

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

**MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK HELİCOBACTER
PYLORİ GENOTİPLERİNDE miR-98 VE miR-16-5P
miRNA'LARININ EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Şafak ŞENER**

**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 HELİCOBACTER
PYLORİ GENOTİPLERİNDE miR-98 VE miR-16-5P
miRNA'LARININ EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Şafak ŞENER**

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

İstanbul – 2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Şafak ŞENER tarafından hazırlanan “**Mide Kanserinde Polimorfik Helicobacter Pylori Genotiplerinde Mir-98 ve Mir-16-5p miRNA’larının 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: Şafak ŞENER Tez 28.12.17.docx (D34228893)
Submitted: 12/28/2017 11:30:00 AM
Submitted By: burcuyazicioglu@halic.edu.tr
Significance: 8 %

Sources included in the report:

Sevde Hasanoğlu Yüksek Lisans Tez 15.12.2017.pdf (D33989460)
<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-26>
<http://www.pnas.org/content/108/38/16032.full>
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55936-8_5/fulltext.html
http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/ene_01_ponencia.html
<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-015-0111-0>
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2012.00092/full>
<https://en.wikipedia.org/wiki/CagA>
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-05971-5_21
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926156/>
<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47465-0>
<http://www.pnas.org/content/99/22/14428.full>
<https://www.deepdyve.com/lp/wiley/the-vacuolating-cytotoxin-of-helicobacter-pylori-zzObHQIsjC>
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2003.00347.x/full>
https://scholarsbank.uoregon.edu/xmlui/bitstream/handle/1794/12477/Wandler_oregon_0171A_10427.pdf?sequence=1
<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>

Instances where selected sources appear:

50

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2016 – 2018 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörülle bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan yüksek lisans arkadaşlarım Ferhat Erdoğan, Meyrem Osum ile Feyza Nur Argüç'e ve Arş. Gör. Anıl Cebeci'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca maddi manevi bana destek olan, verdiğim her kararın arkasında durarak beni bugünlere getiren çok sevdiğim anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul, 2018

Şafak ŞENER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	III
ÇİZELGELER	V
ŞEKİLLER	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Mide Kanseri	1
1.2. Mide Kanseri Risk Faktörleri	2
1.2.1. Tütün Ürünlerinin Mide Kanserine Etkisi	2
1.2.2. Alkolün Mide Kanserine Etkisi	2
1.2.3. Düşük Sosyoekonomik Durum	3
1.2.4. Mide Kanseri ve Aile Geçmişi	3
1.2.5. Diyet	3
1.3. <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.3.1. Vakuolleyici Sitotoksin A (VacA)	7
1.3.1.1. VacA'nın Mide Hastalıklarındaki Rolü	10
1.3.1.2. VacA'nın Epitelyal Hücre Fonksiyonları Üzerine Etkisi	10
1.3.1.3. VacA ve Mide Kanseri Mekanizmaları	12
1.3.2. Sitotoksin İlişkili Gen A (CagA)	12
1.3.2.1. Tip IV Sekresyon Sistemi ve CagA	15
1.4. MikroRNA	16
1.4.1. miRNA'ların Mide Kanseri Gelişimine Etkisi	17
1.4.2. miRNA'ların Kansere Tanısında Kullanılması	17
1.4.3. miRNA'ların Mide Kanseri Tedavisinde Kullanılması	17
1.5. Mide Kanserinde <i>H. pylori</i> ve mikroRNA ilişkisi	18
1.6. miR-98 ve Kansere	18
1.7. miR-16 ve Kansere	19
2. AMAÇ	22
3. GEREÇLER	24
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler	24
3.2. Toplanan Dokuların Saklanması İçin Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve Polimeraz Enzimleri	24
3.4. Primerler	24
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi Tampon ve Kimyasalları	27
3.6. AGS Hücre Hattı için Besiyeri ve Dondurma Medyumunun Hazırlanması	27
3.7. qRT-PCR Reaksiyon Bileşenleri	28
3.8. Poli(A) Kuyruk Ekleme Reaksiyonu Bileşenleri	28
3.9. DNA büyüklük markörleri	28
3.10. Diğer Kimyasallar	28
3.11. Kitler	28
3.12. Cihazlar ve Markaları	29

3.13. Sarf Malzemeler.....	30
4. YÖNTEM	32
4.1. Mide Kanser Dokularının Saklanması	32
4.2. Mide Tümörlü Dokulardan DNA İzolasyonu.....	32
4.3. PZR ile CagA ve VacA Gen Varyasyonlarının Belirlenmesi	32
4.4. Agaroz Jel Elektrophrez Yöntemi	34
4.5. Dokudan Total mRNA İzolasyonu	34
4.6. cDNA Sentezi	35
4.6.1.Poli (A) Kuyruk Ekleme Reaksiyonu	35
4.6.2. First-strand cDNA Sentez Reaksiyonu	36
4.7. SYBR Green qRT-PZR ile miRNA Ekspresyon Analizi	37
4.8. Hücre Kültürü	39
5. SONUÇLAR	40
5.1. Agaroz Jel Elektrophreziyle VacA Polimorfik Bölgelerinin Saptanması	40
5.2. Agaroz Jel Elektrophreziyle CagA Polimorfik Bölgelerinin Saptanması	41
5.3. miR-16-5p'nin qRT-PZR ile Ekspresyon Analizi	43
5.4. miR-98'in qRT-PZR ile Ekspresyon Analizi	44
6. TARTIŞMA	46
6.1. miR-16-5p.....	46
6.2. miR-98	47
7. KAYNAKLAR	49
8. ÖZGEÇMİŞ	62

KISALTMALAR

ALDH2: Aldehid dehidrogenaz 2

H. felis: *Helicobacter felis*

H. heilmannii: *Helicobacter heilmannii*

H. pylori: *Helicobacter pylori*

IM: Bağırsak Metaplazi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

VacA: Vakuolleyici sitotoksin A

MAPK: MAPkinaz

RPTP- α : Reseptör benzeri protein tirozin fosfataz alfa

RPTP- β : Reseptör benzeri protein tirozin fosfataz beta

LRP-1: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-bağlı protein-1

CD18 T: β 2 integrin

Rab7: Ras-bağımlı protein

LAMP1: Lizozomal ilişkili membran proteini 1

ATP: Adenozin trifosfat

PARP: poly(ADP-ribose) polymerase

BcL-2: B-hücreli lenfoma 2

CagA: Sitotoksin ilişkili gen A

CagPAI: Cag patojenite adası

kDa: Kilodalton

SHP2: Src homology-2 domain-containing phosphatase 2

Crk: CT10 regülatör kinaz

IL8: Interlökin 8

TFSS: Tip 4 sekresyon sistemi

mRNA: mesajcı RNA

miRNA: mikroRNA

RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi

pri-miRNA: Birincil miRNA

pre-miRNA: Olgun miRNA

HS: Hipertrofik Skar

CCL18: Kemokin (C-C motif) ligand 18

CDK6: Siklin bağımlı kinaz 6



ÇİZELGELER

Sayfa No.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda CagA bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler	25
Çizelge 3.2. PZR reaksiyonunda VacA bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler	26
Çizelge 3.3. qRT-PZR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler	27
Çizelge 4.1. PZR Reaksiyon Bileşenleri	33
Çizelge 4.2. PZR Reaksiyon Koşulları.....	33
Çizelge 4.3. Agaroz Jel Hazırlanışı	34
Çizelge 4.4. İzole Edilen mRNA Konsantrasyonları	34
Çizelge 4.5. Elde Edilen cDNA Konsantrasyonları	35
Çizelge 4.6. Poli (A) Kuyruk Ekleme Reaktifleri.....	36
Çizelge 4.7. First-strand cDNA Sentez Reaktifleri	36
Çizelge 4.8. qRT-PZR'de Kullanılan Bileşenler	38
Çizelge 4.9. qRT-PZR Reaksiyon Koşulları	38
Çizelge 5.1. miR-16-5 Ekspresyon Analiz Değerleri.....	43
Çizelge 5.2. miR-98'in Ekspresyon Analiz Değerleri.....	44

ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 1.1. Correa Yolağı.....	1
Şekil 1.2. Helicobacter pylori	8
Şekil 1.3. VacA ile hücrel vakuolizasyonun indüklenmesi	10
Şekil 1.4. Helicobacter pylori CagA ve VacA enfeksiyonu	15
Şekil 1.5. DNA hasarı cavabında miRNA'ların rolü	21
Şekil 5.1. T1, T2 ve T3 dokularında VacA polimorfik bölgelerinin agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 5.2. T4, T5 ve T6 dokularında VacA polimorfik bölgelerinin agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 5.3. T1, T2, T3 ve T4 dokularında CagA polimorfik P bölgesinin agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 5.4. T5 ve T6 dokularında CagA polimorfik P bölgesinin agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 5.5. Polimorfik CagA 3' ve R' bölgelerinin agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 5.6. miR-16-5p Ekspresyon Seviyesi.....	44
Şekil 5.7. miR-98a Ekspresyon Seviyesi.....	45

GENEL BİLGİLER

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

ÖZET

MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK HELICOBACTER PYLORİ GENOTİPLERİNDE MİR-98 VE MİR-16-5P MİRNA'LARININ EKSPRESYON ANALİZİ

Mide kanseri, dünya genelinde görülme sıklığı açısından dördüncü; kanser kaynaklı ölümler açısından ise ikinci sıradadır. Yüksek görülme sıklığının yanında geç anlaşılabilmesi, mide kanseri hastalarının birkaç sene içinde hayatlarını kaybetmelerine yol açmaktadır. En çok bilinen risk faktörleri, tütün ürünleri kullanımı, beslenme tarzı ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonudur. Bakteri enfeksiyonunun, genetik yatkınlıkla birleştiğinde mide kanseri riskini önemli ölçüde arttırdığı bilinmektedir. *Helicobacter pylori* kanser oluşumunda rol oynayan ve polimorfik özellik gösteren CagA ve VacA olarak isimlendirilen iki önemli gen taşımaktadır. MikroRNA'lar küçük, kodlamayan RNA molekülleridir. Yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğundaki bu moleküller, post-transkripsiyonel evrede gen ekspresyonunu negatif yönde düzenler. Kanser mekanizmalarında önemli görevler üstlendikleri bilinmektedir. Hem tümörü tetikleyici hem de tümör baskılayıcı özellikleri vardır.

Bu çalışmada, *Helicobacter pylori* genlerinden VacA ve CagA polimorfizmleri, Türk popülasyonunda çalışılmış ve bu polimorfizmler ile mide kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca MiR-98 ve MiR-16-5p miRNA'larının tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyelerindeki değişimler de incelenmiştir. İncelenen CagA ve VacA polimorfizmlerinin hastalıkla ilişkili olduğu görülmüş, tümör baskılayıcı ve pro-apoptotik etki gösteren miRNA'ların ise ekspresyon seviyelerinde, AGS kontrol hücre hattına göre azalma olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mide kanseri, *Helicobacter pylori*, MiR-98, MiR-16-5p

GENERAL INFORMATION

Name and Surname: Şafak ŞENER

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-98 AND MIR-16-5P MIRINA IN POLYMORPHIC HELICOBACTER PYLORI GENOTYPES IN GASTRIC CANCER

Gastric cancer is the fourth most common cancer in the world; and second in terms of cancer-related deaths. Besides the high rates of incidence, stomach cancer cause deaths within a few years because of its late diagnosis. The most well known risk factors are the use of tobacco products, diet and *Helicobacter pylori* infection. It is known that bacterial infection, when combined with genetic predisposition, significantly increases gastric cancer risk. *Helicobacter pylori* carries two important genes which play a role in cancer formation and show polymorphic characteristics, called CagA and VacA. MicroRNAs are small, non-coding RNA molecules. These molecules are about 20-25 nucleotides and regulate gene expression in the negative direction in the post-transcriptional stage. It is known that they have important roles in cancer mechanisms. They can both trigger and suppress tumor.

In this study, VacA and CagA polymorphisms of *Helicobacter pylori* genes were studied in Turkish population and the relationship between these polymorphisms and gastric cancer was investigated. Also, miR-98 and miR-16-5p miRNAs have been examined for changes in expression levels in tumor tissues. CagA and VacA polymorphisms have been found to be associated with disease, while tumor suppressor and pro-apoptotic miRNAs have been found to be reduced in expression levels relative to AGS control cell line.

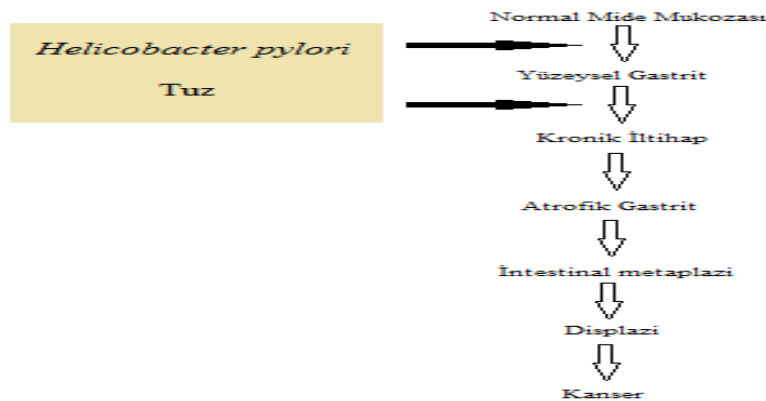
Keywords: Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, MiR-98, MiR-16-5p

1.GİRİŞ

1.1 Mide Kanseri

Mide kanseri 1930-1940'lı yıllardan önce batı ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser nedenli ölümlerde birinci sırada yer almaktaydı. Geçen yüzyıldan bu yana görülme sıklığındaki azalmaya rağmen, mide kanseri hala dünya genelinde kanser bağlantılı ölümlerde ilk sıralarda yer almaya devam etmektedir (Ferlay ve diğ., 2015). Mide kanseri dünya genelinde görülme sıklığı açısından dördüncü; kanser kaynaklı ölümler açısından ise ikinci sıradadır (Ferro ve diğ., 2014). Her yıl yaklaşık 720.000 kişi mide kanserinden hayatını kaybetmektedir. Yüksek görülme sıklığının yanında geç anlaşılabilmesi, mide kanseri hastalarının birkaç sene içinde hayatlarını kaybetmelerine yol açmaktadır (Noto ve diğ., 2017). Son yıllarda yaygınlığı azalsa da, geç tanı konulabilmesi mide kanserini hala ölüm oranı en yüksek hastalıklardan biri yapmaktadır.

Pek çok insan mide kanseri; uzun süreli bir *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) enfeksiyonundan sonra, Correa yolağı (Correa pathway) olarak bilinen çok basamaklı histopatolojik cascade'la ortaya çıkar (Şekil 1.1.). Bunlar sırasıyla gastrit, atrofi, bağırsak metaplazi (IM), displazi ve nihai olarak da mide kanseridir (Fox ve Wang., 2007).



Şekil 1.1. Correa Yolağı (Fox ve Wang., 2007)

1.2 Mide Kanseri Risk Faktörleri

Mide kanserinde *H. pylori* enfeksiyonu başta olmak üzere tuz, tütün ürünleri, alkol, diyet lif alımı, düşük sosyoekonomik durum, obezite ve aile geçmişi başlıca risk faktörlerindedir (Yoon ve Kim, 2015).

1.2.1 Tütün Ürünlerinin Mide Kanserine Etkisi

Sigara kullanımı; kanser de dahil olmak üzere önlenebilir ölümlerin en önemli sebeplerinden biridir. Akciğer, üst solunum yolu ve sindirim sistemi, mesane, pankreas ve karaciğer gibi pek çok organ ve sistem üzerinde karsinojenik etkisi olduğu gösterilmiştir (Tredaniel ve diğ., 1997). Sigara kullanımı kanser riskini iki katına çıkarmaktadır (www.cancer.org). Fakat sigara kullanımının hangi mekanizmalarla mide kanserine neden olduğu bilinmemektedir.

1.2.2 Alkolün Mide Kanserine Etkisi

Alkol kullanımının mide kanseri riskini arttırıp arttırmadığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Toplamda 34.557 hastanın yer aldığı 59 farklı çalışma incelenerek oluşturulan bir metaanaliz (44 vaka-kontrol, 15 kohort), aşırı alkol tüketiminin (günde 4 veya daha fazla içki) mide kanseri riskini arttırıcı etkisi olduğunu göstermiştir. İçki içmeyenlerle karşılaştırıldığında, aşırı alkol tüketenler mide kanserine yakalanma riski açısından 1.20 kat fazla risk göstermişlerdir (Tramacere ve diğ., 2012).

Buna karşın başka bir metaanaliz, alkol kullanımını bırakan hastaların mide kanserine yakalanma riski üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmalarda mide kanseri riskinde alkol kullanımının bırakılmasına rağmen bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Jarl ve diğ., 2013).

Fakat alkol kullanımının mide kanseri risk faktörü üzerine olan etkisi kanserin nerede olduğuna bağlı olarak değişebilir. Bir çalışmada alkol kullanımının mide kanseri riski üzerine etkisinin aldehid dehidrogenaz 2 (ALDH2) polimorfizmiyle ilgili olduğu gösterilmiştir (Shin ve diğ., 2011). Alkolün etkileri vücutta gen kodlayan enzimlerin etanol metabolizması için polimorfizmleriyle ayarlanmıştır. Bunların yanında aldehid dehidrogenaz 2 enzimi genetik frekans olarak etnik çeşitliliğe bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Goedde ve diğ., 1992). Örneğin aktif ALDH2*1/*1 genotipi neredeyse tüm Kafkasya ve Güneydoğu Asya'da görülürken, Doğu Asya'da daha sıklıkla inaktif ALDH2 *2 alleleline rastlanmaktadır. Alkol tüketiminin ALDH2 genotipine bağlı

olarak çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. ALDH2 *1/*2 genotipine sahip bireylerde alkolün daha karsinojenik etki gösterdiği gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2006).

1.2.3.Düşük Sosyoekonomik Durum

Yakın zamanda Kore’de yapılan bir çalışma sosyoekonomik durum ve mide kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Mide kanserinin tedavi edilebilir bir hkanser türü olduğu düşünüldüğünde ve düşük sosyoekonomik çevrede yayan insanların tedavi almaları; sosyoekonomik açıdan daha iyi koşullarda yayan insanlara göre daha zor olduğundan bu durum mide kanseri hastalarının üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Kim ve diğ., 2017).

1.2.4.Mide Kanseri ve Aile Geçmişi

Aile geçmişi mide kanseri açısından önemli risk faktörleri arasındadır. Dünyada mide kanseri hastalarının oranları farklılık gösterse de; aile geçmişinde mide kanseri olan hastaların, kansere yakalanma oranları 2 ile 3 kat fazladır.

Kasım 2000’den Mart 2002’ye kadar yapılan bir çalışmada aile geçmişinin mide kanserine yakalanma riski ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Chang ve diğ., 2002).

1.2.5. Diyet

Pek çok diyet faktörü mide kanser riskini etkiler. Bu risk faktörlerinden en önemlisi ise tuzdur. Aşırı tuz alımı kanser riskini arttıran önemli bir faktördür (Shikata ve diğ., 2006). Yüksek miktarda sodyum kloridin mide mukozasına zarar verdiği, hücre ölümüne neden olduğu ve hücre bölünmesinin tetiklediği hayvan modellerinde gösterilmiştir (Cohen ve Roe, 1997). Yüksek tuz içeren beslenmenin *H. pylori* kolonileşmesi ve *H. pylori* kaynaklı iltihaplanma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gaddy ve diğ., 2013).

Meyve ve sebze tüketiminin ise kanser oluşumu üzerinde engelleyici rol oynadığı saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada meyve ve sebzelerde bulunan C vitamininin özofagus ve mide kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2014).

1.3. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

H. pylori'nin ortaya çıkması günümüzden yaklaşık 125 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu bakterinin ilk olarak İtalyan anatomist Giulio Bizzozero tarafından keşfedildiği düşünülmektedir. Bizzozero aynı zamanda tüm bölünen hücrelerin hücre çekirdeğine gereksinin duyduğunu da kanıtlayan önemli bir bilim insanıdır (Castiglioni, 1947). Köpeklerde mide mukozası üzerine yaptığı gözlemler sonucu, mide salgı bezlerinde yaşıyan mikrororganizmaları bildirmiştir. Elle çizdiği resimlerde, Bizzozero, parietal hücreler ve gastrik bezler içerisinde yaklaşık 10 dalga boyuna sahip gram negatif organizmaları göstermiştir. Bu mikrororganizmalar yüksek olasılıkla *Helicobacter heilmannii* (*H. heilmannii*) veya *Helicobacter felis* (*H. felis*) türüne ait olmalıdır. Bizzozero 18 Mart 1892'de Torino'da düzenlenen Tıp Akademisi'nde verdiği raporunda bu mikroorganizmaların sağlıklı canlılarda mı yoksa hasta canlılarda mı bulunduğu konusunda tam emin olamadığını söylemiştir (Figura ve Orderda, 1996).

Bizzozero'nun çalışmasını bir adım ileri götürerek genişleten ise Salomon olmuştur. Salomon farelerle çalışmıştır ve bu alışmaları, *H. Felis*-enfekte farelerin *Helicobacter* tedavisinde kullanılacak model organizma haline gelmesini sağlamıştır (Salomon, 1896).

20. yüzyıldan itibaren yapılan çalışmalarda, patologlar zaman zaman insan mide mukozasında spiral şekilli mikroorganizmalar tespit etmişlerdir (şekil 1.2) (Krienitz, 1906). Fakat 1950'lerde insanlar üzerine yapılacak önemli çalışmalara kadar *H. pylori* enfeksiyonunun sonuçları anlaşılamamıştır ve insanlar daha şiddetli sonuçlara yol açabilen mide ameliyatları olmaya devam etmişlerdir.

1950'ler ve 60'larda Harvard Tıp Fakültesi'nden Susumu Ito mide mukozasının elektron mikroskopu altında detaylı bir incelemesi yapmıştır ve çeşitli fotoğraflar çekip, çizimler yapmıştır. Yaptığı gözlemlerden bazılarında *H. pylori*'yi de gözlemlemiş ve bu mikroorganizmanın ayrıntılı bir fotoğrafını da yayınlamıştır.

1975'te Steer ve Colin-Jones yayınladıkları makalede gastrik ülser hastalarının midesinde *H. pylori* bulunduğunu göstermişlerdir. Hastalığı taşımayan kontrol grubunda ise bakteriye rastlanmamıştır. Fakat laboratuvar ortamında *H. pylori*'yi kültür etmeyi başaramamışlardır. Onun yerine *Pseudomonas aeruginosa* kültüre edilmiştir

ve Steer ve Colin-Jones da hastalığa bu mikroorganizmanın neden olduğunu düşünmüşlerdir (Steer ve Colin-Jones, 1975).

Warren ve Marshall tarafından 1984'te keşfedilmesinden bu yana; *H. pylori*'nin dünya genelinde geniş bir yayılım gösterdiği anlaşılmıştır. Mikroaerofilik, gram-negatif, spiral şekilli, kamçılı ve nötrofilik *H. pylori* (Tomb ve diğ., 1997), mide kanserinin (GC) en önemli risk faktörüdür ve gelişmiş ülkelerde 50 yaş ve üzeri populasyonun %40'ı *H. pylori* enfeksiyonu taşımaktadır (Starzynska ve Malfertheiner 2006). Gelişmekte olan ülkelerde bu oranın daha da yüksek olduğu bilinmektedir (yaklaşık %80) (Tokudome ve diğ., 2006). Bu da *H. pylori* enfeksiyonunu en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biri yapmaktadır (Cover ve Peek, 2013). 1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation-WHO) tarafından da *H. pylori* Sınıf-I karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır. Yine aynı yıl Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer) *H. pylori*'yi insanlar üzerinde karsinojenik olarak sınıflandırmıştır (International Agency for Research on Cancer, 1994). Enfeksiyonlar semptomatik olmasına rağmen yüksek risk hastaları dışında, enfeksiyonun görüntülenmesi ve tedavisi henüz yeterli düzeyde gerçekleştirilememektedir (Shepherd ve diğ., 2013).

H. pylori enfeksiyonu mide mukozasında yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açar ve bu bölgede bağışıklık hücreleri sayısı bir anda artar. *H. pylori* ile enfekte olmuş pek çok insanda lamina propria ve epitelyal bezlerde nötrofiller gözlenmiştir (Paul ve Yardley, 1989).

Aslında dokuyu istila etmeyen *H. pylori*, epitelin üzerinde bulunan mukus tabakasında yaşar. Fakat bakterilerin bir kısmı epitel dokuya geçebilir (Hessey ve diğ., 1990). İlk bağışıklık yanıtı bakterinin ürettiği toksinlerin mide mukoza dokusuna taşınmasıyla başlar. *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi amonyak üretir ve bu da ökaryotik hücreler üzerinde toksik etki yaratır (Visek, 1968). Ayrıca sitotoksik aktivitesi de uzak hücrelerde bile vakoller oluşturarak bağışıklık yanıtın ortaya çıkmasına neden olur (Leunk ve diğ., 1988).

H. pylori insandan insana genelde tükürük yoluyla bulaşmaktadır. Fakat kirli sularda da bu bakteriye rastlandığından, özellikle dışkı bulaşmış suların içilmesiyle de bakteri bulaşabilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde bakteri enfeksiyonunun gelişmiş

ülkelere göre fazla olmasının sebebi; kontamine sular ve düşük hijyen şartlarından kaynaklanmaktadır (Ishaq ve Nunn, 2015).

H. pylori enfeksiyonu görülme sıklığı açısından, dünyada bölgeden bölgeye değişiklik gösterse de bu enfeksiyonların mide kanserine dönüşme oranları aynı değildir. Örneğin dünyada enfeksiyonun en sık görüldüğü yerler Afrika kıtası ülkeleridir (~%91). Fakat düşük oranda mide kanseri vakasına rastlanmaktadır. Aynı şekilde Asya'da Bangladeş ve Hindistan gibi daha az gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranda *H. pylori* enfeksiyonu olmasına rağmen; daha gelişmiş ülkeler olan Kore Japonya ve Çin'de mide kanseri görülme sıklığı daha fazladır.

Bu farklılıklar birçok faktörün kombinasyonu ile açıklanabilir. Bunlar; enfeksiyona yakalanma yaşı, farklı *H. pylori* suşları, konağın genetik profili ve çevresel faktörler olarak gösterilebilir.

Yapılan birçok çalışma bakteri enfeksiyonunun cinsiyetle değişmediğini göstermiştir. Bunun yanında enfeksiyon oranlarının yaşla önemli bir ilişkisi vardır. Örneğin Türk populasyonunda 348 hastayla yapılan bir çalışmada hastaların kanlarında *H. pylori* enfeksiyonuna karşı geliştirilen antikor miktarlarına bakılmıştır. Çalışmaya göre 1 yaş ve altı hastalarda antikor oranı <17.4%; 1-4 yaş arasında 15.5%; 5-9 yaş arasında 30.6%; 10-14 yaş arasında 47.3%; 15-19 yaş arasında 58.4%; 20-29 yaş arasında 62.6%; 30-39 yaş arasında 67.6%; 40-49 yaş arasında 81.3%; 50 yaş üstünde ise 66.3% olarak bulunmuştur (Us ve Hasçelik, 1998). Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere *H. pylori* enfeksiyonunun yaşla birlikte artmaktadır. *H. pylori*'nin akut enfeksiyonunda mide mukozasındaki polimorf nükleer hücre süzülmesi tetiklenir. Eğer enfeksiyon etkili bir şekilde temizlenmezse mukozaya mononükleer hücreler yerleşmeye başlar. Bu da proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesinin ardından uzak doku ve organlarda çeşitli komplikasyonlara yol açar (Tokudome ve diğ., 2006). Bunun yanında *H. pylori* enfeksiyonu taşıyan insanların yalnızca %0.4'ü mide kanseri geliştirmektedir (Watson ve diğ., 2006).

H. pylori enfeksiyonu birçok farklı hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Şeker hastalığı (diyabet), kemik erimesi (osteoporoz), hiperparatiroid ve obezite bunlardan bazılarıdır (Papamichael ve diğ., 2009).



Şekil 1.2. *Helicobacter pylori* (www.bu.edu)

1.3.1. Vakuolleyici sitotoksin A (VacA)

Uzun yıllar boyunca insan midesinin bakteri üreyemeyecek kadar sert asidik koşullara sahip olduğu düşünülmüştür. Fakat bu görüş gram-negatif bir bakteri olan *H. pylori*'nin 1980'ler ve sonrasında mideden izole edilmesiyle değişmiştir (Marshall ve Warren, 1984). Bu bakteri eğer herhangi bir antimikrobiyal tedavi uygulanmazsa yıllarca, hatta insanın tüm hayatı boyunca midede yaşamaya devam edebilir (Suerbaum ve Michetti, 2002).

H. pylori'nin keşfinden kısa süre sonra, *H. pylori* kültür filtratındaki bir proteinin, büyük hücre içi vakuoller oluşturmaya neden olabileceği bildirilmiştir. Bu etkiden sorumlu proteinin VacA olarak bilinen bir kromozomal gen tarafından kodlandığı tespit edilmiştir (Cover ve Blaser., 1992).

H. pylori VacA adını, enfekte olan hücrelerde vakuolasyonu indüklemeye yeteneğinden almaktadır. Epitel hücrelerinde vakuol oluşumu indüklemesi VacA'nın ilk bildirilen etkisi olmuştur (Şekil 1.3) (Cover ve Blaser, 1992; Leunk ve diğ., 1988).

Bir toksin farklı hücrelerde farklı etkiler gösterebilmektedir. VacA ile ilgili yapılan çalışmalarda da VacA'nın farklı hücre tipleri üzerine farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Cover ve Blanke, 2005). Ayrıca VacA'nın vakuol oluşturmak dışında farklı etkiler gösterdiği de bulunmuştur. VacA'nın gösterdiği farklı etkiler arasında mitokondriden sitokrom c salınımının indüklenmesiyle apoptozun tetiklenmesi (Galmiche ve diğ., 2000), üre permeazı (Tombola ve diğ., 2001), T ve B lenfositlerinin aktivasyonunun baskılanması (Gebert ve diğ., 2003; Torres ve diğ., 2007), otofajinin

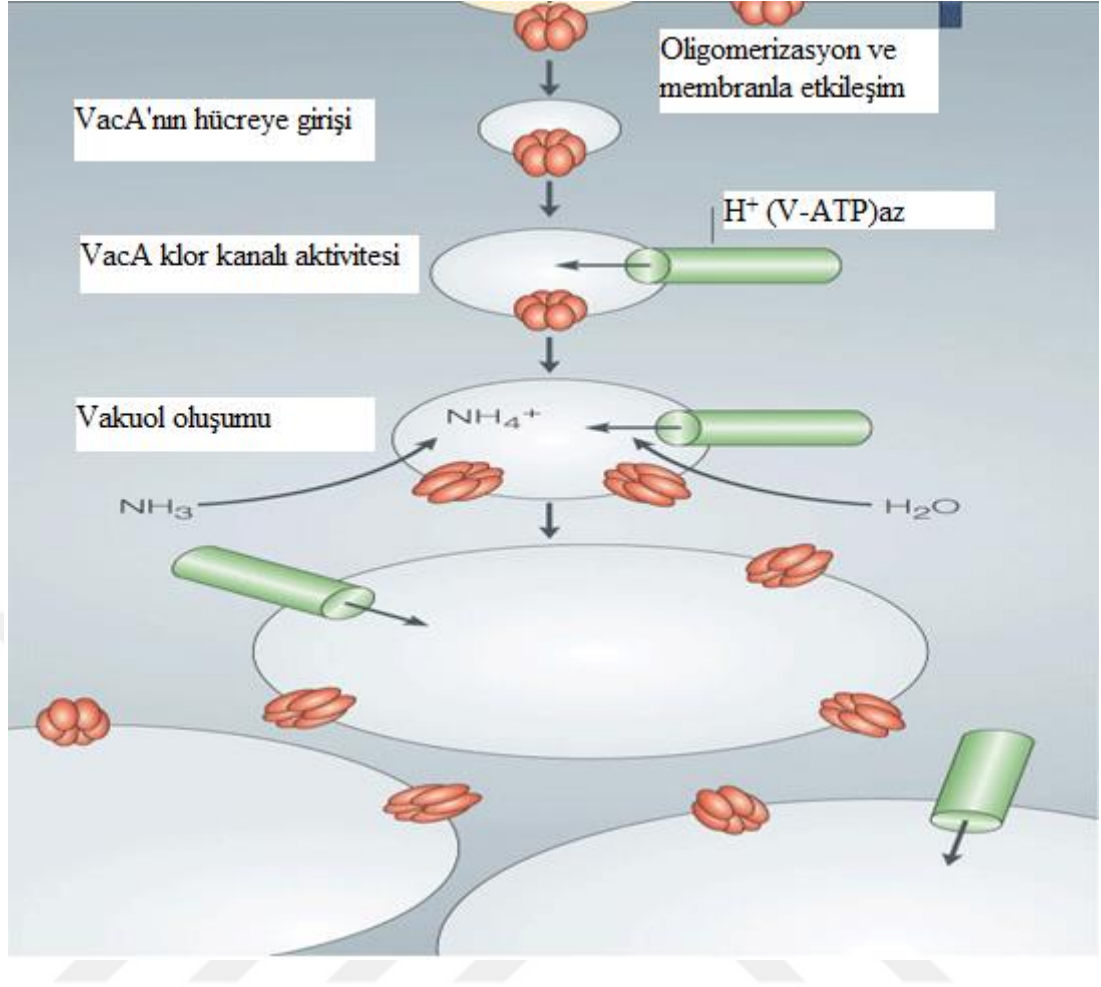
indüklenmesi (Terebiznik ve diğ., 2009) ve nekrozun tetiklenmesi sayılabilir (Radin ve diğ., 2011).

Normal insan mukozasından primer epitel hücrelerinde *H. pylori* sitotoksininin vakuolasyona neden olup olmadığı ile ilgili yapılan çalışmalarda primer insan mide epitel hücrelerinin *H. pylori* vakuolasyon sitotoksin aktivitesine karşı oldukça duyarlı olduğu gösterilmiştir. Birçok *H. pylori* suşu, çeşitli ökaryotik hücre tiplerinde sitoplazmik vakuolasyona neden olan bir sitotoksin üretmektedir (Smoot ve diğ., 1996).

Hücre yüzeyiyle etkileşimde olan pek çok liganda benzer olarak VacA'nın hücreye bağlanması MAPkinazlar (MAPK) gibi pek çok sinyal yolağını aktive etmektedir (Boquet ve Ricci, 2012). Son yapılan çalışmalar vakuolizasyon dışında VacA'nın iki karakteristik özelliğini daha ortaya koymuştur: İntrinsik hücre apoptozunun tetiklenmesi ve T lenfosit proliferasyonunun baskılanması. Şunu da belirtmek gerekir ki; vakuol oluşturma, apoptozun tetiklenmesi ve T lenfosit proliferasyonunun baskılanması VacA'nın gözenek oluşturma aktivitesine bağlıdır (Utsch ve Haas, 2016).

VacA'nın amino asit sırası ve yapısı, bilinen diğer bakteriyel toksinlerin dizilimleri veya yapılarıyla farklılık göstermektedir (Gonzalez-Rivera ve diğ., 2016). VacA toksini 140 kDa olarak üretilir ve proteolitik prosesler sonucu 88 kDa bir toksin oluşur (Chamber ve diğ., 2013).

VacA hücre yüzeyinde lipid sallarına bağlanır (Schraw ve diğ., 2002). Epitel hücrelerdeki reseptörleri, sfingomiyelin, reseptör benzeri protein tirozin fosfataz alfa (RPTP- α), reseptör benzeri protein tirozin fosfataz beta (RPTP- β), ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-bağlı protein-1 (low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1)); T lenfositleri üzerindeki reseptörü ise β 2 integrin (CD18)'dir (Patel ve diğ., 2002, Geisse ve diğ., 2004). Reseptöre bağlanıp membrandan içeriye alındıktan sonra sadece endosomal bölmeler ile ilişkili olmadığı, aynı zamanda mitokondri, golgi ve endoplazmik retikulum ile de ilişkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 1.3. VacA ile hücresel vakuolizasyonun indüklenmesi (Cover ve Blanke, 2005)

Pek çok bakteriyel toksinin, bakterinin konakçısında kolonize olmakta rol aldığı bilinmektedir. Şimdiye kadar izole edilen tüm *H. pylori* suşlarında VacA genine rastlandığı için, bu genin de bakterinin insan mide hücrelerinde kolonize olmak için bulunduğu düşünülmektedir (Schmitt ve Haas, 1994).

VacA'nın kolonizasyondaki rolü pek çok hayvan deneylerinde çalışılmıştır. Sıçan, çöl faresi ve gnobiyotik domuz yavrularında; VacA geni susturulmuş (VacA-null) *H. pylori* suşlarının koloni oluşturabildikleri bulunmuştur (Eaton ve diğ., 1997). Bu da VacA'nın bu canlılarda koloni oluşturmak için gerekli bir gen olmadığını göstermektedir. Fakat farelerde VacA genine sahip olan *H. pylori* suşlarının VacA-null suşlara kıyasla koloni oluşturmada daha avantajlı konuma geldikleri de ispatlanmıştır (Salama ve diğ., 2001). Bir çalışmada s1-i1 veya s1-i2 formu taşıyan VacA'nın s2-i2 taşıyanlara göre koloni oluşturmada daha başarısız oldukları gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2001). Bu çalışma da bize s2 allelinin koloni oluşturma ve vücutta kalıcılığında çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

VacA'nın hücrede koloni oluşumunun hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiği henüz aydınlatılamamıştır. Fakat bununla ilgili birkaç hipotez öne sürülmektedir. *H. pylori* yüzeyine bağlanmış VacA proteinleri gastrik hücrelere bakteriyel yapışmayı artırmak ve böylece koloni oluşumunu arttırmak için adezinler olarak görev yapabilir (Ilver ve diğ., 2004). VacA'nın neden olduğu mide epitel hücrelerinin değişimi, koloni oluşumu ve bakteriyel çoğalmayı desteklemek için mide ortamını potansiyel olarak değiştirebilir (Tan ve diğ., 2011). VacA ile indüklenen parietal hücre fonksiyonunun inhibisyonu midenin *H. pylori* koloni oluşumunu kolaylaştırabilir (Wang ve diğ., 2008). Son olarak, VacA birçok immün hücrelerin işlevlerini hafifletebilir, bu nedenle VacA'nın immüno-modüler etkileri koloni oluşturmayı kolaylaştırabilir (Utsch ve Haas, 2016; Torres ve diğ., 2007).

Uzun süreli ve kalıcı *H. pylori* enfeksiyonu insanlarda mide mukozasında iltihaplanmaya yol açar ve bu da lokal immün bir yanıt ortaya çıkarır. Buna rağmen *H. pylori* konakçı tarafından ortaya çıkarılan bu immün yanıtı direnç gösterir. VacA'nın bu direnç sistemindeki rolü henüz gösterilememiştir. Fakat yine de bazı çalışmalarda VacA'nın bazı immün yanıtları baskıladığı gösterilmiştir. Bu nedenle de, VacA'nın sadece kolonizasyonda rol alan bir gen olmayıp, aynı zamanda *H. pylori*'nin insan konakçlarına ısrarla yerleşmesini sağlamada bir rolü olabileceği akla yatkındır.

1.3.1.1. VacA'nın mide hastalıklarındaki rolü

S1 bölgesi taşıyan VacA genine sahip bakteri suşlarının S2 bölgesi taşıyan suşlarla karşılaştırılması sonucu; s1 suşu taşıyanların peptik ülser ve mide kanseri riskini arttırdığı bulunmuştur (Atherton ve diğ., 1995). Ayrıca m1 tip VacA taşıyan bakterilerin m2 taşıyanlara oranla mide epitel hasarı ve mide kanseri geliştirme riskinin de yine arttığı gösterilmiştir. Bunun yanında i1 de i2 taşıyan suşlara oranla daha fazla mide kanseri riskine yol açar (Figueiredo ve diğ., 2002).

1.3.1.2. VacA'nın epitelyal hücre fonksiyonları üzerine etkisi

VacA'nın ilk gösterilen etkisi vakuolizasyon olmuştur (Leunk ve diğ., 1988). Başta mide epitelyum hücresi olmak üzere, pek çok hücre tipi VacA ile enfekte edildiğinde vakuolizasyon göstermiştir (Pagliaccia ve diğ., 1998). VacA ile indüklenmiş vakuoller asidiktir ve bu vakuoller midenin asidik ortamında aktiflerdir (Cover ve diğ., 1991). Geç endositik kompartmanlarda bu vakuoller Rab7Ras-bağımlı

protein (Rab7), Lizozomal ilişkili membran proteini 1 (LAMP1) ve Lgp110 gibi markerlarla tespit edilebilirken, erken endositik kompartmanlarda bu vakuollerin markerları yoktur (Molinari ve diğ., 1997). Bu da vakuollerin geç endositik kompartmanlardan geliştiklerini göstermektedir.

Hücre içi vakuollerin şekilleri amonyum klorid gibi zayıf bazların eksikliğine bağlıdır (Li ve diğ. 2004). Bu zayıf bazların eksikliğinde VacA vakuolizasyona sebep olamaz ama yine de geç endositik kompartmanlarda tespit edilebilen değişiklikler meydana getirebilir. Bu değişiklikler epidermal büyüme faktörünün hücre içinde yıkılmasının baskılanması, prokatepsin D olgunlaşmasının baskılanması (Satin ve diğ., 1997), geç endositik kompartmanların kümelenmesi (Li ve diğ., 2004) ve antijen salınımının baskılanmasıdır (Molinari ve diğ., 1998).

Geç endositik kompartmanlara etkilerine ek olarak VacA'nın mitokondri üzerine de etkisi vardır. VacA mitokondride membran potansiyelini bozar ve sitokrom c salınımını tetikler. Mitokondrideki bu değişiklikler hücre içi ATP konsantrasyonunda azalmaya sebep olur ve bunun sonucu olarak da hücre döngüsü bozulma meydana gelir. (Willhite ve Blanke, 2004).

VacA ile transfekte edilmiş hücrelerde bu genin ekspresyonu PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) molekülünün kesilmesine yol açar ki bu da kaspaz-3'ün aktivasyonu anlamına gelmektedir (Galmiche ve diğ., 2000). Mitokondriyel apoptozu engelleyen (B-hücreli lenfoma 2) BcL-2 ve Vac-A birlikte transfekte hücrelerde ise VacA'nın PARP'ı kesmesinin baskılandığı gösterilmiştir (Galmiche ve diğ., 2000).

VacA'nın mitokondri üzerine etki edebilmesi için daha uzun bir süre ve daha yüksek konsantrasyon gerekmektedir (Willhite ve diğ., 2003). Bu durum VacA'nın mitokondri üzerine etkisinin dolaylı yoldan gerçekleştiğini düşündürse de, bazı çalışmalar VacA'nın mitokondri içinde lokalize olduğunu, dolayısıyla da VacA'nın mitokondriye direk etki ettiğini göstermektedir (Galmiche ve diğ., 2000). VacA'nın N-terminal ucunda bulunan bazı mutasyonlar VacA'nın membranda kanal oluşturamamasına sebep olmaktadır. Böylelikle sitokrom-c salınımı da gerçekleşemez. Bununla birlikte VacA membran kanallarının oluşumunu bloke eden bir ajan olan NPPB, VacA ile indüklenen sitokrom-c salınımı inhibe eder. Bu da VacA'nın

mitokondri üzerindeki etkisinin membrandaki kanallara bağlı olduğunu göstermektedir (Willhite ve Blanke, 2004).

1.3.1.3. VacA ve Mide Kanseri Mekanizmaları

Hangi spesifik VacA formunun mide kanserine yol açtığı konusunda birkaç mümkün mekanizma vardır. *H. pylori* hücreye in vivo bağlanınca yüksek olasılıkla bu hücreler yüksek konsantrasyonda VacA ile karşılaşmaktadırlar. s1-m1 alleline sahip VacA formları in vitro epitelyum hücre ölümüne neden olurken, toksin de aynı etkileri in vivo yapmaktadır. VacA'nın epitel hücre ölümüne neden olmasının sonucu olarak hücre proliferasyonu gerçekleşir ki bu da kanser riskini arttıran bir faktördür. VacA'nın hücre ölümüne neden olarak ya da hücre-hücre bağlantısına etki ederek, tek tabakalı epitel tabakayı bozduğu bildirilmiştir (Papini ve diğ., 1998). Sonuç olarak VacA karsinojenlerin mide mukozası içine girişini veya invazivliği ve malin hücrelerin yayılımını arttırabilir.

H. pylori gastrik bezlere de girebildiğinden, mide kök hücrelerine ve parietal hücrelere yakın bir yerde lokalize olur. VacA'nın bu hücreler üzerine toksik etkisi de kansere neden olabilir. In-vitro çalışmalar VacA'nın, parietal hücrelerin asit üretme kapasitesini azalttığını göstermiştir. Bu durum da midenin normal asidik ortamında yaşayamayan nitrat-üreten bakterilerin üremesine neden olabilir. Bu bakteriler mide kanseri riskini arttırmaktadırlar.

VacA in-vitro pek çok immün hücrenin aktivitesini inhibe eder. Örnek olarak T ve B hücreleri, eozinofiller, dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller gösterilebilir. Bunun dışında VacA'nın in-vivo ve pro-inflamatuar etkileri de tespit edilmiştir. İnflamasyon kanser oluşumunu engelleme konusunda önemli bir promotör olduğundan, VacA'nın pro-inflamatuar etkisi kanserin tetiklenmesine neden olabilir.

1.3.2. Sitotoksin İlişkili Gen A (CagA)

CagA *H. pylori* ile ilgili en iyi çalışılmış virulans faktördür. 1990 yılında Cover ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma CagA ve mide kanseri arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Cover, 1990). Bu araştırmanın yanı sıra Owen ve Krakowka da birbirlerinden bağımsız olarak *H. pylori*'nin sitotoksik etkisini ortaya koyan çalışmalar ortaya çıkarmışlardır (Owen, 1995; Krakowka ve diğ., 1998).

H. pylori fenotipik açıdan hemen hemen bütün suşlarda karakteristiğini koruyan bir özellik göstermektedir. Fakat yaklaşık %60 oranında CagA geni taşımaktadır (Tummuru ve diğ., 1993). CagA Cag patojenite adasında (CagPAI) kodlanır. *H. pylori* DNA'sına entegre 40 kilobazlık'lık bir DNA segmentidir ve konakçı hücreye enjekte edilebilen bilinen tek efektör proteindir (Censini ve diğ., 1996). CagA, Cag patojenite adasındaki son gendir ve yaklaşık 130 kDa CagA proteinini kodlar. Keşfedilmesinden bu yana peptik ülser ve mide kanseri gibi önemli mide hastalıklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur.

Pozitif CagA geni taşıyan *H. pylori* suşlarının enfeksiyonunun peptik ülser, atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve son olarak da mide kanseri riskini arttırdığı, CagA negatif suşlarla enfekte olan bireylerle karşılaştırıldığında yüksek çıktığı gösterilmiştir (Blaser ve diğ., 1995).

CagA geninin C-terminal uç bölgesinin ikinci tekrarı Doğu Asya ve Avrupa suşlarında farklılık göstermektedir. Doğu Asya suşlarında SHP2'ye (Src homology-2 domain-containing phosphatase 2) daha yüksek bağlanma gösterir. Ki bu da Batı suşlarıyla karşılaştırıldığında peptik ülser ve mide kanseri riskini oldukça yükselten bir durumdur (Higashi ve diğ., 2002).

CagA yaklaşık 30 genden meydana gelen Cag patojenite adasının içinde bulunmaktadır. CagPAI genlerinin Tip IV Sekresyon Aparatı'nı kodladığı düşünülmektedir (Covacci ve Rappuoli, 1998). Ayrıca bu sistemin, diğer bakteriyel patojenlerde olduğu gibi; protein efektör moleküllerin hedef konak hücrelere translokasyonunu düzenlediği düşünülmektedir.

H. pylori enfeksiyonunun ardından CagA pozitif suşlar, Cag proteinini konak doku hücrelerine Tip IV sekresyon aparatı vasıtasıyla enjekte eder. Bu protein plazma membranının iç yüzeyine lokalize olduktan hemen sonra burada Abl kinaz ve Src kinaz ailesi tarafından fosforile edilebilir. Bu kinazlar CagA'nın karboksi-terminal ucu içinde beş aminoasitlik bir tekrar, Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) bulunan tirozin artıklarını fosforile eder.

Bu tekrarlar, EPIYA dizisinin yanındaki bölgelerde bulunan aminoasit sekanslarına dayanarak dört farklı EPIYA motifi üretmek üzere kategorize edilebilir, EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C ve EPIYA-D. Bu motifler bölgeden bölgeye farklı

Bir kere konakçı hücrelere enjekte edildiğinde, CagA, hücresel tight-junction'ı hücre polariteyi, hücre çoğalması ve farklılaşmasını, hücre yayılımını, inflamatuvar cevabın indüklenmesini ve belki de hücre elongasyonunu etkilemek için direkt olarak fosforile edilmemiş bir hale gelebilir.

Kronik mukozalinflamasyonun ve *H. pylori* virulans faktörlerinin direk etkisinin hastalığın ciddiyetini ve uzun dönem hasta sonuçlarını belirlediğine inanılmaktadır (Correa ve diğ., 1992).

Bir *H. pylori* suşunda CagA geni bulunması, CagA negatif suşlarla enfekte bireylerle karşılaştırıldığında mide kanseri açısından daha riskli konumdadır (Şekil 1.4) (Tsugawa ve diğ., 2012). CagA pozitif suşlarda hidrojen peroksit seviyesinde yükselme ve oksidatif DNA hasarı görülmektedir (Handa ve diğ., 2007). Ek olarak ayrıca inflamatuvar ve oksidatif stres belirteçlerinden tümör-nekroz faktörü- α ve interleukin-8 (IL8) seviyelerinde de artış olur (O'Hara ve diğ., 2009). CagA bunun yanında mide kanseri belirteci olarak da kullanılır (Amieva ve diğ., 2016).

CagA, Cag patojenite adasının (CagPAI) ucuna lokalize olmuştur. Yaklaşık 39 kb'lık bir bölgedir (Yamaoka ve diğ., 2010).

1.3.2.1. Tip IV Sekresyon Sistemi ve CagA

CagA proteini kodlayan CagA geninin bulunup bulunmamasına bağlı olarak *H. pylori*, CagA pozitif ve CagA negatif suşlar olarak ikiye ayrılabilir. Karboksi-terminal (C-terminal) uçta bulunan yapısal polimorfizme bağlı olarak CagA tarafından kodlanan CagA proteini 130 ila 145kDa uzunlukta olabilir (Covacci ve diğ., 1993). CagA bakteriyel bir sitotoksin olarak düşünülse de, sitotoksik etkiye neden olan etkenlerden biri de VacA'dır (vacuolating toxin A) (Tummuru ve diğ., 1994).

Batı ülkelerinde izole edilen suşlardan yaklaşık %30-40'ı CagA patojenite adası taşımamaktadır (CagA-negatif). Fakat Doğu Asya suşlarının hemen hemen tamamında Cag patojenite adası bulunmaktadır (CagA-pozitif) (Ito ve diğ., 1997).

Suşlara bağlı olarak Cag patojenite adası 27-31 gen taşımaktadır. Bu genlerden en az 18'i Tip IV sekresyon sistemini oluşturmaktadır (TFSS) (Backert ve diğ., 2015).

H. pylori CagA geninin mide kanseriyle ilişkisi ilk olarak 1995'te gösterilmiştir (Blaser ve diğ., 1995).

1.4. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar küçük, kodlamayan RNA molekülleridir. Yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğundaki bu moleküller, post-transkripsiyonel evrede gen ekspresyonunu negatif yönde düzenler. miRNA'lar spesifik genler tarafından kodlanırlar. Görevleri mesajcı RNA'ları (mRNA) translasyonunu baskılamak ya da mRNA'ların parçalanmasını sağlamaktır. miRNA'lar; inflamasyon, hücre büyümesi, apoptoz, gelişim, farklılaşma, endokrin homeostazisi ve hatta kanser gibi pek çok biyolojik proseste rol oynarlar (Johnson ve diğ., 2007).

miRNA'lar, RNA-indüklenmiş susturma kompleksine (RNA-induced silencing complex (RISC)) rehberlik eder ve bu kompleksin hedef transkriptlere yönlenmesini sağlar. Ardından da bu hedeflerin katlanmasını indükler veya translasyonel baskılamaya neden olurlar (Achkar ve diğ 2016). miRNA'lar pek çok ökaryotik canlıda bulunurlar fakat biyogenezleri ve sinyal yolları hayvanlar ve bitkiler arasında farklılık göstermektedir (Kamthan ve diğ., 2015).

miRNA'lar farklı genomik bölgelerde bulunan kendi genleri tarafından kodlanırlar. Öncelikle microRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından, birincil-miRNA (primary-miRNA (pri-miRNA)) olarak sentezlenirler. 5' cap ve poli-A kuyrukları vardır. Bu aşamada birkaç yüz nükleotid ile birkaç kilobaz uzunluktadırlar. Ardından çift aşamalı bir proses sonucu olgun miRNA'lara (precurcor miRNA (pre-miRNA)) dönüşürler. Bu işlem hayvan hücrelerinde mikroşlemci kompleks (microprocessor complex) adı verilen bir protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. İlk kesim bu komplekste yer alan Drosha ve Pasha tarafından katalizlenir (Lee ve diğ., 2003). Drosha enzimi RNaz III ailesinden bir nükleazdır ve nükleusta primer RNA transkriptleri üzerine etki gösterir. Pasha ise çift iplikli RNA bağlayıcı proteindir. Kesimin ardından pre-miRNA molekülü yaklaşık 70 nükleotit uzunluğundadır (Yi ve diğ., 2003; Bohnsack ve diğ., 2004). Pre-miRNAlar, RanGTP/exportin 5-bağımlı mekanizma ile sitoplazmaya taşınırlar (Lund ve diğ., 2004). Sitoplazmaya taşındıktan sonra miRNA'lar tanınırlar ve Dicer enzimi ile ikinci bir kesim gerçekleşir (Hutvagner ve diğ., 2001). Bu kesim sonucu yaklaşık 22 nükleotitlik pre-miRNA molekülü meydana gelir (Ketting ve diğ., 2001).

1.4.1. miRNA'ların Mide Kanseri Gelişimine Etkisi

Hem onko-miRNA'lar hem de tümör süpresör miRNA'lar kanser gelişimi üzerine önemli roller üstlenirler. Yapılan çalışmalarda onco-miRNA miR-130'un mide kanserine over eksprese olduğu gösterilmiştir (Duan ve diğ., 2016). Yine başka bir çalışmada miR-24'ün BCL2L11 ekspresyonunu baskılayarak apoptozu engellediğini ortaya koymuştur. miR-15, miR-16, miR-34 ve miR-181b gibi mikroRNA'lar ise BCL2'yi tetikleyerek apoptozu tetikleyen süpresör miRNA'lardır. Bu miRNA'lar beklendiği gibi mide kanserinde düşük ekspresyon gösterirler (Nishizawa ve Suzuki, 2013).

1.4.2. miRNA'ların Kanser Tanısında Kullanılması

Kanser tanısı, hastalığın ilerlemesi, yinelenmesi ve tedavisinde çok önemlidir. Mide kanseri için de çeşitli tanı yöntemleri geliştirmiştir. Bunlardan biri miRNA'ların kan serumundan tespitidir. miR-223, miR-233, miR-21 ve miR-218 gibi mikroRNA'ların mide kanseri hastalarında kan serumlarında önemli değişiklikler gösterdikleri anlaşılmıştır (Wang ve diğ., 2014). Örneğin Li ve ark. 60 hasta ve 60 kontrolle yaptıkları çalışmada miR-223 ve miR-21 seviyelerinin mide kanseri hastalarının plazmalarında, sağlıklı bireylerden fazla olduğunu bulmuşlardır. Buna rağmen, miR-218 seviyeleri ise daha düşük olarak bulunmuştur. Bunun dışında yine aynı çalışmada, *H. pylori* ile enfekte olduğu bilinen hastaların serum miR-223 seviyeleri, bakteri ile enfekte olmayan fakat mide kanseri hastalığı taşıyan bireylerin serum miR-223 seviyelerinden oldukça fazla çıkmıştır (Li ve diğ., 2012). Bu mikroRNA'lar dışında pek çok mikroRNA daha serum düzeylerine bakılarak mide kanseri tanısında biyomarker olarak kullanılmaktadır ve bu markerların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

1.4.3. miRNA'ların Mide Kanseri Tedavisinde Kullanılması

Son yıllarda yapılan çalışmalar miRNA'ların mide kanseri tedavisinde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. miRNA'ları hedef alacak olan ilaçlar tümör süpresör miRNA'ların overeksprese olmasını, onco-miRNA'ların ise inhibe edilmesini sağlayabilir (Riquelme ve diğ., 2016).

Diğer yandan ilaç direnci açısından da miRNA'ların rolü büyüktür. Pek çok çalışmada miRNA'ların ilaç taşıyıcıları, ilaç metabolizması enzimleri, transkripsiyon

faktörleri ve reseptörleri üzerine etkisi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu miRNA'lar kullanılarak mide kanser hücrelerinin ilaç dirençlerinin azaltılabileceği düşünülmektedir (Hao ve diğ., 2017). Fakat bir miRNA birden fazla hedef geni etkilediğinden üzerinde çalışılması gereken bir konudur.

1.5. Mide Kanserinde *H. pylori* ve mikroRNA ilişkisi

H. pylori enfeksiyonu, miRNA ekspresyonu mekanizmasını bozarak miRNA aktivitesini etkilemektedir. Bu da *H. pylori*'nin konak hücre savunmasından kaçınmasını sağlamaktadır.

miR-146a ve miR-155, özellikle *H. pylori* kaynaklı proinflamatuvar bağışıklık yanıtın negatif düzenlenmesinde rol oynar. miR146a mide kanserine duyarlılığı arttıran bir miRNA'dır (Okubo ve diğ., 2010) ve invitro ve in vivo çalışmalar; *H. pylori*'nin miR-146a'yı yukarı regüle ettiğini göstermiştir (Liu et al., 2010). *H. pylori* enfeksiyonu sonucu gelişen mide kanserinde, tümör süpresör miRNA'ların baskılandığı, tümörjenik miRNA'ların ise tetiklendiği görülmüştür. Örneğin mide kanserinde *H. pylori* enfeksiyonu sonucu miR-31, miR-101, miR-141, miR-203, miR-210, miR-218, miR-375, miR-449 aşağı-regüle olurken miR-17, miR-20a, miR-21, miR-146a, miR-155 and miR-223 yukarı-regüle olmuştur (Noto ve Peek, 2011).

1.6. miR-98 ve Kanser

miRNA'lar hücrelerde pek çok rol üstlenirler. Tümör oluşumu bunlardan en önemlisidir. Fakat kanser anjiyogenezinde, invazyonda ve tümör gelişiminde rol alan diğer yolaklardaki rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Siragam ve diğ., 2012).

miR-98 tümör baskılayıcı bir miRNA'dır (Ting ve diğ., 2012). Meme kanseri (Siragam ve diğ., 2012), prostat kanseri (Ting ve diğ., 2012), Hipertrofik skar (HS) (Bi ve diğ., 2017), Kriptosporidyum parvum enfeksiyonu (Hu ve diğ., 2011), şizofreni (Rizos ve diğ., 2016), kronik hipertansiyon (Vashukova ve diğ., 2016) gibi pek çok hastalıkla ilgili çalışılmıştır.

Prostat kanseri ve meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda, miR-98'in tümör baskılayıcı özelliği gösterilmiştir. Ayrıca vitamin D'nin miR-98 üzerine

indükleyivi bir özellik gösterdiği de bulunmuştur (Ting ve diğ., 2012). Bunun yanında meme kanserinin metastazında önemli bir rolü olan kemokin (C-C motif) ligand 18 (CCL18)'in miR-98'i baskıladığı; bu sayede de metastazı gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Let-7/miR-98 ailesinin Ras onkogenini hedef alarak tümör baskılanmasında önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir (Johnson ve diğ., 2005). Bu yüzden de miR-98 baskılanması tümör oluşumunda önemli bir etkidir. Siragam ve ark ise yine meme kanserinde miR-98'in activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11'i hedef alarak tümör anjiyogenezini ve invazyonu baskıladığını ortaya koymuşlardır (Siragam ve diğ., 2012).

miR-98'in şizofreni üzerine etkisine baktığımızda, yapılan bir çalışmada kanserli ve şizofreni hastası bir grup ile yalnızca şizofreni hastalığı taşıyan başka bir grup karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada miR-98-5p'nin baskılanması ile birlikte beyinde tümör veya tümörle birlikte şizofreni görüldüğü sonucuna ulaşılmıştır. Fakat mir98'in yalnızca şizofreniye sebep olduğu görülmemiştir (Rizos ve diğ., 2016).

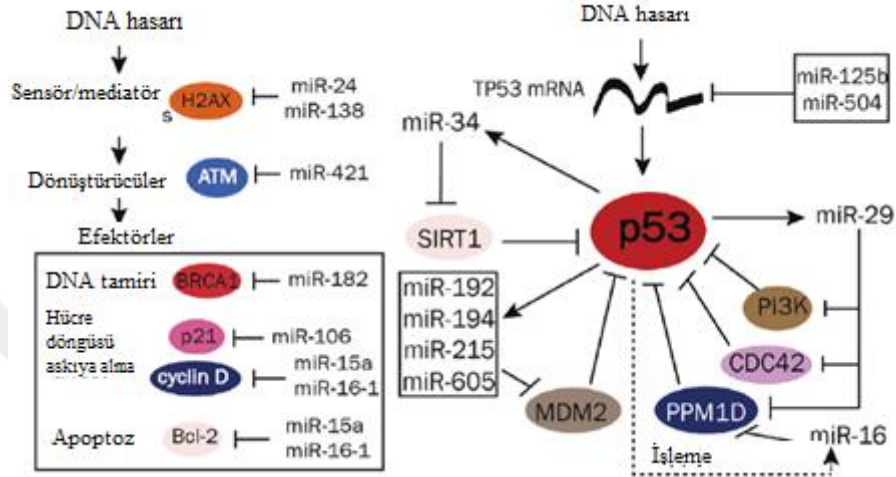
Guoku ve ark. miR-98'in proliferatif etkisi üzerine yoğunlaşmışlardır. Yaptıkları çalışmada insan HS fibroblast hücrelerini kullanmışlardır ve bu hücrelerde miR-98 mRNA seviyesinin kontrol grubuna oranla daha düşük çıktığı bulunmuştur. miR-98 seviyesi HS hücrelerinde baskılanarak downregüle olmuştur (Bi ve diğ., 2017). Bu da miR-98'in antiproliferatif etkisini ortaya koymaktadır.

1.7. miR-16 ve Kanser

miR-16, miR-15 ailesine ait miRNA'lardan biridir. miR-15a/16-1 ve miR-15b/16-2 dizilerinden olgunlaşır. miR-15a/16-1 insanlarda 13. kromozomda lokalize olmuştur (Gu ve diğ., 2017). Ökaryotik hücrelerde sayısız biyolojik proseste rol alan önemli miRNA'lardan biridir. Fakat buna rağmen, miR-16'nın fizyolojik fonksiyonlarını nasıl gerçekleştirdiği hala tam olarak anlaşılamamıştır (Yan ve diğ. 2013).

miR-16 insanlarda tümörlerle ilişkilendirilen ilk miRNA'lardan biridir (Calin ve diğ., 2002). Kanıtlar göstermektedir ki; miR-16 hücre döngüsünü düzenleme, proliferasyonu baskılama, apoptozu teşvik etme ve tümörijeniteyi baskılama gibi pek çok önemli rol üstlenmektedir (Aqeilan ve diğ., 2009). miR-16 anti apoptotik bir gen olan Bcl-2 (Cimmino ve diğ., 2005), G1-2 transisyonunda rol alan genlerden siklin

D1, siklin D3, siklin E1 ve siklin-bağımlı kinaz 6 (cyclin-dependent kinase 6(CDK6)) (Linsley ve diğ., 2007) ve Wnt sinyal yolağında rol alan WNT3A Bonci ve diğ., 2008) gibi genleri hedef alır. Ayrıca kronik lenfositik lösemi (Calin ve diğ., 2002), prostat kanseri (Bonci ve diğ., 2008) ve akciğer kanseri (Bandi ve diğ., 2009) gibi birçok kanserde de miR16'nın ya kısmen delesyona uğradığı ya da baskılandığı görülmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. DNA hasarı cavabında miRNA'ların rolü (Liu ve Lu, 2012)

Aqeilan ve ark. kronik lenfositik lenfomaya 13q14.3 gen bölgesindeki bir delesyonun neden olduğunu ve bu bölgenin de miR-15a/miR-16-1 hedef bölgesi olduğunu saptamışlardır. Bu bölgede meydana gelen delesyon sonucu, miR15a/miR16-1 bağlanamamakta ve sonuç olarak kanser meydana gelmektedir (Aqeilan ve diğ. 2009). Yine aynı gen bölgesindeki delesyonların multipl miyelom, mantle hücreli lenfoma ve prostat kanserinde de görüldüğü rapor edilmiştir (Dong ve diğ. 2001).

Son yapılan çalışmalarda miR-16'nın tropik hastalıklardan olan malaryada da downregüle olduğu gösterilmiştir. Plazma miR-16 seviyesinin, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli düzeyde düştüğü gösterilmiştir (Chamnanchanunt ve diğ. 2015).

2. AMAÇ

H. pylori 1982 yılındaki keşfinin ardından, özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık rastlanılan kronik bakteri enfeksiyonudur (Ou ve diğ., 2013). Birçok mide hastalığıyla ilişkilendirilen, dünya çapında bir sağlık problemidir. Dünya nüfusunun yarısından fazlasının *H. pylori* ile enfekte olduğu bilinmektedir (Garza-González ve diğ., 2014).

H. pylori tarafından üretilen iki adet ana virulan faktör vardır: VacA ve CagA. CagA proteini, *H. pylori* enfeksiyonuna tepki olarak sinyal iletiminde yer alan hücre içi boşluğa salınır, buna karşılık VacA *H. pylori*'ye konak hücrelerini istila ederek konakçı hücrelerde vakuolizasyona ve sonuçta hücre hasarına yardımcı olabilir (Yamaoka ve diğ., 2010).

miRNA'ların %50'sinden fazlasının tümörle ilişkili bölgenin yakınlarında yerleşim göstermesi, miRNA'ların tümörle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. post-transkripsiyonel aşamada mRNA'ların aktivitesini değiştirerek; proliferasyon, apoptoz, metastaz ve ilaç direnci gibi pek çok mekanizmada rol oynayan miRNA'lar, mide kanseriyle ilişkili pek çok biyolojik süreçte de değişikliklere sebep olur (Calin ve Croce, 2007). Çalışmada ele alınan miR98a ve mşR-16-5p'nin proapoptotik miRNA'lar olduğu ve kanserle ilişkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

H. pylori enfeksiyonu, CagA ve VacA genleri sayesinde kanser karşıtı miRNA'ların baskılanmasına neden olurken, kanserle ilişkili pek çok miRNA'nın da ekspresyon seviyesinin artmasını sağlar. Bu sayede miRNA'lar aracılığıyla kanser mekanizmasının düzenlenmesini bozarak, kansere sebep olur.

Türk popülasyonunda önemli oranda (~%90) *H. pylori* enfeksiyonu görülmesine karşın, bu enfeksiyonun miRNA ifadesi üzerine etkisi araştırılmamıştır. Bunun yanında polimorfik CagA ve VacA'nın miR-98a ve miR-16-5p ifadesi üzerine etkisi de daha önce çalışılmamıştır.

Bu çalışmada *H. pylori* ile enfekte ve mide kanseri taşıyan doku örneklerinde polimorfik CagA ve VacA genlerinin polimorfik bölgeleri PZR ve agaroz jel yöntemiyle saptanmaya çalışılmıştır. VacA ve CagA virulans faktörlerinin pro-apoptotik miR-98 ve miR-16-5 miRNA'larına nasıl etki ettikleri ve bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler gerçek zamanlı PZR yöntemiyle incelenmiştir. Dokular arasında kıyaslama yapılarak hangi polimorfizmlerin bu miRNA'larda daha çok baskılamaya sebep olduğu gözlemlenmiştir.



3. GEREÇLER

3.1 Araştırmada Kullanılan Örnekler

Mide kanseri doku örnekleri T.C. 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 tumor dokusu örneği NPO HIPEC sorumluluğunda 2016-2017 yılları arasında T.C. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mide kanser teşhisi konup mide ameliyat geçiren hastalardan temin edilmiştir.

ATCC'den alınan AGS (İnsan Kafkasya gastrik adenokarsinoması) hücre hattı kontrol amaçlı kullanılmıştır.

3.2 Toplanan Dokuların Saklanması ve Kullanılan Solüsyonlar

RNA-Later Solüsyonu : Thermo Fisher Scientific
Absolut Etanol : Sigma-Aldrich

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve Polimeraz Enzimleri

10X (NH₄)₂SO₄'lü Taq Tampon dNTP (10 mM) : Thermo Fisher Scientific
25 mM MgCl₂ : Thermo Fisher Scientific
İleri primer : Sentromer
Geri primer : Sentromer
Taq DNA Polimeraz rekombinant (5U/μl) : Thermo Fisher Scientific

3.4 Primerler

PZR reaksiyonunda CagA ve VacA bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primerler çizelge 3.1. ve çizelge 3.2.'de, kantitatif PZR'de kullanılan primerler ise çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda CagA bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler

PRİMER	DİZİ (5'-3')	ÜRÜN BOYUTU
İleri Primer cag2 ^a -F	5' GGAACCCTAGTCGGTAATG 3'	cagA 3' değişken gölge (450-850bp) (Argent RH., et al., 2004, Rudi J., et al. 1998)
Geri Primer cag4 ^a -R	5' ATCTTTGAGCTTGTCTATCG 3'	
İleri Primer cagA28F	5' TTCTCAAAGGAGCAATTGGC 3'	P1, P2,P3 motifleri için
Geri Primer cagA-P1C	5' GTCCTGCTTTCTTTTATTAACCTTAGC 3'	P1 motifi (264-291bp) (Argent RH., et al., 2004)
Geri Primer cagA-P2TA	5' TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG3'	P2 motifi (309- 336bp) (Argent RH., et al., 2004)
Geri Primer cagA-P3E	5' ATCAATTGTAGCGTAAATGGG 3'	P3 motifi (468- 672bp) (Argent RH., et al., 2004)
CAG1-F	5' ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA 3'	cagA 3' tekrar dizileri (Tip A 642-651bp, Tip B ve D 756bp, Tip C 810-813bp) (YamaokaY.,et al., 1998)
CAG2-R	5' GTAATTGTCTAGTTTCGC 3'	

Çizelge 3.2. PZR reaksiyonunda VacA bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler

PRİMER	DİZİ (5'-3')	ÜRÜN BOYUTU
İleri Primer Va1F	5'ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	S1: 259 bp S2:286 bp
Geri Primer Va1R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
İleri Primer Va3F	5' GCTCAAAATGCGGTCATGG3'	M1:290 bp
Geri Primer Va3R	5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'	
İleri Primer Va4F	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3'	M2:352-400 bp
Geri Primer Va4R	5' CATAACTAGCGCCTTGCAC 3'	
İleri Primer VACF1-	5' GTTGGGATTGGGGGAATGCCG 3'	İ1:426
Geri Primer C1R	5' TTAATTTAACGCTGTTTGAAG 3'	
İleri Primer VACF1	5'GTTGGGATTGGGGGAATGCCG 3'	İ2:432
Geri Primer C2R	5'GATCAACGCTCTGATTTGA 3'	

Çizelge 3.3. qRT-PZR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler

PRİMER	DİZİ (5'-3')
miR-98a	5' UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU 3'
miR-16-5p	5'UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG 3'
RNU6-1	5' GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAACGAUACA- GAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCAAUU- CGUGAAGCGUCCAUAUUUU 3'

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi Tampon ve Kimyasalları

- Agaroz : Sigma-Aldrich
- 6X DNA jel yükleme boyası : Thermo-Fisher Scientific
- UltraPure™ Etidyum Bromid (10 mg/ml) : Thermo-Fisher Scientific
- GeneRuler™ 100 bp DNA ladder : Thermo-Fisher Scientific
- 1:1:4 DNA ladder: DNA yükleme boyası: distile su

5X TBE

- Tris-baz : Sigma-Aldrich
- EDTA : Sigma-Aldrich
- Borik Asit : Sigma-Aldrich

3.6. AGS Hücre Hattı için Besiyeri ve Dondurma Medyumu Hazırlama

AGS Besiyeri

- DMEM/F12 : Thermo-Fisher Scientific
- FBS : Thermo-Fisher Scientific
- Penisilin Streptomisin : Thermo-Fisher Scientific

AGS Dondurma Medyumları

- DMEM/F12 : Thermo-Fisher Scientific
- FBS : Thermo-Fisher Scientific

- DMSO : Thermo-Fisher Scientific

Hücrelerin kaldırılması için Kullanılan Kimyasallar

- Tripsin : Thermo-Fisher Scientific
- PBS : Thermo-Fisher Scientific

3.7. qRT-PZR Reaksiyon Bileşenleri

- SensiFast SYBR® Non-Rox Mix : Bioline
- MystiCq MicroRNA qPCR Assay Primer : Sigma-Aldrich
- MystiCq Universal PCR Primer : Sigma-Aldrich
- cDNA

3.8. Poli(A) Kuyruk Ekleme Reaksiyonu Bileşenleri

- Poly(A) Tailing Buffer : Thermo-Fisher Scientific
- Poly(A) Polimeraz : Thermo-Fisher Scientific
- MystiCq MicroRNA cDNA Reaction Mix : Thermo-Fisher Scientific
- Ready Script Reverse Transcriptase : Thermo-Fisher Scientific

3.9. DNA büyüklük markörleri

New England BioLabs 2-log 100 kbçDNA markörü: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmanlar içeren DNA markörü (New England Biolabs).

3.10. Diğer Kimyasallar

2-merkaptoetanol : Merck

HBSS (Hank'sBalanced Salt Solution) : Gibco

Çamaşır Suyu

3.11. Kitler

PureLink™ Genomic DNA Mini Kit : Invitrogen

(Katalog numarası: K182001)

NucleoSpin® RNA

: Machery-Nagel

(Katalog numarası: 740955.250)

MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix : Sigma-Aldrich

(Katalog numarası: MIRRT)

Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/ μ L) : Thermo-Fisher

(Katalog numarası: 10342-053)

SensiFAST SYBR[®] No-ROX Kit : Bioline

(Katalog numarası: BIO-98005)

MystiCqmicroRNA SYBR Green qPCR Ready Mix (2X) : Sigma

(Katalog numarası: MIRRM03)

3.12. Cihazlar ve Markaları

CİHAZ

MARKA

Mikropipet Seti : FinnpiPETTE™ F2 Thermo Scientific

Elektroforez Güç Kaynağı : EC250-90 Thermo Scientific

Mikrodalga Fırın : MD592 Arçelik

Elektroforez Tankı : Claver

-80 Buzdolabı : Haier-Biomedikal

Hassas Terazi : Precisa XB220A

Distile Su Cihazı : Smart 2 PureThermoScientific

Dik Tip Otoklav : BES

Mini Spin Plus : Eppendorf

Manyetik Karıştırıcı : MR3001 K Heidolph

Thermalcycler T100 PCR : BioRad

CFX Connect Real-Time System : BioRad

Minispın : Four E'S Scientific

MultiSkan GO μ Drop : Thermo Scientific

Homojenizatör : Retsch MM400

LaminarFlow : FasterSafeFast Classic

Dri-block : DB-2DTechné

Buz Cihazı : AF 80 Scotsman

Santrifüj Cihazı : Universal 320 R Hettich

Vorteks	: HeidolphReax top
Su Banyosu	: Memmert WNB 14
İnkübaktör	: Memmertİnco 2
Azot Tankı	: Thermo Scientific
pH Metre	: ISOLAB
Etüv	: FN 500 NÜVE
Jel görüntüleme cihazı	: GEN-BOX-imagERCfXER Biyotek
İnvert Mikroskop	: AXIOinvert Vert.A1Zeiss
Işık mikroskobu	: Olimpus CK40
Pipet Filler	: ThermoScientific
SafeVacVacuumAspirator	: SCIOLOGEX

3.13. Sarf Malzemeler

Filtreli uç (10µl, 120µl,200µl 1000µl)	: Isolab
Pipet ucu (10µl, 200µl, 1000µl)	: Isolab
Eppendorf (0.5ml, 1.5ml, 2.0ml)	: Axygen
PCR tüpü (0.2ml)	: Axygen
Cyro tüp (2ml)	: GreinerBio-one
Rack	: Isolab
Steril bistüri uç	: Broche
Platemax®UltraClearSealing Film	: Axygen
PCR®Microplate	: Axygen
Parafilm	: BEMIS
15ml, 25ml, 50ml falkon	: Isolab
250ml Erlen	: Isolab
Mezür 50ml, 500ml, 1000ml	: Isolab
Flask (25cm ² ,75cm ²) (Corning)	: Sigma
CorningDish (150cm ²)	: Sigma

Cam pastör pipet	: Marienfeld
Corning® Costar® Stripette® serolojik pipet (5ml-10ml-25ml-50ml)	: Sigma
Beher	: Isolab
Eldiven	: Beybi
Corning® 150mL VacuumFilter	: Sigma



4. YÖNTEM

4.1. Mide Kanser Dokularının Saklanması

T.C İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden (Samatya Hastanesi) kanserli ve normal mide dokusu örnekleri toplandı. Toplanan kanserli ve normal mide dokusu örneklerinden DNA izolasyonu için kullanılacaklar ~1,5 ml absolut etanol; RNA izolasyonu için kullanılacaklar ise ~1,5 ml RNAlater solüsyonu bulunan kriyotüplerde, içinde -196°C'de sıvı nitrojen bulunan tankta muhafaza edildi.

4.2. Mide Tümörlü Dokulardan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için PureLink Genomic DNA kitinden yararlanılmıştır. İzolasyon yapılırken kit protokolü uygulanmıştır.

4.3. PZR ile CagA ve VacA Gen Varyasyonlarının Belirlenmesi

PZR, istenilen gen bölgesinin laboratuvar ortamından çoğaltılması işlemidir. Bu bölgelerin çoğaltılabilmesi için, bölgeye spesifik, primer denilen sentetik oligonükleotid dizileri kullanılmaktadır. Bir PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için kalıp DNA, ileri ve geri primer, dört tip deoksिनükleotid trifosfat (dNTP) ve yüksek sıcaklıkta işlev gösterebilen polimeraz (Taq polimeraz) gerekmektedir.

PZR; denatürasyon, bağanma ve uzama aşamalarından oluşmaktadır. Her döngü sonucu oluşan DNA molekülleri, bir sonraki döngü için kalıp görevi gördüğünden, her döngü sonucu bir önceki döngünün iki katı kadar DNA meydana gelmektedir. Genellikle bir PZR işlemi 30 döngüden oluşmaktadır. Koşullar ve kullanılan kimyasallar değişiklik gösterebilir.

Bu çalışmada kullanılan reaksiyon bileşenleri ve koşullar Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. PZR Reaksiyon Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Stok Konsantrasyon	Çalışma Konsantrasyonu	Son Hacim
Tampon	10X	1X	2,5 µl
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
MgCl₂	25 mM	2,5 mM	2,5 µl
İleri primer	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
Geri primer	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
Taqpolimeraz	5 U/µl	1,25 U	0,25ul
DNA	100 – 400 ng/µl	-	1 ul (100-400ng/ul)
dH2O	-	-	17,25 µl
Toplam hacim	-	-	25ul

Çizelge 4.2. PZR Reaksiyon Koşulları

	Reaksiyon Koşulları	CagA 3' değişken bölge, EPIYA motifleri ve VacA polimorfik bölgeleri	Reaksiyon Koşulları	cagA 3' bölgedeki dizi tekrarlarına bağlı boyutları farklı ürünler
İlk	95°C	2dk	95°C	2dk
Denatürasyon	95°C	30sn (35 Döngü)	95°C	30sn(35 Döngü)
Bağlanma	55°C	30sn (35 Döngü)	52°C	30sn (35 Döngü)
Uzama	72°C	1dk (35 Döngü)	72°C	1dk (35 Döngü)
Son Uzama	72°C	5dk	72 °C	5dk

4.4 Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Agaroz jel elektroforez yöntemi DNA molekülünün uygun şekilde izole edildiğini ve çoğaltıldığını kontrol etmek için kullanılan bir yöntemdir. DNA'nın yüklü bir molekül olma esasına dayanır. DNA'nın istenilen şekilde ve uzunlukta izole edilip edilmediğini anlamak için farklı uzunlukta DNA bölgeleri içeren bir ladder jele yüklenir. Bu sayede ne kadar uzunlukta bir DNA molekülü elde edildiği kontrol edilebilir.

Çalışmada kullanılan agaroz jel konsantrasyonu ve hazırlanışı çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Agaroz Jel Hazırlanışı

5X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) pH 8,3			%2'lik Agaroz Jel	
Kimyasal	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Kimyasal	Kullanılan Miktar
Tris	890 mM	54 g	Agaroz	1 g
Borik Asit	890 mM	27,5 g	TBE	50 mL
EDTA	0,5 M	20 ml		
Distile su	-	1 L'ye tamamlanincaya kadar		

4.5. Dokudan Total mRNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için NucleoSpin RNA kiti kullanılmıştır. İzolasyon kit prosedürüne uygun olarak yapılmıştır.

Elde edilen RNA konsantrasyonları Çizelge 4.4.'teki gibidir:

Çizelge 4.4. İzole Edilen mRNA Konsantrasyonları

mRNA örneği	Konsantrasyon
AGS Hücre Hattı	650 ng/ul
T1 Doku Örneği	653,9 ng/ul
T2 Doku Örneği	97,54 ng/ul
T3 Doku Örneği	206,8 ng/ul
T4 Doku Örneği	111 ng/ul
T5 Doku Örneği	365 ng/ul
T6 Doku Örneği	532 ng/ul

4.6. cDNA Sentezi

MRNA moleküllerinden DNA elde etmek için cDNA sentezi gerçekleştirilmelidir. Bu sayede tek zincirli bir RNA molekülünden çift zincirli DNA molekülü meydana gelir. mRNA'dan DNA elde etmek, mRNA'yı daha sağlam bir molekül olan DNA sayesinde daha ayrıntılı incelemeye olanak sağlar. Ayrıca DNA klonlanabilen bir molekül olduğundan mRNA'yı cDNA'ya çevirmek onun klonlanmasını da sağlar. mRNA'lardan elde edilen cDNA konsantrasyonları çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Son cDNA konsantrasyonları 400 ng olacak şekilde mRNA kullanılmıştır.

Bu çalışmada MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix kullanılmıştır. İki aşamalı olarak gerçekleştirilen kit protokolü izlenmiştir. Kit reaktifleri çizelge 4.5. ve çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Elde Edilen cDNA Konsantrasyonları

cDNA örneği	Konsantrasyon
AGS Hücre Hattı	650 ng/ul
T1 Doku Örneği	653,9 ng/ul
T2 Doku Örneği	97,54 ng/ul
T3 Doku Örneği	206,8 ng/ul
T4 Doku Örneği	111 ng/ul
T5 Doku Örneği	365 ng/ul
T6 Doku Örneği	532 ng/ul

4.6.1. Poli (A) Kuyruk Ekleme Reaksiyonu

- 1.1. cDNA sentez bileşenleri (enzim hariç) çözündürüldü ve buza yerleştirildi.
- 1.2. Tüpler kısaca santrifüj edildi.
- 1.3. Aşağıdaki reaktifler buz üzerine yerleştirilip 0,2ml'lik PZR tüplerine dağıtıldı.

Çizelge 4.6. Poli (A) Kuyruk Ekleme Reaktifleri

Reaktif	Hacim
Poly (A) TailingBuffer (5x)	2ul
RNA upto 1ug	1-5ul (0,4ug-1ug)
Nuclease-free-water	1-6ul
Poly(A) Polymerase	1ul
Total Hacim	10ul

1.4. Tüpler hafifçe vortekslendikten sonra kısaca santrifüj edildi.

1.5. Tüpler 37°C’de 60sn, 70⁰C’de 5dk inkübe edildi.

1.6. Tüpler kısaca santrifüj edildikten sonra buza yerleştirildi.

4.6.2. First-strandcDNA Sentez Reaksiyonu

1.7. Aşağıdaki reaktifler poly (A) kuyruk ekleme reaksiyonuna eklendi.

Çizelge 4.7. First-strand cDNA Sentez Reaktifleri

Kimyasal	Stok Konsantrasyon	Çalışma Konsantrasyonu	Hacim
Poly(A) Kuyruk ekleme reaksiyon karışımı	-	-	10 µl
MystiCqmicroRNAcDNA ReactionMix	-	-	9ul
ReadyScript Reverse Transcriptase	-	-	1ul
Total Hacim			20ul

1.8. Tüpler hafifçe vortekslendikten sonra kısaca vortekslendi.

1.9. Tüpler 42⁰C ‘de 20dk, 85⁰C’de 5dk inkübe edildi.

4.7. SYBR Green qRT-PZR ile miRNA Ekspresyon Analizi

Polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinin floresan tekniklerle bir araya getirilmesi gerçek zamanlı veya kantitatif PZR tekniğinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu teknik nörobilim, gelişimsel biyoloji ve medikal tanıda sıklıkla kullanılmaktadır. İlk olarak Higuchi ve ark ortaya çıkardığı bu teknik kısa zamanda popülerleşerek sıklıkla kullanılan bir teknik haline gelmiştir (Higuchi ve ark, 1992).

Gerçek zamanlı PZR tekniği diğer kantitatif PZR tekniklerine göre daha sık tercih edilmektedir. Bunun sebebi de reaksiyon bittikten sonra farklı bir analiz yöntemine ihtiyaç duyulmamasıdır. Geleneksel PZR yönteminden farklı olarak, elde edilen DNA miktarı gerçek zamanlı olarak ölçülebilmektedir. Bu sayede ürün kaybı ve meydana gelebilecek kontaminasyonların önüne geçilmiş olur (Livak ve diğ., 1995).

Gerçek zamanlı PZR’de her döngü sonrası üretilen ampikon miktarı floresan boyama teknolojileriyle ölçülmektedir. Bunun için genellikle çift zincirli DNA’ya bağlanan SYBR Green boyalar kullanılır. Her döngü sonucu DNA’nın miktarı arttıkça SYBR Green’in yaptığı floresan ışımaya da artar (Nolan ve diğ., 2006).

Gerçek zamanlı PZR dört basamaktan oluşmaktadır: Doğrusal zemin fazı, erken üstel faz, doğrusal faz ve plato fazı. Doğrusal zemin fazı ilk 10-15 döngüyü kapsamakta ve floresan ışımaya bu basamakta arkaplanda kalmaktadır. Eşik değerine erken üstel faz basamağında ulaşılır. Eşik değerinin aşıldığı döngü ‘C_t’ olarak adlandırılır. Doğrusal faz, DNA’nın optimal koşullarda sayısal olarak ikiye katlandığı fazdır. Reaksiyon bileşenleri sınırlı sayıda olduğu için son fazda DNA miktarının artışı durur ve plato fazına girilir (Bustin, 2000)

Gerçek zamanlı PZR’de kesin ölçüm ve göreceli ölçüm olmak üzere iki şekilde ölçüm yapılabilir. Kesin ölçümde standart eğri oluşturmak için konsantrasyonubilen bir örnek kullanılır. Standart eğri C_t ile total RNA veya cDNA’nın başlangıç miktarları arasında ilişki kurulmasını sağlar. Böylelikle C_t değerine bakılarak miktarı bilinmeyen RNA veya cDNA’nın konsantrasyonu bulunabilir (Heid ve diğ., 1996).

Göreceli ölçümde ise hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler eksternal standart veya bir referans örnek baz alınarak ölçülür (Livak ve Schmittgen, 2001). Sonuçlar hedef/referans oranını verir. Çeşitli matematiksel yöntemlerle ve çıkan

sonuçlar bir housekeeping gene göre normalize edilmelidir. Bunun için de ilk olarak test ve referans örneklerin C_t değerleri ile housekeeping genin C_t değeri arasındaki fark bulunur. Bu değer ΔC_t 'yi verir. Ardından ise hedef ve referans örneklerin arasındaki C_t değeri farkı hesaplanır ($\Delta\Delta C_t$). Hedef genin ifadesindeki değişim $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüyle bulunur (Marino ve diğ., 2003).

Bu çalışmada, *H. pylori* enfekte mide kanser dokularında miR-98 ve miR-16-5p ekspresyon seviyelerinin *cagA* ve *VacA* varyasyonlarına bağlı değişip değişmediğini belirlemek üzere qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak *H. pylori* enfeksiyonu içermeyen AGS hücre hattı kullanılmıştır. Normalizasyon için ise RNU6-1 kullanılmıştır.

qRT-PCR reaksiyonu için SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit kullanıldı. Reaksiyonda kullanılacak primer dizileri Çizelge 2.8'de, reaktifler ve miktarları Çizelge 2.9'da ve reaksiyon koşulları Çizelge 2.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. qRT-PZR'de Kullanılan Bileşenler

Kullanılan Kimyasal	Hacim
2x SensiFAST SYBR® Non-ROX Mix	5 µl
MystiCq microRNA qPCR Assay Primer (10 µM)	0,4 µl
MystiCq Universal PCR Primer (10 µM)	0,4 µl
cDNA	1-2 µl (20ng)
Nuclease –free-water	2,2-3,2 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 4.9. qRT-PZR Reaksiyon Koşulları

Reaksiyon Koşulları	Süre
95 °C	2dk
95 °C	5sn
60 °C	30sn (40 Döngü)

4.8. Hücre Kültürü

T.C. Yeditepe Üniversitesi'nden dondurulmuş şekilde alınan AGS hücre hattı sıvı azot tankında taşınarak alındı. Ardından bu hücre hattı önceden 37 °C'de sabitlenmiş su banyosunda çözündürüldü. %10FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penicilin streptomycin içeren 5 ml DMEMF12 complete medium, 15ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Çözünen hücre hattı complete medium içeren falcona aktarıldı. Dondurma mediyumu'nu uzaklaştırmak için 5 dk. 1000 rcf'de +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 8 ml DMEMF12 complete mediyumu ile çözündürüldü. 75 cm² flaska (T75) 14 ml DMEMF12 eklendi. Çözürülen pelletten, flasklara 1:8 oranında ekim yapıldı. Ekilen hücre hattının pasajı aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

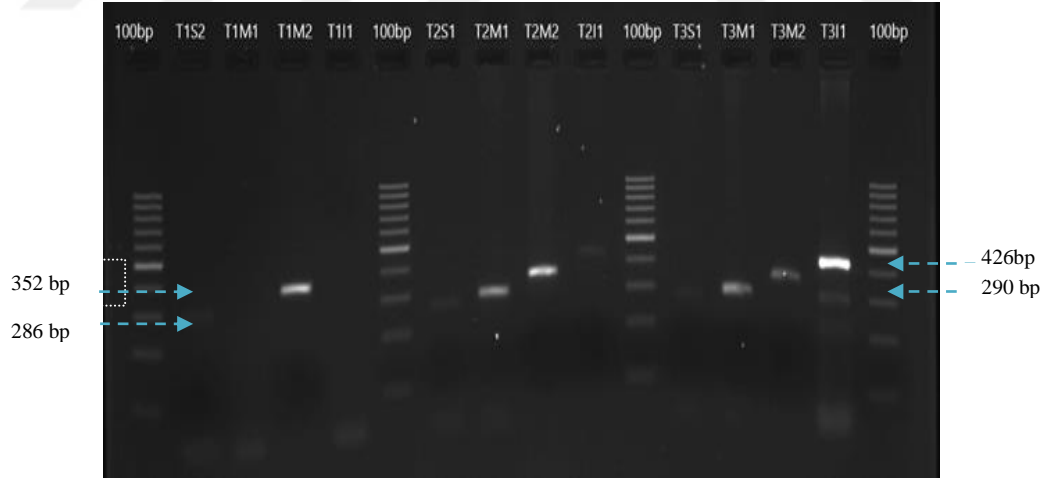
- Flasktan mediyum uzaklaştırıldı.
- ml PBS (Phosphate Buffered Saline) ile iki kez yıkama yapıldı.
- Hücreleri yüzeyden kaldırmak için 2 ml tripsin eklendi ve hücreler 5 dk. karbondioksitli inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.
- ml complete DMEM flaska eklenerek hücreler flasktan falkona aktarıldı.
- 300 g'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 8 ml DMEMF12 complete mediyumu ile çözündürüldü.
- 75 cm² flaska (T75) 14 ml DMEMF12 eklendi.
- Çözürülen pelletten, flasklara 1:8 ekim yapıldı.
- Her pasaj sonrası yaklaşık 5 milyon hücre 1ml dondurma mediyumu ile cyro tüp içinde donduruldu.
- Dondurma mediyumu: %50 DMEM-F12 , %40 FBS ve %10 DMSO ile hazırlandı.
- Hücre hattı RNA izolasyonu elde etmek için kullanıldı.

5. SONUÇ

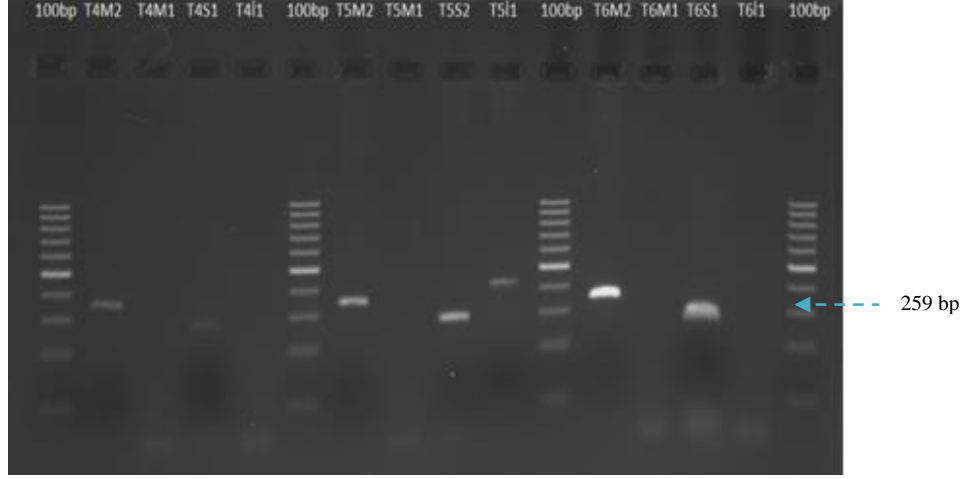
Agaroz jel elektroforeziyle yapılan inceleme sonucunda 6 dokuda da *H. pylori* enfeksiyonuna rastlandı. Elektroforez 100 V'ta 300 A'de 30 dk boyunca gerçekleştirilmiştir.

5.1. Agaroz Jel Elektroforeziyle VacA Polimorfik Bölgelerinin Saptanması

İncelemesi yapılan 6 dokuda da çeşitli polimorfik bölgelere rastlanmıştır. M1 bölgesi 290 bç, M2 bölgesi 352-400 bç arası, S1 bölgesi 259 bç, S2 bölgesi 286 bç ve i1 bölgesi 426 bç olarak jelde bant vermiştir. S1, M1, M2 ve i1 bölgeleri T2 ve T3 dokularında tespit edilmiştir. S2 ve M2 T1 ve T5 dokularında S1 ve M2 ise T4 ve T6 dokularında görülmüştür. Tüm dokulara ait VacA agaroz jel görüntüleri Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. T1, T2 ve T3 dokularında M, S ve i VacA polimorfik bölgelerinin agaroz jel görüntüsü

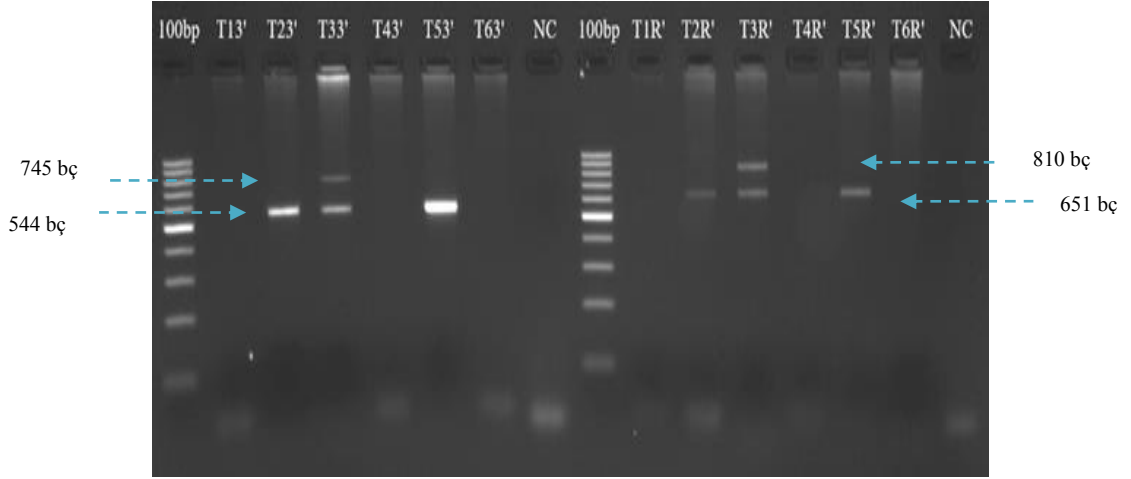


Şekil 5.2. T4, T5 ve T6 dokularında M, S ve i VacA polimorfik bölgelerinin agaroz jel görüntüsü

5.2. Agaroz Jel Elektroforeziyle CagA Polimorfik Bölgelerinin Saptanması

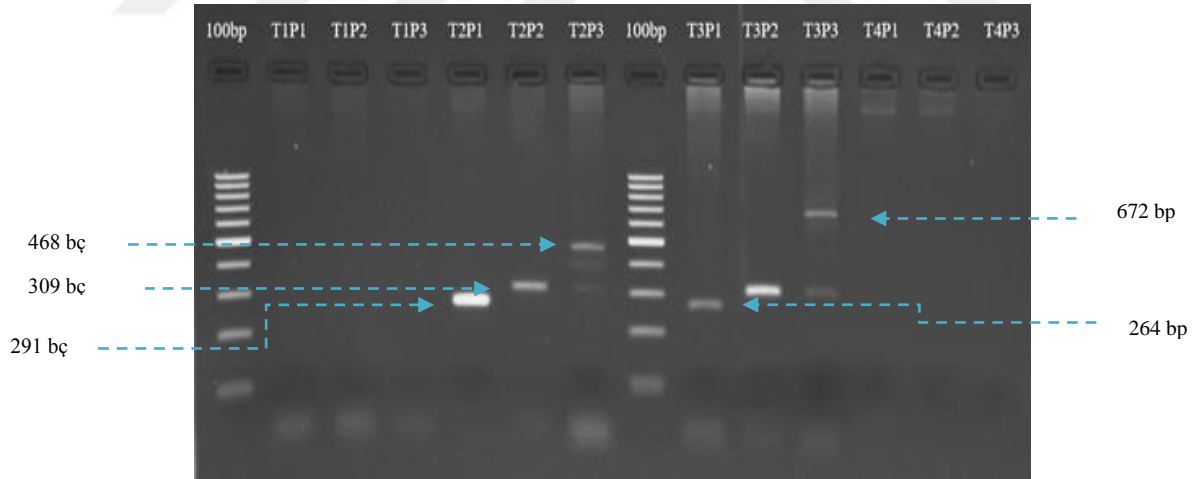
6 dokunu 3'ünde tüm CagA varyasyon bölgelerine rastlanmışken, diğer 3 dokuda polimorfik bölge gözlenememiştir. Yani 3 doku CagA pozitif, diğer 3 doku ise CagA negatif olarak belirlenmiştir. 3' bölgesi iki dokuda (T2 ve T5) sadece 544 bp'lik tek bant, bir dokuda (T3) ise hem 544 hem de 745 bp'lik iki bant vermiştir. Çift bant veren dokuda iki farklı suş olduğu düşünülmektedir. Ürün boyutu EPIYA deseninin tahmin edilmesine olanak sağlamaktadır. Buna göre 544 bp'lik bant veren dokularda ABC EPIYA deseni, 745'lik bp'lik bölgede bant veren dokuda ise ABCCC EPIYA desenini içerdiği düşünülmektedir.

Yine PZR ve agaroz jel elektroforezi sonucu T2, T3 ve T5 dokularında R1, R2 ve R3 bölgeleri tespit edilmiştir. 3' bölgede olduğu gibi R bölgesinde de T2 ve T5 dokuları 651 bp'lik bant verirken, T3 dokusu 651 ve 810 bp'lik bölgede bant vermiştir. Bu sonuçlara bakıldığında 651 bp bant veren T2 ve T5 A tipi, 651 ve 810 bp bant veren T5 dokusunun ise A ve C tipi iki çeşit suş içerdiği bulunmuştur. ² değişken bölge ve R' bölgesi agaroz jel sonuçları Şekil 5.3.'te verilmiştir.

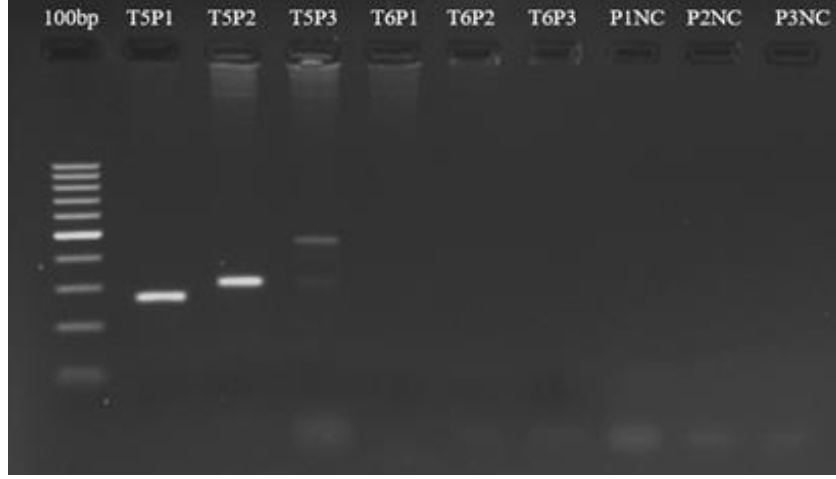


Şekil 5.3. Polimorfik CagA 3' ve R' bölgelerinin agaroz jel görüntüsü (NC: negatif kontrol)

EPIYA motiflerinin tespiti için yapılan PZR ve agaroz jel elektroforezi sonucu CagA P1, P2 ve P3 motifleri tespit edilmiştir. P1 motifi 264 ve 291 bç'lik bölgede T2, T3 ve T5 dokularında; P2 motifi 309 bç'lik bölgede T2, T3 ve T5 dokularında ve P3 bölgesi de 468 ve 672 bç'lik bölgede ve yine T2, T3 ve T5 dokularında tespit edilmiştir. P bölgelerinin agaroz jel görüntüsü sonuçları Şekil 5.4. ve Şekil 5.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.4. T1, T2, T3 ve T4 dokularında CagA polimorfik P bölgesinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.5. T5 ve T6 dokularında CagA polimorfik P bölgesinin agaroz jel görüntüsü (NC: negatif kontrol)

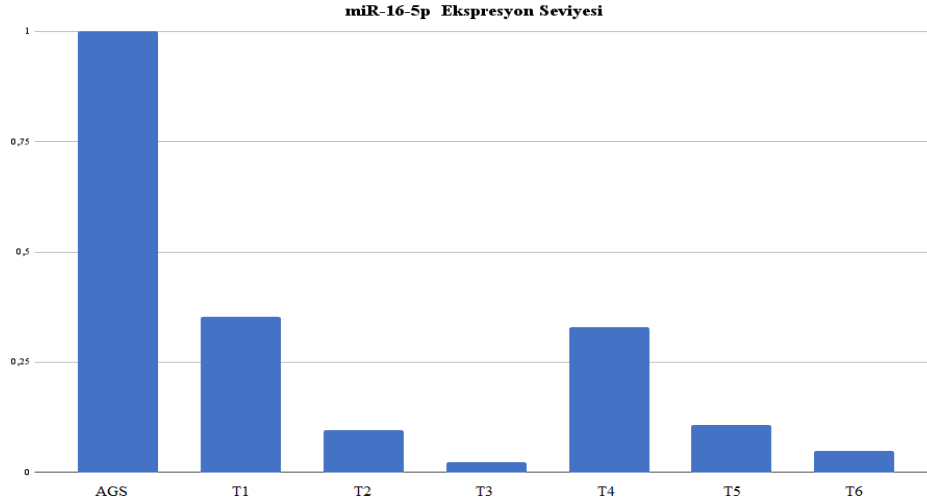
5.3. miR-16-5p'nin qRT-PZR ile Ekspresyon Analizi

Gerçek zamanlı kantitatif PZR metodu ve SYBR Green floresan boya kullanılarak miR-98a ve miR-16-5p miRNA'larının ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. AGS mide doku hattı kontrol olarak kullanılmıştır. Ekspresyon analizi sonuçları çizelge 5.1.'de ve çizelge 5.2'de gösterilmiştir. Ayrıca bu ekspresyon seviyeleri Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.'da da grafik olarak verilmiştir.

miR-16-5p'nin ekspresyon seviyelerine bakıldığında en çok baskılanmanın 0,022 kat ifade ile T3'te meydana geldiği görülmektedir. T3'ü sırasıyla T6, T2, T5, T4 ve T1 izlemektedir. T3, T2 ile birlikte VacA ve CagA açısından tüm polimorfizmleri taşımaktadır.

Çizelge 5.1. miR-16-5 Ekspresyon Analiz Değerleri

Doku Örnekleri	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Standart Hata
AGS	4,69	0,00	1	-4,89
T1	6,15	1,46	0,352	-6,25
T2	8,08	3,39	0,095	-8,08
T3	10,21	5,52	0,022	-10,18
T4	2,12	-2,57	0,329	-6,39
T5	7,89	3,20	0,108	-7,92
T6	9,61	4,92	0,048	-9,12



Şekil 5.6. miR-16-5p Ekspresyon Seviyesi

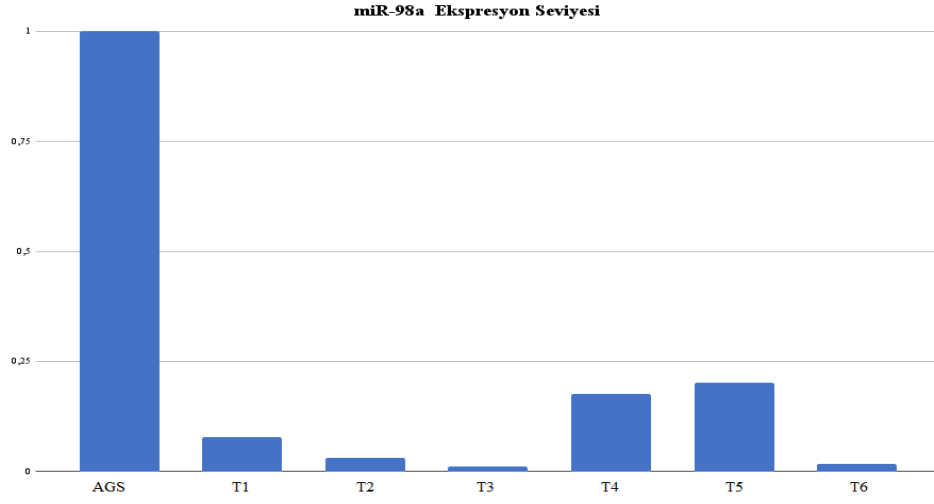
5.4.miR-98'in qRT-PZR ile Ekspresyon Analizi

Çizelge 5.3.'de ve çizelge 5.4.'te de görüldüğü üzere MiR-98'in *H. pylori* enfekte dokularda; AGS hücre hattı ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesi azalmaktadır. Baskılanma en çok 0,012 kat ifade ile T3 dokusunda görülmektedir. Bu dokuda aynı zamanda S1,M1;M2 ve i1 VacA polimorfik bölgeleri ve CagA P (P1,P2,P3), 3' ve R' bölgeleri bulunmaktadır.

T3'ün ardından en çok baskılanan miRNA doku T2'deki miRNA'dır. Bu dokuda da yine aynı şekilde CagA ve VacA'da incelenen tüm bölgelerde polimorfizm görülmektedir. Bu iki dokuyu sırasıyla T1, T4, T5 ve T6 izlemektedir. T1 VacA S2 ve M2 polimorfik bölgelerini taşıırken, CagA bölgesi görülmemektedir. T4'te sadece S1 ve M2; T6 ise sadece S1 ve M1 bölgelerinde bant vermektedir. T5 dokusunda VacA S2, M2, i1; CagA P (P1,P2,P3), 3' ve R' bölgelerinde bant vermektedir.

Çizelge 5.2.miR-98'in Ekspresyon Analiz Değerleri

Doku Örnekleri	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Standart Hata
AGS	4,69	0,00	1	-8,1
T1	11,75	3,74	0,077	-11,81
T2	13,06	5,05	0,031	-13,1
T3	14,51	6,50	0,012	-14,49
T4	10,57	2,56	0,177	-10,77
T5	10,37	2,36	0,201	-10,39
T6	8,39	0,38	0,017	-14,01



Şekil 5.7. miR-98a Ekspresyon Seviyesi

6. TARTIŞMA

H. pylori CagA ve VacA, kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiş virulans faktörlerdir. Birçok *H. pylori* suşu, çeşitli ökaryotik hücre tiplerinde sitoplazmik vakuolasyona neden olan bir sitotoksin üretmektedir (Smoot ve diğ. 1996). VacA'nın hücreye bağlanması MAPkinazlar (MAPK) gibi pek çok sinyal yolağını aktive etmektedir (Boquet ve Ricci, 2012). CagA ise Cag patojenite adasında kodlanan bir genidir ve proliferasyonun artması ve apoptozun baskılanması gibi çeşitli hücreyel değişikliklere neden olmaktadır (Censini ve diğ. 1996).

VacA, M-, S- ve i- olmak üzere üç farklı polimorfik bölge içermektedir. Bu bölgeler uzunluk farklılıklarına bağlı olarak M1, M2, S1, S2, i1 ve i2 olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda M1, S1 ve i1 allellerini içeren suşların M2, S2 ve i2 içeren suşlara kıyasla kanser gelişimi riskini arttırdığı gösterilmiştir. (Atherton ve diğ. 1995, Figueiredo ve diğ. 2002).

CagA ise 3' değişken bölgede Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala bazlarının farklı tip ve tekrar sayılarına rastlanmıştır. Bu bölge bazların adından yola çıkarak EPIYA motif olarak isimlendirilmiştir. EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C ve EPIYA-D olarak dört farklı forma sahip olan bu motifler bölgeden bölgeye de farklılık göstermektedir.

Bu çalışmada S- ve M- bölgeleri tüm dokularda bulunmuşken, bu dokulardan 5 tanesinde S1 diğ. dokuda ise S2 bölgesi bulunmuştur. S1 ve S2 allellerinin aynı dokuda bulunmaması beklenen bir durumdur (Paniagua ve diğ., 2009).

Aynı zamanda CagA pozitifliği tespit edilmiş üç mide kanserli dokudanikisinin, ABC EPIYA desenli A-tipi CagA'ya sahip tek tip suşu; birinin ise AB-ABC EPIYA desenli A ve C tipi CagA'lara sahip iki çeşit suşu içerdiği belirlendi.

6.1. miR-16-5p

Kanıtlar göstermektedir ki; miR-16 hücre döngüsünü düzenleme, proliferasyonu baskılama, apoptozu teşvik etme ve tümörijeniteyi baskılama gibi pek çok önemli rol üstlenmektedir (Aqeilan ve diğ. 2009). miR-16-5p'de *H. pylori*'nin

pozitif olduğu örneklerde AGS kontrol hücrelerine göre baskılanma gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre *H. pylori*'nin mir-16-5 üzerinde bir etkisi olduğu söylenebilir.

miR-16-5p'nin en çok T3 dokusunda baskılandığı görülmüştür. miR-16-5p pro-apoptotik bir miRNA'dır ve tüm VacA ve CagA polimorfizmlerini taşıyan bu dokuda baskılanması, polimorfik VacA ve CagA genlerinin apoptozu engelleyip, tümör oluşumuna neden olabileceğini düşündürmektedir.

T2 de aynı T3'te olduğu gibi polimorfik tüm bölgelere sahiptir. Fakat baskılanma T3'teki kadar olmamıştır. Bunun sebebinin miRNA'lar üzerindeki baskılanmanın CagA ve VacA genlerinin dışında farklı mekanizmalar tarafından da gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

T3'ten sonra en fazla baskılanma gösteren doku T6 olmuştur. Polimorfik CagA taşımayan bu örnek S1 ve M1 bölgesi taşımaktadır. VacA S1 ve M1 bölgelerini birlikte taşıyan dokularda, örneğin T2, T3 ve T6 dokularında, miR-16-5p'nin diğer dokulara kıyasla daha fazla baskılandığı görülmektedir. S1 ve M2 ortak olan T4'te ise baskılanma en az düzeydedir. Önceki yapılan çalışmalarda M1 polimorfizminin M2 polimorfizmine göre kanser riskini daha çok arttıran bir polimorfizm olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden M1 bölgesi taşıyan dokularda, pro-apoptotik bir miRNA üzerinde daha fazla baskılanma meydana gelmesi beklenen bir durumdur (Atherton ve diğ. 1995).

6.2. miR-98

miR-98 tümör baskılayıcı bir miRNA'dır (Ting ve diğ. 2012). Tümör baskılayıcı bir miRNA olan miR-98'in polimorfik VacA ve CagA taşıyan *H. pylori* ile enfeksiyonu sonucu baskılandığı gözlenmiştir. T3 ve T6 miRNA'nın en çok baskılandığı dokular olmuşturlardır.

VacA s1/m1/i1 polimorfik bölgesine sahip T2 ve T3 doku örneklerinde baskılanma seviyesinin arttığı görülmektedir. Aynı zamanda bu örnekler CagA P1, P2, P3, 3' ve R' bölgelerini de içermektedir. miR-98'in bu dokularda fazla baskılanma göstermesi, polimorfik bölgelerin tümör baskılanmasını engellediğini düşündürmektedir.

Bu iki dokudan farklı olarak T5 M1 bölgesi içermemektedir. M1 polimorfik bölgesinin olmaması, ekspresyon seviyesindeki düşüşlerin gözle görülür bir şekilde azaldığını göstermektedir. Bu sonuca bakılarak M1 polimorfik gen bölgesinin miR-98 üzerinde önemli bir etkisi olduğu söylenebilir.

T6'da yalnızca VacA S1 ve M1 bölgeleri olmasına rağmen, miRNA üzerinde en çok baskılanma gözlenen ikinci doku olması; araştırmaya dahil edilmemiş bir etmenin bu doku üzerine etki ettiğini akla getirmektedir.

Çalışmada az sayıda örnek kullanılması ve bu örnek sayısının azlığından dolayı istatistik analiz yapılamaması, doku sayısının artırılması gerekliliğini akla getirmektedir. Ayrıca CagA ve VacA pozitif dokularda miR-16-5p ve miR-98 hedef genlerinin tespiti miRNA'ların davranışlarının aydınlatılmasını da sağlayacaktır.

Az sayıda örnek kullanılmasına rağmen, çalışmanın geneline bakıldığında, proapoptotik ve tümör baskılayıcı olarak belirlenen iki miRNA'nın (miR-16-5p ve miR-98), tümör dokularında AGS hücre hattına kıyasla baskılanması, VacA ve CagA genlerinin bu miRNA'lar üzerinde ifadeyi azaltıcı bir etki gösterdiklerini düşündürmektedir. Fakat aynı virulans faktörleri içeren dokularda farklı seviyede baskılanmalar gözlemlenmektedir. Bu da CagA ve VacA dışında *H. pylori*'nin miRNA'lar üzerine etkili başka virulans faktörler içerdiğini de akla getirmektedir. Polimorfik CagA ve VacA'nın miR-16-5p ve miR-98 üzerine etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için, bu genlerin vektöre klonlanıp AGS hücre hatlarına transfekte edilmesi gerekmektedir. miRNA'ların ifadesindeki değişiklikler bu sayede daha iyi anlaşılacaktır.

Toparlamak gerekirse yapılan bu çalışmada CagA ve VacA'nın incelenen iki miRNA olan miR-98 ve miR-16-5p ifadesi üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu etkinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla doku örneğiyle çalışmak ve polimorfik CagA ve VacA genlerini AGS hücre hatlarına klonlayarak miRNA ifade seviyelerine ve hedef genlerine bakılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Achkar, NP, Cambiagno, DA, Manavella, PA. miRNA biogenesis: A dynamic pathway. *Trends Plant Sci.* 2016, 21, 1034–1044.
- Akopyants NS, Clifton, SW, Kersulyte, D, Crabtree, JE, Youree, BE, Reece, CA, Bukanov, NO, Drazek, ES, Roe, BA. & Berg, DE. (1998) *Mol. Microbiol.* 28, 37-53.
- Amieva M, Peek RM, Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori* - induced gastric cancer. *Gastroenterology.* 2016; 150:64–78.
- Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death and Differentiation* (2010) 17, 215–220 (2010). doi:10.1038/cdd.2009.69.
- Atherton, JC. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270, 17771–17777 (1995).
- Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. (2015) Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol.* 10, 955–965.
- Backert, S. ve Tegtmeyer, N. The versatility of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA in signal transduction and molecular crosstalk. *Toxins.* 2, 69–92 (2010).
- Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, Kappeler A, Brunner T, Vassella E: miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2009, 69: 5553-5559. 10.1158/0008-5472.CAN-08-4277.
- Bi S, Chai L, Yuan X, Cao C, Li S. MicroRNA-98 inhibits the cell proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts via targeting Col1A1. *Biol Res.* 2017; 50: 22. Published online 2017 Jun 19. doi: 10.1186/s40659-017-0127-6.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55, 2111–2115.
- Blaser MJ, Perez-Perez, GI, Kleanthous, H, Cover, TL, Peek, RM, Chyou, PH, Stemmermann, GN. & Nomura, A. (1995) *Cancer Res.* 55, 2111-2115.

Bohnsack, MT, Czaplinski, K, Gorlich, D. Exportin-5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185–191 (2004).

Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R: The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008, 14: 1271-1277. 10.1038/nm.1880.

Boquet, P. ve Ricci, V. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends Microbiol.* 20, 165–174 (2012).

Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost.* 2007 Dec;5(12):2429-36. Epub 2007 Sep 26.

Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-193.

Calin GA, Croce CM. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest.* 2007;117:2059–66.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99: 15524-15529. 10.1073/pnas.242606799.

Castiglioni, A. 1947. A History of Medicine, 2nd ed. Alfred A. Knopf, New York, N.Y.

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J.E, 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. U.S.A.* 93, 14648–14653. 10.1073/pnas.93.25.14648

Chambers, M.G, Pyburn, T.M, Gonzalez-Rivera, C, Collier, S.E, Eli, I, Yip, C.K, Takizawa, Y, Lacy, D.B, Cover, T.L, Ohi, M.D. Structural analysis of the oligomeric states of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *J. Mol. Biol.* 2013, 425, 524–535.

Chamnanchanunt S., Kuroki C., Desakorn V., Enomoto M., Thanachartwet V., Sahassananda D., Sattabongkot J., Jenwithisuk R., Fucharoen S., Svasti S., Umemura T. Downregulation of plasma miR-451 and miR-16 in Plasmodium vivax infection. *Exp Parasitol.* 2015 Aug;155:19-25. doi: 10.1016/j.exppara.2015.04.013. Epub 2015 Apr 22.

Chang YW, Han YS, Lee DK, Kim HJ, Lim HS, Moon JS, Dong SH, Kim BH, Lee JI, Chang R. Role of *Helicobacter pylori* Infection Among Offspring or Siblings of Gastric Cancer Patients. *Int J Cancer.* 2002 101, 469-474.

Chen YJ, Chen C, Wu DC, Lee CH, Wu CI, Lee JM, Goan YG, Huang SP, Lin CC, Li TC, Chou YP, Wu MT. Interactive effects of lifetime alcohol consumption and alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms on esophageal cancer risks. *Int J Cancer*. 2006 Dec 15;119(12):2827-31.

Shin CM, Kim N, Cho SI, Kim JS, Jung HC, Song IS. Association between alcohol intake and risk for gastric cancer with regard to ALDH2 genotype in the Korean population. *International Journal of Epidemiology*, Volume 40, Issue 4, 1 August 2011, Pages 1047–1055

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005, 102: 13944-13949. 10.1073/pnas.0506654102.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multi stepand multifactorial process— First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer research*. 1992;52(24):6735–40

Covacci, A. & Rappuoli, R. *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasispecies. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 96–102 (1998).

Cover TL ve Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. May 25, 1992. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 10570-10575.

Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun*. 1990 Mar;58(3):603-10

Cover, T. L. & Peek, R. M. Diet, microbial virulence and *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gut Microbes* 4, 482–493 (2013).

Cover, T. L., Puryear, W, Pérez-Pérez, G. I. & Blaser, M. J. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infect. Immun*. 59,1264–1270. (1991).

Cover, T.L.; Blanke, S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol*. 2005, 3, 320–332.

Dong JT, Boyd JC, Frierson Jr HF. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate*. 2001; 49: 166–171.

Duan J, Zhang H, Qu Y, Deng T, Huang D, Liu R, Zhang L, Bai M, Zhou L, Ying G, Ba Y. Onco-miR-130 promotes cell proliferation and migration by targeting TGFbetaR2 in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7:44522–44533.

Eaton, K. A, Cover, T. L, Tummuru, M. K, Blaser, M. J. & Krakowka, S. Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun*. 65, 3462–3464 (1997).

Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int. J. Cancer*. 2015, 136, E359–E386.

Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, et al. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980–2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur. J. Cancer*. 2014;50:1330-1344.

Figueiredo C. ve diğ. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1680–1687 (2002).

Figura N, Orderda G. Reflections on the first description of the presence of Helicobacter species in the stomach of mammals. *Helicobacter*. 1996;1:4–5.

Fox JG ve Wang TC. (2007) Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest.* 117(1):60-69.

Galmiche A., Rassow J., Doye A., Cagnol S., Chambard JC., Contamin S., de Thillot V., Just I., Ricci V., Solcia E., Van Obberghen E., Boquet P. The N-terminal 34-kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 19, 6361–6370 (2000).

Galmiche, A. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 23, 6361–6370

Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ, Javier F. A review of Helicobacter pylori diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J. Gastroenterol.* 2014 Feb;20(6):1438–1449.

Gebert, B. (2003) Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 301, 1099–1102

Geisse, N.A.; Cover, T.L.; Henderson, R.M.; Edwardson, J.M. Targeting of Helicobacter pylori vacuolating toxin to lipid raft membrane domains analysed by atomic force microscopy. *Biochem. J.* 2004, 381, 911–917.

Gloria Luz Paniagua, Eric Monroy, Raymundo Rodríguez, Salvador Arroniz, Cristina Rodríguez, José Luis Cortés, Ausencio Camacho, Erasmo Negrete and Sergio Vaca. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in Helicobacter pylori strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin. Microbiol Antimicrob.* 2009; 8: 14.

Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R, Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum. Genet.* 1992 Jan;88(3):344-6.

Gonzalez-Rivera, C.; Campbell, A.M.; Rutherford, S.A.; Pyburn, T.M.; Foegeding, N.J.; Barke, T.L.; Spiller, B.W.; McClain, M.S.; Ohi, M.D.; Lacy, D.B.; et al. A Nonoligomerizing Mutant Form of Helicobacter pylori VacA Allows Structural Analysis of the p33 Domain. *Infect. Immun.* 2016, 84, 2662–2670.

Gu Q., Zhao G., Wang Y, Xu B., Yue J. Silencing miR-16 Expression Promotes Angiotensin II Stimulated Vascular Smooth Muscle Cell Growth. *Cell Dev. Biol.* 2017 Mar; 6(1): 181. Published online 2017 Mar 24.

Gupta, V.R.; Patel, H.K.; Kostolansky, S.S.; Ballivian, R.A.; Eichberg, J.; Blanke, S.R. Sphingomyelin functions as a novel receptor for *Helicobacter pylori* VacA. *PLoS Pathog.* 2008, 4, e1000073.

Handa O., Naito Y., Yoshikawa T. CagA protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 73:1697–1702.

Hao NB., He YF., Li XQ, Wang K. ve Wang LR. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. *Oncotarget.* 2017 Oct 6; 8(46): 81572–81582. Published online 2017 Jul 12.

Hessey SJ, Spencer J, Wyatt J, Sobala G, Rathbone BJ, Axon ATR, Dixon MF. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut.* 1990;31:134- 138.

Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(22):14428–33.

Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA.* 2002 Apr 3;287(13):1690-8.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992 Apr;10(4):413-7.

Hu G., Zhou R., Liu J., Gong AY., Chen XM. MicroRNA-98 and let-7 Regulate Expression of Suppressor of Cytokine Signaling-4 in Biliary Epithelial Cells in Response to *Cryptosporidium parvum* Infection. *J Infect Dis.* Author manuscript; available in PMC 2011 Jul 1. doi: 10.1086/653212.

Hutvagner, G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 293, 834–838 (2001).

Hyuk Yoon ve Nayoung Kim. Diagnosis and Management of High Risk Group for Gastric Cancer. *Gut and Liver.* 2015. 9(1): 5–17.

I. Tramacere E. Negri C. Pelucchi V. Bagnardi M. Rota L. Scotti F. Islami G. Corrao C. La Vecchia P. Boffetta. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Annals of Oncology.* Volume 23, Issue 1, 1 January 2012, Pages 28–36.

Ilver, D.; Barone, S.; Mercati, D.; Lupetti, P.; Telford, J.L. *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell. Microbiol.* 2004, 6, 167–174.

- International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 61. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*. 1994.
- Ishaq S., Nunn L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterol Hepatol. Bed. Bench.* 2015 Spring; 8(Suppl1): S6–S14.
- Ito Y., Azuma T., Ito S., Miyaji H., Hirai M., Yamazaki Y., Sato F., Kato T., Kohli Y., Kuriyama M. (1997) Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1710–1714.
- Jarl J, Heckley G, Brummer J, Gerdtham UG. Time characteristics of the effect of alcohol cessation on the risk of stomach cancer: a meta-analysis. *BMC Public Health.* 2013;13:600.
- Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The *let-7* microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 2007;67:7713–22.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell.* 2005;120:635–647.
- Kamthan, A.; Chaudhuri, A.; Kamthan, M.; Datta, A. Small RNAs in plants: Recent development and application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 208.
- Ketting, R. F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659 (2001).
- Kim NY, Oh JS, Choi Y, Shin J, Park EC. Relationship between socioeconomic status and accessibility for endoscopic resection among gastric cancer patients: using National Health Insurance Cohort in Korea: poverty and endoscopic resection. *Gastric Cancer.*
- Krakowka S, Eaton KA, Leunk RD. Antimicrobial therapies for *Helicobacter pylori* infection in gnotobiotic piglets. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jul;42(7):1549-54.
- Krienitz W. Ueber das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1906;32:872.
- Lee, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425, 415–419 (2003).
- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 1988 Jun;26(2):93-9.
- Li BS, Zhao YL, Guo G, Li W, Zhu ED, Luo X, Mao XH, Zou QM, Yu PW, Zuo QF, Li N, Tang B, Liu KY, et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-

218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PloS one*. 2012;7:e41629.

Li, Y., Wandinger-Ness, A., Goldenring, J. R. & Cover, T. L. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol. Biol. Cell*. 15, 1946–1959 (2004).

Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, Johnson JM, Cummins JM, Raymond CK, Dai H, Chau N, Cleary M, Jackson AL, Carleton M, Lim L: Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol. Cell Biol*. 2007, 27: 2240-2252. 10.1128/MCB.02005-06.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods*. 25:402-408.

Livak, K.J., S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. 1995. Oligo nucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic*. 4: 357-362.

Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 303, 95–98 (2004).

Marino, J.H., P. Cook, and K.S. Miller. 2003. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. *J. Immunol. Methods*. 283:291-306.

Marshall, B. J. & Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1, 1311–1315 (1984).

Medhurst, A.D., D.C. Harrison, S.J. Read, C.A. Campbell, M.J. Robbins, and M.N. Pangalos. 2000. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J. Neurosci. Methods*. 98:9-20.

Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1993 Jun 15; 90(12):5791-5.

Molinari M., Galli C., Norais N., Telford JL., Rappuoli R., Luzio JP., Montecucco C. Vacuoles Induced by *Helicobacter pylori* Toxin Contain Both Late Endosomal and Lysosomal Markers. *J. Biol. Chem*. 272, 25339–25344 (1997).

Molinari M., Salio M., Galli C., Norais N., Rappuoli R., Lanzavecchia A., Montecucco C. Selective Inhibition of Ii-dependent Antigen Presentation by *Helicobacter pylori* Toxin VacA. *J. Exp. Med*. 187, 135–140 (1998).

Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. *Infect Immun*. 1994 Jun; 62(6):2609-13.

- Nishizawa T, Suzuki H. The role of microRNA in gastric malignancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:9487–9496.
- Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006;1:1559–1582.
- Noto JM ve Peek RM. The role of microRNAs in *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011; 1():21.
- Noto JM, Peek RM Jr. The gastric microbiome, its interaction with *Helicobacter pylori*, and its potential role in the progression to stomach cancer. *PLoS Pathog.* 2017.
- O’Hara A.M., Bhattacharyya A., Bai J. Tumor necrosis factor (TNF)- α -induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1. *Cytokine.* 2009; 46:359–369.
- Ou Z, Xiong L, Li DY, Geng L, Li L, Chen P, Yang M, Zeng Y, Zhou Z, Xia H et al. Evaluation of a new fluorescence quantitative PCR test for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in children. *BMC Gastroenterol.* 2013 Jan;13:7.
- Owen RJ. Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 1995 Sep;9(3):415-46.
- Pagliaccia C., Bernard M, Lupetti P, Ji X., Burroni D., Cover TL., Papini E., Rappuoli R., Telford JL., Reytrat JM. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998 Aug 18; 95(17): 10212–10217.
- Papamichael KX, Papaioannou G, Karga H, Roussos A, Mantzaris GJ. *Helicobacter pylori* infection and endocrine disorders: Is there a link? *World J. Gastroenterol.* 2009;15:2701–7.
- Papini, E.; Satin, B.; Norais, N.; de Bernard, M.; Telford, J.L.; Rappuoli, R.; Montecucco, C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J. Clin. Investig.* 1998, 102, 813–820.
- Patel, H.K.; Willhite, D.C.; Patel, R.M.; Ye, D.; Williams, C.L.; Torres, E.M.; Marty, K.B.; MacDonald, R.A.; Blanke, S.R. Plasma membrane cholesterol modulates cellular vacuolation induced by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* 2002, 70, 4112–4123.
- Paul G, Yardley JH. Pathology of *pylori*-associated gastric and esophageal lesions. In: Blaser MJ, ed. *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York: Igaku Shoin, 1989:73-98.
- Radin, J.N. et al. (2011) *Helicobacter pylori* VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 79, 2535–2543.

Ricci, V. Relationship between VacA toxin and host cell autophagy in *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. A few answers, many questions. *Toxins*. 8, 203 (2016).

Riquelme I, Letelier P, Riffo-Campos AL, Brebi P, Roa JC. Emerging Role of miRNAs in the Drug Resistance of Gastric Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:424.

Rizos E., Sifakakos N., Skourti E., Papageorgiou C., Tsoporis J., Parker TH., Christodoulou DI., Spandidos DA., Katsantoni E., Zoumpourlis V. miRNAs and their role in the correlation between schizophrenia and cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* 2016 Dec;14(6):4942-4946. doi: 10.3892/mmr.2016.5853. Epub 2016 Oct 14.

Salama, N. R., Otto, G., Tompkins, L. & Falkow, S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect. Immun.* 69, 730–736 (2001).

Salomon H. Ueber das spirillum saugetiarmagens und sien verhalten zu den belegzellen (abstract 1) *Zentralbl. Bakteriol.* 1896;19:433–442.

Satin B., Norais N., Rappuoli R., Telford JL., Murgia M., Montecucco C., Papini E. Effect of *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin on Maturation and Extracellular Release of Procathepsin D and on Epidermal Growth Factor Degradation. *J. Biol. Chem.* 272, 25022–25028 (1997).

Schmitt, W. & Haas, R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12,307–319 (1994).

Schraw, W.; Li, Y.; McClain, M.S.; van der Goot, F.G.; Cover, T.L. Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 34642–34650.

Shepherd NA, Warren BF, Williams GT, Greenson JK, Lauwers GY, Novelli MR. *Morson and Dawson's Gastrointestinal Pathology*. 5th ed. UK: Wiley-Blackwell; 2013.

Siragam V., Rutnam ZJ., Yang W., Fang L., Luo L., Yang X., Li M., Deng Z., Qian J., Peng C., Yang BB. MicroRNA miR-98 inhibits tumor angiogenesis and invasion by targeting activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11. *Oncotarget*. 2012 Nov; 3(11): 1370–1385. Published online 2012 Nov 6. doi: 10.18632/oncotarget.717.

Smoot, D.T.; Resau, J.H.; Earlington, M.H.; Simpson, M.; Cover, T.L. Effects of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells. *Gut* 1996, 39, 795–799.

Starzynska T, Malfertheiner P. *Helicobacter* and digestive malignancies. *Helicobacter*. 2006;11(Suppl 1):32–5.

Steer H. W., Colin-Jones D. G. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut*. 1975;16:590–597.

Suerbaum, S. & Michetti, P. Helicobacter pylori infection. *N. Engl. J. Med.* 347, 1175–1186 (2002).

Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, Sasakawa C. Interaction of CagA with Crk plays an important role in Helicobacter pylori-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* 2005 Nov 7;202(9):1235-47.

Tan, S.; Noto, J.M.; Romero-Gallo, J.; Peek, R.M., Jr.; Amieva, M.R. Helicobacter pylori perturbs iron trafficking in the epithelium to grow on the cell surface. *PLoS Pathog.* 2011, 7, e1002050.

Terebiznik, M.R. et al. (2009) Effect of Helicobacter pylori's vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy.* 5, 370–379.

TingHJ., MessingJ., Yasmin-KarimS., Lee YF. Identification of microRNA-98 as a Therapeutic Target Inhibiting Prostate Cancer Growth and a Biomarker Induced by Vitamin D. *J. Biol. Chem.* 2013 Jan 4; 288(1): 1–9. Published online 2012 Nov 27. doi: 10.1074/jbc.M112.395947.

Tokudome S, Ghadimi R, Suzuki S, Hosono A, Tanaka T, Arakawa K, et al. Helicobacter pylori infection appears the prime risk factor for stomach cancer. *Int. J. Cancer.* 2006;119:2991.

Tomb J. F., White O., Kerlavage A. R., Clayton R. A., Sutton G. G., Fleischmann R. D., et al. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature.* 389, 412–412. 10.1038/38792.

Tombola, F. et al. (2001) The Helicobacter pylori VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J. Clin. Invest.* 108, 929–937.

Torres, V.J. et al. (2007) Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocytes subsets. *J. Immunol.* 179, 5433–5440.

Torres, V.J.; VanCompernelle, S.E.; Sundrud, M.S.; Unutmaz, D.; Cover, T.L. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. *J. Immunol.* 2007, 179, 5433–5440.

Trédaniel J, Bofetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int. J. Cancer:* 72,565–573 (1997).

Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G (2015). MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nature Reviews Nephrology.*11, 23–33.

Tsugawa H., Suzuki H., Saya H. Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe.* 2012; 12:764–777.

Tummuru, M. K. R., Cover, T. L., and Blaser, M. J. Cloning and expression of a high molecular weight major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immunol.* 61: 1799-1809, 1993.

- Us D ve Haşçelik G. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in an asymptomatic Turkish population. *J. Infect.* 1998 Sep;37(2):148-50.
- Utsch, C.; Haas, R. VacA's Induction of VacA-Containing Vacuoles (VCVs) and Their Immunomodulatory Activities on Human T Cells. *Toxins.* (Basel) 2016, 8, 190.
- Vashukova ES., Glotov AS., Fedotov PV., Efimova OA., Pakin VS., Mozgovaya EV., Pendina AA., Tikhonov AV., Koltsova AS., Baranov VS. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by superimposed pre-eclampsia on chronic hypertension. *Mol. Med. Rep.* 2016 Jul;14(1):22-32. doi: 10.3892/mmr.2016.5268. Epub 2016 May 13.
- Visek WJ. Some aspects of ammonia toxicity in animal cells. *J. Dairy Sci.* 1968;51:286-295.
- Wang H, Wang L, Wu Z, Sun R, Jin H, Ma J, Liu L, Ling R, Yi J, Wang L, Bian J, Chen J, Li N, et al. Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening. *Med. Oncol.* 2014;31:298.
- Wang Q, Chen Y, Wang X, Gong G, Li G, Li C. Consumption of fruit, but not vegetables, may reduce risk of gastric cancer: results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Cancer.* 2014;50(8):1498–1509. doi: 10.1016/j.ejca.2014.02.009.
- Wang, F.; Xia, P.; Wu, F.; Wang, D.; Wang, W.; Ward, T.; Liu, Y.; Aikhionbare, F.; Guo, Z.; Powell, M.; et al. *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 26714–26725.
- Wang, W-C, Wang, H.-J, & Kuo, C.-H. Two distinctive cell binding patterns by vacuolating toxin fused with glutathione S-transferase: one high-affinity m1-specific binding and the other lower-affinity binding for variant m forms. *Biochemistry.* 40, 11887–11896 (2001).
- Watson SA, Grabowska AM, El-Zaatari M. Gastrin-active participant or bystander in gastric carcinogenesis? *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6:936–46.
- Willhite, DC. ve Blanke, SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell. Microbiol.* 6, 143–154 (2004).
- Willhite, DC, Cover, TL, Blanke, SR. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J. Biol. Chem.* 278, 48204–48209 (2003).
- Winter, JA, Letley, DP, Cook, KW, Rhead, JL, Zaitoun, AA, Ingram, RJ, Amilon, KR, Croxall, NJ, Kaye, PV, Robinson, K. A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and *Helicobacter pylori*-induced metaplasia in the stomach. *J. Infect. Dis.* 2014, 210, 954–963.
- Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev. Gastroenterol Hepatol.* 2010 Nov: 7(11):629-41.

Yan X, Liang H, Deng T, Zhu K, Zhang S, Wang N, Jiang X, Wang X, Liu R, Zen K, Zhang CY, Ba Y, Chen X. The identification of novel targets of miR-16 and characterization of their biological functions in cancer cells. *Molecular Cancer*. 2013;12:92.

Yi, R, Qin, Y, Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 17, 3011–3016 (2003).



İnternet Erişim

<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>



8. ÖZGEÇMİŞ

Şafak ŞENER

Adakent, Barış mah. Ankara cad. Pertevniyal Apt. A Blok Kat:5 Da:12
Beylikdüzü/İSTANBUL

Telefon: 0 (212) 873 46 37
Cep: 0 (537) 519 04 54
E-posta: safaksener@halic.edu.tr

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 23.04.1991
Doğum Yeri: Kadıköy/İSTANBUL
Medeni Hali: Bekar
Ehliyet: 10.01.2012 (B)

Eğitim

1996-2004 Özel Cihangir Okulları (2.'lik derecesiyle mezun oldum)
2004-2008 Vefa Lisesi
2010-2014 Haliç Üniversitesi
2015-2018 Haliç Üniversitesi (Yüksek Lisans)

İsteğe Bağlı Stajlar

Gelişim Tıp Laboratuvarı – Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (PCR)
İstanbul Üniversitesi – Onkoloji Enstitüsü

Teknik Bilgiler

PCR, PCR Optimizasyonu (RT, Multiplex, Touchdown)
RFLP
İzolasyon teknikleri (DNA, RNA, plazmid)
Elektroforez, Jelde yürütme, Kromatografi teknikleri
Hücre kültürü
MS Office

NCBI (Pubmed, BLAST, OMIM, Nucleotide, Genome, GENE, Protein)

Sertifikalar

University of Cambridge Young Learners English Starters (2000)

University of Cambridge ESOL Examinations Preliminary English Test (PET) (Haziran 2012)

IX. İÜGEN Molecular Biology and Genetics Students' Winter School Participation Certificate (24-26 Şubat 2012)

Bilkent Üniversitesi – Evrimde Yeni Ufuklar Sempozyumu (22 Mart-23 Mart 2014)

Sunumlar

Kanser Genetiği (Moleküler Genetik)

Akciğer Kanseri (Kanser Genetiği)

Colin Pitchfork (Adli Bilimler)

Kök Hücre Farklılaştırılması (Hayvan Doku ve Kültürü)

Alzheimer Hastalığı (AD) (Hücre Moleküler Biyolojisi II)

Kistik Fibrozis (CF) (İnsan Genetiği)

Darwin ve Evrim (Biyolojide Sunum Teknikleri)

Yabancı Diller

İngilizce (Advance)