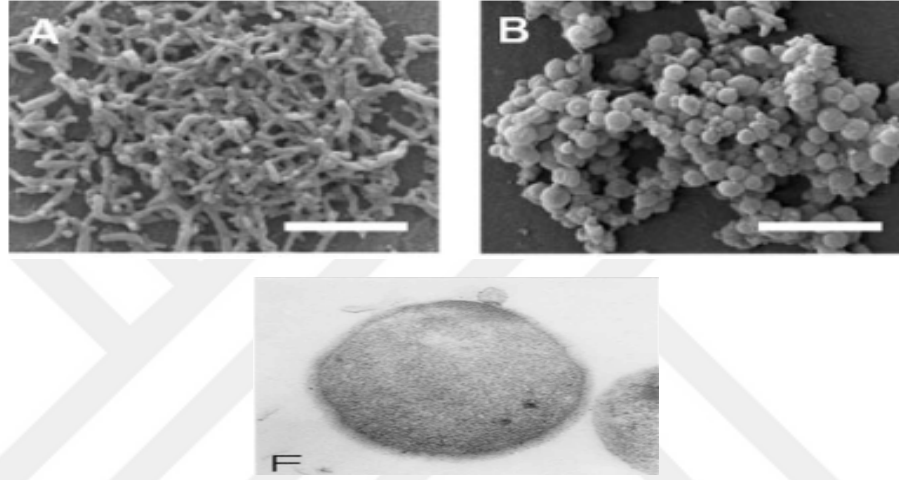
2005'de Warren ve Marshall, *H. pylori' yi* keşfettikleri ve gastrit ve peptik ülserle yol açtıklarını gösterdiklerinden Nobel Tıp Ödülü almışlardır (Kusters ve diğ., 2006).

1.2.2. *Helicobacter pylori' nin* Morfolojisi

H. pylori, mide biyopsi örneklerinde 3-3.5µm uzunluğunda ve 0.5-1µm genişliğinde, mikroaerofilik, gram negatif bir bakteridir. Bakteri, hareketi için gerekli bir uçtan uzanan (unipolar) 4-6 kılıflı flagellaya ve pürüzsüz bir yüzeye sahiptir (Şekil 1.2) (Goodwin CS. ve diğ., 1985, Marshall ve Warren, 1984, Jones and Fox, 1985). *H. pylori' nin* çoğunlukla spiral ve kokoid (kültürü yapılamayan) olmak üzere farklı şekilleri mevcuttur. Ancak in vitro kültür ortamlarda, *H. pylori* çoğunlukla çubuk şeklinde olsa da yaşlanma veya olumsuz koşullara bağlı olarak kokoid forma dönüşmektedir (Şekil 1.3). Araştırmacıların bir kısmı Ribo Nükleik asit (RNA) kaybıyla oluşan kokoid formun, bakteriyel hücre ölümüne bağlı geliştiğini savunmaktadır (Kusters ve diğ., 1997). Ancak bazı araştırmacılar kokoid forma dönüşümün, bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını sağlayabilecek aktif bir süreç olabileceğini ileri sürmektedir (Azevedo ve diğ., 2007).



Şekil 1.2. Mide mukozasından kültürlen *H. pylori* spiral bakterilerin negatif boyanmış preparasyonu (Jones and Fox,1985)



Şekil 1.3. A. Spiral hücreler; B-F. Kokoid hücreler (Azevedo ve diğ.,2007, Kusters ve diğ.,1997)

1.2.3. *Helicobacter pylori*'nin Epidemiyolojisi

H. pylori, dünya nüfusunun yaklaşık yarısını enfekte etmekte ve tedavi edilmediği takdirde konakçının yaşamı boyunca midedeki kalıcılığını sürdürmektedir (Tsutsumi ve diğ., 2003).

H. pylori prevalansı, gelişmiş ülkelere kıyasla gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir (Bor ve diğ., 2007, Ozaydın ve diğ., 2013). *H. pylori* prevalansının düşük olduğu bölgelerde, mide kanseri göreceli olarak düşük insidansa sahiptir. Ancak Kolombiya'daki mide kanser insidansı düşük ve yüksek iki bölgede, *H. pylori* prevalansının benzer olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle dünya çapında değişiklik gösteren mide kanser insidansı, sadece *H. pylori* prevalansındaki değişikliklerle ilişkilendirilememektedir (Loh ve diğ., 2010).

H. pylori enfeksiyonu ve yaş arasında ters bir ilişki bildirilmiştir. Türkiye’de 18 yaş üzeri yetişkinlerde *H. pylori* prevalansı %82.5 olarak bulunmuştur (Ozaydın ve diğ., 2013) *H. pylori* prevalansının erken yaşlarda yaşla birlikte arttığı, ancak belirli bir yaştan sonra (50-60 yaş) azaldığı saptanmıştır. Ankara’da *H. pylori* prevalansı, 40-49 yaş grubunda en yüksek iken; 50 yaş üzerinde azalmaya başladığı bulunmuştur (Us ve Hasçelik, 1998). Ancak bazı çalışmalar *H. pylori* prevalansının yaşla birlikte arttığını ileri sürmektedir (Megraud ve diğ., 1989).

Türkiye dahil birçok ülkede, *H. pylori* enfeksiyonu için kadınlara kıyasla erkeklerin daha yüksek bir risk taşıdığı bildirilmiştir. Cinsiyet farkının sebebi belirsiz olsa da bu durum kadınlara kıyasla erkeklerin, hijyene daha az önem vermesi, alkol ve sigaraya daha fazla yönelmelerinden kaynaklanabilmektedir (Ozaydın ve diğ., 2013).

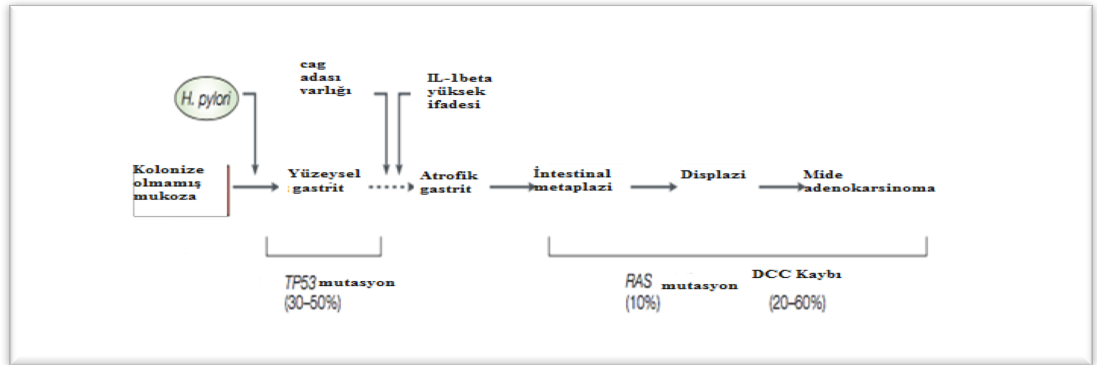
H. pylori enfeksiyonu için yerleşim bölgelerinin bir risk faktörü oluşturduğu bilinmektedir. Türkiye’ nin doğusunun, güneye kıyasla *H. pylori* enfeksiyonu açısından daha yüksek bir risk altında olduğu bildirilmiştir. Bunun olası nedeni doğunun narenciye bakımından fakir bir bölge olmasıdır. Özellikle narenciyelerin yüksek miktarda içerdiği C vitamini, enfeksiyonların önlenmesinde etkilidir (Ozaydın ve diğ., 2013).

1.2.4. *Helicobacter pylori*’ nin Mide Kanseriyle İlişkisi

H. pylori, sadece mide epitelini kolonize edebildiğinden insanlarda mide mukozasını ve mide metaplazinin geliştiği bölgeleri (duodenum) enfekte etmektedir (Wyatt ve diğ., 1990). *H. pylori*’ nin mide mukozasını enfekte etmesinde üreaz ve flagella önemli rol oynamaktadır (Eaton ve diğ., 1991, Eaton ve diğ., 1992, Eaton ve diğ., 1996). *H. pylori* asidik ortamlarda yaşayamaz ve asidik gastrik lümeninden, alkalik mide mukusuna geçişte koruyucu bir üreaz enzimi üretmektedir (Eaton ve diğ., 1994). Bu üreaz enzimi, üreyi, amonyak (NH₃) ve karbon dioksit (CO₂) hidroliz eder. Oluşan NH₃ (asit nötrleştirici), *H. pylori*’ nin mide asiditesinden korunmasını sağlar (Marshall ve diğ., 1990).

H. pylori, mide kanseri gelişiminde etkili olabilecek bir risk faktörüdür (Parsonnet ve diğ., 1991). *H. pylori*, çoğunlukla erken çocukluk döneminde kazanılmakta ve toplumun küçük bir yüzdesinde peptit ülser, mide karsinoması gibi hastalıklara neden olmaktadır (Malaty ve diğ., 2002, Yamaoka ve diğ., 1998). Çoğu çalışma *H. pylori* enfeksiyonunun, hem intestinal hem de diffüz mide adenokarsinoma riskini önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir (Hansson ve diğ., 1993).

H. pylori enfeksiyonu, kronik gastritin esas nedeni olup mide kanser riskinin artışıyla ilişkili atrofi ve metaplaziye yol açmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu ve gastrit, mide kanserinin her iki alt tipinin (intestinal ve diffüz tip adenokarsinoma) gelişimine katılmaktadır. Ancak her iki alt tipin gelişimi, *H. pylori* ilişkili gastritin, inflamasyondan atrofiye doğru seyrine göre belirlenmektedir. İntestinal tip mide karsinomu, atrofiye bağlı; diffüz tip mide karsinomu ise non-atrofi, non-metaplaziye bağlı gelişmektedir (Sipponen ve diğ., 1992). İntestinal tip mide kanser gelişimi, *H. pylori* enfeksiyon varlığında normal mukozanın, sırasıyla kronik yüzeysel gastrit, atrofik gastrit, intestinal metaplazi, displazi ve sonunda adenokarsinoma şeklinde meydana gelmektedir (Şekil 1.4.) (Peek ve Blaser, 2002).

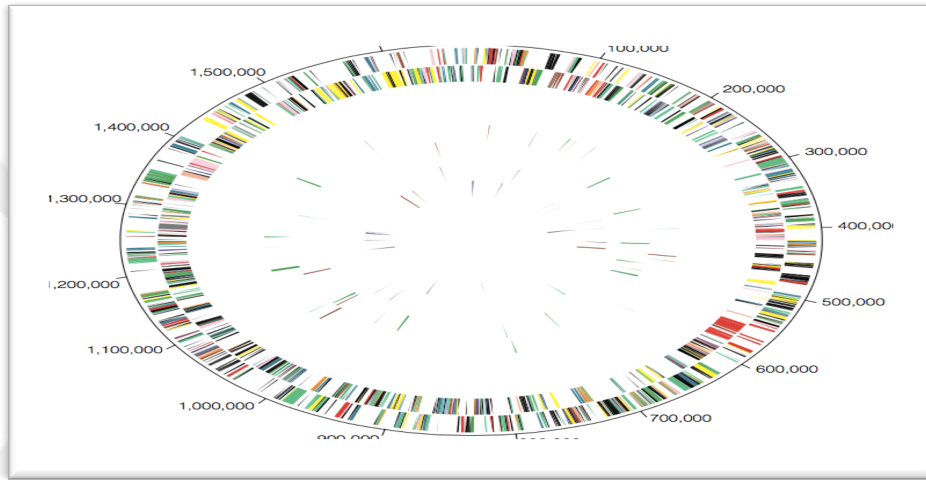


Şekil 1.4. İntestinal tip mide adenokarsinoma gelişimi (Peek and Blaser, 2002)

H. pylori'nin, atrofik gastritli bireylerin mide biyopsi örneklerinde nadir bulunduğu ve zamanla azalarak tespiti zor hale geldiği gösterilmiştir. Ayrıca intestinal metaplazi gelişiminin *H. pylori*'nin yok olmasına neden olacak koşulları sağlayabileceği bildirilmiştir (Karnes ve diğ., 1991).

1.2.5. *Helicobacter pylori*' nin Genomu

H. pylori 26695 ve J99 suşlarının tam genom dizi analizi yapılmıştır. *H. pylori* 26695 ve J99 suşlarının genomu sırasıyla, 1,667,867bp ve 1,643,831bp büyüklüğünde olup daireseldir (Şekil 1.5.). Bu suşların genomlarında ortalama %39 oranında guanin+sitozin (G+C) bulunmaktadır. Her iki suş genomu, 16S ve 23S-5S ribozomal RNA (rRNA) genlerinin iki kopyasını içermektedir. Bu rRNA genlerinin birbirine yakın olmaması bu lokusların kompleks bir şekilde regüle edilebileceğini göstermektedir (Alm ve diğ., 1999, Tomb ve diğ., 1997).



Şekil 1.5. *H. pylori* 26695 kromozomunun dairesel temsili (Tomb ve diğ.,1997)

J99 ve 26695 suşları, *H. pylori* ilişkili hastalıkların şiddetiyle bağlantılı sitotoksin ilişkili gen patojenite adasını (cag PAI) içermektedir. Ancak diğer suşlara kıyasla bu suşların, cagPAI'daki sitotoksin ilişkili gen 7'de (cag7) delesyon içerdiği bildirilmiştir (Alm ve diğ., 1999).

H. pylori genetik olarak heterojendir. Farklı bireylerden elde edilen *H. pylori* izolatları genomik açıdan farklılıklar göstermektedir. Ayrıca aynı ailenin üyeleri arasında benzer *H. pylori* suşlarının, bireyler arasında önemli farklılıklar gösterdiği de bildirilmiştir. Bu genetik heterojenlik, *H. pylori*' nin konakçının değişen mide koşullarına adaptasyonunu ve başarılı bir şekilde kolonizasyonunu sağlamaktadır (Kuipres ve diğ., 2009).

1.2.6. *Helicobacter pylori* Çeşitliliğinin Mide Kanseri Riskine Etkisi

H. pylori suş çeşitliliği, konakçı genetiğiyle belirlenen inflamatuvar yanıtlar, konak ve mikrobiyal belirteçler arasındaki etkileşimlerin mide kanseri gelişiminde etkili olduğuna inanılmaktadır (Peek ve Blaser, 2002).

Horizontal gen transferi ve rekombinasyon, *H. pylori* suşlarının genetik çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır. Horizontal gen transferi, transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon gibi mekanizmalarla meydana gelmektedir. Ancak tek bir konağın iki veya daha fazla farklı suş taşıması ve *H. pylori*'nin kompetant özelliği transformasyonun, horizontal gen transferi için daha etkili bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Go ve diğ., 1996. Taylor ve diğ., 1995). Rekombinasyon dışında nokta mutasyonları, inversiyon, insertion veya delesyonlar gibi kromozomal yeniden düzenlemelerin de, *H. pylori* suşlarındaki genetik çeşitliliğe katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Peek ve Blaser, 2002).

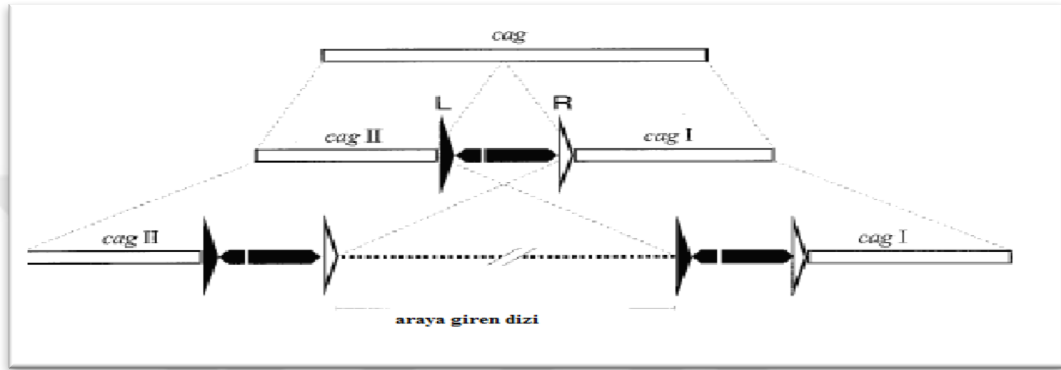
Bu genetik çeşitliliğe rağmen mide kanseri risk derecesini gösterebilecek, cag PAI, vakuolizasyon sitotoksin A (VacA) ve kan grubu antijen bağlayıcı adhezin (BabA2) genlerini içeren birkaç genetik lokasyon mevcuttur (Peek ve Blaser, 2002).

H. pylori suşları, tip I ve tip II suşları şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Tip I suşları, vacA ve sitotoksin ilişkili gen A (cagA) genine sahipken; tip II suşları sadece vacA genine (null gen veya non-toksik, immuno-reaktif) sahiptir. Birçok çalışmaya göre, duodenal ülserli, mide tümörlü birçok hastanın, yaklaşık 40kb uzunluğunda cag PAI sahip tip I suşlarla enfekte olduğu bildirilmiştir (Censini ve diğ., 1996, Xiang ve diğ., 1995)

1.2.7. Cag PAI

H. pylori suşları arasında en önemli varyasyonlardan biri, 27-31 gen içeren cag PAI'sinin varlığıdır (Peek ve Blaser, 2002). 40 kb uzunluğundaki bu cag PAI, horizontal iletim yoluyla edinilip glutamat rasemaz geninin 3' ucuna eklenmiştir. Cag PAI, glutamat rasemaz geninin 3' ucundaki duplikasyonlarla oluşan 31bç'lik direkt bir tekrarlarla çevrelenmiştir. *H. pylori* suşlarında cag PAI, tek bir kesintisiz yapı şeklinde bulunabileceği gibi, insertion dizisi 605'in (IS605) bir kopyası veya iki IS605 dizisinin çevrelediği büyük bir kromozomal DNA parçasıyla cag I ve cag II şeklinde iki bölüme ayrılabilir (Şekil 1.6.). Sadece tip I suşlarında bulunan IS605, tnpA (transpozaz A) ve tnpB (trnpozaz B) transpozazlarını kodlar. Bu

yapının, cag PAI'ında iki veya daha fazla tekrarı bulunabilmektedir. IS (insertion dizisi) elementleri ve 31bç'lik direkt tekrarlar, *H. pylori* cag PAI' nin yeniden düzenlenmesine, kısmi veya tamamen delesyonlarına neden olabilmektedir (Censini ve diğ., 1996). Ancak cag PAI genlerinin delesyonlarını taşıyan bazı suşların, IS elementlerini içermedikleri tespit edilmiştir. Bu suşlardaki delesyonlarda, IS elementleri dışında başka mekanizmaların etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Jenks ve diğ., 1998).



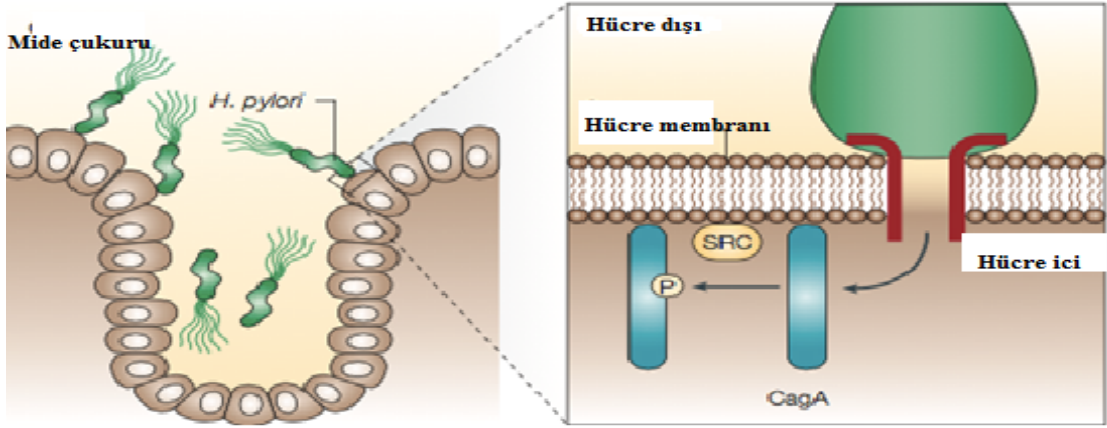
Şekil 1.6. Cag PAI yapısı (Censini ve diğ., 1996)

Cag PAI, cagA ve epitel hücrelere nüfuz eden şırınga benzeri bir yapı oluşturup cagA' nın translokasyonunu sağlayan tip IV salgılama sistemi (T4SS) proteinlerini kodlayan genleri içermektedir (Argent ve diğ., 2005, Censini ve diğ., 1996).

1.2.8. CagA

Cag PAI'sındaki, cagI bölgesinin bir terminal geni olan cagA, 120-145kiloDalton'luk (kDa) immunodominant bir protein olan cagA antijenini kodlar. CagA negatif suşlardan ziyade cagA pozitif suşlar, gastrit inflamasyon, atrofik gastrit, peptit ülser hastalığı ve mide kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Tsutsumi ve diğ.,2003, Nguyen ve diğ., 2015).

T4SS ile mide epitel hücrelere aktarılan cagA, plazma membranının iç yüzeyine lokalize olup c-Src, Lyn, Fyn ve Yes gibi tirozin fosforile edici Src kinaz ailesinin birçok üyesi tarafından tirozinlerden fosforilasyona uğrar (Şekil 1.7.). CagA' nın tirozin fosforilasyonu, proteinin karboksil terminal değişken bölgesindeki (3' değişken bölge) Glutamik asit-Prolin-Izolosin-Tirozin-Alanin (EPIYA) motiflerinde meydana gelmektedir (Higashi ve diğ., 2005, Tsutsumi ve diğ.,2003).



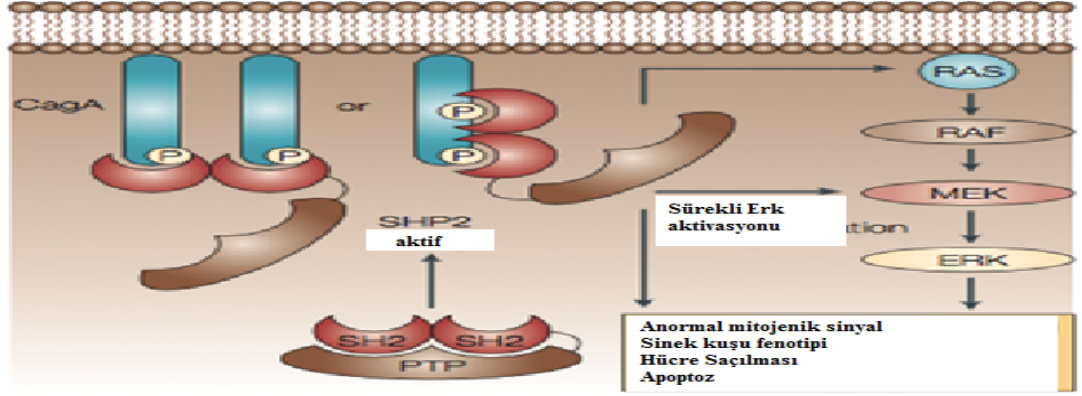
Şekil 1.7. CagA pozitif *H. pylori*'nin mide epitel hücreleriyle etkileşimi ve cagA'nın hücrelere aktarımı (Hatakeyama,2004)

Fosforilasyona bağımlı veya bağımsız bir şekilde cagA proteini, hücresel moleküllerle etkileşerek hücredeki birçok değişikliğe (epitel-mezenkimal geçiş hücre çoğalmasındaki artış vs) yol açmaktadır (Cover, 2016).

Fosforillenmiş cagA, Src homoloji 2 (SH2) içeren protein-tirozin fosfotazla (SHP2) etkileşerek aktivasyonunu sağlar. Bu etkileşim için SHP2'nin SH2 domainleri (N-SH2, C-SH2) ve cagA'nın tirozinlerden fosforilasyonu gereklidir. CagA-SHP-2 etkileşimiyle oluşan bu kompleks, Ras bağımsız-ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz (ERK), mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) aktivasyonunu sağlayarak sinek kuşu fenotip (hücre şeklinin uzaması ve hareketi) oluşumuna öncülük eder (Şekil 1.8) (Higashi ve diğ., 2004, Nagase ve diğ., 2015).

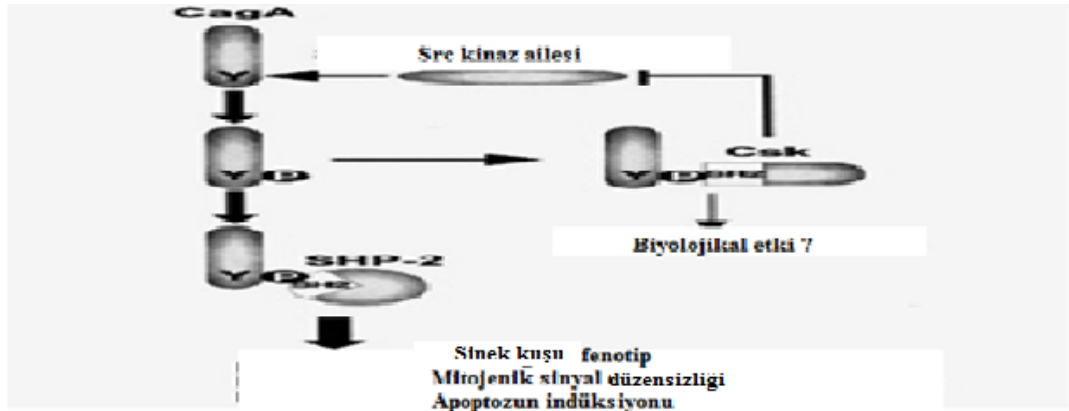
Fosforillenmiş cagA, SHP-2'yi sitoplazmadan membrana toplayarak membrana yakın aktivasyonunu sağladığı için, memeli iskele adaptör proteinlerine benzetilmektedir. CagA'nın patojenik aktivitesi için cagA'nın membrana bağlanması gereklidir. CagA'nın membrana bağlanması, EPIYA motifleriyle sağlanmaktadır. Tek bir EPIYA motifi, cagA'nın membrana lokalizasyonu için yeterli olsa da SHP-2 gibi proteinlerin membrana lokalizasyonunu yönlendirmede yeterli değildir (Higashi ve diğ., 2004, Higashi ve diğ., 2005).

CagA bağımlı SHP-2 ifadesinin düzensizliği, Ras'ın aktivasyonu ile apoptozu tetikleyebilmektedir (Şekil 1.8). Birçok çalışma, kronik gastritli hastalarda *H. pylori* enfeksiyonunun, genetik instabilite ve p53'ü inaktive edici nokta mutasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle cagA-SHP-2 kompleksinin konak hücredeki etkisi p53 durumuna göre değişmektedir (Tsutsumi ve diğ., 2003).



Şekil 1.8. CagA-SHP2 kompleksinin MAPK yolağını indüklemesi (Hatakeyama,2004)

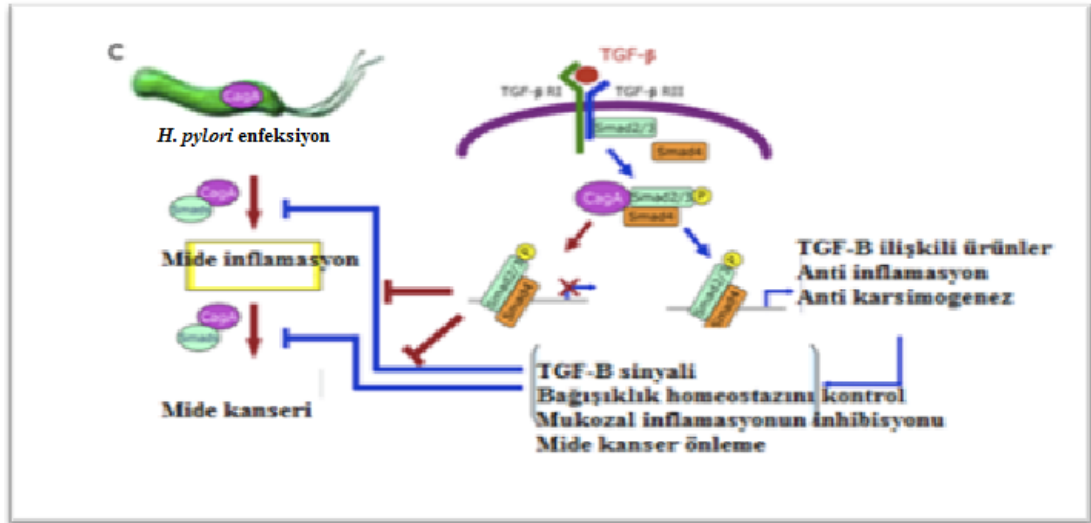
CagA'nın tirozin fosforilasyon formu, SHP2'ye ek olarak düşük affiniteyle C-terminal SRC kinazla (CSK) etkileşmektedir. CagA-CSK kompleks oluşumuyla uyarılan CSK, Src kinaz ailesini inaktive etmektedir. Src kinaz inaktivasyonu ile cagA fosforilasyon seviyesi azalmakta ve CagA-SHP-2 kompleksi inhibe edilerek sinek kuşu fenotip oluşumu engellenmektedir (Şekil 1.9) (Tsutsumi ve diğ., 2003).



Şekil 1.9. CagA-SHP-2 sinyalinin Csk tarafından düzenlenmesi (Tsutsumi ve diğ., 2003).

CagA' nın C-terminal bölgesinde, EPIYA motiflerinden farklı olan ve CRPIA (fosforilasyondan-bağımsız aktiviteden sorumlu korunmuş tekrarlar) olarak adlandırılan bir motifin, *H. pylori* patogenezinde önemli rol oynadığı bulunmuştur. Fosforilasyondan bağımsız bir şekilde cagA' nın (CRPIA motifi ile), aktive edilmiş hepatosit büyüme faktör reseptörüyle (MET) etkileşerek, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ Akt sinyalizasyonunun sürekli aktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir. Adaptör protein Gab1, aktive edilmiş MET'e doğrudan bağlanarak Met aşağı akış sinyal yolağının modülasyonuna katılmaktadır. CagA' nın, Met sinyal yolağında, Gab1'in fonksiyonel rolünü taklit ettiği düşünülmektedir. PI3K'ya bağımlı bir şekilde GSK3β ve IKβ kinaz fosforilasyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Böylece PI3K/Akt yolağının aktivasyonu, sırasıyla çoğalmayı ve inflamasyonu tetikleyen β-katenin ve nükleer faktör kappa B (NF-KB) aktivasyonuna aracılık etmektedir (Suzuki ve diğ., 2009).

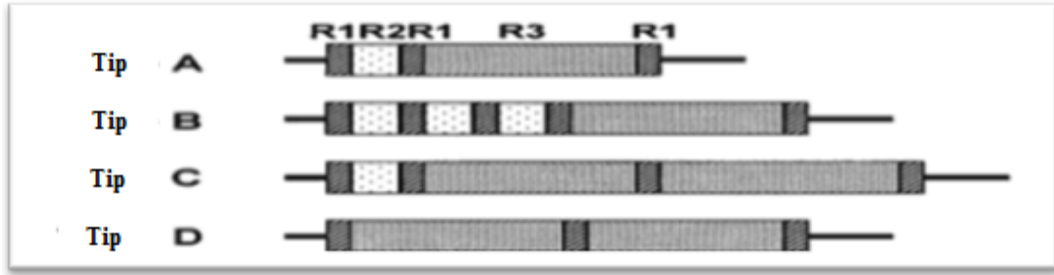
CagA, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) sinyalizasyonunda, hemen hemen tüm Smad'larla etkileşimde bulunsa da Smad3'e daha güçlü bir şekilde bağlanmaktadır. Böylece cagA, Smad3 ve Smad4 kompleks oluşumunu baskılayarak, TGF-β' nin anti-inflamatuar ve kanser baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır (Şekil 1.10) (Nguyen vd., 2015).



Şekil 1.10. CagA' nın TGF-B yolağındaki etkisi (Nguyen ve diğ., 2015)

1.2.9. CagA Dizisi ve Ekspresyonundaki Varyasyonlar

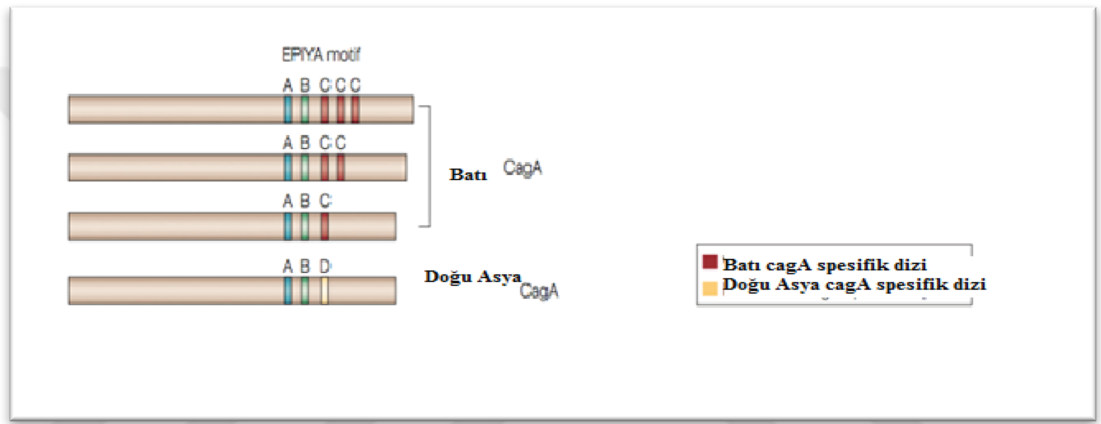
CagA geninin primer yapısı, oldukça korunmuş 5' bölgeyi ve değişken sayıda tekrar dizilerin varlığı nedeniyle proteinde boyut farklılıkları oluşturan 3' değişken bölgeyi içermektedir. Mide karsinoma insidansı yüksek olan Japonya'da, cagA'nın 3' değişken bölgeleri incelendiğinde R1 (EPIYA), R2 ve R3 gibi farklı tekrar bölgelerinin sayısındaki varyasyonlara bağlı oluşan dört farklı cagA primer dizi yapısı (A-D) belirlenmiştir (Şekil 1.11). C tipi cagA yapısının, mide kanserli hastalarda daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Mide kanserli hastalardan izole edilen B ve C tip suşların, şiddetli atrofik gastrite neden olduğu gösterilmiştir. C-tipi suşlarla enfekte hastalarda yüksek cagA antikor seviyesi, daha güçlü ve kalıcı bir bağışıklık tepkisini göstermektedir. Bu yüksek seviyede bağışıklık tepkisi, şiddetli atrofi gelişimine neden olabilmektedir. Tüm bu sonuçlar, cagA gen yapısındaki varyasyonların, cagA pozitif *H. pylori* suşları arasındaki virülans farklılıklarının belirlenmesinde bir belirteç görevi görebileceğini ortaya koymaktadır (Yamaoka ve diğ., 1998).



Şekil 1.11. CagA 3' bölgedeki farklı tekrar bölgelerinin sayısındaki varyasyonlara bağlı oluşan dört farklı primer gen yapısı; Tip A gen (642-651bç), B ve D tip cagA gen (756bç), C tip cagA gen (810-813bç); R1-EPIYA (15bç), R2 (42bç), R3 (147bç) (Yamaoka ve diğ., 1998)

CagA geni, karboksil-terminal değişken bölgede, EPIYA motif içeren dizi tekrarlarına sahiptir. Bu dizilerin farklı sayıdaki tekrarı, cagA protein boyutundaki farklılıklara neden olmaktadır. Ayrıca EPIYA motifleri arasındaki insersiyon veya delesyonlar, motif sayısını etkilemeden proteinde boyut farklılıkları oluşturabilmektedir (Argent ve diğ., 2005). CagA EPIYA motiflerinin çevresindeki amino asit dizilerine bağlı olarak EPIYA-A, -B, -C veya -D olmak üzere üç farklı EPIYA dizisi mevcuttur. Bunlar; ilk pozisyon (P1; EPIYA-A) EPIYA(Q/K) VNKKK(T/A)GQ, ikinci pozisyon (P2;EPIYA-B) EPIY(A/T)QVAKKV, üçüncü pozisyon (P3;EPIYA-C) EPIYATIDDLGGPFPL veya (EPIYA-D), EPIYATIDFDEANQAG'dir (Şekil 1.12) (Argent ve diğ., 2005, Hatakeyama, 2004).

Üçüncü pozisyondaki EPIYA motif tipine bağlı olarak *cagA*, Batı *cagA* (EPIYA-C) ve Doğu Asya *cagA* (EPIYA-D) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Japon, Kore ve Çin gibi ülkelerdeki bireyler, Doğu Asya *cagA* suşlarla; Doğu Asya harici ülkelerdeki bireyler, Batı *cagA* suşlarla enfektir. Batı *cagA* proteini, EPIYA-C motifinin birden fazla tekrarını içerebilirken; Doğu Asya *cagA* proteini, EPIYA-D tekrarını çoğunlukla içermemektedir. Batı *cagA*'nın SHP-2'ye bağlanma aktivitesinin, EPIYA-C motif tekrarındaki artışla pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca EPIYA-C motif tekrarındaki artışın, mide kanser riskini artırdığı bildirilmiştir (Nagase ve diğ., 2015).



Şekil 1.12. CagA karboksil terminal bölgedeki EPIYA motif tipi ve miktarı (Hatakeyama, 2004)

H. pylori suşları arasında, *cagA* ifade seviyesinde önemli farklılıklar bulunmaktadır. Kolombiya'daki bir çalışma, *H. pylori* suşları arasındaki *cagA* ifadesinde önemli farklılıkların olduğunu ortaya koymuştur. CagA'nın transkripsiyonel başlangıç yeri ile ATG başlatma bölgesi arasında lokalize AATAAGATA motifinin, yüksek seviyede *cagA* ifade eden suşlarda daha sık bulunduğu tespit edilmiş ve mide kanser gelişim riskiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak bu motifin, düşük seviyede *cagA* ifade eden suşlardaki varlığının belirlenmesiyle yüksek seviyede *cagA* ifadesi için bu motifin aşağı akışındaki dizilerin gerekliliği de ortaya konulmuştur (Loh ve diğ., 2011).

Konak hücreye yüksek miktarda *cagA* translokasyona sahip suşların, daha yüksek hidrojenaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. T4SS ile *cagA*'nın konak hücrelere translokasyonu için enerji gereklidir. Bu enerjinin de hidrojenazın, hidrojen (H₂) oksidasyonunu katalizlemesiyle sağlanabileceği bildirilmiştir. Ayrıca yüksek hidrojenaz aktivitesinin, yüksek seviyede inflamasyona ve mide kanser gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Tüm bu sonuçlar, hidrojenaza bağlı hidrojen oksidasyonunun, *H. pylori* indüklü mide kanser gelişimindeki rolünü ortaya koymaktadır (Wang ve diğ., 2016).

1.3. MikroRNA'lar

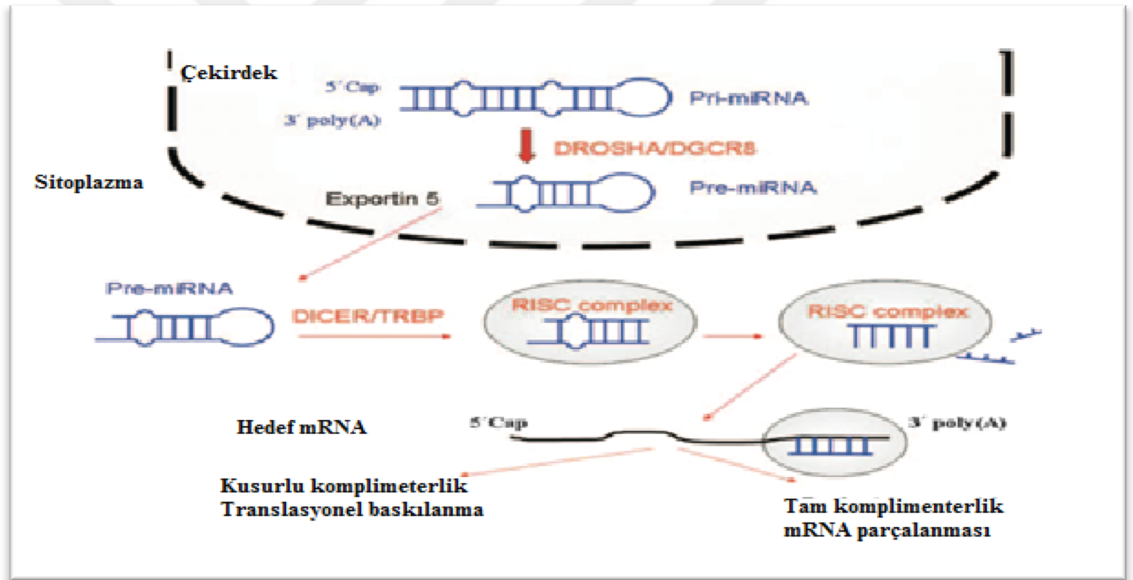
MikroRNA'lar (miRNA), küçük kodlamayan tek zincirli RNA'lar olup bitki ve hayvanların genomlarından kodlanmaktadır (Catalanotto vd., 2016). MiRNA'lar, yaklaşık 20-25 nükleotit uzunluğunda olup hedef gen mRNA'larının 3' translyasyona uğramayan bölgelerine (UTR) bağlanarak transkripsiyon sonrası gen ifadesinin baskılanmasından sorumludur (Erson ve Petty, 2008, Zhang ve diğ., 2007).

MiRNA genlerinin büyük bir çoğunluğu kanserle ilişkili genomik bölgelerde veya kırılğan bölgelerde lokalizedir (Zhang ve diğ., 2007). İnsan genomundaki protein kodlayan genlerin yaklaşık 60%'ını hedefleyebilen miRNA'lar, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz gibi birçok sürece katılmakta ve ifadesindeki değişiklikler çeşitli kanser türlerinin gelişmesine neden olabilmektedir (Taguchi, 2016:1712).

1.3.1. MikroRNA Biyogenezi

MiRNA'lar, polimeraz II/III tarafından primer-miRNA'a (pri-miRNA) olarak zamana ve dokuya spesifik bir şekilde transkript edilmektedir. 5'şapka ve 3'poliadenilasyona sahip pri-miRNA, yüzlerce veya binlerce nükleotit uzunluğundadır. RNA III endonükleaz Drosha ve çift zincirli RNA'ya bağlanan protein DiGeorge sendrom kritik bölge 8'i (DGCR8) içeren nükleer mikroproses kompleksi, pri-miRNA'ları, 60-70 nükleotit uzunluğundaki prekürsör-miRNA'lara (pre-miRNA) dönüştürür. Oluşan pre-miRNA'lar eksportin 5 ve Ras ilişkili nükleer protein-guanozin-5'-trifosfat (RAN-GTP) ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmadaki pre-miRNA, RNA III endonükleaz Dicer tarafından, 20-25 nükleotitlik olgun miRNA dupleksine bölünür. Bu olgun miRNA duplexi, Dicer, trans-aktivasyon tepkisi RNA-bağlayıcı protein (TRBP) ve Argonaute 2'yi (Ago2) içeren RNA

indüklü bir susturma kompleksine (RISC) yüklenir. TRBP, çift-zincirli miRNA'ların termodinamik özelliklerine göre kılavuz ve yolcu zincirleri ayırt eder. Daha stabil 5' ucuna sahip zincir, rehber zinciri; daha az stabil 5' ucuna sahip zincir ise yolcu zinciri oluşturur. RISC kompleksindeki Ago proteini, miRNA dupleksini çözerek parçalanacak yolcu zinciri uzaklaştırır. Ancak bazı durumlarda miRNA dupleksindeki her iki zincir işlevsel olup farklı mesajcı RNA (mRNA) popülasyonlarını hedefleyebilmektedir (Erson ve Petty, 2008, Catalanotto vd., 2016). Olgun tek zincirli miRNA'lar, 5' ucunun 2-8 pozisyonundaki nükleotitleri içeren tohum dizisine komplementer olan hedef mRNA'ya, RISC kompleksini yönlendirir. MiRNA-mRNA arasındaki tam komplementerlik, mRNA transkriptinin parçalanmasına; kusurlu komplementerlik traslasyonun baskılanmasına neden olur (Şekil 1.13) (Zhang ve diğ., 2007, Taguchi, 2016:1712)



Şekil 1.13. MiRNA Biyogenezi (Erson ve Petty, 2008)

MiRNA'ların, hedef mRNA' nin 3'UTR'si dışında 5'UTR ve kodlayıcı bölgelerine de (miRNA tepki elementlerine (MRE) sahip) bağlanabildiği bildirilmiştir (Catalanotto vd., 2016). MiRNA'lar intergenik veya intronik bölgelerde bulunmaktadır. İtronlarda lokalize bazı miRNA'lar, buldukları gene antisens yönde bulunabilmekte veya genden bağımsız düzenleyicilere sahip olabilmektedir. Bazı intronik miRNA'lar, mirtronlar, biyogenezinde Drosha ile bölünmeyi atlayarak splayzingle pri-miRNA'lardan pre-miRNA'lara işlenmektedir (Erson ve Petty, 2008). Kısa intronlardan kaynaklanan bazı miRNA'ların, agotronlar, biyogenezi ise Drosha ve Dicer'dan bağımsız ancak Argonaute (Ago) bağlı olarak gerçekleşmektedir (Taguchi, 2016:1712). Bazı miRNA'lar, RNA editing eğilimi göstermektedir. Farklı dokularda miRNA'ların editing eğilimi, farklı gen setlerini hedeflemesine olanak sağlamaktadır (Erson ve Petty, 2008).

1.3.2. MikroRNA ve Kanser İlişkisi

MiRNA'ların ifadesindeki değişim birçok kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. MiRNA'ların ifadesindeki değişimlere yol açan mekanizmalar; miRNA genlerinin amplifikasyonu/delesyonu, miRNA'ların anormal transkripsiyonel kontrolü, epigenetik düzensizlik ve miRNA biyogenezindeki bozukluklardır. Mide kanserinde miRNA ifadesindeki azalma, çoğunlukla promotorlerindeki CpG adalarının hipermetilasyonuna bağlı gelişmektedir. Ago2 kaybına bağlı gelişen miRNA biyogenezindeki bozukluklar, miRNA sentezinin bloke edilmesine neden olmaktadır (Irmak-Yazicioglu MB, 2016). MiRNA'lar, onkogen ve tümör baskılayıcı genler olarak ikiye ayrılır (Peng ve Croce, 2016). Kanserde ifadesi artan miRNA'lar, onkogen fonksiyonuna sahip olup tümör baskılayıcı genleri baskılayarak tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır. Kanserlerde ifadesi azalan miRNA'lar ise, tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olup onkogenleri baskılayarak tümör gelişimini engellemektedir (Zhang ve diğ., 2007).

1.3.3. *Helicobacter pylori*'nin MikroRNA İfadesine Etkisi

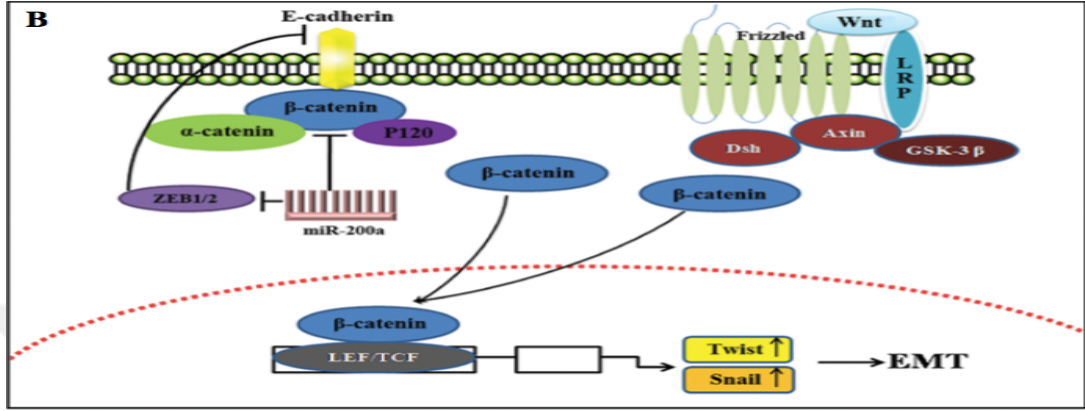
Birçok miRNA ifadesinin, *H. pylori* enfekte mide mukozasında değiştiği ve bu değişimin, kısmen *H. pylori* indüklü konak inflamatuvar immün yanıtlara bağlı olduğu bildirilmiştir. CagA pozitif *H. pylori* suşlarının, let-7 aile üyesi dahil birçok miRNA ifadesini değiştirdiği gösterilmiştir (Matsushima ve diğ., 2011). Let-7 aile üyeleri, Ras onkogeninin ifadesini negatif bir şekilde düzenleyen tümör baskılayıcı genlerdir. Özellikle, *H. pylori* virülans faktör cagA'nın inflamasyondan bağımsız bir şekilde, let-7 ifadesini epigenetik mekanizmalarla baskılayarak *H. pylori* indüklü mide kanser gelişimine aracılık ettiği tespit edilmiştir (Irmak-Yazicioglu MB, 2016, Hayashi ve diğ., 2013). Ayrıca ABCCC ve ABD tip cagA'ların, let-7 ifadesinin baskılanmasında benzer kanserojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Hayashi ve diğ., 2013). Zhang ve diğ., (2008), miR-21 ifadesinin mide kanser dokularında ve *H. pylori* enfekte mide mukozasında arttığını ve bu artışın hücre çoğalmasını, invazyonunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Zhu ve diğ., (2012), *H. pylori* cagA proteininin, Erk1/2 kinazlara bağımlı bir şekilde miR-1290, NF-KB'ye bağımlı bir şekilde miR-584 ifadelerini artırarak hücre işlevleri etkilediğini ileri sürmüştür. MiR-1290, NF-KB baskılayıcı faktör (NKRF)'ü baskılayarak NF-KB'nin aktivasyonu ile miR-584'ü aktive etmiştir. MiR-584, fosforillenmiş Erk1/2'nin önemli fosfotazlarından biri olan protein fosfataz 2 katalitik altbirim alfa'yı (PPP2ca) baskılayarak Erk1/2 aktivitesinin devamlılığını sağlamıştır. MiR-1290 ve miR-584'ün ortak hedeflerinden Çatal başı kutu protein A1 (Foxa1), dokuya spesifik transkripsiyonu teşvik eden ve doku ile hücrelerin epigenetik işaretleriyle ilişkili bir öncü transkripsiyon faktördür. Foxa1 ifadesinin susturulması, sonik hedgehog, Notch ifadesindeki artışa neden olmaktadır. Tüm bu sonuçlar, miRNA-584 ve miRNA-1290'ın hücre farklılaşmasına müdahale ettiğini ve dokuları yeniden şekillendirdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca cagA'nın, Erk1/2'yi aktive ederek miR-1290'ı indükleme yeteneğinin, cagA'nın C-terminal değişkenliğinden (EPIYA tekrarlarının değişken sayısı) dolayı farklı olabileceği düşünülmektedir. Noto ve diğ., (2013), *H. pylori* cagA'nın, miR-320 ifadesini azaltıp, anti-apoptotik B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesinin bir üyesi olan myeloid hücre lösemi-1 (Mcl-1) ifadesini artırarak, apoptozu baskılayarak mide kanseri için artmış bir risk oluşturduğunu göstermiştir. Tüm bu bulgular miRNA'ların, *H. pylori*'ye bağlı mide kanser gelişimindeki rolünü ortaya koymaktadır.

1.3.4. Mide Kanserinde MikroR-200a-3p

MiR-200a, tümör hücrelerinde tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren miR-200 ailesine ait olup 1. kromozomda lokalizedir (Chang ve diğ., 2015, Park ve diğ., 2008). MiR-200a' nın, mide adenokarsinomada önemli ölçüde ifadesinin azaldığı; yakından ilişkili özofagus adenokarsinomada ise ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu iki kanserdeki miR-200a ifadesindeki farklılık, etiyoloji ve moleküler sinyallerdeki farklılıkları göstermektedir (Chen ve diğ., 2013).

MiR-200a' nın, Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki β -katenini hedefleyerek migrasyon, invazyon ve çoğalmayı baskıladığı bildirilmiştir. MiR-200a ifadesinin, mide kanserinin ilerlemesiyle önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. MiR-200a' nın, epitelial-mezenkimal geçiş (EMT) ve tümör büyümesini negatif bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir (Cong ve diğ., 2013). EMT, hücre polaritesi ve hücre-hücre adezyon kaybına yol açan tümör ilerlemesiyle ilişkili bir süreç olup hücre hareket ve metastazını teşvik etmektedir (Schliekelman ve diğ., 2011). EMT geçiren epitel hücreler, E-kaderin gibi epitel belirteçlerin ifadesini kaybederek N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal belirteçleri ifade etmeye başlarlar (Cong ve diğ., 2013). Çinko parmak E-kutu bağlama homeobox 1/2 (ZEB1/ZEB2), Snail ve Twist gibi transkripsiyonel faktörler, EMT'in teşvik edilmesinde görevlidir (Davalos ve diğ., 2011). Mide kanserinde, ZEB1/ZEB2 kompleksi, miR-200a' nın hedefi olarak tespit edilmiştir (Cong ve diğ., 2013). ZEB1/ZEB2 kompleksi, E-kaderin promotoruna bağlanarak E-kaderin ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır (Saydam ve diğ., 2009). MiR-200a ifadesinin azalmasına bağlı ZEB1/ZEB2' nin E-kaderinin ifadesini azaltması, katenin-kaderin kompleksine bağlı β -kateninin, çekirdeğe göçüne yol açarak hücre çoğalması, metastaz ve tümörigenezi teşvik eden Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar miR-200a' nın, E-kaderin seviyesini artırarak ve β -katenin seviyesini azaltarak, EMT ve hücre büyümesini baskılayıcı bir role sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 1.14) (Cong ve diğ., 2013).

Snail, baskılayıcı bir transkripsiyonel faktör olup E-kaderinin direkt transkripsiyonel baskılanmasından sorumludur. Ayrıca bir transkripsiyonel faktör olan Twist, E-kaderinin transkripsiyonel baskılanmasına katılmaktadır. Bu transkripsiyonel faktörlerin ifadesinin, miR-200a ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Cong ve diğ., 2013).



Şekil 1.14. miR-200a' nın, ZEB1/ZEB2 kompleksini ve β-katenini hedefleyerek EMT'i regüle etmesi (Cong ve diğ.,2013)

Mide kanseriyle ilişkili miRNA'ların belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, mide kanser dokularında miR-200a-3p ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2015). *H. pylori* enfekte insan mide mukozasında miRNA ekspresyon profilini belirlemek için yürütülen bir çalışmada miR-200a ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Matsushima ve diğ., 2011).

1.3.5. Mide Kanserinde MikroR-29a-3p

Mide kanseri dahil birçok kanserde miR-29a ifadesindeki azalmanın kanser gelişimini ve ilerlemesini teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle mide kanserinde miR-29a, tümör baskılayıcı bir role sahiptir. MiR-29a' nın potansiyel hedefleri arasında bulunan Robo1'in, hücre invazyon ve migrasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir. Robo1'in aşağı akışında kanser gelişimine katkıda bulunan Erk sinyali ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) bulunmaktadır (Liu ve diğ 2015).

Chen ve diğ., (2014), miR-29a' nın, anjiyogenezde görevli vasküler endotelial büyüme faktör A'yı (VEGF-A) hedefleyerek invazyon ve metastazı baskıladığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada, miR-29a' nın p42.3 ifadesini baskılayarak, G1 fazında hücre döngüsünün askıya alınmasıyla hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. MiR-29a' nın hedeflediği p42.3, memelilerde oldukça korunmuş, transformasyonu teşvik edici bir onkogendir. Hücre döngüsü boyunca farklı bir şekilde ifade edilen p42.3'ün ifadesindeki artış, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevli kontrol noktası kinaz 2 (CHK2) ifadesinin azalmasına ve siklin B1 ifadesinin ise artmasına neden olmaktadır (Cui ve diğ., 2011).

He ve diğ., (2016), insan telomeraz ters transkriptazın (hTERT), miR-29a ifadesini direkt veya indirekt bir şekilde azaltarak, mide kanserinde invazyon ve metastazı teşvik edici Integrin β 1 (ITGB1) ifadesini artırdığını bildirmiştir. Telomerazın sınırlayıcı altbirimi olan hTERT, telomeraz aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (Zvereva ve diğ., 2010). Mide kanser dokularında yüksek oranda ifade edilen hTERT'in uzak metastaz ve lenfatik metastazı teşvik ettiği bildirilmiştir (Lü ve diğ., 2012). MiR-29a' nın direkt hedefi olarak belirlenmiş ITGB1, hücre adezyon molekülü olup hücrelerin, ekstraselüler matrikse (ECM) adezyonunda görevlidir. Kanser hücrelerinde anormal bir şekilde ifade edilen ITGB1, invazyon, migrasyon, anjiyogenez ve hücre çoğalmasında önemli rol oynamaktadır (He ve diğ., 2016).

MiR-29a' nın, miR-29a-3p ve miR-29a-5p olmak üzere iki farklı transkripti mevcuttur. Mide kanserinde miR-29a-3p transkriptinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. MiR-29a-3p' nin G1/S geçişinde görevli siklinD1, siklin bağımlı kinaz 2, 4 ve 6 (CDK2, CDK4 ve CDK6) ifadelerini azaltarak hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-29a-3p' nin mide kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu baskıladığı ortaya konulmuştur. Integrin alfa 6 prekürsör (ITGA6) ve DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A), miR-29a-3p' nin potansiyel hedefleri olarak gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2015).

1.3.6. Mide Kanserinde MikroR-223-5p

Mide kanserinde miR-223 ifadesindeki artışın, hücre çoğalması ve invazyonu teşvik ettiği, apoptozu ise baskıladığı gösterilmiştir. MiR-223'ün potansiyel olarak F-kutu ve WD tekrar domain içeren 7'yi (FBXW7/hCdc4) hedeflediği tespit edilmiştir (Li ve diğ., 2012). F-kutu protein ailesine ait olan FBXW7/hCdc4, Skp, Cullin, F-kutusu içeren kompleks (SCF) ubiquitin ligazların fosforilenmiş substratları tanıma bileşeni olarak fonksiyon göstermektedir. Memelilerde fonksiyonel olarak korunmuş SCF ubiquitin ligaz, c-jun, siklinE1 gibi onkoproteinlerin ubiquitin bağımlı proteolizinden sorumludur (Koepp ve diğ., 2001, Nateri ve diğ. 2004).

Birçok araştırma miRNA'ların, mide kanseri dahil birçok kanserde anti-kanser ilaç direncinin gelişmesindeki rolünü bildirmiştir. Mide kanserinde miR-223'ün, FBXW7 ifadesini azaltarak, G1/S kontrol noktasındaki proteinlerin düzensizliğine (CDK2, CDK4, CDK6, siklin D1 (CCND1), siklin D2 (CCND2) ve siklin D3 (CCND3) ifadesinin artması ve p14, p16, p21 ve p27 ifadesinin azalması) ve apoptozun baskılanmasına yol açarak mide kanser hücrelerini sisplatine dirençli hale getirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca miR-223 ifadesindeki artışa bağlı mide kanseri ve ilaç direncinin gelişmesinde *H. pylori* enfeksiyonunun önemli rol oynayacağı ileri sürülmüştür (Zhou ve diğ., 2015).

Normal mide hücreleri ve metastatik olmayan mide kanser hücrelerine kıyasla miR-223'ün sadece metastatik mide kanser hücrelerinde aşırı derecede ifade edildiği bildirilmiştir. Metastatik olmayan mide kanser hücrelerinin metastatik özellik kazanması için miR-223'ün migrasyon ve invazyonu teşvik ettiği gösterilmiştir. Mide kanserinde ifadesi artan Twist transkripsiyon faktörünün, miR-223 ifadesinin düzenlenmesine katıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca kanser metastazının baskılanmasında önemli rol oynayan EPB41L3'ün (protein 4.1B/akciğer-1 adenokarsinomunda farklı şekilde ifade edilen (Dal-1)), miR-223'ün direkt hedefi olduğu bildirilmiştir (Irmak-Yazicioglu MB, 2016, Li ve diğ., 2011). Hücre iskelet proteinlerinin grup 4.1 ailesinin bir üyesi olan EPB41L3, hücre şeklinin, hücre-hücre adezyonunun ve hücre hareketinin düzenlenmesine katılmaktadır (Gutmann ve diğ., 2011).

Stathmin 1 (STMN1), onkoprotein 18, mikrotübülleri depolimerize ederek ve tubulin heterodimerlerinin polimerizasyonunu engelleyerek mitoz aşamasında önemli rol oynamaktadır (Belmont ve Mitchison, 1996, Wallon ve diğ., 2000). STMN1 ifadesinin baskılanması, G2/M fazında hücrelerin birikmesine, mitotik ağ anormalliklerine ve mitozdan çıkıştaki zorluklara yol açmaktadır. Birincil mide adenokarsinomalarında ve mide kanser hücre hatlarında, STMN1 ifadesindeki artış tespit edilmiştir. STMN1'in susturulmasının, mide kanser hücrelerinin çoğalmasını, koloni oluşumunu, invazyon ve metastazını baskılayıp; G1 fazında hücre döngüsünün askıya alınmasını ve geç apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Mide kanser hücrelerinde STMN1, miR-223'ün hedefi olarak tespit edilmiştir (Kang ve diğ., 2012). Ancak STMN1 ifadesinin, p53 tarafından negatif bir şekilde düzenlendiği bildirilmiştir (Johnsen ve diğ., 2000). Mutant olmayan p53 proteini kararsız ve yarılanma ömrü kısa olduğu için saptanması oldukça zordur. Ancak çekirdekte biriken mutant p53, kararlı ve daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip olduğundan saptanabilmektedir. STMN1 pozitif tümörlerde anormal nükleer p53 birikimi saptanmıştır. Bu nedenle STMN1 aşırı ifadesinin mide kanserinde kısmen p53 baskılanmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Kang ve diğ., 2012).

H. pylori enfeksiyonunun, hem normal mide dokusunda hem de mide kanser dokusunda miR-223 ifadesini artırdığı bildirilmiştir. *H. pylori* enfekte mide kanser hücrelerinde miR-223 ifadesindeki artışın, hücre çoğalmasını, koloni oluşumunu, migrasyon ve invazyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (Ma ve diğ., 2013).

Kapsamlı bir meta-analiz çalışmasıyla, dolaşımdaki miR-223'ün mide kanseri tanısal etkinliğinin nispeten yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bağımsız bir doğrulama testiyle, plazma miR-223'ün benzer tanısal etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Mide kanserli hastalarda yüksek miR-223 ekspresyonunun, doku, hücreler ve plazma arasında fark göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlar, plazma miR-223'ün, kanser tanısı için güvenilir ve non-invaziv bir biyobelirteç olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak insan kanser tanısında potansiyel uygulanabilirliğini doğrulamak üzere geniş kapsamlı çalışmalar gereklidir (Zhou ve diğ., 2015).

2. AMAÇ

H. pylori cagA, mide kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiş bir virülans faktördür (Peek ve Blaser, 2002). CagA geninin 3' bölgesindeki R1, R2, R3 dizi tekrarlarına bağlı olarak (A-D) dört farklı cagA yapısının varlığı bildirilmiştir. C-tipi cagA'ya sahip suşların, mide kanserli hastalarda daha yaygın olduğu ve şiddetli atrofik gastrite neden oldukları gösterilmiştir (Yamaoka vd., 1998). Ayrıca cagA geninin 3' bölgesinde EPIYA motif içeren dizi tekrarlarının varlığı tespit edilmiştir (Argent ve diğ., 2005). EPIYA motiflerinin çevresindeki amino asit dizilerine bağlı olarak EPIYA-A, -B, -C veya D olmak üzere üç farklı EPIYA dizisi mevcuttur (Argent ve diğ., 2005). Özellikle birden fazla EPIYA-C motifi içeren cagA'nın, hücrel moleküllere daha yüksek oranda bağlanarak mide kanser riskini artırdığı bildirilmiştir (Nagase ve diğ., 2015).

H. pylori virülans faktör cagA'nın, let-7 dahil birçok miRNA ifadesini değiştirdiği tespit edilmiştir (Matsushima ve diğ., 2011).

Türk popülasyonunun %82.5'i *H. pylori* enfeksiyonu içermesine rağmen *H. pylori*'nin miRNA ifadesine etkisiyle ilişkili bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca bu zamana kadar literatürde polimorfik (3' değişken bölgede dizi varyasyonları) cagA'ya sahip suşlarla enfekte mide kanserli dokularında miR-200a-3p, miR-225-5p ve miR-29a-3p ifade değişimlerinin analizine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sonuçlara bağlı olarak bu çalışmada, mide kanserli dokuları enfekte eden suşların cagA 3' değişken bölgelerindeki dizi varyasyonlarının (EPIYA motif tipi ve miktarı, 3' değişken bölgedeki R1, R2, R3 bölgelerinin organizasyonu) belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca cagA 3' bölge dizi varyasyonlarına sahip suşlarla enfekte kanserli mide dokularında miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifade değişimlerinin analizi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL

3.1. Biyolojik Malzemeler

Kanserli mide doku örnekleri, TC. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulunun 03.09.2014 tarihli 1362 sayılı etik kurulu izni ile toplanmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen altı tümörlü doku örneği, NPO HIPEC sorumluluğunda 2016-2017 yılları arasında TC. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mide kanser teşhisi konup, mide ameliyatı geçiren hastalardan temin edilmiştir.

Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alınan İnsan Kafkasya gastrik adenokarsinoma (AGS) hücre hattı kontrol amaçlı kullanılmıştır.

3.2. Dokuların Saklanması Kullanılan Solüsyonlar

RNAlater[®] solüsyonu (Ambion) (Thermo Fisher Scientific)

Absolute Etanol (Sigma-Aldrich)

3.3. DNA ve RNA İzolasyonunda Kit Harici Gerekli Kimyasallar

2-Merkaptoetanol (Merck)

Etanol \geq 99,8% (Sigma-Aldrich)

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bileşenleri

Taq DNA Polimeraz, Rekombinant 5U/ul (Thermo Fisher Scientific)

MgCl₂, 25mM (Thermo Fisher Scientific)

dNTP Karışımı, 10mM (Thermo Fisher Scientific)

10X (NH₄)₂ SO₄ 'lü Taq Tampon

: 750mM Tris-HCl (pH 8.8 25⁰)

200mM (NH₄)₂ SO₄

0,1% (v/v) Tween 20

(Thermo Fisher Scientific)

3.5. Primerler

Helicobacter pylori cagA 3' değişken bölge ve dizi varyasyonlarını saptamak için kullanılan primer dizi ve uzunlukları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

100uM İleri (F) Primer

(Sentromer)

100uM Geri (R) Primer

(Sentromer)

Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda kullanılan primer çiftlerinin dizisi ve uzunlukları

Primer	Dizi (5'-3')	Ürün Boyutu
Cag2³-F Cag4²-R	5' GGAACCCTAGTCGGTAATG 3' 5' ATCTTTGAGCTTGTCTATCG 3'	CagA 3' değişken bölge 450-850bç (Argent ve diğ., 2004, Rudi ve diğ., 1998)
İleri Primer CagA28F	5' TTCTCAAAGGAGCAATTGGC 3'	P1, P2,P3 Motifleri için
Geri Primer CagA-P1C	5' GTCCTGCTTTCTTTTATTAAGTTAGC 3'	P1 motifi 264-291bç (Argent ve diğ., 2004)
Geri Primer CagA-P2TA	5' TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG 3'	P2 motifi 309-336bç (Argent ve diğ., 2004)
Geri Primer CagA-P3E	5' ATCAATTGTAGCGTAAATGGG 3'	P3 motifi 1P. 465-498bç, 2P. 570bç, 3P. 672bç (Argent ve diğ., 2004)
CAG1-F CAG2-R	5' ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA 3' 5' GTAATTGTCTAGTTTCGC 3'	CagA 3' tekrar dizileri Tip A 642-651bç, Tip B ve D 756bç, Tip C 810-813bç (Yamaoka ve diğ., 1998)
VA4F VA4R	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3' 5' CATAACTAGCGCCTTGAC 3'	VacA m2 bölgesi 346bç (Rudi ve diğ., 1998)

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR’da olgun miRNA ifadelerinin analizi için kullanılan primer dizileri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

10mg/ml MystiCq® microRNA qPCR Assay Primer (Sigma- Aldrich)
(hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-200a-5p)

Çizelge 3.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR’da kullanılan olgun miRNA primer dizileri

Primer	Dizisi
hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU
RNU6-1	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUACUAAAAUUGGAACGAUACA- GAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCAAUU- CGUGAAGCGUCCAUAUUUU

3.6. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

5X TBE (Tris - Borik asit- EDTA) Tamponu (pH: 8.3)

Tris-Baz (Sigma-Aldrich)

EDTA (pH 8.0), 0.5M (Sigma-Aldrich)

Borik Asit (Sigma-Aldrich)

UltraPure™ EtBr (Etidyum Bromid),10mg/ml (Thermo Fisher Scientific)

GeneRuler™ 100bç DNA Ladder

GeneRuler 100bç’lik DNA Ladder: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmalar içermektedir (Thermo Fisher Scientific)

%2’lik Agaroz jel :0,5X TBE Tamponu

Agaroz (Sigma-Aldrich)

6X DNA Jel yükleme boyası : 10mM Tris-HCl (pH 7,6)
0.03% Bromfenol mavisi
0.03% Ksilen siyanol FF
60% gliserin
60mM EDTA
(Thermo Fisher Scientific)

3.7. Hücre Kültürü Besiyeri ve Solüsyonlar

(1:1) 1X DMEM/ F-12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium
F-12 Nutrient Karışım (Ham)
+ L-glutamin
15mM HEPES
(Thermo Fisher Scientific)

Penisilin-Streptomisin : +5,000 Units/mL Penisilin
+ 5,000 Units/mL Streptomisin
(Thermo Fisher Scientific)

FBS (Thermo Fisher Scientific)

1X PBS (pH: 7.4) (Thermo Fisher Scientific)

DMSO (Sigma-Aldrich)

Tripsin – EDTA (0,05%), fenol kırmızısı (Thermo Fisher Scientific)

3.8. Cihazlar

Finnpipette™ F2 Değişken Hacim Tek Kanal Pipetler (Thermo Fisher Scientific)

Elektroforez Güç Kaynağı EC250-90 (Thermo Fisher Scientific)

Elektroforez Tankı (Clever Scientific)

Hassas Terazı (Precisa XB220A)

Barnstead™ Smart2Pure™ Su Arıtma Sistemi (Thermo Fisher Scientific)

Dik Tip Otoklav	(BES)
Mini Spin Plus Mikrosantrifüj	(Thermo Fisher Scientific)
Manyetik Karıştırıcı	(Heidolph MR3001K)
Thermal cycler T100™ PZR	(BioRad)
CFX Connect™ Real-Time PZR Belirleme Sistemi	(BioRad)
Mini Sipin	(Four E'S Scientific)
Multiskan™ GO Mikroplate Spektrofotometre	(Thermo Fisher Scientific)
Homojenizatör	(Retsch MM400)
Laminar Kabin	(Faster SafeFast Classic)
Dri-block DB-2D	(Techne)
AF80 Kar Buz Makinesi	(Scotsman)
Evrensel 320 R Masaüstü Santrifüj	(Hettich)
Vorteks	(Heidolph Reax Top)
Su Banyosu WNB 14	(Mettler)
Inkübator INCO2	(Mettler)
Azot Tankı	(Thermo Fisher Scientific)
pH Metre Masaüstü	(Isolab)
FN 500 Kuru Havalı Sterilizatör	(Nüve)
Jel görüntüleme cihazı GEN-BOX-imagER CFx	(ER Biyotek)
AXIO invert Vert.A1 mikroskop	(Zeiss)
CK40 ışık mikroskobu	(Olimpus)
S1 Pipet Filler	(Thermo Fisher Scientific)
SafeVac Vakum Aspiratör	(SCIOLOGEX)
-80 Buzdolabı	(Haier-Biomedikal)
MD592 Süper Mikrodalga	(Arçelik)

3.9. Sarf Mazlemeler

10µl, 120µl,200µl 1000µl Filtreli uç	(Isolab)
10µl, 200µl, 1000µl Pipet ucu	(İsolab)
0.5ml, 1.5ml, 2.0ml Eppendorf	(Axygen)
0.2ml PZR tüpü	(Axygen)
2ml Karyovial tüp	(Greiner Bio-one)
Rack	(İsolab)
Steril bistüri uç	(Braun)
Platamax [®] UltraClear Sealing Film	(Axygen)
PZR [®] Mikroplate	(Axygen)
Parafilm	(BEMIS)
15ml ,25ml, 50ml Falcon	(Isolab)
250ml Erlen	(Isolab)
50ml, 500ml, 1000ml Mezür	(Isolab)
75cm ² Corning Flask	(Sigma-Aldrich)
Cam pastör pipet	(Marienfeld)
Tohma lam	(Marienfeld)
5mL,10mL,25mL,50mL Corning [®] Costar [®] Stripette [®] serolojik pipetler	(Sigma-Aldrich)
Beher	(Isolab)
Corning [®] 150mL Vakum Filtre	(Sigma-Aldrich)

3.10. Kullanılan Kitler

PureLink™ Genomik DNA Mini Kit	(Invitrogen)
NucleoSpin [®] RNA	(Machery-Nagel)
MystiCq™ microRNA cDNA Sentez Karışımı	(Sigma-Aldrich)
SensiFAST™ SYBR [®] No-ROX Kit	(Bioline)

4.YÖNTEM

4.1. Kanserli Mide Dokularının Saklanması

TC İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesinden toplanan kanserli mide doku örneklerinden DNA izolasyonu için kullanılacaklar absolute etanol; RNA izolasyonu için kullanılacaklar ise RNAlater solüsyonu içeren tüplere konularak -196°C sıvı azot tankında muhafaza edildi.

4.2. Kanserli Mide Dokularından Bakteri Genomik DNA İzolasyonu

Absolute etanol içeren tüplerde saklanan kanserli mide dokularından bakteri genomik DNA izolasyonu, Invitrogen PureLink™ Genomik DNA Mini Kit'in protokolüne göre yapıldı. DNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesinde Multiskan™ GO Mikroplate Spektrofotometre kullanıldı. DNA konsantrasyonu $Abs_{260} \times 50 \times (10/0.52)$ formülüyle belirlendi. DNA saflığı ise A260/A280 oranıyla tespit edildi. A260/A280 oranı 1.8 saf DNA'yı, A260/A280 > 1.8 RNA kontaminasyonunu, A260/A280 < 1.8 protein kontaminasyonunu göstermektedir.

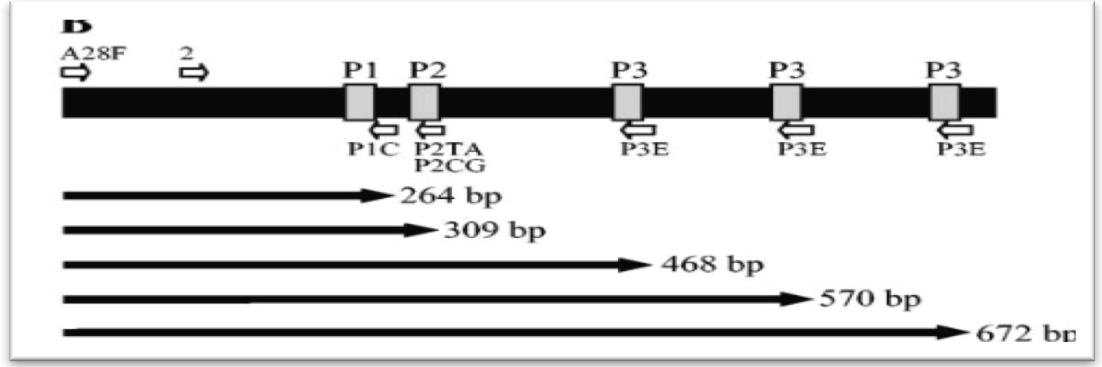
4.3. PZR ile CagA 3' Değişken Bölge ve Dizi Varyasyonlarının Saptanması

PZR, DNA'daki spesifik bir dizinin çoğaltılmasını sağlayan in vitro enzimatik bir yöntemdir. PZR ile DNA'daki hedef bölgenin çoğaltılabilmesi için kalıp DNA, oligonükleotid primerler, dNTP, DNA polimeraz, tampon ve Mg^{+2} gibi reaktifler gereklidir. Primerler, hedef DNA parçasının iki ucuna tamamlayıcı dizilere sahip olup hedef bölgeyi çeveler. DNA polimeraz da bu primerlere nükleotitleri ekleyerek hedef bölgenin çoğaltılmasını sağlar.

PZR'da her bir döngü; denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzaması şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır. Bir döngüde oluşan ürünler bir sonraki döngüde kalıp görevi göreceğinden hedef DNA bölgesi tekrarlayan bir dizi döngüde üssel olarak artmaktadır (Gribyan ve Avashia, 2013). Tüm PZR uygulamaları benzer şartlarda gerçekleştirilememektedir. Bu nedenle PZR optimizasyonu gereklidir. Optimizasyonun yapılmaması, PZR ürününün tespit edilememesi veya düşük verimlilikte çoğaltılması, spesifik olmayan ürünlerin oluşumu, primer-dimer gibi bir takım problemlere neden olmaktadır (Grunenwald, 2003).

Kanserli mide dokularından izole edilen suş genomik DNA'larının, cagA 3' değişken bölgelerinin varlığını ve içerdikleri varyasyonları belirlemek üzere PZR gerçekleştirildi. CagA 3' değişken bölgeyi saptamak için 450-850bp'lik ürün oluşturan cag2^a-F ve cag4^a-R primer çifti kullanıldı. CagA'nın 3' değişken bölgesinde 3 farklı tirozin fosforilasyon motifi (p1-(A motif), p2-(B motif), p3-(C motif)) gözlemlenmektedir. Bu üç motifin saptanmasında ileri primer cagA28F'in sabit tutulup geri primerlerin (A motifi için cagAP1C, B motifi için cagAP2TA ve C motifi için cagAP3E) değiştirildiği üç ayrı reaksiyon gerçekleştirildi. PZR sonrası A EPIYA motifinin 264-291bp'lik, B EPIYA motifinin 309-336bp'lik, C EPIYA motifinin ise 465-498, 570 ve 672 bp'lik ürünler oluşturması beklenmektedir (Şekil 4.1). Ayrıca cagA 3' bölgedeki R1, R2, R3 bölgelerinin tekrarına bağlı oluşan (A-D) primer cagA yapısını belirlemek üzere cag1 ve cag2 primerleriyle PZR yapıldı. PZR sonrası cagA'nın A tipi için 642-651bp'lik, B ve D tipi için 756bp'lik ve C tipi için 810-813bp'lik ürünlerin oluşması beklenmektedir.

Agaroz jel elektroforezi için 5X TBE tampon, agaroz jel ve 100bp DNA uzunluk belirtecinin hazırlanması Çizelge 4.1, optimize edilmiş PZR'da kullanılan reaktifler ve miktarları Çizelge 4.2., reaksiyon koşulları ise Çizelge 4.3'te gösterildi. PZR sonuçları (5ul PZR ürün; 1X yükleme boyası), %2'lik agaroz jelde 110V'da 300mA'de 30dk yürütülüp UV altında kontrol edildi.



Şekil 4.1. CagA P1(A), P2(B) ve P3 (C) EPIYA motiflerinin saptanmasında kullanılan primer çiftlerinin pozisyonu ve oluşturdukları ürün boyutları

Çizelge 4.1. TBE tampon, agaroz jel ve DNA uzunluk belirteci

5X TBE Tampon	54g Tris-Baz + 20ml EDTA + 27,5g Borik asit + dH ₂ O ile 1000ml'ye tamamlanır
2% Agaroz Jel	50ml 0,5X TBE tamponu + 1g Agaroz
100bç DNA uzunluk belirteci	1X DNA Ladder : 1X Yükleme Boyası: 4X Deiyonize su

Çizelge 4.2. PZR reaktifleri ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Stok Konsatrasyon	Kullanılan miktar	Çalışma Konsantasyonu
(NH ₄) ₂ SO ₄ 'lü Taq Tampon	10X	2,5ul	1X
MgCl ₂	25mM	3ul	3mM
dNTP Karışımı	10mM	0,5ul	0,2mM
İleri Primer	10uM	0,5ul	0,2uM
Geri Primer	10uM	0,5ul	0,2uM
Taq polimeraz	5U/ul	0,25ul	1,25U
DNA	100ng/ul	2ul	200ng
dH ₂ O	-	15,75ul	-
Toplam Hacim	-	25ul	-

Çizelge 4.3. PZR reaksiyon koşulları

	CagA 3' değişken bölge ve EPIYA motifleri	CagA 3' bölgedeki R1-R2-R3 tekrarlarına bağlı boyutları farklı ürünler
İlk denatürasyon	95°C 2dk	95°C 2dk
Denatürasyon	95°C 30sn	95°C 30sn
Bağlanma	55°C 30sn	52°C 30sn
Uzama	72°C 1dk	72°C 1dk
Son uzama	72°C 5dk	72°C 5dk

4.4. Hücre Kültürü

4.4.1. Hücre Hatlarının Çözülmesi

Sıvı azot tankında muhafaza edilen 2ml'lik karyovial tüpteki AGS hücre hattı, 37°C su banyosunda hızlıca çözdürüldü. 10% fetal sığır serum (FBS), 1% penisilin streptomisin ve DMEM/F-12 ile tamamlanmış büyüme ortamı hazırlandı. 5ml tamamlanmış büyüme ortamı, 15ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Çözünen hücreler, tamamlanmış büyüme ortamı içeren falkona transfer edildi. Dondurma ortamını uzaklaştırmak için hücreler, 4°C'de 1000xg'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti, 8ml tamamlanmış büyüme ortamıyla çözdürüldü. 75cm²'lik flaslara (T75), 14ml tamamlanmış büyüme ortamı eklendi ve çözdürülen pelletten 1:8 oranında ekim yapıldı. Hücre ekimi yapılan flasklar 37°C'de 5% karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

4.4.2. Hücre Hattının Pasajlanması

Flask yüzeyini 80-90% oranında kaplayan kültür hücreleri, yeni büyüme ortamlarına pasajlandı. Bunun için konflüente ulaşan flastaki tamamlanmış büyüme ortamı, vakum aspiratörle çekilerek uzaklaştırıldı. Hücreler, büyüme ortamındaki serumdan arındırılmak üzere 5ml PBS ile iki kez yıkandı. Daha sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreleri tutundukları yüzeyden ayırmak için 2ml tripsin eklenen flask, karbondioksitli inkübatörde 37°C'de 5dk inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 5ml tamamlanmış büyüme ortamı eklenerek tripsinin inaktivasyonu sağlandı. Hücreler flastan, falkonlara transfer edilerek 300xg'de 5dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre pelleti, 8ml tamamlanmış büyüme ortamıyla çözdürüldü. 75cm²'lik flaslara (T75), 14ml tamamlanmış büyüme ortamı eklendi ve çözdürülen pelletten 1:8 oranında ekim yapıldı. Hücre ekimi yapılan flasklar 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

4.4.3. Hücre Hattının Dondurulması

Flasktan tamamlanmış büyüme ortamı, vakum aspiratörle çekilerek uzaklaştırıldı. 5ml PBS ile hücreler iki kez yıkandı. 2ml tripsin eklenen flask, karbondioksitli inkübatörde 37°C’de 5dk inkübe edildi. Flaska 5ml tamamlanmış büyüme ortamı eklendikten sonra hücre süspansiyonu falkona transfer edildi. Hücreler thoma lamında sayıldıktan sonra 300xg’de 5dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. %50 DMEM-F12 , %40 FBS ve %10 DMSO ile dondurma ortamı hazırlandı. Hücre pelleti, 1ml dondurma ortamında yaklaşık 5×10^6 hücre olacak şekilde çözdürüldükten sonra karyovial tüplere transfer edildi. Bu tüpler bir gece -80°C’de bekletildikten sonra ertesi gün sıvı azot tankına yerleştirildi.

4.5. Total RNA İzolasyonu

AGS hücre hattından total RNA izolasyonu

AGS hücrelerini içeren 75cm²’lik flasktan, tamamlanmış büyüme ortamı vakum aspiratörle çekilerek uzaklaştırıldı. 5ml PBS ile hücreler iki kez yıkandı. 2ml tripsin eklenen flask karbondioksitli inkübatörde 37°C’de 5dk inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 5ml tamamlanmış büyüme ortamı eklendi. Hücreler flasktan, falkonlara transfer edilerek 300xg’de 5dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırılarak pelleti oluşturan hücrelerden total RNA izolasyonu, NucleoSpin[®] RNA protokolüne göre yapıldı.

Kanserli mide dokularından total RNA izolasyonu

RNAlater[®] solüsyonu içeren tüplerde saklanan kanserli mide dokularından total RNA izolasyonu, NucleoSpin[®] RNA protokolüne göre yapıldı. RNA konsantrasyon ve saflığının belirlenmesinde, Multiskan[™] GO Mikroplate Spektrofotometre kullanıldı. RNA konsantrasyonu $A_{260} \times 40 \times (10/0,52)$ formülüyle belirlendi. RNA saflığı ise A_{260}/A_{280} oranıyla tespit edildi. A_{260}/A_{280} oranının 1.8- 2.1 arasında olması RNA’ nın saf olduğunu göstermektedir.

4.6. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'dan, miRNA cDNA sentezi için MystiCq™ miRNA cDNA sentez karışımı kullanıldı. RNA izolasyon sonrası düşük konsantrasyona sahip örnekler, 400ng (0,4ug) veya 500ng (0,5ug), yüksek konsantrasyona sahip örnekler ise 1000ng (0,1ug) olacak şekilde cDNA sentezi yapıldı. RNA konsantrasyonu ve cDNA sentezinde kullanılan RNA miktarları Çizelge 4.4'te, cDNA sentez reaksiyon reaktifleri ve miktarları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da gösterildi.

Çizelge 4.4. RNA konsantrasyonu ve cDNA sentezinde kullanılan RNA miktarları

Örnek	RNA Konsantrasyonu	cDNA sentezinde kullanılan RNA miktarı	Oluşan cDNA ürün miktarı	Nükleazsız su
AGS hücre hattı	650 ng/ ul	1,5 ul	1000ng	5,5ul
T1 doku	653,9 ng/ ul	1,5ul	1000ng	5,5ul
T2 doku	97,54 ng/ ul	4,1ul	400ng	2,9ul
T3 doku	206,8 ng/ ul	4,8ul	1000ng	2,2 ul
T4 doku	111 ng/ ul	4,5 ul	500ng	2,5ul
T5 doku	365 ng/ ul	2,7ul	1000ng	4,3ul
T6 doku	532 ng/ ul	1,9ul	1000ng	5,1ul

Poli (A) kuyruk ekleme reaksiyonu

Aşağıdaki reaktifler, buz üzerine yerleştirilmiş 0,2ml'lik PZR tüplerine dağıtıldı.

Çizelge 4.5. Poli (A) kuyruk ekleme reaktifleri

Reaktif	Hacim
Poli (A) Kuyruk ekleme Tamponu (5x)	2ul
RNA 1ug'ye kadar	1-5ul (0,4ug-1ug)
Nükleazsız su	1-6ul
Poli (A) Polimeraz	1ul
Total Hacim	10ul

Tüpler 37°C'de 60sn, 70°C'de 5dk inkübe edildi.

İlk-zincir cDNA sentez reaksiyonu

Aşağıdaki reaktifler poli (A) kuyruk ekleme reaksiyonuna eklendi.

Çizelge 4.6. İlk-zincir cDNA sentez reaktifleri

Reaktif	Hacim
Poli (A) Kuyruk ekleme reaksiyonu	10ul
MystiCq microRNA cDNA Reaksiyon Karışımı	9ul
ReadyScript Ters Transkriptaz	1ul
Total Hacim	20ul

Tüpler 42⁰C 'de 20dk, 85⁰C' de 5dk inkübe edildi.

Kantitatif gerçek zamanlı PZR'da 20ng/ul cDNA kullanılacağı için 500ng ve 1000ng (20ul'de 500ng ve 1000ng) olarak sentezlenen miRNA cDNA ürünleri, 1ul'de 20ng olacak şekilde nükleazsız suyla seyreltildi. cDNA sentez ürünlerinin seyreltilmesi Çizelge 4.7'de gösterildi.

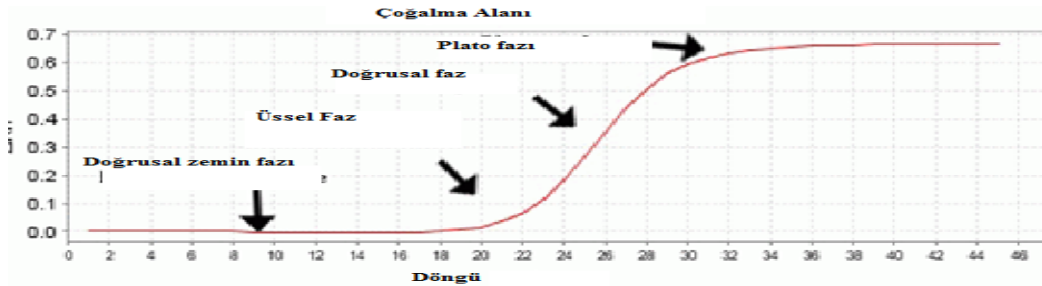
Çizelge 4.7. cDNA sentez ürünlerinin seyreltilmesi

Örnek	cDNA sentez ürün miktarı	Seyreltme-eklenecek nükleazsız su miktarı	Son konsantrasyon
AGS hücre hattı ve T1, T3, T5, T6 dokular	20ul'de 1000ng	30ul	50ul'de 1000ng 20ng/ul
T4 dokusu	20ul'de 500ng	5ul	25ul'de 500ng 20ng/ul

4.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Olgun MiRNA İfadesinin Analizi

Gerçek zamanlı PZR, gen ifadesinin analizini sağlayan güvenli kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntemde, PZR ürün konsantrasyonunu floresans yoğunluğuyla ilişkilendiren çeşitli floresan boyalar veya hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır (Wong and Medrano, 2005).

Gerçek zamanlı PZR, doğrusal zemin fazı, üssel faz, doğrusal faz ve plato fazı olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır (Şekil 4.7). Doğrusal zemin fazında (ilk 10-15 döngü) PZR yeni başlamakta ve floresan sinyal, arka planı aşmadığından sadece arka plan floresansı tespit edilebilmektedir. Erken üssel fazda, floresan seviyesi, arka plan floresansından daha yüksek bir eşığe (threshold) ulaşmaktadır. Floresansın bu eşığe ulaştığındaki döngü, Ct veya Cq (döngü eşığı) olarak tanımlanmaktadır. Bu değer, başlangıçtaki kopya sayısına karşılık gelmektedir. Üssel faz boyunca, her döngüden sonra DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Ancak PZR bileşenlerinin etkinlik ve miktarlarının azalmasıyla reaksiyon yavaşlamaya başlar. Böylece DNA her döngüde iki katına çıkamayacağından reaksiyon doğrusal faza geçer. Reaksiyon bileşenlerinin tamamen tükenmesiyle ürün oluşmadığı için reaksiyon, floresan seviyesinde artışın olmadığı bir plato fazında ilerler (Şekil 4.2) (Wong ve Medrano, 2005).



Şekil 4.2. Gerçek Zamanlı PZR fazları (Wong ve Medrano, 2005)

Taban çizgisi (base line), tespit seviyesinin altındaki floresans sinyalinin döngü sayısıdır. Eşik (threshold), ürün floresan artışından önceki spesifik olmayan floresans değeridir (Arismendry ve Castellanos, 2011).

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonundan elde edilen veriler, kesin ve göreceli olarak ölçülebilmektedir. Kesin ölçüm, gen ifade miktarının sayısal (ürün kopya sayısı) olarak belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunun için konsantrasyonu bilinen bir örneğin bir seri dilüsyon standartları kullanılarak bir standart eğri oluşturulur. Miktarı bilinmeyen örneklerin Ct değerleri, bu standart eğriyle karşılaştırılarak ürün miktarı belirlenebilmektedir. Göreceli ölçüm, gen ifadesinin olup olmadığını belirlemek ve örnekler arasında gen ifade değişikliklerini karşılaştırmak için kullanılmaktadır. Bir örnekteki (örneğin tümörlü doku) gen ifade değişiklikleri, kalibratör (normal doku) olarak bilinen bir referans örnekle karşılaştırılarak belirlenir. Karşılaştırmalı Ct yöntemi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), test (tümör dokusu) ve referans (normal doku) örnekler arasındaki gen ifade değişimlerinin (kat değişimlerini) belirlenmesinde kullanılmaktadır. Her örnek için kullanılacak RNA miktarlarındaki farklılıkları düzeltmek ve PZR kurulumu ve döngü süreçlerinin neden olduğu değişimleri azaltmak üzere referans genler, PZR’i normalize etmek için kullanılmaktadır. Referans gen olarak GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz), β -aktin ve 18S rRNA gibi internal genler kullanılmaktadır. Çünkü bu genler tüm dokularda benzer oranlarda ifade edilmekte ve herhangi bir tedavi sürecinde ifadeleri genellikle sabit kalmaktadır. Bu yöntemde test (tümör dokusu) ve referans (normal doku) örneklerden elde edilen hedef genin Ct değerleri, doğrudan bir internal gene normalize edilir. Yani ilk önce test ve referans örnekler için hedef gen ve internal genin Ct değerleri arasındaki fark (ΔCt) hesaplanır. Ardından hedef ve referans örneklerin ΔCt değerlerinin farkı ($\Delta\Delta Ct$) hesaplanır. Burda hedef örneğin ΔCt ’si referans örneğinin ΔCt ’sine normalize edilir. İki örnek arasındaki hedef genin ifadesindeki kat değişimi, $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ile bulunur (Rao ve diğ., 2013, Wong ve Medrano, 2005).

$$\Delta Ct (\text{test örnek}) = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{internal gen})$$

$$\Delta Ct (\text{referans örnek}) = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{internal gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{test örnek}) - \Delta Ct (\text{referans örnek})$$

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} = \text{hedef gen kat değişimi}$$

AGS hücre hattına kıyasla polimorfik cagA'ya sahip suşlarla enfekte kanserli mide dokularında miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifade değişimlerinin analizi için gerçek zamanlı PZR, SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit kullanılarak gerçekleştirildi. AGS hücre hattı, *H. pylori* enfeksiyonu içermediğinden kontrol grubu olarak kullanıldı. Normalizasyon için ise RNU6-1 tercih edildi. Reaksiyonda kullanılacak reaktifler ve miktarları Çizelge 4.8'de, reaksiyon koşulları ise Çizelge 4.9'da gösterildi.

Çizelge 4.8. Gerçek zamanlı-PZR'da kullanılacak reaktifler

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Çalışılan Konsantrasyon
SensiFAST SYBR® Non-ROX Karışımı	2X	5ul	1X
MystiCq mikroRNA qPZR Deneme Primer	10uM	0,4ul	400nM
MystiCq Evrensel PZR Primer	10uM	0,4ul	400nM
cDNA	20ng/ul	1ul	20ng
Nükleazsız su	-	3,2ul	-
Toplam hacim	-	10ul	-

Çizelge 4.9. Gerçek zamanlı-PZR reaksiyon koşulları

Ön inkübasyon	95 °C 2dk
Denatürasyon	95 °C 5sn
Bağlanma	60 °C 30sn

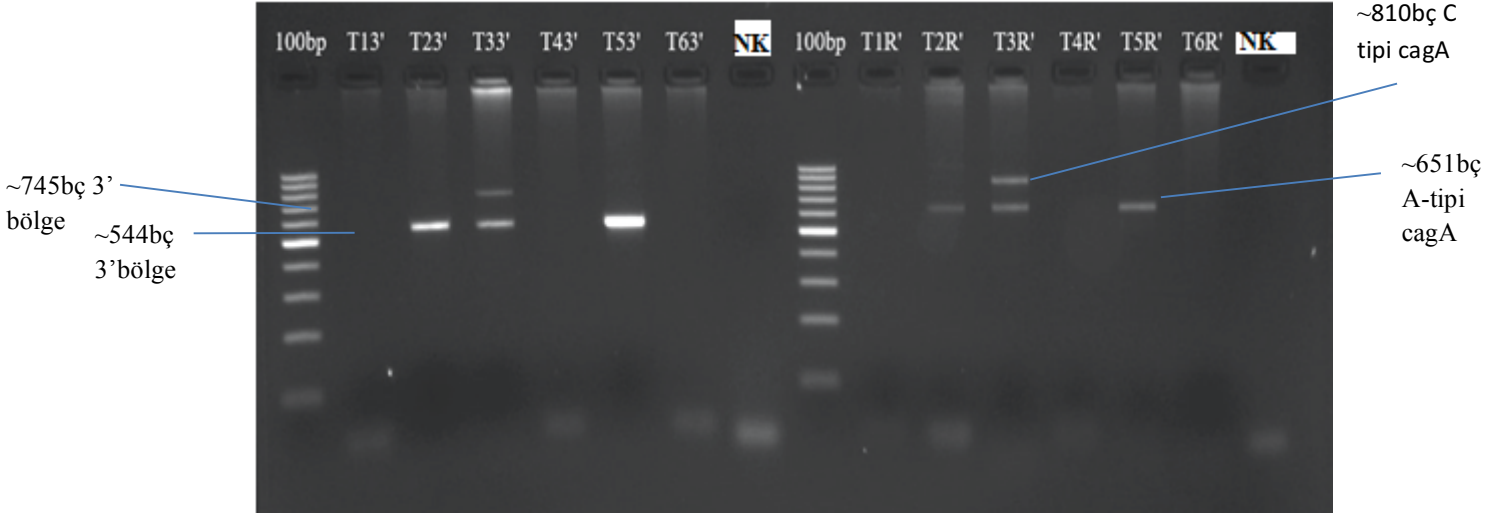
5.BULGULAR

5.1 PZR ile CagA 3' Değişken Bölge ve Dizi Varyasyonlarının Saptanması

H. pylori'ye özgü primerlerle gerçekleştirilen PZR reaksiyon sonucunda altı kanserli mide dokusunun *H. pylori*'yle enfekte olduğu belirlendi (Şekil 5.1. Şekil 5.2. Şekil 5.3).

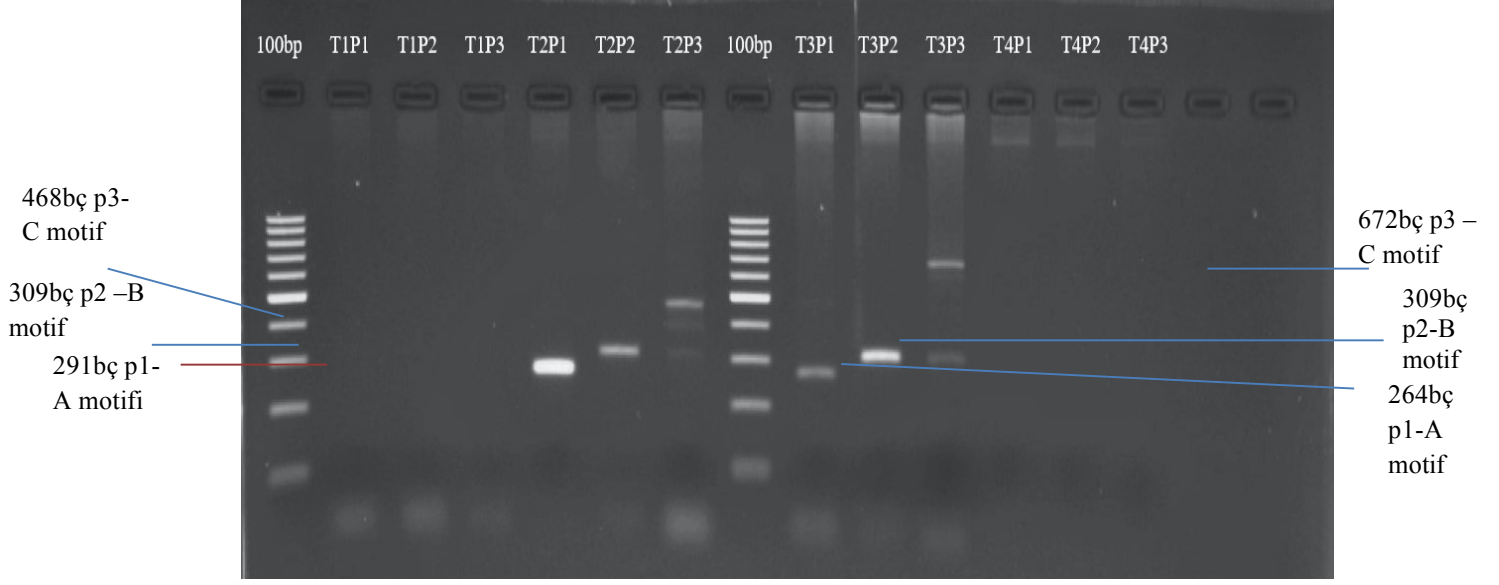
PZR sonucunda cagA 3' değişken bölge, üç kanserli mide dokusundan izole edilen suşlarda tespit edildi. Böylece altı kanserli mide dokusundan üçünün cagA pozitif, diğer üçünün ise cagA negatif olduğu belirlendi. CagA 3' değişken bölgenin, iki kanserli mide dokusundan izole edilen suşlar için ~554bç'lik tek bantlı PZR ürünü ve tek kanserli mide dokusundan izole edilen suşlar için ise ~554bç'lik ve ~745bç'lik çift bantlı PZR ürünü 2%'lik agaroz jelde gözlemlendi. Bu çift bantlı ürün sonucuna göre, bir kanserli mide dokusunun en az iki çeşit suş içerdiği düşünülmektedir. CagA 3' değişken bölgenin ürün boyutu, EPIYA motifinin tahmin edilmesine olanak sağlamaktadır. Buna bağlı olarak cagA 3' değişken bölgenin ~554bç'lik PZR ürününün ABC EPIYA motifini, ~745bç'lik ürününün ise ABCCC EPIYA motifini içerdiği tahmin edilmektedir (Şekil 5.1).

CagA' nın 3' değişken bölgesinde R1, R2 ve R3 tekrarlarını kapsayan bölgenin varlığı, PZR sonucunda üç kanserli mide dokusundan izole edilen suşlarda tespit edildi. R1, R2 ve R3 tekrarlarını kapsayan bölgenin, iki kanserli mide dokusundan izole edilen suşlar için ~651bç'lik tek bantlı PZR ürünü, bir kanserli mide dokusundan izole edilen suşlar için ise ~651bç'lik ve ~810bç'lik çift bantlı PZR ürünü %2'lik agaroz jelde gözlemlendi. Böylece üç kanserli mide dokusundan ikisinin A tipi (~651bç) tek tip suş, birinin ise A ve C (~810bç) tipi olmak üzere iki çeşit suş içerdiği belirlendi (Şekil 5.1).

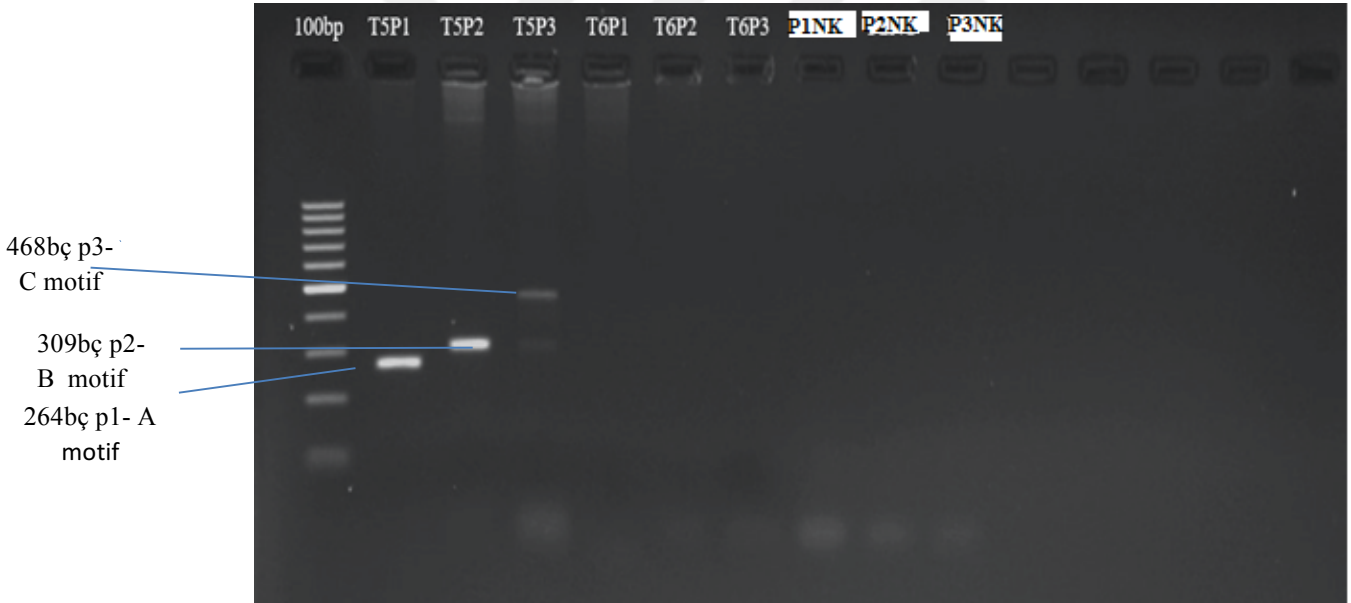


Şekil 5.1. PZR ile cagA 3' değişken bölgenin ve R1, R2, R3 gibi farklı tekrarları kapsayan bölgenin saptanması; 1 ve 9 kuyucuklar uzunluk belirteci 100bç Marker, T13'-T63' dokulardan T23', T33' ve T53' dokular cagA 3' değişken bölge için (+), T1R'-T6R' dokulardan T2R', T3R' ve T5R' dokular cagA 3' bölgede R1,R2, R3 tekrarları kapsayan bölge için (+), 8 ve 16 kuyucuklar negatif kontrol (NK)

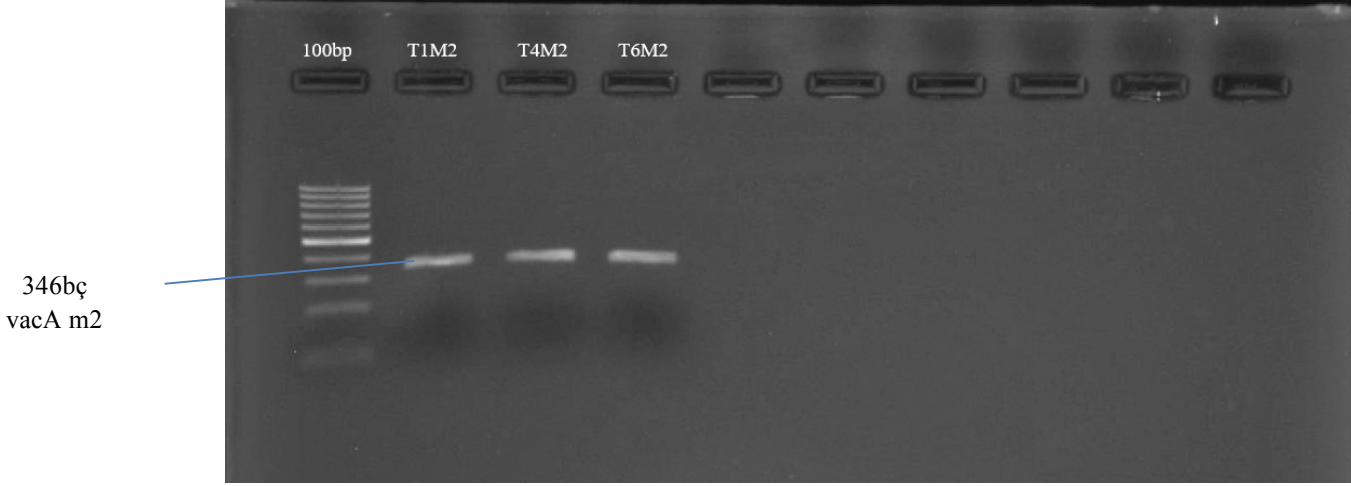
EPIYA motiflerinin varlığını, tipini ve tekrar sayısını saptamak için PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. CagA pozitif iki kanserli mide dokusundan izole edilen suşların, cagA P1 motifi için 264bç'lik ve 291bç'lik, P2 motifi için 309bç'lik ve P3 motifi için 468bç'lik PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde gözlemlendi. Böylece bu suşların, cagA ABC EPIYA motifini içerdiği belirlendi. CagA pozitif bir kanserli mide dokusundan izole edilen suşların ise cagA P1 motifi için 264bç'lik, P2 motifi için 309bç'lik, P3 motifi için diğerlerinden farklı olarak 672bç'lik PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde gözlemlendi. Böylece bu suşların, cagA AB ve ABC EPIYA motifleri içerdiği belirlendi. CagA 3' değişken bölgenin boyutuna bağlı olarak bu dokunun, cagA ABC ve ABCCC EPIYA motiflerine sahip iki çeşit suşu içerdiği tahmin edilmekteydi. Ancak EPIYA motiflerini belirlemek için gerçekleştirilen PZR sonucunda, P3 motifinin (C motifi) 468bç'lik ve 570bç'lik ürünleri tespit edilemedi (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. PZR ile EPIYA motiflerinin saptanması; 1 ve 8 kuyucuklar uzunluk belirteci 100bç Marker, T2 ve T3 dokular p1, p2 ve p3 motifler için (+), T1 ve T4 dokular p1, p2 ve p3 motifler için (-)



Şekil 5.2. PZR ile EPIYA motiflerinin saptanması; 1.kuyucuk uzunluk belirteci 100bç Marker, T5 dokusu p1, p2 ve p3 motifler için (+), T6 dokusu p1, p2 ve p3 motifler için (-), P1NK, P2NK, P3NK ise P1, P2, P3 için negatif kontrol (NK)



Şekil 5.3. *H. pylori* vacA m2 bölgeleri; 1. kuyucuk uzunluk belirteci 100bç marker, T1, T4, T6 dokuları vacA m2 bölgesi için (+)

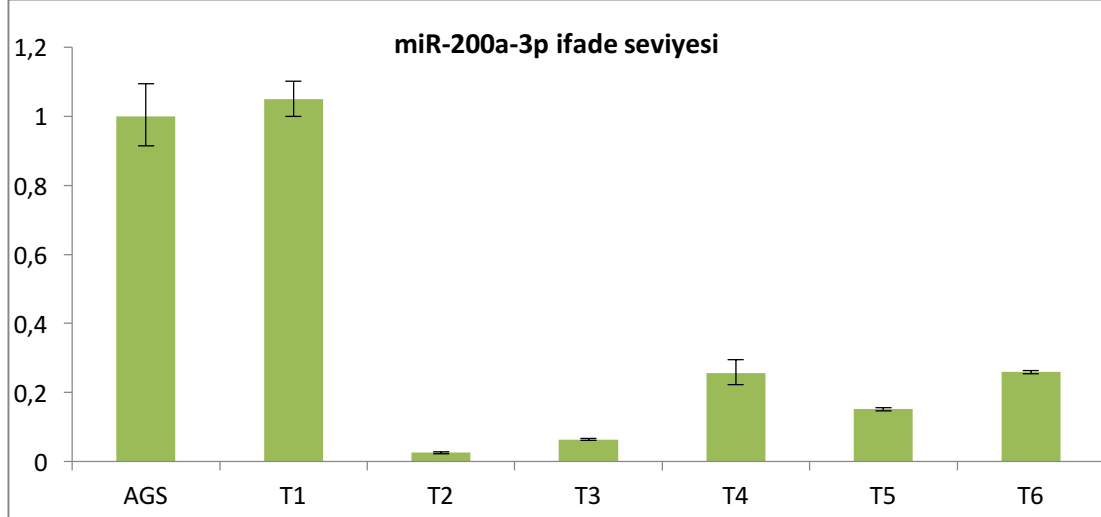
5.2. Kanserli Mide Dokularında Olgun MiRNA İfade Değişiminin Belirlenmesi

AGS hücre hattına kıyasla *H. pylori* pozitifliği tespit edilen altı kanserli mide dokusundaki miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadelerinin değişimi, SYBR Green floresan boya kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR ile incelendi. *H. pylori* enfeksiyonu içermeyen AGS hücre hattı kontrol grubu olarak kullanıldı. AGS hücre hattına kıyasla *H. pylori* ve polimorfik cagA varlığında kanserli mide dokularındaki miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadelerinin kat değişim miktarı Tablo 5.1, Tablo 5.2 ve Tablo 5.3'te verildi. Ayrıca miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadelerinin kat değişim miktarı Şekil 5.4, Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'de grafik olarak gösterildi.

AGS hücre hattına kıyasla *H. pylori* pozitif altı kanserli mide dokusunun beşinde miR-200a-3p ifadesinin azaldığı; birinde ise çok az bir artış gösterdiği gözlemlendi. CagA negatif kanserli mide dokularına kıyasla cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-200a-3p ifadesinin daha fazla azaldığı belirlendi. AGS hücre hattına kıyasla ABC EPIYA motifli A-tipi cagA'yı içeren iki kanserli mide dokusundan birinde miR-200a-3p' nin 0,026 kat; diğerinde ise 0,15 kat daha az ifade edildiği tespit edildi. AGS hücre hattına kıyasla AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA'ları içeren bir kanserli mide dokusunda ise miR-200a-3p' nin 0,064 kat daha az ifade edildiği bulundu (Çizelge 5.1 ve Şekil 5.4).

Çizelge 5.1. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-200a-3p ifadesinin değişimi

Örnek	Doku ΔCq Değeri	Kontrol (AGS) ΔCq Değeri	$\Delta\Delta Cq$	$2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ Ekspresyon kat değişimi	Kat maksimum hata	Kat minimum hata
AGS hücre hattı <i>H. pylori</i> (-)		6,60	0	1	0,094294	0,086169
T1 doku cagA(-)	6,53	6,60	-0,07	1,049	0,052188	0,049717
T2 doku ABC EPIYA motifli A-tipi cagA	11,88	6,60	5,28	0,026	0,002533	0,002307
T3 doku AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA	10,56	6,60	3,96	0,064	0,002266	0,002189
T4 doku cagA (-)	8,57	6,60	1,97	0,256	0,039109	0,033929
T5 doku ABC EPIYA motifli A tipi cagA	9,32	6,60	2,72	0,15	0,004825	0,004677
T6 doku cagA (-)	8,55	6,60	1,95	0,259	0,00454	0,004462

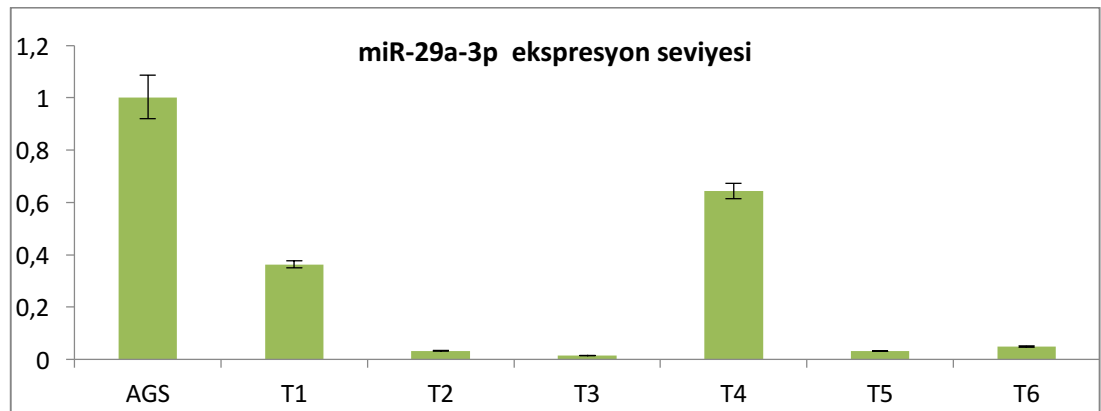


Şekil 5.4. AGS hücre hattına kıyasla mide kanser dokularında miR-200a-3p ifadesinin değişimi

AGS hücre hattına kıyasla *H. pylori* enfekte altı kanserli mide dokusunda miR-29a-3p ifadesinin azaldığı belirlendi. CagA negatif kanserli mide dokularına kıyasla cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-29a-3p ifadesinin daha fazla azaldığı tespit edildi. AGS hücre hattına kıyasla ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif iki kanserli mide dokusunda miR-29a-3p' nin 0,03 kat daha az ifade edildiği bulundu. AGS hücre hattına kıyasla AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA'lar için pozitif bir kanserli mide dokusunda miR-29a-3p' nin 0,015 kat daha az ifade edildiği belirlendi (Çizelge 5.2 ve Şekil 5.5).

Çizelge 5.2. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-29a-3p ifadesinin değişimi

Örnek	Doku ΔCq Değeri	Kontrol (AGS) ΔCq Değeri	$\Delta\Delta Cq$	$2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ Ekspresyon kat değişimi	Kat maksimum hata	Kat minimum hata
AGS hücre hattı <i>H. pylori</i> (-)		4,01	0	1	0,086735	0,079812
T1 doku cagA(-)	5,47	4,01	1,46	0,36	0,012819	0,012382
T2 doku ABC EPIYA motifli A tipi cagA	8,92	4,01	4,91	0,033	0,00082	0,0008
T3 doku AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C- tipi cagA'lar	10,03	4,01	6,02	0,015	0,000654	0,000628
T4 doku cagA (-)	4,65	4,01	0,64	0,644	0,029676	0,028369
T5 doku ABC EPIYA motifli A tipi cagA	8,97	4,01	4,96	0,032	0,000112	0,000112
T6 doku cagA (-)	8,35	4,01	4,34	0,049	0,001925	0,001853

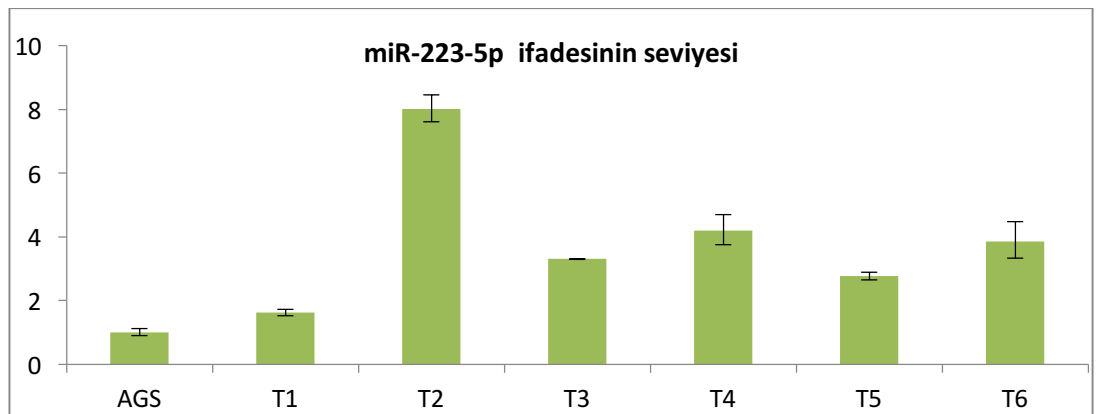


Şekil 5.5. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-29a-3p ifadesinin değişimi

AGS hücre hattına kıyasla *H. pylori* enfekte altı kanserli mide dokusunda miR-223-5p ifadesinin arttığı gözlemlendi. ABC EPIYA motifli A-tipi cagA'ya sahip suşlarla enfekte iki kanserli mide dokusunun birinde miR-223-5p ifadesinin diğer kanserli mide dokularına kıyasla daha fazla arttığı belirlendi. AGS hücre hattına kıyasla bu kanserli mide dokusundaki miR-223-5p ifadesinin 8 kat daha fazla olduğu tespit edildi. AGS hücre hattına kıyasla AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA'lar için pozitif kanserli mide dokusunda ve ABC EPIYA motifli A tipi cagA pozitif kanserli mide dokusunda, miR-223-5p' nin sırasıyla 3,3 ve 2,77 kat daha fazla ifade edildiği bulundu (Çizelge 5.3., Şekil 5.6).

Çizelge 5.3. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-223-5p ifadesinin değişimi

Örnek	Doku ΔCq Değeri	Kontrol (AGS) ΔCq Değeri	$\Delta \Delta Cq$	$2^{(-\Delta \Delta Cq)}$ Ekspresyon kat değişimi	Kat maksimum hata	Kat minimum hata
AGS hücre hattı <i>H. pylori</i> (-)		13,44	0	1	0,125058	0,11157
T1 doku cagA (-)	12,75	13,44	-0,69	1,6	0,103847	0,097567
T2 doku ABC EPIYA motifli A-tipi cagA	10,44	13,44	-3,01	8	0,42837	0,40667
T3 doku AB EPIYA motifli ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA'lar	11,72	13,44	-1,73	3,3	0,011477	0,011437
T4 doku cagA (-)	11,37	13,44	-2,07	4,19	0,492473	0,440776
T5 doku ABC EPIYA motifli A-tipi cagA	11,97	13,44	-1,47	2,77	0,117639	0,112847
T6 doku cagA (-)	11,49	13,44	-1,95	3,86	0,605403	0,523394



Şekil 5.6. AGS hücre hattına kıyasla kanserli mide dokularında miR-223-5p ifadesinin değişimi

AGS hücre hattına kıyasla polimorfik cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadesinin kat değişimi Çizelge 5.4'te gösterildi.

Çizelge 5.4. miR-200-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadesinin kat değişimi

Polimorfik cagA pozitif dokular	MiRNA	AGS hücre hattına kıyasla kat değişimi
ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif doku	miR-200a-3p	0.026 ↓
AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C-tipi cagA pozitif doku	miR-200-3p	0.064 ↓
ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif doku	miR-200-3p	0.15 ↓
ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif doku	miR-29a-3p	0.03 ↓
AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C-tipi cagA pozitif doku	miR-29a-3p	0.015 ↓
ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif doku	miR-29a-3p	0.03 ↓
ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif doku	miR-223-5p	8 ↑
AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C-tipi cagA pozitif doku	miR-223-5p	3.3 ↑
ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif doku	miR-223-5p	2.77 ↑

6. TARTIŞMA

H. pylori cagA, mide kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiş bir virülans faktördür (Peek ve Blaser, 2002). CagA proteini, fosforilasyona bağımlı ve bağımsız bir şekilde hücredeki birçok molekülle etkileşerek hücre çoğalmasının artması, apoptozun baskılanması gibi birtakım hücresel değişikliklere neden olmaktadır (Cover, 2016). CagA geninin, 3' değişken bölgedeki R1, R2 ve R3 tekrarlarına bağlı olarak (A-D) dört farklı yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Bunlardan C-tipi cagA yapısına sahip suşların, mide kanserli hastalarda daha yaygın olduğu ve şiddetli atrofik gastrite neden olduğu gösterilmiştir (Yamaoka ve diğ., 1998). Ayrıca cagA 3' değişken bölgede farklı tip ve sayıda EPIYA (A-B-C) motiflerinin varlığı bildirilmiş ve bunlardan EPIYA-C motif tekrarındaki artışın mide kanser riskini artırdığı ortaya konulmuştur (Nagase ve diğ., 2015). Bu çalışmada cagA pozitifliği tespit edilmiş üç mide kanserli dokudan ikisinin, ABC EPIYA motifli A-tipi cagA'ya sahip tek tip suşu; birinin ise AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA'lara sahip iki çeşit suşu içerdiği belirlendi. CagA 3' değişken bölgenin PZR ürün boyutu, EPIYA motifinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Argent ve diğ., 2005). Buna bağlı olarak AB ve ABC EPIYA motifli cagA'ları içerdiği belirlenen suşların, cagA 3' değişken bölgenin ürün boyutuna bağlı olarak ABC ve ABCCC EPIYA motifli cagA'ları içermesi beklenmekteydi. Ancak EPIYA motiflerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen PZR'da iki EPIYA-C motifi (468bç ve 570bç'lik) tespit edilemedi. Bu motiflerin tespit edilememesi, EPIYA-C motiflerini içeren dizilerin primerler tarafından tanınamayacak alternatif sekanslara sahip olabilmesinden kaynaklanabilir (Argent ve diğ., 2005). Ayrıca 3' değişken bölgedeki insersiyonlar ve delesyonlar, cagA 3' değişken bölge PZR ürün boyutunu değiştirebilmektedir (Argent ve diğ., 2005). Bu nedenle AB ve ABC motiflerini içerdiği belirlenen cagA 3' bölgelerde insersiyonlar meydana gelmiş olabilir. Bu sonuçlara bağlı olarak EPIYA-C motiflerin veya insersiyonların varlığının belirlenebilmesi için dizi analizi gereklidir.

Mide kanserinde miR-200a ifadesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2013). Ancak bir çalışmada miR-200a' nın iki farklı transkriptinden biri olan miR-200a-3p ifadesinin mide kanserinde arttığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2015). MiR-200a' nın β -katenini ve ZEB1/ZEB2 kompleksini hedefleyerek çoğalmayı, migrasyon, invazyon ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir (Cong ve diğ., 2013). *H. pylori* enfekte insan mide mukozasında miRNA ekspresyon profilini belirlemek için yürütülen bir çalışmada, miR-200a ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Matsushima ve diğ., 2011). Ancak bu zamana kadar polimorfik cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-200a-3p ifadesindeki değişimin analizine yönelik literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada AGS hücre hattına kıyasla cagA 3' değişken bölgesinde dizi varyasyonlarına sahip suşlarla enfekte kanserli mide dokularında miR-200a-3p ifadesinin azaldığı belirlendi. Bu sonuca ve daha önceki çalışmalara göre miR-200a-3p' nin, tümör baskılayıcı bir fonksiyona sahip olup 3' bölgede dizi varyasyonları içeren cagA virülans faktör varlığında ifadesinin azalabileceği düşünülmektedir.

Mide kanserinde miR-29a ifadesindeki azalmanın kanser gelişimini ve ilerlemesini teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle miR-29a, mide kanserinde tümör baskılayıcı bir role sahiptir. MiR-29a' nın potansiyel hedefleri arasında Robo1, VEGF-A, p42.3 ve ITGB1 yer almaktadır. MiR-29a' nın, bu genlerin ifadesini azaltarak çoğalmayı, migrasyon, invazyon ve metastazı baskıladığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2014, Cui ve diğ., 2011, He ve diğ., 2016, Liu ve diğ. 2015). MiR-29a' nın iki farklı transkriptinden biri olan miR-29a-3p' nin mide kanserinde önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. MiR-29a-3p' nin G1/S geçişinde görevli siklinD1, CDK2, CDK4 ve CDK6 ifadelerini azaltarak çoğalmayı baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-29a-3p' nin mide kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu baskıladığı ortaya konulmuştur. ITGA6 ve DNMT3A, miR-29a-3p' nin potansiyel hedefleri olarak gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2015). Ancak bu zamana kadar *H. pylori* enfekte kanserli mide dokularında ve özellikle polimorfik cagA varlığında miR-29a-3p ifadesindeki değişimin analizine yönelik literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada AGS hücre hattına kıyasla cagA 3' dizi varyasyonlarına sahip suşlarla enfekte kanserli mide dokularında miR-29a-3p ifadesinin azaldığı tespit edildi. AGS hücre hattına kıyasla ABC EPIYA motifli A-tipi cagA pozitif iki kanserli mide dokusunda miR-29a-3p ifadesinin benzer oranda

azaldığı gözlemlendi. AGS hücre hattına kıyasla AB EPIYA motifli A ve ABC EPIYA motifli C tipi cagA'lar için pozitif kanserli mide dokusunda miR-29a-3p'nin daha fazla azaldığı bulundu. Bu sonuçlara göre 3' bölgedeki dizi varyasyonlarına bağlı patojenik aktivitesi artan cagA'nın varlığında miR-29a-3p ifadesinin daha fazla azalacağı tahmin edilmektedir.

Mide kanserinde onkogenik bir fonksiyona sahip miR-223'ün FBXW7'yi hedefleyerek çoğalmayı teşvik etmesi ve apoptozu baskılamasıyla mide kanseri ve ilaç direncinin gelişmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Li ve diğ., 2012, Zhou ve diğ., 2015). Ayrıca kanser metastazının baskılanmasında önemli rol oynayan EPB41L3'ün, miR-223'ün hedefi olduğu tespit edilmiştir (Li ve diğ., 2011). *H. pylori* enfekte normal mide ve mide kanser dokularında, miR-223 ifadesinin arttığı bulunmuştur (Ma ve diğ., 2013). Özellikle miR-223 ifadesindeki artışa bağlı mide kanseri ve ilaç direncinin gelişmesinde *H. pylori* enfeksiyonunun önemli rol oynayacağı ileri sürülmüştür (Zhou ve diğ., 2015). Ancak polimorfik cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-223-5p ifadesindeki değişimin analizine yönelik literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada AGS hücre hattına kıyasla cagA 3' dizi varyasyonlarına sahip suşlarla enfekte kanserli mide dokularında miR-223-5p ifadesinin arttığı belirlendi. Bu sonuçlara göre polimorfik cagA'nın varlığında miR-223-5p ifadesinin artacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada sınırlı sayıda örnek kullanılmıştır. Elde edilen bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlandırılabilmesi için örnek sayısının artırılması gereklidir. Ayrıca polimorfik cagA pozitif kanserli mide dokularında bu miRNA'ların hedeflediği genlerin ifadesinin analizi, polimorfik cagA'nın bu miRNA'ların ifadesine etkisinin belirlenmesinde etkili olacaktır.

Bu çalışmada az sayıda örnek kullanılmasına rağmen AGS hücre hattına kıyasla dizi varyasyonlarına sahip cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p miRNA'larının ifadesindeki değişikliklerin gözlemlenmesiyle polimorfik cagA'nın bu miRNA'lar üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca cagA dışında diğer *H. pylori* virülans faktörlerin de bu miRNA'ların ifadesinin düzenlenmesine katkıda bulunabileceği tahmin edilmektedir. Dizi varyasyonlarına sahip cagA'nın miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadelerine etkisinin tam ortaya konulabilmesi için polimorfik cagA'nın vektöre klonlanıp hücre hatlarına transfekte edildikten sonra bu miRNA'ların ifadesindeki

değişikliklerin incelenmesine gerek duyulmaktadır. Ayrıca bu hücre hatlarında, miRNA'ların hedef genlerinin ifadesinin de değerlendirilmesi yararlı olacaktır. *H. pylori* cagA virülans faktörün, let-7 dahil birkaç miRNA ifadesini epigenetik mekanizmalarla baskıladığı tespit edilmiştir (Irmak-Yazicioglu MB, 2016, Hayashi ve diğ., 2013). Özellikle dizi varyasyonlarına sahip cagA pozitif kanserli mide dokularında miR-200a-3p ve miR-29a-3p ifadelerindeki azalmanın belirlenmesi polimorfik cagA' nın, bu miRNA'ların epigenetik düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle polimorfik cagA' nın, bu miRNA'ların epigenetik düzenlenmesindeki rolünün araştırılması yararlı olacaktır.

CagA' nın 3' değişken bölgesinde EPIYA motifleri dışında CRPIA motiflerin varlığı da bildirilmiştir. CagA' nın CRPIA motiflerine bağlı biyolojik etkinliğinin, EPIYA motiflerine ve onun fosforilasyonuna bağlı etkinliğinden önemli ölçüde farklı olduğu düşünülmektedir (Suzuki ve diğ., 2009). CagA' nın 3' değişken bölgesi dışında transkripsiyon başlama bölgesi yakınlarındaki belirli bir motifin yüksek seviyede cagA'ya neden olduğu ve mide kanser riskini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca yüksek hidrojenaz aktivitesine sahip suşların konak hücrelere daha fazla cagA translokasyonuna neden olduğu ve mide kanser riskini artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre cagA' nın patojenliğini etkileyecek 3' bölgedeki EPIYA motifleri, R1, R2, R3 tekrar bölgeleri dışındaki diğer dizi varyasyonlarının ve virülans faktörlerin miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ifadelerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak polimorfik cagA' nın, miR-200a-3p, miR-29a-3p ve miR-223-5p miRNA'larının ifadesini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ancak cagA dışında diğer virülans faktörlerin ve hücrel moleküllerin de bu miRNA'lar üzerinde etkili olabileceği tahmin edilmektedir.

7. KAYNAKLAR

Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Gulid BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, İves C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 37(6): 176-180.

Argent RH, Zhang Y, Atherton JC (2005). Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* cagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(2): 791-795.

Arismendy JP and Castellanos JM. (2011) Real time PCR Application in dengue studies. *Colomb Med*. 42: 243-258.

Azevedo NF, Almedia C, Cerqueria L, Dias S, Keevil CW, Viera MJ (2007). Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(10): 3423-3437.

Belmont LD and Mitchison TJ. (1996) Identification of a protein that interact with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell*. 84(4):623-631.

Bor S, Vardar R, OmerciN, Memik F, Suleymanlar I, Oguz D, Colakoglu S, Yucesoy M, Turkdogan K, Gurel S, Dogan I, Yıldırım B, Goral V, Dokmeci G, Okucu N, Duman D, Simsek I, Demir A (2007). Prevalence patterns of gastric cancers in Turkey: Model of a developing country with high occurrence of *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22: 2242–2245

Catalanotta C, Cogoni C, Zardo G (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci*. 17(10): 1712

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A (1996). Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-I specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(25): 14648-14653.

Chang L, Guo F, Huo B, Lv Y, Wang Y, Liu W (2015). Expression and clinical significance of the microRNA-200 family in gastric cancer. *Oncol Lett.* 9(5): 2317-2324.

Chen L, Xiao H, Wang ZH, Huang Y, Liu ZP, Ren H, Song H (2014). miR-29a suppresser growth and invasion of gastric cancer cells in vitro by targeting VEGF-A. *BMP Rep.*47(1): 39-44.

Chen Z, Saad R, Jia P, Peng D, Zhu S, Washington MK, Zhao Z, Xu Z, El-Rifai W (2013). Gastric adenocarcinoma has a unique micRNA signature not present in esophageal adenocarcioma. *Cancer.* 119(11): 1985-1993.

Chen Z, Liu X, Hu Z, Wang Y, Lui M, Lui X, Li H, Ji R, Guo Q, Zhou Y (2015). Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer. *Oncol Lett.*10(1): 329-336.

Cong N, Du P, Zhang A, Shen F, Su J, Pu P, Wang T, Zjang J, Kang C, Zhang Q (2013). Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the Wnt/ β -catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 29(4):1779-1587.

Cong H, Yao RY, Sun Z.Q, Qiu WS, Yao YS, Feng TT, Xin C, Liang J, Yue L (2016). DNA hypermethylation of the vimentin gene inversely correlates with vimentin expression in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Oncology Letters,* 11(1), 842–848.

Cui Y, Su WY, Xing J, Wang YC, Wang P, Chen XY, Shen ZY, Cao H, Lu YY, Frang JY (2011). MiR-29a Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest through the Downregulation of p42.3 in Human Gastric Cancer. *PLoS One.* 6(10):e25872.

Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carnerio F, Esteller M (2011). Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene* 31: 2062-2074.

Erson AE ve Petty EM. (2008) microRNAs in development and disease. *Clin Genet.* 74: 296–306.

Eser S, Yakut C, Özdemir R, Karakılınç H, Özalın S, Marshall SF, Karaoğlanoğlu O, Anbarcıoğlu Z, Üçüncü N, Akın Ü, Özen E, Özgül N, Anton-Culver H, Tuncer M (2010). Cancer incidence rates in Turkey in 2006: A detailed registry based estimation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 11(6): 1731–1739.

Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S (1991). Essential Role of Urease in Pathogenesis of Gastritis Induced by *Helicobacter pylori* in Gnotobiotic Piglets. *Infection and Immunity.*59(7):2470-2475.

Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S (1992). Mobility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 37(2):123-127.

Eaton KA ve Karakowka S. (1994) Effect of Gastric pH on Urease-Dependent Colonization of Gnotobiotic Piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 62(9): 3604-3607.

Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S (1996). Colonization of Gnotobiotic Piglets by *Helicobacter pylori* Deficient in Two Flagellin Genes. *Infection and Immunity*. 64(7): 2445-2448.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5), E359–E386.

Gariyban L and Avashia N. (2013) Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 133(3): e6.

Go MF, Kapur V, Graham DY, Musser JM (1996). Population Genetic Analysis of *Helicobacter pylori* by Multilocus Enzyme Electrophoresis: Extensive Allelic Diversity and Recombinational Population Structure. *Journal of Bacteriology*.178(13): 3934-2928.

Goodwi CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH (1985). Unusual cellular fatty acids and distinctive ultra- structure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol*. 19:257-267.

Goodwin CS, Blake P, and Blincow E (1986). The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of antibiotics and anti-ulcer agents against *Campylobacter pyloridis*. *J. Antimi- crob. Chemother*. 17:309-314.

Goodwin CS, Collins MD, Blincow E (1986). The absence of thermoplasmaquinones in *Campylobacter pyloridis*, and its temperature and pH growth range. *Microbios Lett*. 32: 137-140.

Goodwin CS, Armstrong JA., Chilvers T, Peters M, David Collins, M, Sly L, McConnell W, Harper WES (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov.as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 397–405.

Grunenwald H (2003). Optimization of Polymerase Chain Reactions. *Methodes Mol Biol*. 226:89-100.

Gutmann DH, Hirbe AC, Huang ZY, Haipek CA (2001). The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol Dis*. 8(2):266-78.

Hatakeyama M (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* cagA protein. *Nat Rev Cancer*.4(9):668-694.

Hansson LE, Engstrand L, Nyren O, Evans DJ, Lindgren A, Bergström R, Andersson B, Athlin L, Bendtsen O, Tracz P (1993) *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 105(4): 1098-1103.

Hayashi Y, Tsujii M, Wang J, Kondo J, Akaska T, Jin Y, Li W, Nakamura T, Nishida T, Lijima H, Tsuji S, Kawano S, Hayashi N, Takerhara T (2013). CagA mediates epigenetic regulation to attenuate let-7 expression in *Helicobacter pylori*-related carcinogenesis. *Gut*. 62(11): 1536-1546.

He B, Xiao YF, Tang B, Wu YY, Hu CJ, Xie R, Yang X, Yu ST, Dong H, Xhao XY, Li JL, Yang SM (2016). hTERT mediates gastric cancer metastasis partially through the indirect targeting of ITGB1 by microRNA-29a. *Sci Rep*. 6:21955

Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M, EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor cagA in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(24): 23130-23137.

Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Kamiya NM, Azumas T, Hatakeyama M (2005). EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor cagA in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(24). 23130-23137.

Irmak-Yazicioglu MB (2016). Mechanisms of microRNA deregulation and microRNA targets in gastric cancer. *Oncol Res Treat*. 39: 126-139.

Jenks PJ, Megraud F, Labigme A (1998). Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. *Gut*. 43: 752-758.

Johnsen HI, Aurelio ON, Kwaja Z, Jørgensen GE, Pellegata NS, Plattner R, Stanbridge EJ, Cojot JF (2000). p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G2/M cell-cycle arrest. *Int J Cancer*. 88(5): 685-691.

Jones DM, Curry A, Fox AJ (1985). An ultrastructural study of gastric Campylobacter-like Organism '*Campylobacter pyloridis*'. *Journal of General Microbiology*, :2335-2341.

Kang W, Tong JH, Chan AW, Lung RW, Chau SL, Wong QW, Wong N, Yu J, Cheng AS, To KF (2012). Stathmin1 Plays Oncogenic Role and Is a Target of MicroRNA-223 in Gastric Cancer. *PLoS One*. 7(3): e33919.

Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman N.D, Kamangar F (2014). Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(5): 700–713.

Karnes WE, Samloff IM, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SW, Waish JH (1991). Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology*. 10(11). 167-174.

Kidd M and Modlin IM. (1998) A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion*, 59(1):1–15.

Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294(5540): 173–177.

Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, Van Der Ende A, Van Der Hulst RW, Wirth HP, Höök-Nikanne J, Thompson SA, Blaser MJ (2000). Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis*. 181(1): 273-282.

Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers E (2006). Patogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3): 449-490.

Lau PP, DeBrunner-Vossbrinck B, Dunn K, Miotto MT, MacDonnell D M, Rollins CJ, Pillidge RB, Hespell RR, Colwell SL, Mitchell, Fox GA (1987). Phylogenetic diversity and position of the genus *Campylobacter*. *Syst. Appl. Microbiol*. 9:231-238.

Lauren P (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *An attempt at a histo-clinical classification*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 64: 31-49.

Li J, Gou Y, Liang X, Sun M, Wang G, De W, Wu W (2012). MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. *J Cancer Res Clin Oncol*. 138(5):763-774.

Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, Sun L, Ji G, Shi Y, Han z, Han S, Nie Y, Chen X, Zhao Q, Ding J, Wu K, Daiming F (2011). MiRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res*. 9(7): 824-833.

Liu X, Cai J, Sun Y, Gong R, Sun D, Zhong X, Jiang S, He X, Bao E, Yang L, Li Y (2015). MicroRNA-29a inhibits cell migration and invasion via targeting Roundabout homolog 1 in gastric cancer cells. *Mol Med Rep*. 12(3): 39944-3950.

Loh JT, Shaffer CL, Blanca Piazuolo M, Bravo LE, McClain MS, Correa P, Cover TL (2011). Analysis of *cagA* in *Helicobacter pylori* strains from Colombian populations with contrasting gastric cancer risk reveals a biomarker for disease severity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20(10): 2237-2249.

Lü MH, Deng JQ, Cao YL, Fang DC, Zhang Y, Yang SM (2012). Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: a meta-analysis. *Exp. Ther. Med*. 3 (4): 728-734.

Ma L, Chen Y, Zhang B, Liu G (2014). Increased microRNA-223 in *Helicobacter pylori*- associated gastric cancer contributed to cancer cell proliferation and migration. *Biosci Biotechnol Biochem*. 78(4),602-608.

Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ (1985). Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric campylobacter. *Med J Aust.* 142 :436–439.

Marshall, BJ and Goodwin CS. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:68.

Marsahall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, Guerrant RL (1990). Urea Protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* From the Bactericidal Effect of Acid. *Gastroenterology.* 99 (3): 697-762.

Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, Yamaoka Y, Berenson GS (2002). Age at acquisition of *Helicobacter pylori* Infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *The Lancet.* 59(9310):931-5.

Matsushima K, Isomoto H, Inoue N, Nakayama T, Hayasji T, Nakayama M, Nakao K, Hurayama T, Kohno S (2011). MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infection gastric mucosa. *Int J Cancer.* 128(2):361-279.

Megraund F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbouri A, Hoa DQ (1989). Seroepidemiology of campylobacter pylori infection in various populations. *Journal of Clinical Microbiology,* 27(8):1870–1873.

Nagase L, Hayashi T, Senda T, Hatakeyama M (2015). Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western cagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. *Nature.* 5:15749.

Nateri AS, Riera-Sans L, Da Costa C, Behrens A (2004). The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science.* 303(5662):1374–1378.

Nguyen TT, Kim SJ, Park JM, Hahm KB, Lee HJ (2015). Repressed TGF- β signaling through cagA-Smad3 interaction as pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J. Clin. Biochem Nurt.* 57(2):113-120.

Noto JM and Peek RM. (2012) The role of micRNAs in *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 1:21.

Noto JM, Blanca Piazuelo M, Chaturvedi R, Bartel CA, Thatcher EJ, Delgado A, Romero-Gallo J, Wilson KT, Correa P, Patton JG, Peek RM (2013). Strain-specific suppression of microRNA-320 by carcinogenic *Helicobacter pylori* promotes expression of the antiapoptotic protein Mcl-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 305(11):G786-96

Ozaydin N, Turkyilmaz SA, Cali S (2013). Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the ^{13}C -Urea breath test. *BMC Public Health.* 13:1215.

Park SM, Gaur AB, Lengyel E and Peter ME (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22: 894-907.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibely RK (1991). *Helicobacter pylori* Infection and The Risk of Gastric Carcinoma. *The New England Journal of Med.* 325(16):1127-31.

Peek RM and Blaser MJ. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.*2(1):28-37.

Peng Y and Croce CM. (2016) The role of miRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 1, 15044.

Powell J and McConkey CC. (1990) Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *British Journal of Cancer.* 62(3): 440–443

Roa X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinforma Biomath.* 3(3): 71-85.

Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W (1998). Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genes and Relationship to VacA and *cagA* Protein Expression, Cytotoxin Production, and Associated Diseases. *J Clin Microbiol.* 36 (4): 944-948.

Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, Senol O, Boke E, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Fraefel C, Gusella JF, Krichevsky AM, Breakefield XO (2009). Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 29(21): 5923-5940.

Schliekelman MJ, Gibbons DL, Faca VM, Creighton CJ, Rizvi ZH, Zhang Q, WONG CH, Wang H, Ungewiss C, Ahn YH, Shin DH, Kurie JM, Hanash SM (2011). Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesen- chymal transition in cancer. *Cancer Res* 71: 7670-7682.

Sipponen P, Kosunen TU, Valle J, Riihela M, Seppala K (1992). *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol.* 45(4):319-329.

Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, Nagai S, Koyasu S, Gilman RH, Kersulyte D, Berg DE, Sasakawa C (2009). *Helicobacter pylori cagA* phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe.* 5(1): 23-34.

Qiu M, Cai M, Zhang D, Wang Z, Wang D, Li Y, Xu R (2013). Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *Journal of Translational Medicine* 11(1): 58.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388(6642): 539-547.

Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M (2003). Attenuation of *Helicobacter pylori* cagA.SHP2 Signaling by Interaction between cagA and C-terminal Src Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(6):3664-3670

Us D and Haşçelik G. (1998) Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in an Asymptomatic Turkish population. *J of Infect*, 37(2):148–150.

Taguchi, Y-h (Ed.) (2016). micRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*, Italy

Taylor NS, Foz JG, Akopyants NS, Berg DE, Thompson N, Shames B, Yan L, Fonham E, Janney F, Hunter FM (1995). Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 33(4): 918-923.

Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR (1998). Variants of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Different *H. pylori*-Associated Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(8): 2258-2263.

Yun J, Song SH, Park J, Kim HP, Yoon YK, Lee KH, Han SW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Kim TY (2012). Gene silencing of EREG mediated by DNA methylation and histone modification in human gastric cancers. *Lab Invest*, 92(7), 1033–1044.

Wallon G, Rappsilber J, Mann M, Serrano L (2000). Model for stathmin/OP18 binding to tubulin. *EMBO J*. 19(2): 213-222.

Wang G, Romero-Gallo J, Benoit SL, Plazuelo MB, Dominguez RL, Morgan DS, Peek RM, Maler RJ (2016). Hydrogen metabolism in *Helicobacter pylori* plays a role in gastric carcinogenesis through facilitating cagA translocation. *mBio*.7(4): e01022-16.

Wang Y, Liu S, Zhang Y, Bi C, Xiao Y, Lin R, Huang B, Tian D, Ying S, Su M (2014). *Helicobacter pylori* infection and gastric cardia cancer in Chaoshan region. *Microbes and Infection*, 16(10), 840–844.

Warren JR and Marshall B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*. :1273-1275.

Wong ML and Medrano JF. (2005) Real-time PCR form RNA quantitation. *BioTechniques*. 39. 75-78.

Wyatt JI, Rathbone BJ, Sobala GM, Shallcross T, Heatley RV, Axon ATR, Dixon MF (1990). Gastric epithelium in the duodenum: Its association with *Helicobacter pylori* and inflammation. *Journal Clinical Pathology*.43:981-986.

Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A (1995). Anlysis of Expression of cagA and vacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two majör types and that cagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infection and Immunity*. 63(1): 94-98.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007). MiRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*. 302(1): 1-12.

Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J. Liu W, Xiao, Lu H (2008). miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Inverst*. 88(12):1358-1366.

Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K (2004). Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer*, 7(2):61-77

Xhou X, Ji G, Chen H, Jin W, Yin C, Zhang G (2015). Clinical role of circulating miR-223 as a novel biomarker in early diagnosis of cancer patients. *Int J Clin Ezp Med*. 8(9):16890-16898.

Zhou X, Jin W, Jia H, Yan J, Zhang G (2015). MiR-223 promotes the cisplatin resistance of human gastric cancer cells via regulating cell cycle by targeting FBXW7. *Journal of Experimantal & Clinical Cancer Research* 34(1): 28.

Zhou Z, Wang L, Song W, Cui H, Chen G, Qiao F, Hu J. Zhou R, Fan H (2015). Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology*. 13:101.

Zhu Y, Jiang Q, Lou X, Ji X, Wrn X, Wu J, Haiying T, Jiang T, He W, Wang C, Du Q, Zheng S, Mao J, Huanf J (2012). MicroRNAs up-regulated by cagA of *Helicobacter pylori* induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *Plos one*. 7(4): e35147.

Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova O (2010) Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)* 75(13): 1563-1568.

İnternet Erişim

Cover TL (2016). *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *mBio*. 26(1):e01869-15. Erişim Tarihi: 22 Aralık 2017, <http://mbio.asm.org/content/7/1/e01869-15.long>

Konturek JW (2003). Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(SUPPL. 3), 23–41.

http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_03_s3/pdf/23_12_03_s3_article.pdf



8. ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Kıbrıs'ın Gazimağusa ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kıbrıs'ta tamamladı. 2014'te Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümün'den mezun oldu. 2010-2014 yılları arasında Gazimağusa Devlet Hastanesi biyokimya/mikrobiyoloji bölümünde, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sitogenetik laboratuvarında ve Yakın Doğu Hastanesi tıbbi genetik anabilim bölümünde staj yaptı. 2015'ten beri Haliç Üniversitesi'nde yüksek lisansa devam etmektedir.

