

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

**MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK *HELICOBACTER*
PYLORI VACA GENOTİPLERİNDE MİR-200a-3p,
MİR-223-5p VE MİR-29a-3P MİRNA'LARININ
EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: FERHAT ERDOĞAN

DANIŞMAN
Doç. Dr. M. BURCU IRMAK YAZICIOĞLU

İSTANBUL 2018

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

**MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK *HELICOBACTER*
PYLORI VACA GENOTİPLERİNDE MİR-200a-3p,
MİR-223-5p VE MİR-29a-3P MİRNA'LARININ
EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: FERHAT ERDOĞAN

DANIŞMAN
Doç. Dr. M. BURCU IRMAK YAZICIOĞLU

İSTANBUL 2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

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

Tez Savunma Tarihi: 15.01.2018

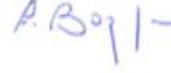
Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

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 SAVAŞKAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Vekil Müdür

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Ferhat Erdoğan tez 28.12.2017.docx (D34228776) Submitted: 12/28/2017 11:20:00 AM
Submitted By: burcuyazicioglu@halic.edu.tr
Significance: 9 %

Sources included in the report:

SULTAN CANSU GÖNENÇ.pdf(D21163206)

Birmur Cömez YL Tez.docx (D29550854) <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-26>
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2012.00092/full> https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55936-8_5/fulltext.html <https://academic.oup.com/jid/article/210/6/954/2908513/A-Role-for-the-Vacuolating-Cytotoxin-VacA-in>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-014-2138-8> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1093/emboj/19.23.6361/references>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676300> <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2012.00037/full>
<http://europepmc.org/articles/PMC4052787> <http://jvi.asm.org/content/80/23/11767.full>

Instances where selected sources appear:

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2015 – 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 hoşgörüsüyle bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu'na çok teşekkür ederim.

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

Son olarak eğitim hayatım boyunca bana destek olan ve verdiğim her kararın arkasında durarak beni bu günlere getiren sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul, 2017

Ferhat Erdoğan

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	III
ÇİZELGELER	V
ŞEKİLLER	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Mide Kanseri ve Epidemiyolojisi	1
1.2. <i>H. Pylori</i>	3
1.2.1 <i>H. Pylori</i> 'nin Tarihçesi.....	3
1.2.2 <i>H. Pylori</i> 'nin Epidemiyolojisi.....	4
1.2.3 <i>H. Pylori</i> VacA	5
1.3 MikroRNA	9
1.3.1 MiRNA ve Mide Kanseri	11
1.3.2 MiR-29A ve Mide Kanseri	12
1.3.3 MiR-200A ve Mide Kanseri	14
1.3.4 MiR-223 ve Mide Kanseri	16
2.AMAÇ	18
3. MATERYAL	19
3.1 Çalışmada Kullanılan Mide Kanseri Örnekleri.....	19
3.2 Kimyasallar	19
3.3 Kullanılan Kitler	20
3.4 Cihazlar	20
3.5 Sarf Malzemeler	21
3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bileşenleri	22
3.7 Elektroforez	23
3.8 AGS Hücre Hattı için Besiyeri Bileşenleri	24
3.9 PZR primerleri	24
3.10 Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Primerleri	25
4. YÖNTEM	26
4.1 Mide Kanseri Dokularından Bakteri Genomik DNA İzolasyonu	26
4.2 Mide kanseri dokusundan RNA izolasyonu.....	26
4.3 Total RNA'dan cDNA sentezi	27
4.4 PZR ile VacA Allellerinin Saptanması	28
4.5 AGS Hücre Kültürü	29
4.6 RT-PCR ile miRNA Ekspresyon Analizi	30
5. BULGULAR	32
5.1 PZR ile VacA Allellerinin Saptanması	32

5.2 RT-PCR ile miR-200a-5p Ekspresyon Analizi	33
5.3 RT-PCR ile miR-29a-3p Ekspresyon Analizi	34
5.4 RT-PCR ile miR-223-3p Ekspresyon Analizi	35
6. TARTIŞMA	37
7. KAYNAKLAR	40
8. ÖZGEÇMİŞ	52



KISALTMALAR

- AGS:** İnsan Kafkasya adenokarsinoma hücre hattı
AML: Akut miyeloid lösemide
KHDAK: Küçük hücre dışı akciğer kanseri
ml: Mililitre
FBS: Fetal sığır serumu
Cm: Santimetre
PBS: Fosfat tamponlu salin
DMSO: Dimetil sülfoksit
RT-PZR: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HER: İnsan epidermal büyüme faktörü
cDNA: Komplementer DNA
µl: Mikrolitre
TNF: Tümör Nekroz Faktör
ATPaz: Adenozin trifosfataz
LRP-1: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilgili protein 1
ZEB: Çinko Parmak E-Kutu Bağlama Homeobox
UTR: Çevrilmemiş bölge
IRAK-1: İnterlökin-1 reseptör ilişkili kinaz
NF-KB: Nükleer Faktör kappa B
bp: Baz çifti
kDa: Kilo Dalton
CDH1: Cadherin-1
MİR: MikroRNA
MAPK: Mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz
CDC42: Hücre bölünmesi kontrol proteini 42
EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş
IL: İnterlökin
DK: Dakika
SN: Saniye
NLRP3: nükleotid bağlayıcı alan ve lösün bakımından zengin tekrar içeren protein 3.

RCF: Rölatif santrifüj kuvveti

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

H. Pylori: Helicobacter Pylori

VacA: Vakuolasyon sitotoksin A

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

VEGFA: Vasküler endotelyal büyüme faktörü A

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

RNA: Ribo Nükleik asit

RPTP-: Receptor-benzeri protein tirozin fosfataz

ÇİZELGELER

Sayfa No.

Çizelge 1.1. Mide kanserinde miRNA'ların gözlemlenen ekspresyonu	12
Çizelge 3.1. 5x TBE Hazırlama	23
Çizelge 3.2 Agaroz jel hazırlama	23
Çizelge 3.3 AGS hücre hattı besiyeri	24
Çizelge 3.4 Dondurma medyumunu	24
Çizelge 3.5 PZR primer dizileri	25
Çizelge 3.6 RT-PCR primerleri	25
Çizelge 4.1: İzole edilen RNA konsantrasyonları	26
Çizelge 4.2 Poli (A) kuyruk ekleme reaktifleri	27
Çizelge 4.3 cDNA sentez reaktifleri	27
Çizelge 4.4: PZR reaktifleri	28
Çizelge 4.5: PZR koşulları	29
Çizelge 4.6: RT-PZR reaktifleri	30
Çizelge 4.7: RT-PCR reaksiyon koşulları	31
Çizelge 5.1: miR-200a-5p Ekspresyon Analizi	33
Çizelge 5.2: Mir-29a-3p ekspresyon analizi	35
Çizelge 5.3: Mir-223-3p ekspresyon analizi	36

ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 1.1 VacA 140 kDa'lık prekürsör protein	7
Şekil 1.2. VacA 88 kDa aktif toksin bölgesi.....	9
Şekil 1.3. miRNA'ların oluşum mekanizması ve RISC ile bağlanması.	10
Şekil 1.4. miRNA'ların apoptoz üstünde aldığı roller.	11
Şekil 1.5. Mir-29a'nın hedef geni p42.3'ün şeması.....	14
Şekil 1.6. MiR-200a ekspresyonu sonucunda E-cadherin üzerindeki baskılanma. ...	15
Şekil 1.7. miR-223 down regülasyonunu.....	17
Şekil 5.1: T1, T2 ve T3 adlı dokuların PZR ile VacA polimorfik bölgelerinin tespiti	32
Şekil 5.2. T4, T5 ve T6 adlı dokuların PZR ile VacA polimorfik bölgelerinin tespiti	33
Şekil 5.3 miR-200a-5p ekspresyon değişim grafiği.....	34
Şekil 5.4 miR-29a-3p ekspresyon değişim grafiği.....	35
Şekil 5.5 miR-223-5p ekspresyon değişimi grafiği.	36

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Ferhat Erdoğan
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Doç. Dr. M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ocak 2018

ÖZET

MİDE KANSERİNDE POLİMORFİK *HELICOBACTER PYLORI* VACA GENOTİPLERİNDE MİR-200a-3p, MİR-223-5p VE MİR-29a-3P miRNA'LARININ EKSPRESYON ANALİZİ

Mide kanseri insidansı ve mortalitesi oldukça yüksek olan bir kanser türüdür. Küresel çapta kansere bağlı ölüm oranlarında ikinci sırada yer almaktadır. *H. pylori* mide kanseri risk faktörü olarak bilinmektedir. *H. pylori*'den vakuol oluşturucu bir protein salgılanmaktadır. Vakuol oluşturucu proteinin vacA adı verilen gen tarafından kodlandığı bilinmektedir. VacA'nın kodladığı protein prekürsör halde 140 kDa boyutundadır. Salgılanan proteinden proteolitik prosesler sonucunda 88 kDa'lık aktif toksin bölgesi oluşmaktadır. Aktif toksin bölgesi p33 ve p55 adlı iki koldan meydana gelmektedir. Bu iki kol üzerinde s-, m- ve i- bölgeleri mevcuttur. *H. pylori* vacA toksin bölgelerinde farklı alleller (S1/M1/i1 veya S2/M2/i2) içeren formlar bulunmaktadır. S1/M1/i1 allelleri en polimorfik formlardır. *H. pylori* vacA'nın vakuol oluşturma yeteneği ile apoptozu tetiklemesi ve T lenfositlerinin proliferasyonunun baskılanması gibi diğer etkileri arasında doğrudan bir ilişki mevcuttur. *H. pylori* virülans faktör VacA'nın, let-7 dahil birçok miRNA ifadesini değiştirdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada kanserli mide dokularından izole edilen *H. pylori* suşlarında VacA geninin polimorfik bölgelerini saptamak üzere PZR analizi yapıldı. Farklı VacA formlarına sahip kanserli mide dokularında, miR-29a-3p, miR-200a-5p ve miR-223-3p miRNA'larının ifade değişimi kantitatif gerçek zamanlı PZR ile analiz edildi. Farklı VacA formlarının mide kanseri dokularında, çalışılan miRNA'ların ifade seviyesini etkileyebileceği gözlemlendi.

Anahtar sözcük: *H. pylori*, VacA, miRNA, Gastrik kanser.

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Ferhat Erdoğan
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Doç. Dr. M. Burcu Irmak Yazıcıoğlu
Degree Awarded and Date : Master of Science – January 2018

SUMMARY

EXPRESSION ANALYSIS OF MIR-200a-3p, MIR-223-5p AND MIR-29a-3P miRNAs IN POLYMORPHIC HELICOBACTER PYLORI VACA GENOTYPES IN GASTRIC CANCER

Gastric cancer is a type of cancer with a high incidence and mortality. It is the second largest cancer-related mortality in the global dimension. *H. pylori* is known as a stomach cancer risk factor. A vacuole-forming protein is released from *H. pylori*. It is known that the vacuole forming protein is encoded by the gene called VACA. The protein encoded by VacA is 140 kDa in size as a precursor. Proteolytic processes from secreted proteins result in an active toxin region of 88 kDa. The active toxin region comes from the two ponds called p33 and p55. There are s-, m- and i- regions on these two arms. In *H. pylori* vacA toxin regions there are forms containing different alleles (S1 / M1 / i1 or S2 / M2 / I2). The S1 / M1 / I1 alleles are the most polymorphic forms. There is a direct relationship between the ability of *H. pylori* vacA to form vacuole and other effects such as apoptosis triggering and suppression of T lymphocyte proliferation. *H. pylori* virulence factor VacA has been found to alter many miRNA expressions, including let-7. In this study, PZR analysis was performed to detect polymorphic regions of VacA gene in *H. pylori* strains isolated from stomach cancer tissues. Expression changes of miR-29a-3p, miR-200a-5p and miR-223-3p miRNAs in cancerous stomach tissues with different VacA forms were analyzed by quantitative real-time PZR. It was observed that different VacA forms may affect the expression level of miRNAs studied in stomach cancer tissues.

Key words: *H. pylori*, VacA, miRNA, Gastric cancer.

1.GİRİŞ

1.1 Mide Kanseri ve Epidemiyolojisi

Mide kanseri global çapta etkisini göstermeye devam eden agresif bir hastalıktır. Son on yıl baz alındığında insidansında genel çapta bir düşüğe rağmen mide kanseri global çapta en yaygın dördüncü kanser türüdür. Kanser ölümlerinin ise ikinci en önemli nedenidir (Jemal ve diğ.,2011, Ferro ve diğ.,2014).

Gastrik kanser insidansı ve mortalitesi global çapta düşüş göstermektedir. Ancak bölgeler arasında istatistikte ciddi farklar mevcuttur.

Gastrik kanserdeki azalma gelişen beslenme şartları, daha iyi korunma ve erken teşhis sayesinde ancak hala kötü bir prognoz taşımaktadır. Gastrik kanser genel olarak geç evrelerde teşhis edilmektedir. Tedavi yöntemleri kemoterapi ve kemoradyoterapi ile cerrahi operasyonlardır. Bu yaklaşımlar mortalitenin azalmasını sağlamıştır (Sasako ve diğ.,2011, Bang ve diğ.,2012).

Yeni vakaların %70'inden fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Erkeklerde mide kanseri oranları kadınların yaklaşık iki katından fazladır. Yüksek insidansa sahip başlıca bölgeler Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika'dır. Bölgesel varyasyonlar, beslenme farklılıkları ve *H. Pylori (Helicobacter Pylori)* enfeksiyonun yaygınlığı, bölgelere göre değişen insidansı açıklamaktadır (Jemal ve diğ.,2011).

Gastrik kanseri için çeşitli sınıflandırma yöntemleri mevcuttur. En yaygın olarak kullanılan yöntem Lauren sınıflandırma yöntemidir. Lauren sınıflandırılmasında gastrik kanserde iki ana histolojik alt tip tanımlanmaktadır. Birinci tip en yaygın rastlanan bağırsak tipi, ikincisi tip ise diffüz tip olarak adlandırılır (Lauren, 1956).

Bu alt tipler arasındaki morfolojik farklılık bağırsak alt tipinde korunmuş olan ve diffüz alt tip gastrik karsinomda bozulmuş olan hücre içi yapışma molekülleri ile ilişkilidir. Her iki alt tipte hedeflenebilir protein ifadeleri bulunabilmektedir. Bağırsak alt tipi lezyonlarında tümörlerin %7-34 'ünde HER2(insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2) aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Gravalos ve Jimeno,2008). Gastrik kanserde epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) aşırı ekspresyonunun zayıf prognoz için bir belirteç olduğu saptanmıştır (Graziano ve diğ., 2011). Vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA) ve reseptörünün ifadesi gastrik kanser vakalarında %40 oranında tespit edilmiştir. Aşırı VEGFA ekspresyonu kötü prognoz ve ilerlemiş hastalıkla ilişkilidir (Yoshikawa ve diğ.,2000). Her iki büyüme faktörü böylece, gastrik kanserde belirteç olarak gösterilmiştir.

Bağırsak alt tipi gastrik kanser, yüksek risk taşıyan popülasyonlarda en çok rastlanan gastrik kanser alt tipidir. Global çapta gastrik kanser insidansında görülen azalma sonucu, bağırsak alt tipi en sık rastlanan tip olduğu için, gözle görülür anlamda düşüş mevcuttur (Henson ve diğ.,2004). Gastrik kanserde diffüz alt tip, bağırsak alt tipine oranla daha agresif olduğu kabul görmektedir (Piazuelo ve Correa, 2013). Diffüz alt tipi gastrik kanserin, E-cadherin (CDH1) ekspresyon kaybı ile kuvvetli ilişki içinde olduğu düşünülmektedir. Vakaların büyük bir kısmında hücre adezyon proteini E-cadherin'in ekspresyonunun kaybolduğu tespit edilmiştir. Gastrik kanser vakalarının yaklaşık %25-40'ında heterozigot E-cadherin (CDH1)'de mutasyonlara meydana geldiği tespit edilmiştir (Barber ve diğ., 2008).

Gastrik kanser risk faktörü fazla olan bir kanser türüdür. Hastalığın gelişimini etkileyebilecek çeşitli çevresel, enfeksiyon ve konakçıya bağlı faktörler vardır. Gastrik kanserde ilk sırada anılması gereken faktör *H. pylori* enfeksiyonudur. Kanserojen olarak tanınan ilk bakteri türüdür (IARC,1994). *H. pylori*'nin distal gastrik kanser olgularının %77'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bağırsak alt tipi ve diffüz alt tipi ile ilişkisi mevcuttur. Ancak gastrik kardiyada oluşan karsinom ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir (Helicobacter and Cancer Collaborative Group,2001). *H. pylori* mukoza ilişkili lenfoid dokuda (Malt lenfoma) oluşan lenfomalarda etiyolojik bir ajan olarak tanınmaktadır (Wotherspoon, 1996).

P53 ekspresyon anormallikleri, enfeksiyona bağlı kronik gastrik, metaplazi ve displazide gözlemlenmiştir. *H. pylori* ile P53 arasında ilişki olduğu düşünülmektedir

ancak tam olarak aydınlatılmış değildir. Wild tip P53 proteinin hücre apoptozunu indükleyebildiği ancak mutant formu hücre içi birikimi, apoptozun inhibesi ve hücre çoğalmasını teşvik ederek karsinogenezde rol aldığı kanıtlanmıştır. P53 aşırı ekspresyon durumları genellikle mutant formlarda rastlanmaktadır. Wild tip p53 normal dokularda genellikle negatiftir ve yarı ömrü negatiftir. Yapılan çalışmalarda P53 ifadesinin kontrol gruplarında negatif olduğunu, metaplazi örneklerinde %13,3 ve gastrik karsinom örneklerinde %43'ünde pozitif olduğu saptanmıştır. *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişki kurulduğunda enfeksiyon negatif grupta düşük ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir (Li ve diğ.,2005).

Son olarak gastrik kanser insidansının düşüşündeki büyük pay, hastalığı önlemeye yönelik stratejilerdir. *H. pylori* enfeksiyonunun ortadan kaldırılması en önemli strateji olmasının yanı sıra, meyve ve sebze alımını arttırmak ve tuz tüketimini azaltmak gibi diyet değişiklikleri önemli stratejilerdir (Gonzalez ve diğ.,2003).

1.2 H. PYLORİ

H. pylori gram negatif mikroaerofilik bir bakteridir. Gastrik epitelin lümen yüzeyinde kolonize olmaktadır (Li ve diğ.,2016). *H. pylori* karsinojen bakteri olarak gösterilen ilk bakteridir (Kathleen ve diğ.,2010). Hücre içi sinyal yollarına müdahale eden *H. pylori* gastrik kanser için ana bir risk faktörüdür (Noormohammad ve diğ.,2016).

Yakın zamanda bakteri genomu, patojenik mekanizmaları ortaya çıkarabilmek için tam sekanslamaya tabi tutuldu. Post genomik analizler *H. pylori* genomik çeşitliliğinin ve patojenitesi üzerinde yeni ve ilginç özellikleri ortaya çıkartmıştır (Ahmed, 2005).

1.2.1 H. Pylori'nin Tarihçesi

H. pylori'nin ilk varlığı yüz yılı aşkın süre önce İtalyan araştırmacı Bizzozero'nun yaptığı çalışmalarda gösterilmiştir (Bizzozero, 1893). *H. pylori* varlığı saptanmış olduğu halde kültürünü elde etmek kolay olmamıştır. 1983 yılında Avustralyalı iki bilim adamı tarafından ilk kez insan gastrik dokusundan kültüre edilmiştir (Marshall ve Warren, 1983). *H. pylori* ilk saptandığı zamandan beri morfolojik olarak *Campylobacter* ailesiyle olan benzerliğinden dolayı, bu aile altında

adlandırılmıştır. Kültür edilebildikten sonra anlaşılmıştır ki bu bakteri ile *Campylobacter* ailesi arasında ciddi moleküler farklar mevcuttur. Bu farkın ortaya çıkması sonucunda günümüzdeki adı böylece tayin edilmiştir (Goodwin ve diğ.,1989).

H. pylori'yi ilk kez kültür etmeye başaran Avustralyalı araştırmacılar Marshall ve Warren aynı zamanda bu bakterinin gastrit ve peptik ülser hastalığındaki rolünü de deşifre etmiştir (Marshall ve Warren,1983). Yapılan bu önemli keşifler sonucunda Koralinska Enstitüsü Nobel Meclisi, gastrit ve peptik ülserleşmede *H. pylori*'nin büyük rol oynadığını gösteren bilim adamlarını onurlandırmıştır. 2005 yılında Nobel fizioloji ve tıp ödülüne layık görülmüşlerdir.

Bir bakterinin gastrik ve peptik ülserle sebep olması fikri açıklandığı günlerde kabul görmesi kolay olmamıştır. O dönemlerde peptik ülserin başlıca sebepleri günlük stres ve yaşam tarzı faktörleriydi. Marshall ve Warren yaptığı çalışma sonucunda Duodenal ülserde %90 ve gastrik ülserinde %80'inden *H. pylori*'nin sebep olduğunu ortaya çıkartmışlardır. Bu sonuçları kanıtlamak için Marshall gönüllü olarak bakteri taşımadığını göstermek için mide biyopsisini aldırmıştır. Akut gastrik hastalığına sebep olduğunu göstermek için bakteriyi kendine enfekte etmiştir. Bu çalışma Avustralya tıp dergisinde yayınlanmıştır (Marshall ve diğ.,1985). İki hafta boyunca gelişen hafif bir hastalık, bakterinin gastrite sebep olduğunu kanıtlamıştır.

H. pylori'nin patojen olarak anılmasının yanı sıra bazı yararları olabileceği ihtimali yapılan çalışmalarla birkaç yıldan beri artmıştır (Richter ve diğ.,1999). *H. pylori* enfeksiyonun gastro-özofagal reflü ve özofageal karsinoma karşı koruduğu önerilmektedir (Richter ve diğ.,1999, De Martel ve diğ.,2005).

Her yönden ele alındığında *H. pylori* çok daha yeni fark edilmiş bir bakteri olmasına rağmen birçok etkiye sebep olduğu açıktır. Bir takım yararlı etkilere sebep olduğu son dönemde ortaya çıkmasının yanı sıra oluşturduğu risk faktörleri de bilinmektedir.

1.2.2 *H. Pylori*'nin Epidemiyolojisi

Günümüzdeki insan nüfusunun yaklaşık %50'si *H. pylori* enfeksiyonuna maruz kalmaktadır. Enfekte bireylerin yaklaşık %20'sinde klinik hastalıklar gelişmektedir (Hongqian ve diğ.,2016).

2011 yılında yayınlanan bir makalede literatür taraması yapılarak *H. pylori*'nin epidemiyolojisi, hakemli dergilerde yayınlanan çalışmalarla gözden geçirilmiştir. Genellikle tanı için kullanılan yöntem seroloji testidir (Khean-lee ve diğ.,2013). Araştırmalar sonucu çok kademeli bir örnekleme yöntemi kullanılarak 3153 denek içinde 2310 birey enfekte olduğu gözlemlenmiştir. Endoskopi prosedürünü kabul eden hastalar arasında ise 1022 denekten 733'nün enfekte olduğu tespit edilmiştir (Li ve diğ.,2010).

Kore'de yapılan büyük bir çalışmada 10000 kişi taranmış ve %50,8'inde *H. pylori* enfeksiyonu saptanmıştır (Nam ve diğ.,2010). Vietnam'da enfeksiyon oranı %65,6 olarak tespit edilmiştir (Tung ve diğ.,2010). Türkiye'de yapılan bir çalışmada 3301 kişi taranmıştır. 2353 (%71,3) kişinin enfeksiyonu taşıdığı kaydedilmiştir (Özdil ve diğ.,2010). Türkiye'de yapılan ikinci bir çalışmada ise 4600 kişi taranmış ve oran %82,5 olarak tespit edilmiştir (Özaydın ve diğ.,2013). Narenciye ve C vitamini alınımının fazla olduğu bölgelerde enfeksiyon oranının azalabileceği önerilmiştir (Leonardo ve diğ.,2014).

H. pylori mide kanserinde kilit rol oynamaktadır. Mide kanseri tüm dünyada insidansı ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır (Kathleen ve diğ.,2010).

H. pylori bir gastroduodenal patojendir. Duodenal ve gastrik ülser, nonülser dispepsi, gastrik karsinom ve gastrik mukoza ilişkili lenfoid doku (Malt) lenfomasına da neden olabilmektedir (Stephen ve diğ.,2014). Bunun yanı sıra, son kanıtlar ışığında *H. pylori*'nin özofagus reflüsü Amnon ve diğ. (2010), barrett özofagusu Corley ve diğ. (2013), alerji, astım Chen Y, Blaser MJ (2007) ve enflamatuar bağırsak hastalıklarından koruduğu gözlemlenmiştir (Luther ve diğ.,2010).

1.2.3 *H. Pylori* VacA

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

Epitel hücrelerinde vakuol oluşumunu indüklemesi VacA'nın ilk bildirilen etkisi olmuştur. VacA adını ilk bildirilen etkisi olan, vakuolasyonu indükleme yeteneğinden almaktadır (Leunk ve diğ.,1988).

Bir toksin farklı hücre tipleri üzerinde farklı etkiler gösterebilmektedir. VacA ile yapılan çalışmalar sonucunda farklı hücre tiplerinde farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Cover ve Blanke, 2005). Ayrıca VacA'nın vakuol oluşturmanın yanı sıra farklı etkilerde gösterdiği bulunmuştur. VacA böylece pore oluşturan toksin olarak adlandırılmasının dışında çok fonksiyonel bir toksin olarak da bilinmektedir (Boquet ve Ricci, 2012).

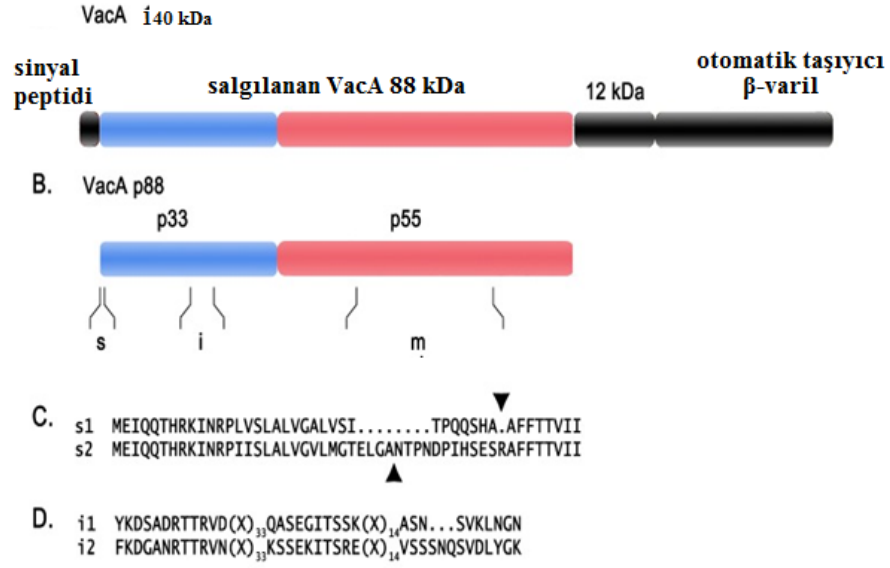
Normal insan mukozasında primer epitel hücrelerinde VacA toksininin vakuolasyona neden olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda insan gastrik epitel hücrelerinin *H. pylori* VacA sitotoksine oldukça duyarlı olduğu gösterilmiştir. Birçok *H. pylori* suşunun, çeşitli ökaryotik hücre tiplerinde vakuolasyona neden olduğunda gözlemlenmiştir (Smoot ve diğ., 1996, Harris ve diğ., 1996).

H. pylori VacA toksininin vakuol oluşturmak haricinde çeşitli etkileri mevcuttur. VacA toksini mitokondriden sitokrom C salınımını indüklemesi ile apoptozun tetiklenmesine etkisi olduğu bilinmektedir (Galmiche ve diğ. 2000). Diğer etkileri arasında üre permeazı Tombola ve diğ. (2001), T Gebert ve diğ. (2003) ve B lenfositlerinin aktivasyonun baskılanması Torres ve diğ. (2007), otofajinin indüklenmesi ve nekrozun tetiklenmesi bulunmaktadır (Radin ve diğ., 2011, Terebiznik ve diğ., 2009).

Hücre yüzeyiyle etkileşimde olan pekçok liganda benzer olarak VacA hücreye bağlanması MAP kinazlar gibi birçok sinyal yollağını aktive eder (Fujikava ve diğ.,2003). VacA toksinin vakuol oluşturma yeteneğinin dışındaki iki en önemli karakteristik özelliği apoptozu tetiklemesi ve T lenfositlerinin proliferasyonunun baskılanmasıdır. Bu iki özellik VacA'nın pore oluşturma aktivitesine bağlıdır (Marianna ve diğ.,2003).

H. pylori, diğer bilinen bakteriyel toksinlerden, yapısal özellikleri ve etkinlikleri önemli ölçüde farklı olan gözenek oluşturma yeteneğine sahip bir VacA toksini salgılar (Christian ve diğ.,2016). VacA toksini ilk salındığında 140 kDa'lık prekürsör bir proteindir (Telford ve diğ.,1994). 140 kDa'lık salgılanan proteinin proteolitik prosesler sonucunda 88 kDa'lık aktif toksin bölgesi oluşmaktadır (Cover ve Blanke,2005). 88 kDa'luk bölge dışında ise 12 kDa'lık peptid bölgesi Nguyen ve diğ. (2005) ve 33 kDa'luk ototransporter β -barrel bölgesi bulunmaktadır (Telford ve

diğ.,1994). 88 kDa'lık aktif toksin bölgesi iki alandan oluştuğu kabul edilmektedir. Bu alanlar P33 ve P55 domainleridir (Torres ve diğ.,2005). (Şekil 1.1)



Şekil 1.1: VacA 140 kDa'lık prekürsör protein (An Overview of Helicobacter pylori VacA Toxin Biology Nora J. Foegeding, 2016).

Birçok bakteriyel toksin konakçı hüresine girerek, hücre içi bölgelerde enzimatik bir aktivite uygulayarak değişikliklere neden olabilir. Konakçı hücrelerin plazma membranında gözenekler oluşturarak hareket edebilirler. VacA konakçı hücrelerinde herhangi bir enzimatik aktiviteye sahip olduğu bilinmemektedir. Düzlemsel lipid bariyerlerinde anyon kanalları oluşturma kapasitesine dayanarak gözenek oluşturu bir toksin olarak sınıflandırılmıştır (Czajkowsky ve diğ.,1999).

VacA hücre yüzeyinde hem lipid sallarına hem de protein reseptörlerine bağlanır. Epitel hücrelerde VacA'nın bağlandığı çok fazla reseptör tespit edilmiştir. Bu reseptörler, sphingomyelin Gupta ve diğ. (2008), glikosfingolipidler Roche ve diğ. (2008), receptor-benzeri protein tyrosine phosphatase alpha (RPTP- α) Yahiro ve diğ. (2003), RPTP- β Yahiro ve diğ. (2004), heperan sülfat Utt ve diğ. (2001), epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) Seto ve diğ. (1998) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü- ilgili protein -1 (LRP-1)'dir (Yahiro ve diğ.,2012). T lenfosit hücresi üzerindeki reseptörü ise β 2 integrin (CD18)'dir (Sewald ve diğ.,2008).

Toksinin reseptöre bağlanması gerçekleşip membrandan içeriye alındıktan sonra sadece endozomal bölmeler ile ilişki içinde değildir. Aynı zamanda mitokondri Calore ve diğ. (2010), golgi ve endoplazmik retikulum ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir.

Hücrenin yüzeyine bağlandıktan sonra, VacA plazma membran geçirgenliğini artırır ve membranın depolarizasyonuna neden olmaktadır (Szabo ve diğ.,2010).

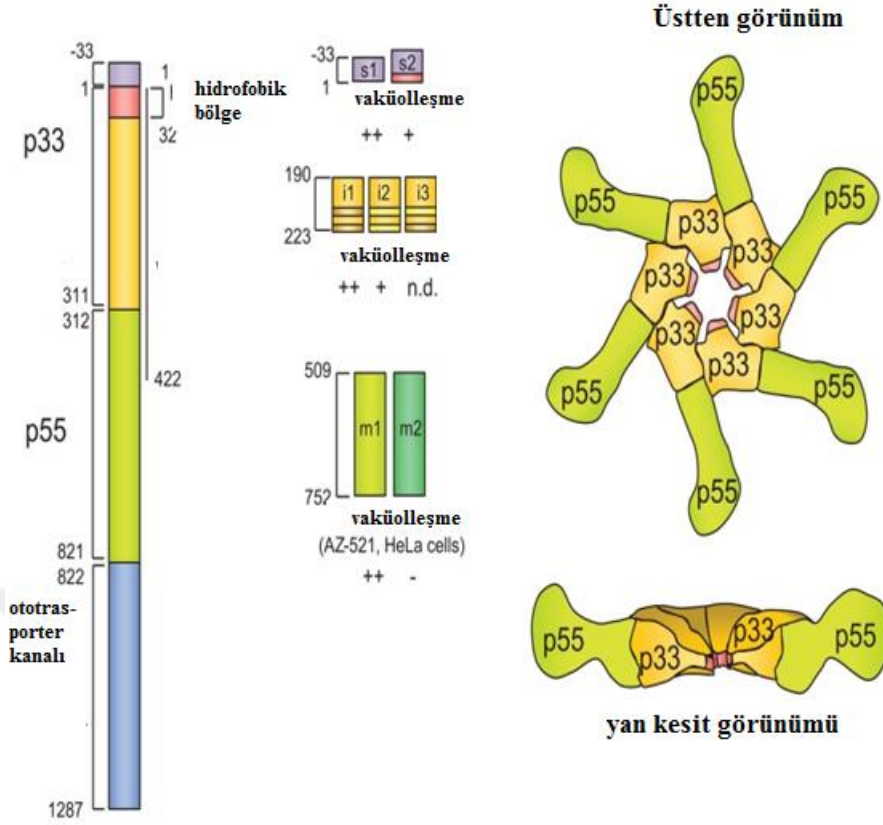
VacA kaynaklı vakuol oluşumu endozom-lizozom yolağından türetildiği düşünülmektedir. Vakuoller ATPaz aktivitesi ile birleşince, endosomal membranlarda VacA anyon kanallarının oluşmasının endozom bölmelerinde ozmatik şişme ve mikroskop ile görülebilecek vakuollerin oluşumuna yol açtığı önerilmiştir (Ricci ve diğ.,1997).

Endositik süreçlerde veya hücre içi trafikte VacA, epidermal büyüme faktörünün (EGF) hücre içi degradasyonunu inhibedilmesine, procathepsin D'nin olgunlaşmasının inhibedilmesine, transferrin reseptör lokalizasyonun pertürbasyonuna ve antijen işlevinin inhibasyonuna neden olmaktadır (Satin ve diğ.,1997, Tan ve diğ.,2011). VacA'nın mitokondri ile ilişkisi mitkondriyal membran potansiyelinin azalmasına, BAX ve BAK'IN aktivasyonuna, sitokrom c salınımına ve mitokondriyal fragmentasyona neden olabilmektedir (Yamasaki ve diğ.,2006, Galmiche ve diğ.,2000, Willhite DR ve Blanke SR,2004).

Tüm *H. pylori* suşları VacA geni içermektedir. Ancak VacA toksin aktivitesi suşlar arasında farklılıklar göstermektedir (Ito ve diğ.,1998). Suşlar arasında VacA protein salınımı sevilerinde de farklılıklar mevcuttur (Cover ve Blaser,1992). VacA dizilerinde üç temel çeşitlilik bölgesi tanımlanmıştır. Bu bölgeler, sinyal dizisi bölgesi(s), ara bölge(i) ve orta (m) bölge'si olmak üzere ayrılır (Rhead ve diğ.,2007). VacA'nın s- bölgesi amino terminal sinyal dizisine ve toksinin amino ucuna karşılık gelmektedir (Mark ve diğ.,2001). İ- bölgesi, VacA'nın p33 alanı içinde bulunmaktadır. M bölgesi, p55 alanının bir bölümüne karşılık gelmektedir (Atherton ve diğ.,1995).

Homolog rekombinasyon *H. pylori*'de sık görülmektedir ve sonuç olarak VacA allleri s-, i- ve m- bölgelerinin tiplerinin birçok kombinasyonunu içerebilmektedir (Atherton ve diğ.,1995). VacA'nın tip s1 formunun aksine tip s2 formları memeli hücrelerinde vakuolasyona neden olmaz. Tip s2 proteinlerde bir hidrofilik 12 amino asit N-terimnal uzantısı bulunur tip s1 de bulunmamaktadır (LETNEY ve Atherton,2000). (Şekil 1.2)

HeLa hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucu m1 aleline sahip VacA'nın aktivitesinin m2 forma sahip VacA toksinine göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Christian ve diğ.,1998). Tip i1 VacA formu jurkar T hücreleri ile yapılan deneylerde i2 VacA formlarından daha aktif olduğu gözlemlenmiştir (Gonzalez ve diğ.,2012).



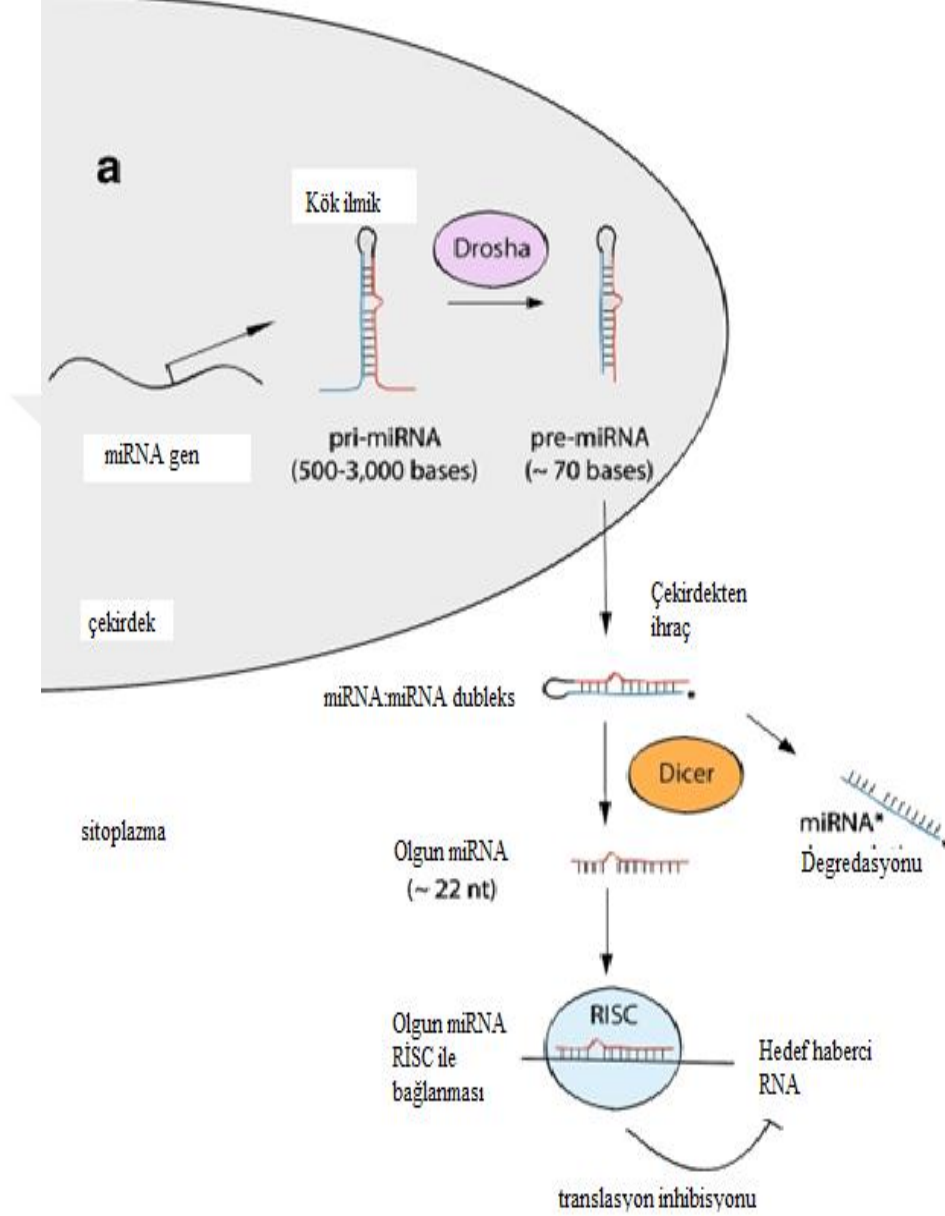
Şekil 1.2: VacA 88 kDa aktif toksin bölgesi. (Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA): Ik-Jung Kim ve Steven R. Blanke, 2012)

Epidemiyolojik çalışmalar *H. pylori* suşlarında bulunan VacA alleli formları ile gastroduodenal hastalık riski arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Özellikle mide kanseri ve peptik ülser riski tip s1, i1 veya m1 formlarını içeren suşlarda tip s2, i2 veya m2 içeren formlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Rhead ve diğ.,2007).

1.3 MikroRNA

MikroRNA'lar (miRNA) ilk olarak 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'da tespit edilmiştir. Ökaryotik canlıların çoğunda bulunmakta olduğu öğrenilmiştir (Lee ve diğ.,1993). İlk tespit edilen miRNA'lar lin-4 ve let-7'dir (Reinhart ve diğ.,2000). Bu miRNA'ları kodlayan genlerin homologları insan dahil birçok hayvanda bulunduğu tanımlanmıştır (Pasquinelli ve diğ.,2000). Yaklaşık 22 nükleotit içeren miRNA'lar insan genomunun yaklaşık %3'ünü oluşturduğu ve protein kodlayıcı

genlerin %30'unu regüle ettiği tahmin edilmektedir (Rajewsky,2006). Gelişme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz dahil, hücredeki fizyolojik aktiviteler için gereklidir (Yazıcıoğlu, 2016)



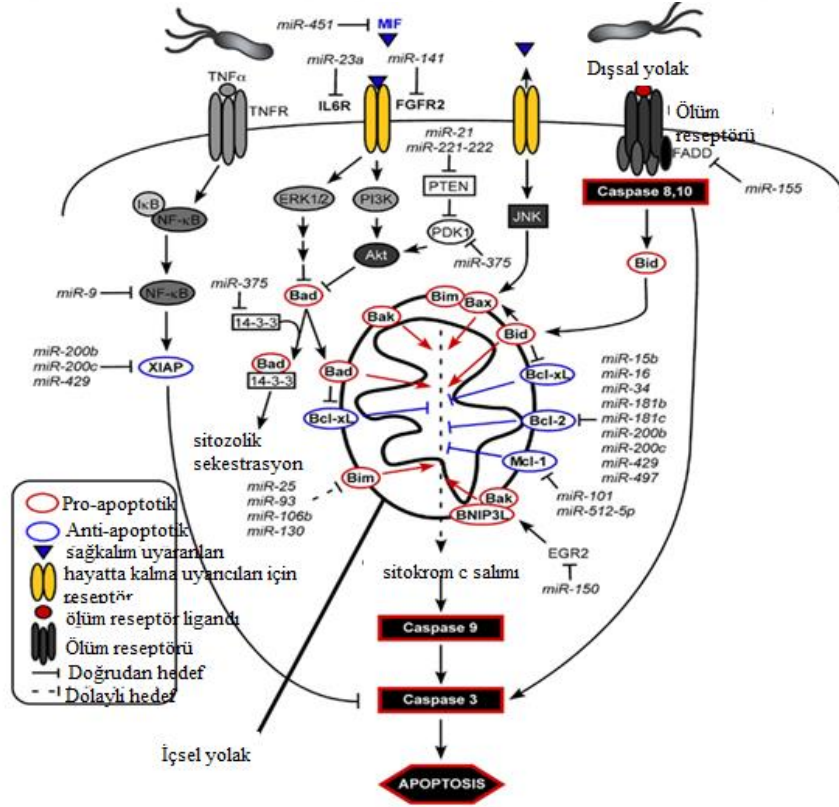
Şekil 1.3: miRNA'ların oluşum mekanizması ve RISC ile bağlanması (MicroRNA: implications for cancer: Sassen ve diğ., 2008)

MiRNA'lar bir veya daha fazla kök ilmik yapısı içeren primer miRNA'lar şeklinde miRNA genlerinden kodlanırlar. Primer miRNA'lar (pri-miRNA) ribonükleaz enzim Drosha ile kök ilmik yapıları çıkartılarak 70 nükleotitik öncül miRNA'lara (pre-miRNA) dönüştürülürler. Pre-miRNA çekirdekten sitoplazmaya

geçmektedir. Sitoplazmada ribonükleaz Dicer tarafından kesilerek yaklaşık 22 nükleotitlik olgun miRNA haline gelmektedir. Olgun miRNA, RNA kaynaklı sessizleştirme kompleksine (RISC) bağlanarak, hedef haberci RNA'nın degradasyonuna veya protein translasyonuna engel olmaktadır (Sassen ve diğ.,2008). (Şekil 1.3)

1.3.1 miRNA ve Mide Kanseri

MiRNA'ların düzenleyici faaliyetlerinin insan hastalıklarıyla, özellikle kanserle ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir. MiRNA'ların anormal ifadesi insan tümöründe karşılaşılmaktadır. Anormal ifade ile miRNA'ların karsenogenezde rol aldığı düşünülmektedir (Calin ve Croce, 2006).



Şekil 1.4: miRNA'ların apoptoz üstünde aldığı roller (The role of microRNAs in Helicobacter pylori pathogenesis and gastric carcinogenesis: Noto ve peek, 2011).

Hücre proliferasyonunu, apoptozu ve istilayı etkileyen, Onko-miRNA ve tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesi değişerek mide karsinogenezise katkıda bulunabilir (Hideyuki ve diğ., 2014) (Şekil 1.4).

Onko-miRNA'lar ve tümör baskılayıcı miRNA'lar mide kanseri progresyonunda önemli rol oynamaktadır (Hao ve diğ.,2017).

Mide kanserinde, çalışması yapılan miRNA'ların ifadesi belirlenmiştir. Onko-miRNA'ların mide kanserinde aşırı ekspresyonu ve tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Mide kanserinde miRNA'ların rollerinin iyi anlaşılması tümör gelişim mekanizmalarına dair yeni anlayışlar ortaya koyabilir (Hideyuki ve diğ., 2014). (Çizelge 1.1)

Çizelge 1.1: Mide kanserinde miRNA'ların gözlemlenen ekspresyonu

MiRNA'lar
Ekspresyon seviyesi artanlar:
let-7a, miR-9, -10a, -10b, -17, -17-5p, -18a, -18b, -19a, -19b, -20a, -20b, -21, -23a, -23b miR-25, -26b, -27, -29b-1, -30b, -31, -34a, -34b, -34c, -92, -98, -99a, -100, -103, -106a miR-106b, -107, -125b, -126, -128a, -130b, -138, -142-3p, -146a, -147, -150, -151-5p miR-155, 181a, -181a-2, -181b, -181c, -185, -191, -192, -194, -196a, -196b, -199a miR-199a-3p, -200b, -210, -214, -215, -221, -222, -223, -296-5p miR-301a, -302f, -337-3p, -340, -370, -421, -520c-3p, -575, -601, -616, -658, -1259
Ekspresyon seviyesi azalanlar:
let-7a, -7f, miR-7, -9, -22, -29c, -30a-5p, -31, -34a, -34b, -34c miR-101, -126, -128b, -129, -129-2, -129-3p, -130b, -133b, -135a, -137, -141, -145 miR-146a, -148, -148b, -149, -152, -155, -181b, -181c, -182, -193b, -195, -195-5p, -197 miR-200, -204, -206, -210, -212, -218, -219-2-3p, -302b, -331-3p, -375 miR-378, -408-3p, -429, -433, -486, -495, -551a, -574-3p, -610, -622, -638, -663, -874

1.3.2 MiR-29A ve Mide Kanseri

MiR-29A'nın çeşitli hastalıklarda karmaşık fonksiyonlara sahip olduğu ileri sürülmektedir. Hem akciğer hem de pankreatik kanser hücre hatlarında bir tümör baskılayıcı olarak davranabileceğini ve bu nedenle, miR-29a'nın over ekspresyonu bu hücre hatlarında invaziv potansiyeli ve proliferasyonunda önemli azalmaya neden olduğu düşünülmektedir (Muniyappa ve diğ.,2009).

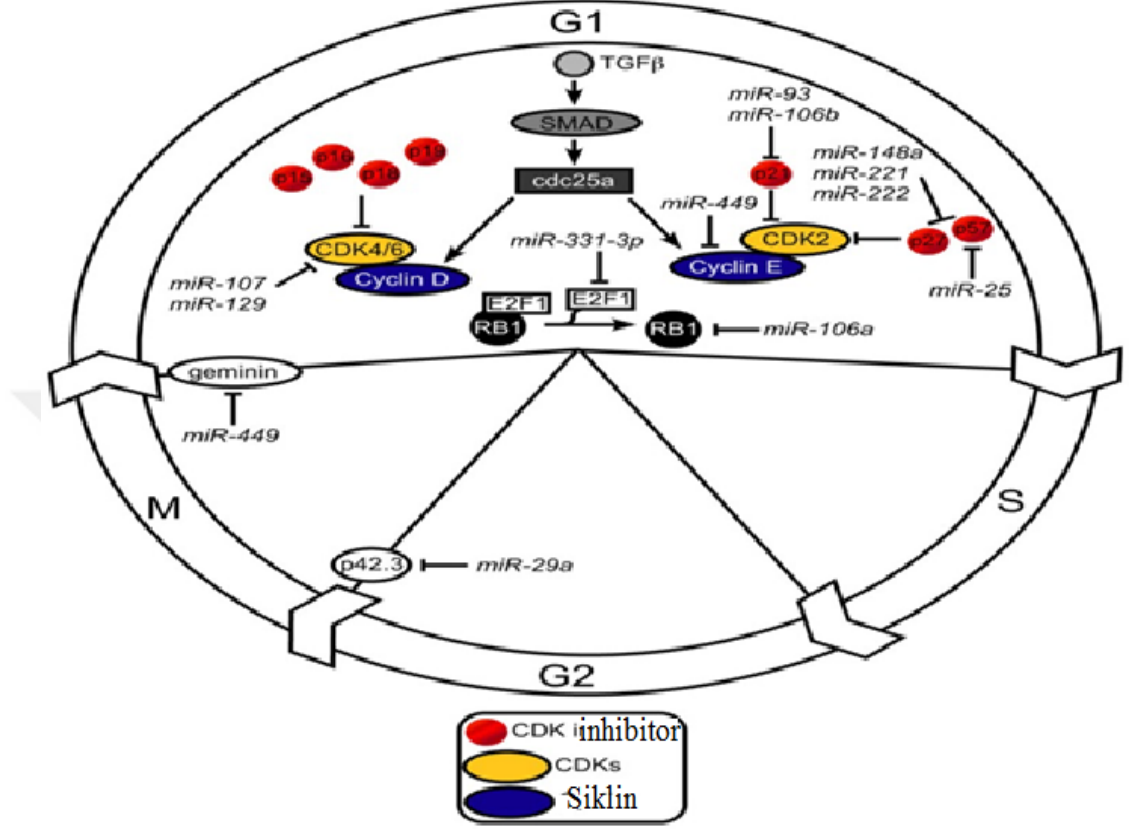
MiR-29a'nın tümör süpresör rolü nöroblastoma, sarkoma ve beyin tümörleri de dahil olmak üzere tümör çeşitliliğinde gözlemlenen down regülasyon ile desteklenmektedir (Xu ve diğ.,2009). Tümör baskılayıcı rolüne zıt olarak insan B-hücresi kronik lenfosittik lösemisinde (B-CLL) Santanam ve diğ. (2010) ve akut miyeloid lösemide (AML) upregüle edilmiştir (Han ve diğ.,2010). Böylelikle olası bir tümör teşvik edici rolü olduğu da önerilmektedir.

Küçük hücre dışı akciğer kanserinde, (KHDAK) miR-29a'nın ekspresyonu, fonksiyonu ve altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Yapılan çalışmada CDC42, mir-29a'nın doğrudan hedef geni olarak tanımlanmıştır. MiR-29a'nın CDC42'yi hedefleyerek KHDAK'da bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. MiR-29a'nın down regülasyonu ters etkilere neden olmaktadır (Yongqiang ve diğ.,2017).

MiR-29a'nın gastrik kanser örneklerinin, sağlıklı örneklerle göre anlamlı derecede down regule olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve istilasını miR-29A'nın normal ifadesinde önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Down regülasyonu sonucunda tümör oluşumu tetiklendiği ortaya konmuştur. Mide kanserinde yapılan çalışmada mir-29a'nın vasküler endotelial büyüme faktörü A'yı (VEGF-A) hedefleyerek baskıladığı gözlemlenmiştir. VEGF-A anjiogenezis, tümör çoğalması ve metastazında anahtar düzenleyicisidir. Bu bulgu ışığında gastrik kanserdeki tümör baskılayıcı rolü ortaya çıkartıldığı düşünülmektedir (Ling ve diğ.,2014).

Yeni tanımlanan ve karakterize edilen p42.3 geni, hücre proliferasyonu ve tümöre özdeşliği ile ilişkilidir. P42.3 insan mide kanseri için up regule olduğu saptanmıştır. MiRNA'ların birçok hücrenel süreçte hayati düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda p42.3 geni ile düzenleyici ilişkiye sahip miRNA'lar tespit edilmeye çalışıldı. MiR-29a'nın, 3'UTR'ye direkt olarak bağlanmasıyla hem mRNA hem protein seviyelerindeki p42.3 ekspresyonunu baskılayabileceği gözlemlenmiştir. MiR-29A'nın diğer bir hedef geninin p42.3 olduğu tespit edilmiştir. Mide kanseri hücre hatları ve doku örneklerinde özellikle miR-29a ve p42.3 ekspresyonu arasında ters bir ilişki gözlemlenmiştir (Yun ve diğ.,2011). MiR-29A'nın mide kanserinde önemli ölçüde down regüle olduğu bildirilmiştir. MiR-

29A'nın down regülasyonu p42.3'ün ekspresyonunda artışa neden olarak hücre döngüsü progresyonunu ve proliferasyonunu teşvik etmektedir (Jennifer ve Richard,2011). (Şekil 1.5)



Şekil 1.5: Mir-29a'nın hedef geni p42.3'ün şeması (The role of microRNAs in Helicobacter pylori pathogenesis and gastric carcinogenesis: Noto ve peek, 2011).

1.3.3 MiR-200A ve Mide Kanseri

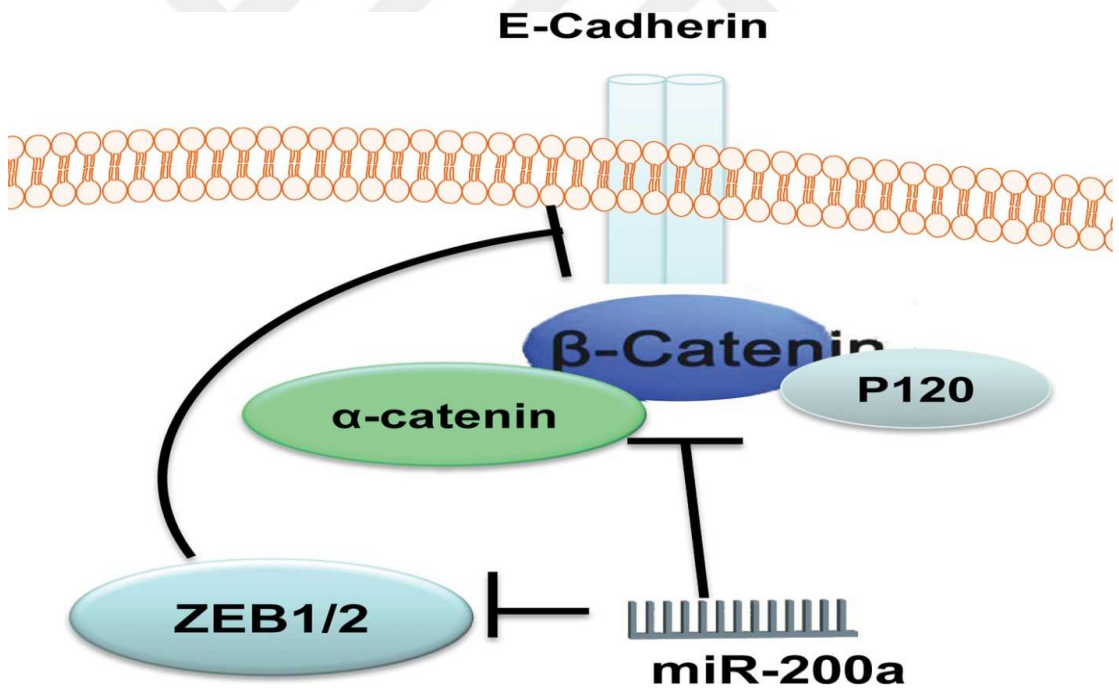
Mir-200a, mir-200 ailesine dahil olan 5 miRNA'dan birtanesidir. MiR-200 ailesi miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429 miRNA'larını kapsamaktadır. MiR-200 ailesinin kanserli örneklerin normal örneklerle kıyaslanması sonucunda anlamlı derecede down regüle olduğu görülmüştür. Gastrik kanserinde, kanserli örneklerin down regüle olduğu gözlemlenmiştir (Chang ve diğ.,2015).

Mir-200a'nın birçok kanser örneklerinde down regüle olduğu bildirilmiştir. Ancak farklı kanser örneklerinde up regülasyonu dikkat çekiyordu. Dokuya özgü rolünün değiştiği düşünülmektedir (Chen ve diğ.,2013). Gastrik adenokarsinoma

örneklerinde down regüle olduğu ancak özofagus adenokarsinoma örneklerinde up regüle olduğu rapor edilmiştir (Li ve diğ.,2010, Hu ve diğ.,2010).

Bazı çalışmalardaki bulgular mide kanseri dokularında miR-200a'nın up regüle olduğunu ve erkek hastalarda oranın daha yüksek olduğundan bahsedilmiştir (Zhaofeng ve diğ.,2015). Mide kanserinde miR-200a'nın over ekspresye edildiği saptanmıştır (Jennifer ve Richard,2011). *H. pylori* enfekte dokularda miR-200a ekspresyon seviyesinde anlamlı olarak azalma olduğu tespit edilmiştir (Diogo ve diğ.,2015).

MiR-200a'nın, β -katenin ile etkileşerek Wnt / β -katenin sinyalini bastırdığını ve böylece migrasyonu, istilayı ve proliferasyonu inhibe ettiğini bulunmuştur. Potansiyel miR-200a hedef genleri ZEB1 ve ZEB2'nin ekspresyonu immünohistokimyasal analizlerle tespit edilmiştir ve miR-200a ve ZEB1 / ZEB2 ifadeleri ters ilişkili olduğu saptanmıştır



Şekil 1.6: MiR-200a ekspresyonu sonucunda E-cadherin üzerindeki baskılanma (MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin: Juan Su ve diğ., 2012).

. ZEB1 ve ZEB2'nin epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecine dahil olduğu gösterilmiştir. MiR-200a'nın bir tümör baskılayıcı faktör olarak hareket ettiğini, EMT

ve tümör büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır. ZEB1 ve ZEB2'nin çekirdeklerde eksprese edildiği immüno Floresan boyama ile saptanmıştır. MiR-200a'nın ekspresyonu sonucunda ZEB1/ZEB2'nin azaldığı ortaya çıkartılmıştır (Şekil 1.6). Aynı zamanda Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivitesini düzenleyen miR-200a'nın yeniden ekspresyonu, sitomembranda E-kadherin'in up regülasyonu ve N-kadherin'in down regülasyonu ile EMT'yi inhibe ettiği ve β -katenin yerini çekirdekten sitoplazmaya kaydırıldığı gözlemlenmiştir. E-kadherin azaltıldığında veya silindiğinde β -katenin, katenin / kadherin komplekslerinden salındığını ve çekirdeğe translokasyona tabi tutulduğu ve Wnt / β -katenin sinyal yolunu harekete geçirdiği gözlemlenmiştir. E-cadherin üzerindeki etkileri yoluyla bir tümör baskılayıcı olarak görev yaparak Wnt / β -katenin yolunu bastırmaktadır (Cong ve diğ.,2013).

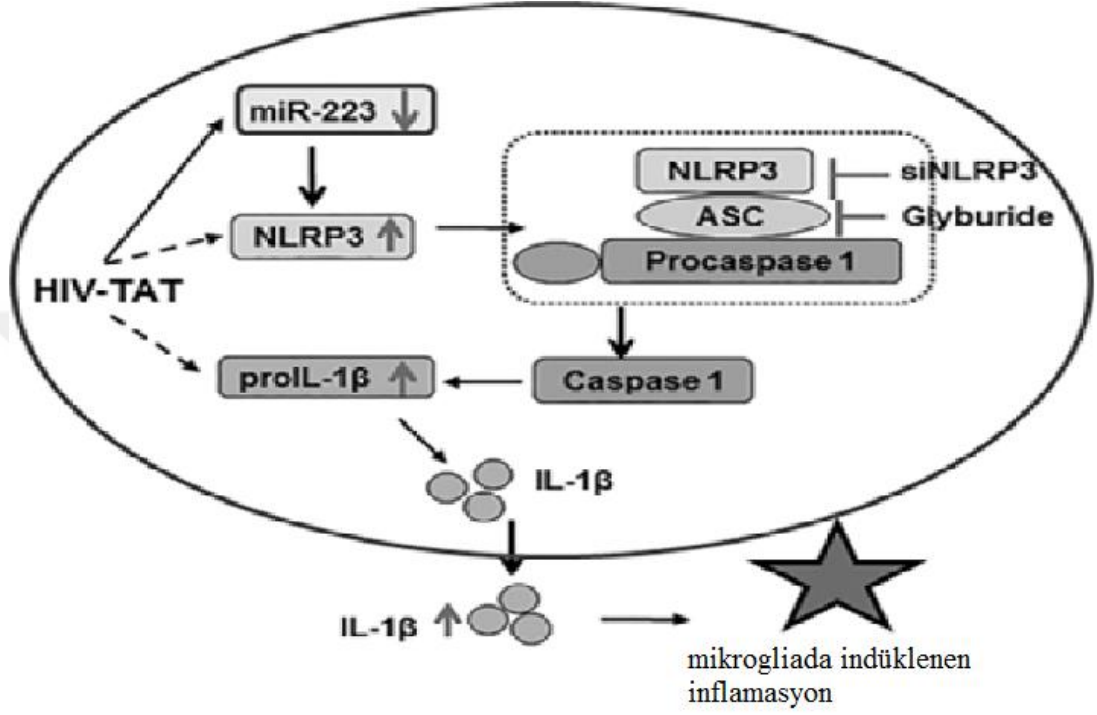
1.3.4 MiR-223 ve Mide Kanseri

Mide kanserinde yapılan çalışmalar sonucunda miR-223'ün yalnızca metastatik kanser hücrelerinde over eksprese edildiği saptanmıştır. Metastatik olmayan gastrik kanser hücrelerinde istilayı ve migrasyonu tetiklediği tespit edilmiştir. MiR-223, transkripsiyon faktörü Twist tarafından indüklenmektedir. MiR-223, PB41L3 ekspresyonunu 3'-çevrilmemiş bölgelerini hedefleyerek post transkripsiyonel olarak down regüle eder (Li ve diğ.,2011).

FBXW7 / hCDC4, bir tümör baskılayıcıdır (Akhoondi ve diğ.,2007). Yapılan çalışmalar sonucunda miR-223'ün post transkripsiyon olarak FBXW7 / hCdc4'ün ekspresyonunu down regüle ettiği tespit edilmiştir. MiR-223 hücrel apoptozu, proliferasyonu ve işgali kontrol ettiği de gösterilmiştir (Li ve diğ.,2012).

MiR-223 over ekspresyon koşullarında NLRP3 proteininin birikmesini ve IL-1 β üretimini engellemektedir (Haneklaus ve diğ.,2012). (Şekil 1.7) MiR-223'ün karmaşık bir mekanizması mevcuttur. MiR-223'ün IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α içeren enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ettiği gibi CD40, CD68, CD80 ve CD163'ün ekspresyonunu düşürdüğü saptanmıştır. MiR-223 IRAK-1, NF- κ B ve MAPK proteinlerini down regüle ettiği tespit edilmiştir (Wang ve diğ.,2016).

H. pylori enfeksiyonu miR-223'ün ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir. Artan ifadesi sonucunda hücre çoğalmasını ve göçü tetikleyerek gastrik kanser gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Ma ve diğ.,2014).



Şekil 1.7: miR-223 down regülasyonunu (HIV-1 Tat primes and activates microglial NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation: Ernest ve diğ., 2017).

2.AMAÇ

H. pylori mide epitelinin lümen yüzeyinde kolonize olan bir gram negatif bakteri olduğu bilinmektedir (Li ve diğ., 2016) *H. pylori* mide kanseri için ana risk faktörüdür (Noormohammad ve diğ., 2016).

H. pylori vakuol oluşturma kabiliyetine sahip bir gene sahiptir. VacA adındaki bu gen toksisitesi oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Hücresel yolaklarda birçok etkiye sahiptir. Vakuol oluşturma kabiliyeti haricindeki etkilerden en önemlisi, mitokondriden sitokrom C salınımını indüklemesi ile apoptozu tetiklemesidir (Galmiche ve diğ., 2000).

İnsan genomunun %3'ünü oluşturan miRNA'ların anormal ifadesi karsinogenezi tetiklediği bilinmektedir (Calin ve Croce,2006). Mide kanserinde çalışılan miRNA'larında anormal ifadeler gözlemlendiği bildirilmiştir (Hideyuki ve diğ., 2014). Mide kanserinde yapılan çalışmalar sonucunda *H. pylori* enfeksiyonun ve farklı VacA genotiplerinin miRNA'ların ifadelerini etkileyebileceği görülmüştür (Diogo ve diğ., 2015).

Bu zamana kadar *H. pylori* enfekte kanserli mide dokularında farklı VacA genotiplerinde, mir-29a, mir-223 ve mir-200a miRNA'larının ifade değişimlerinin analizine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır Bu çalışmada *H. pylori* VacA genotiplerinin mir-29a, mir-223 ve mir-200a miRNA'larının ekspresyon seviyesine bakılarak analizi yapılması hedeflenmiştir. *H. pylori* enfekte altı mide kanseri örneği ile *H. pylori* negatif AGS hücre hattının ekspresyon seviyeleri kıyaslanmıştır. AGS hücre hattındaki miRNA ifadesine göre *H. pylori* enfekte dokular arasındaki ifade farklılıkları araştırılmıştır. *H. pylori* VacA'nın farklı genotiplerinin bu çalışmaya dahil edilen miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki etki gösterilmeye çalışılmıştır.

3.MATERYAL

3.1 Çalışmada Kullanılan Mide Kanseri Örnekleri

Bu çalışmaya T.C. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mide kanser teşhisi konup mide ameliyatı geçiren altı hastanın tümör dokusu dahil edilmiştir. T.C. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulunun 3.9.14 tarihli 1362 sayılı etik kurulu izni ile mide doku örnekleri toplanmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen altı tümör doku örneği, NPO HIPEC sorumluluğunda 2016-2017 yılları arasında TC. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mide kanser teşhisi konup, mide ameliyatı geçiren hastalardan temin edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen mide kanseri doku örneklerinden DNA izolasyonu için kullanılacak olanlar absolut etanol, RNA izolasyonu için kullanılacaklar ise RNA later solüsyonu içeren tüplere aktarıldı. Mide dokularını muhafaza etmek için -196°C sıvı nitrojende saklandı.

3.2 Kimyasallar

Kimyasallar	Kullanım Alanı
➤ RNA later (Ambion)	➤ RNA İzolasyonu için dokuların saklanması.
➤ Absolute ethanol (Sigma-Aldrich)	➤ Genel
➤ 2-merkaptoethanol (Merck)	➤ RNA izolasyonu
➤ Molecular Biology Grade ethanol ≥99.8 (Sigma-Aldrich)	➤ Genel
➤ Agarose (Sigma-Aldrich)	➤ Elektroforez
➤ EtBr (Thermo Fisher)	➤ Elektroforez

➤ Gene Ruler 50bp, 100bp, 1kb DNA ladder (Thermo Fisher)	➤ Elektroforez
➤ Tris (Sigma-Aldrich)	➤ Elektroforez
➤ Edta (Sigma-Aldrich)	➤ Elektroforez
➤ Borik asit (Sigma-Aldrich)	➤ Elektroforez
➤ 6x Jel Loading Dye (BIO LABS)	➤ Elektroforez
➤ DMEM F12 (Thermo Fisher)	➤ Hücre kültürü
➤ Penicilin Streptomisin (Thermo Fisher)	➤ Hücre kültürü
➤ FBS (Fetal Bovine Serum) (Thermo Fisher)	➤ Hücre kültürü
➤ PBS (Phosphate Buffer Saline) (GIBCO)	➤ Hücre kültürü
➤ DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma-Aldrich)	➤ Hücre kültürü

3.3 Kullanılan 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)
- ❖ Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μL) (Thermo-Fisher) (Katalog numarası: 10342-053)
- ❖ SensiFAST SYBR® No-ROX Kit (Bioline) (Katalog numarası: BIO-98005)
- ❖ MystiCq microRNA SYBR Green qPCR ReadyMix (2X) (Sigma-Aldrich) (Katalog numarası: MIRRM03)

3.4 Cihazlar

- ❖ Finnpiquette™ F2 Variable Volume Single-Channel Pipettes (Thermo Fisher)
- ❖ MD592 Süper Mikrodalga (Arçelik)
- ❖ Elektroforez Güç Kaynağı EC250-90 (Thermo Fisher)
- ❖ Elektroforez Tankı (Claver)
- ❖ -80 Buzdolabı (Haier-Biomedikal)
- ❖ Hassas Terazı (Precisa XB220A)

- ❖ Distile Su Cihazı Smart 2Pure (Thermo Fisher)
- ❖ Dik Tip Otoklav (BES)
- ❖ Mini Spin Plus (Eppendorf)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı MR3001K (Heidolph)
- ❖ Thermal cyclers T100 PCR (BioRad)
- ❖ CFX Connect Real-Time System (BioRad)
- ❖ Minisipin (Four E'S Scientific)
- ❖ MultiSkan GO μ Drop (Thermo Fisher)
- ❖ Homojenizatör (Retsch MM400)
- ❖ Laminar Flow (Faster SafeFast Classic)
- ❖ Dri-block DB-2D (Techne)
- ❖ AF 80 Buz Cihazı (Scotsman)
- ❖ Universal 320 R Santrifüj Cihazı (Hettich)
- ❖ Vorteks (Heidolph Reax top)
- ❖ Su banyosu WNB 14 (Memmert)
- ❖ İnkübaktör İncu 2 (Memmert)
- ❖ Azot Tankı (Thermo Fisher)
- ❖ PH Metre Table top (İsolab)
- ❖ Etüv FN 500 (NÜVE)
- ❖ Jel görüntüleme cihazı GEN-BOX-imagER CFX (ER Biyotek)
- ❖ AXİO invert Vert.A1 mikroskop (Zeiss)
- ❖ CK40 ışık mikroskobu (Olimpus)
- ❖ Pipet Filler (Thermo Fisher)
- ❖ SafeVac Vacuum Aspirator (SCIOLOGEX)

3.5 Sarf Malzemeler

- ❖ Filtreli uç (10 μ l, 120 μ l, 200 μ l 1000 μ l) (İsolab)
- ❖ Pipet ucu (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l) (İsolab)
- ❖ Eppendorf (0.5ml, 1.5ml, 2.0ml)
- ❖ PCR tüpü (0.2ml)
- ❖ Cryo tüp (2ml) (Greiner Bio-one)
- ❖ Rack (İsolab)
- ❖ Steril bistüri uç (Braun)

- ❖ Platemax® UltraClear Sealing Film (Axygen)
- ❖ PCR ® Microplate (Axygen)
- ❖ Parafilm (BEMIS)
- ❖ 15ml ,25ml, 50ml falkon (Isolab)
- ❖ 250ml Erlen (Isolab)
- ❖ Mezür 50ml, 500ml, 1000ml (Isolab)
- ❖ Flask (25cm²,75cm²) Corning (Sigma-Aldrich)
- ❖ Corning Dish (150cm²) (Sigma-Aldrich)
- ❖ Cam pastör pipet (Marienfeld)
- ❖ Corning® Costar® Stripette® serological pipettes 5ml-10ml-25ml-50ml (Sigma-Aldrich)
- ❖ Beher (Isolab)
- ❖ Eldiven (Beybi)
- ❖ Corning® 150mL Vacuum Filter (Sigma-Aldrich)
- ❖ Thoma lamı (Marienfeld)

3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bileşenleri

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

MgCl₂ 25mM (Thermo Fisher Scientific)

dNTP karışımı, her biri 10mM (Thermo Fisher Scientific)

10X (NH₄)₂ SO₄'lü Taq Tampon: 750mM Tris-HCl (pH 8.8)

200mM (NH₄)₂ SO₄

0,1% (v/v) Tween 20

(Thermo Fisher Scientific)

3.7 Elektroforez

Elektroforezde kullanılan jeller 0,5X TBE ile %2 agaroz ile hazırlandı. Çizelge 3.1 de TBE hazırlanması ve çizelge 3.2 agaroz jel hazırlama koşulları verilmiştir.

Çizelge 3.1: 5x TBE Hazırlama

Reaktifler	Hacim
0,5 M EDTA (ph=8)	25 mM
Tris-Baz	1.1M
Borik asit	900mM
PH	8.3

Çizelge 3.2: Agaroz jel hazırlama

%2'lik jel	
Agaroz	1 g
TBE	50 ml

6X DNA Jel yükleme boyası:

Etidyum Bromür (EtBr):

GeneRuler™ 100bç DNA Ladder :

10mM Tris-HCl (pH 7,6)

0.03% Bromfenol mavisi

0.03% Ksilen siyanol FF

60% gliserin

60mM EDTA

(Thermo Fisher Scientific)

10 mg/ml.

1X DNA Ladder

1X Yükleme Boyası

4X Deiyonize Su

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

3.8 AGS Hücre Hattı için Besiyeri Bileşenleri

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

AGS hücre hattı için kullanılan besiyeri koşulları çizelge 2.3 ve dondurma medyumu çizelge 2.4'de gösterilmiştir.

Her hazırlanan besiyeri aşamasında tüm bileşenler 0.22µm por içeren filtreden geçirildi.

Çizelge 3.3: AGS hücre hattı besiyeri

AGS hücre hattı için besiyeri hazırlama	
DMEM/F12	%89
FBS	%10
Penicilin Streptomycin	%1

Çizelge 3.4: Dondurma medyumu

AGS hücre hattı için dondurma medyumu hazırlama	
DMEM/F12	%50
FBS	%40
DMSO	%10

3.9 PZR primerleri

H. pylori VacA allellerinin belirlenmesi için çizelge 2.5'de gösterilen primerler kullanılmıştır.

Primerler 100 µM stok halinde alındı. Kullanım için stoktan 10 µM'a dilüe edildi. Primerleri uzun süre saklamak için -20°C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.5: PZR primer dizileri

PRİMER	DİZİ (5'-3')	PZR ÜRÜN BOYUTU
VA1F-VA1R	5'ATGGAATACAACAAACACAC 3' 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	S1: 259 bp S2:286 bp
VA3F-VA3R	5' GCTCAAATGCGGTCATGG3' 5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'	M1:290 bp
VA4F-VA4R	5' GGAGCCCCAGAAACATTG 3' 5' CATAACTAGCGCCTTGAC 3'	M2:352-400 bp
VACF1-C1R	5' GTTGGGATTGGGGGAATGCCG 3' 5' TTAATTAACGCTGTTTGAAG 3'	İ1:426
VACF1-C2R	5'GTTGGGATTGGGGGAATGCCG 3' 5'GATCAACGCTCTGATTGA 3'	İ2:432

3.10 Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Primerleri

RT-PCR için MystiCq® microRNA qPCR Assay Primerleri kullanılmıştır. Primer dizileri çizelge 2.6'da gösterilmiştir. Her bir ileri primer için poli A kuyruğu içeren MystiCq Universal PCR Primer (10 µM) geri primer olarak kullanıldı.

Çizelge 3.6: RT-PCR primerler

İleri Primerler	Primer dizileri
miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miR-223-5p	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU
RNU6-1	GUGCUCGUUCGGCAGCACAUUACUAAAAUUGGAACGAUA CAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCA AAUUCGUGAAGCGUCCAUAUUUU

4. YÖNTEM

4.1 Mide Kanseri Dokularından Bakteri Genomik DNA İzolasyonu

Mide kanseri dokularından, *H. pylori* enfeksiyon tespiti ve VacA genotipinin belirlenmesi için kullanılacak DNA örnekleri PureLink™ Genomic DNA Mini Kit ile izole edilmiştir. DNA izolasyonu sonrasında µDrop ile saflığı ve konsantrasyonu tespit edildi. DNA konsantrasyonu $Abs_{260} \times 50 \times (10/0.52)$ formülüyle belirlendi. DNA saflığı ise A260/A280 oranıyla tespit edildi. A260/A280 oranı 1.8; saf DNA'yı, $A_{260}/A_{280} > 1.8$; RNA kontaminasyonunu, $A_{260}/A_{280} < 1.8$; protein kontaminasyonunu göstermektedir.

4.2 Mide kanseri dokusundan RNA izolasyonu

Mide kanseri dokularından ve AGS hücre hattından cDNA sentezi yapabilmek için RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için NucleoSpin® RNA kiti kullanılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında µDrop ile saflığı ve konsantrasyonu tespit edildi. RNA konsantrasyonu $A_{260} \times 40 \times (10/0.52)$ formülüyle belirlendi. RNA saflığı ise A260/A280 oranıyla tespit edildi. A260/A280 oranının 1,8-2,1 arasında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. RNA konsantrasyonları çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: İzole edilen RNA konsantrasyonları

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

4.3 Total RNA'dan cDNA sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi yapmak için MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix kullanıldı. Bu aşamada yüksek konsantrasyonlu RNA örnekleri 1 ng'a düşük konsantrasyona sahip RNA örnekleri 500-400 ng'a sabitlendi. Kullanılan kit iki aşamada gerçekleşmektedir.

1. cDNA sentez bileşenleri kısaca santrifüj yapıldı.
2. Çizelge 3.1'de bulunan reaktifler 0,2 ml'lik PZR tüplerine konuldu.
3. Tüpler kısaca vortekslendi.
4. 37°C 'de 60 saniye, 70°C'de 5 dakika inkübe edildi.

Çizelge 4.2: Poli (A) kuyruk ekleme reaktifleri

Reaktif	Hacim
Poly (A) Tailing Buffer (5x)	2 µl
RNA MİKTARI	1-5 µl (0,4 µg-1 µg)
Nuclease-free-water	1-6 µl
Poly(A) Polymerase	1 µl
Total Hacim	10 µl

5. Tüplere kısaca spin atılarak buza konuldu.
6. Çizelge 1.2'deki reaktifler eklendi.
7. Kısaca spin atılarak 42°C 'de 20dk, 85°C'de 5dk inkübe edildi.

Çizelge 4.3: cDNA sentez reaktifleri

Reaktif	Hacim
MystiCq microRNA cDNA Reaction Mix	9ul
ReadyScript Reverse Transcriptase	1ul
Total Hacim	20ul

4.4 PZR ile VacA Allellerinin Saptanması

PZR, sentetik oligonükleotid dizileri yardımıyla spesifik DNA dizilerinin çoğaltılması işlemidir. Çoğaltılacak DNA bölgesine göre PZR protokülü ve bileşenleri değişiklik göstermektedir. Denatürasyon işlemi ile DNA'nın çift zincirli yapısı yüksek ısı ile birbirinden ayrılmaktadır. Bağlanma aşamasında daha düşük ısılarla oligonükleotid primerlerin tek zincirli DNA üzerinde eşleniklerine bağlanması gerçekleşir. Son aşamada ısı 72°C'ye kadar çıkartılarak DNA polimeraz aktivasyonu sağlanır. Bu aşamanın süresi amplifiye edilecek DNA boyutuna göre değişiklik göstermektedir. Bu basamaklar oluşturulacak ürüne bağlı olarak 25 ile 40 tekrar şeklinde uygulanır. Her bir tekrar sırasında teorik olarak DNA miktarı iki katına çıkmaktadır (Türk Biyoinformatik Grubu, 2007). Mide kanseri dokusundan izole edilen DNA'larda VacA varlığını ve allellerini saptamak için PZR yapıldı. PZR reaksiyonu reaktifleri çizelge 4.4 ve PZR koşullar çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.4: PZR REAKSİYONLARI

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	Stok konsantrasyon	Kullanılan miktar	Çalışma konsantrasyonu
Tampon	10X	2,5ul	1X
dNTP	10 mM	0,5ul	0,2 mM
MgCl ₂	25 mM	2.5ul	2.5 mM
İleri primer	10uM	0,5ul	0,2 uM
Geri primer 10uM	10uM	0,5ul	0,2 uM
Taq polimeraz (5U)	5 U/μl	0,25ul	1.25U
DNA	100-400ng/ul	1 ul (100-400ng/ul)	
Toplam hacim	-	25ul	

Çizelge 4.5: PZR koşulları

İlk denatürasyon	95°C	2dk	
Denatürasyon	95°C	30sn	(35 Döngü)
Bağlanma	55°C	30sn	
Uzama	72°C	1dk	
Son uzama	72°C	5dk	

VacA s- bölgesi allelini belirlemek amacıyla VA1F ve VA1R primer çifti kullanıldı. M- bölgesi allel m-1 için VA3F ve VA3R primer çifti, allel m-2 için VA4F ve VA4R primer çifti kullanıldı. İ- bölgesi için VACF1 ve C1R veya C2R primer çifti kullanıldı.

4.5 AGS Hücre Kültürü

Yeditepe Üniversitesi'nden AGS hücre hattı dondurulmuş şekilde alınarak sıvı azot içinde taşındı. Önceden 37 °C 'ye ayarlanmış su banyosunda hücre hattı çözdürüldü. Çözünen AGS hücre hattı 5 ml complete medyum içeren falcona aktarıldı. Complete medyum; %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penicilin Streptomycin ve DMEM/F12 medyum ile hazırlandı. Dondurma medyumunu uzaklaştırmak için 5 dakika 1000 rcf +4 °C'de santrifüj edildi. Pelleti kaldırmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet 8 ml DMEM/F12 complete medyum ile çözdürüldü. 8 adet 75 cm²'lik flasklara 14 ml complete medyum eklendi. Her bir flaska 1 ml AGS hücre hattının ekimi yapıldı.

2 veya 3 günde bir pasaj yapıldı. Pasaj yapılırken öncelikle flasktan medyum uzaklaştırıldı. 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) ile iki defa yıkama yapıldı. 2 ml Tripsin eklendi ve 5 dakika karbondioksitli inkübatörde 37°C'de inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Flask yüzeyinden kalkan hücreleri 5 ml complete medyum ile toplanarak 15 ml'lik falkona aktarıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika 300 rcf'de santrifüj yapıldı. Peleti bozmadan süpernatant uzaklaştırıldı. 8 ml complete medyum ile pelet çözdürüldü. 75 cm²'lik flasklara 1:8 oranında ekim yapıldı.

Her yapılan pasaj işleminde yaklaşık 5 milyon hücre 1 ml'lik dondurma medyumunu ile donduruldu. Dondurma medyumunu; %50 DMEM/F12, %40 FBS ve %10

DMSO ile hazırlandı. Medyumlar hazırlanırken filtreden geçirildi. AGS hücre hattı miRNA ekspresyon analizleri için kullanıldı.

4.6 RT-PCR ile miRNA Ekspresyon analizi

Gerçek zamanlı PZR, güvenli kantitatif bir yöntemdir. PZR ürünü ile floresans yoğunluğunu ilişkilendiren çeşitli problemler kullanılmaktadır. RT-PZR dört faza ayrılmaktadır. PZR'ın ilk 10-15 döngüsü doğrusal zemin fazıdır. Bu fazda PZR yeni başlamakta ve floresan sinyal, arka planı aşmadığından sadece arka plan floresansı tespit edilebilmektedir. Erken üssel fazda floresan seviyesi eşik değerine ulaşmaktadır. Floresanın bu eşığa ulaştığında döngü eşığı (Ct) sayısını tanımlamaktadır. Üssel faz boyunca her döngüde DNA miktarı iki katına çıkar. PZR bileşenlerinin miktarı ve etkinliği azalmaya başladığında reaksiyon doğrusal faza geçer. Reaksiyon oluşmadığı ve floresan seviyesinde artış olmadığı zaman bir plato fazına geçiş yapar. Böylece PZR dört fazını gerçekleştirmiş olur (Wong ve Medrano, 2005).

Mide kanseri dokularında olgun miR-200a-5p, miR-29a-3p ve miR-223-5p ekspresyonlarına analiz etmek için RT-PCR gerçekleştirildi. *H. pylori* enfekte dokuları analiz etmek için AGS hücre hattı kontrol grubu olarak kullanıldı. Normalizasyon için RNU6-1 internal kontrolü kullanıldı. RT-PCR'da kullanılan cDNA'lar 20 ng/ μ l'ye sabitlendi. RT-PCR reaktifleri çizelge 4.6 ve RT-PCR koşulları çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6: RT-PCR reaktifleri

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Hacim	Çalışma konsantrasyonu
SensiFAST SYBR® Non-ROX Mix	2X	5 μ l	1X
MystiCq microRNA qPCR Assay Primer	10 uM	0,4 μ l	400 nM
MystiCq Universal PCR Primer	10 uM	0.4 μ l	400 nM
cDNA	20ng/ μ l	1 μ l	
Nuclease –free-water	-	3,2 μ l	
Toplam hacim	-	10 μ l	

Çizelge 4.7: RT-PCR reaksiyon koşulları

İlk denatürasyon	95 °C	2 dk	
Denatürasyon	95 °C	5 sn	40
Bağlanma	60 °C	30sn	döngü

Çift tekrar olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar RNU6-1 ile normalize edilerek ΔCT 'si elde edildi. ΔCT elde etmek için çift tekrar ortalaması şeklinde test edilen örneklerin sonuçları ile RNU6-1 çıkartıldı. Elde edilen ΔCT 'ler ile $\Delta\Delta Ct$ hesaplandı. $\Delta\Delta Ct$ elde edildikten sonra ekspresyon değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. Çift tekrarlar arasındaki hata payı hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ seviyeleri üzerinde gösterildi.

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

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

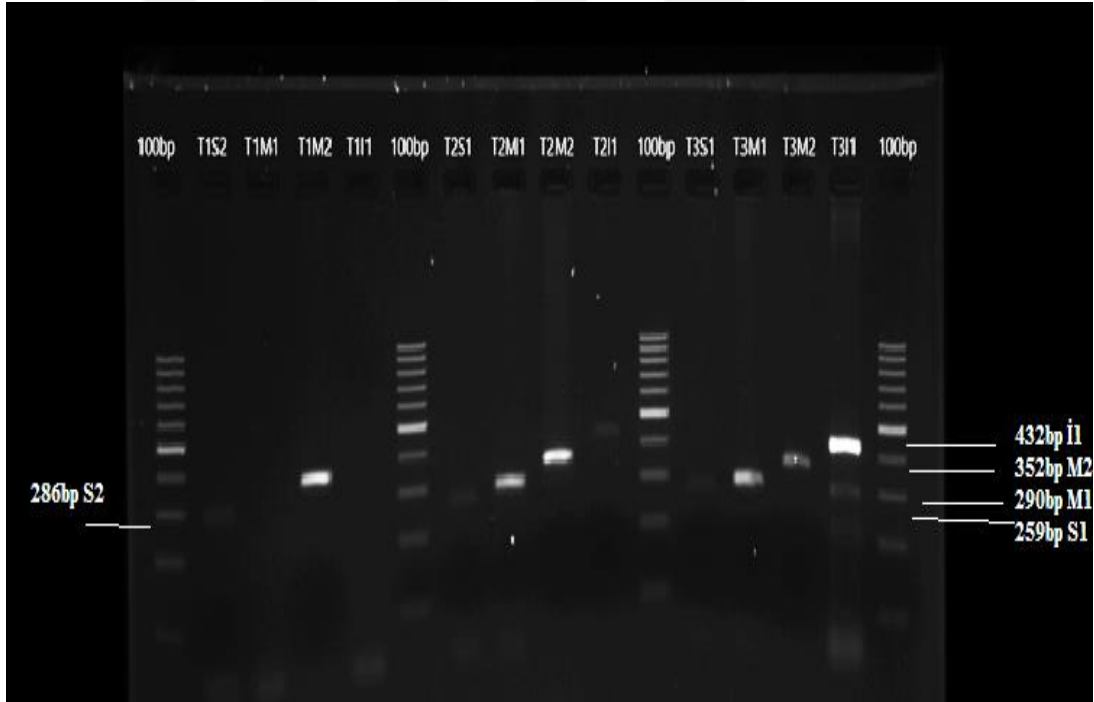
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{test örnek}) - \Delta Ct (\text{referans örnek})$$

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

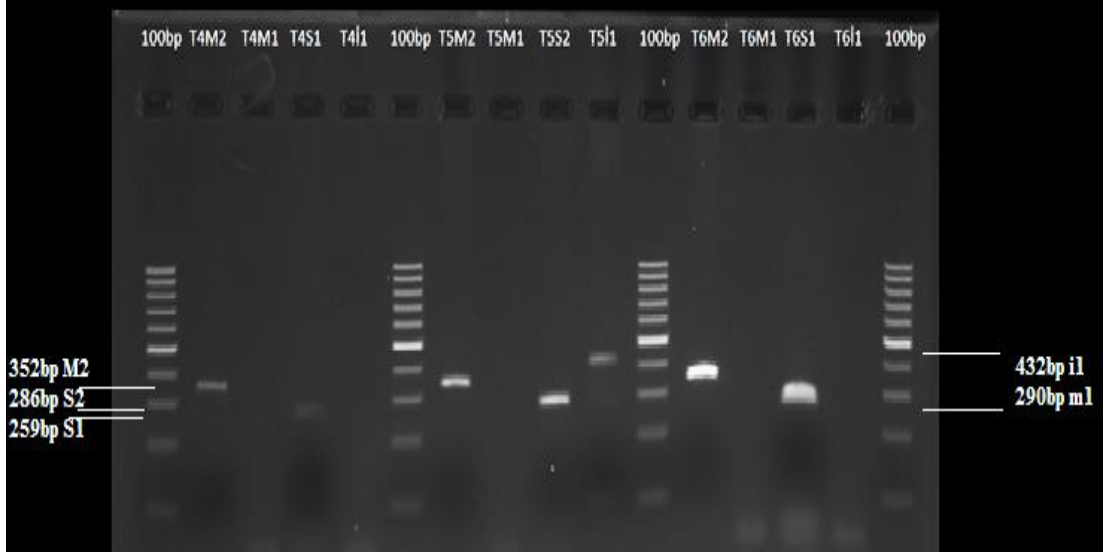
5.BULGULAR

5.1 PZR ile VacA Allellerinin Saptanması

Mide kanseri dokularında yapılan PZR sonucunda çalışmaya dahil edilen 6 dokuda da bakteri enfeksiyonu saptandı. Jel görüntüleri ile VacA bölgesinin varlığı ve allelleri belirlendi. S1 allel için 259 bp, s2 allel için 286 bp, M1 allel için 290 bp, m2 allel için 352-400 bp ve i1 allel için 426bp uzunluğunda bantlar gözlemlendi. İ2 allel için yapılan PZR sonucunda 6 dokuda bantta rastlanılmadı. Jel görüntüleri Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de gösterildi.



Şekil 5.1: T1, T2 ve T3 adlı dokuların PZR ile VacA polimorfik bölgelerinin tespiti.



Şekil 5.2: T4, T5 ve T6 adlı dokuların PZR ile VacA polimorfik bölgelerinin tespiti.

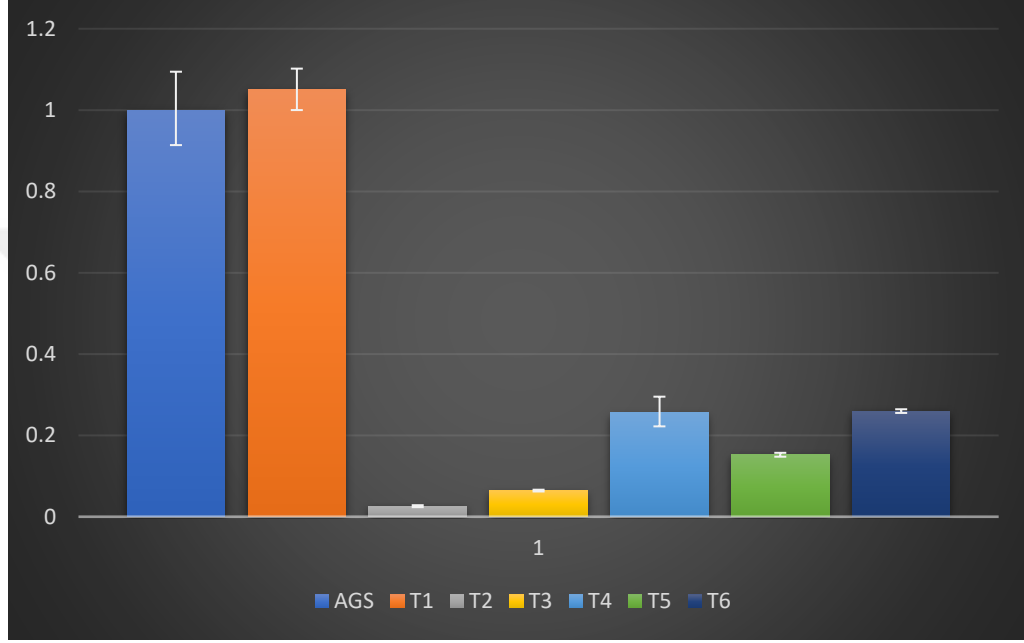
5.2 RT-PCR ile miR-200a-5p Ekspresyon Analizi

Hsa-miR-200a-5p ekspresyon analizi yapılır iken RNU6-1 miRNA'sı house keeping gen olarak kullanıldı. Yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan değerler. Çizelge 5.1 ve şekil 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.1: Mir-200a-5p ekspresyon analizi.

ÖRNEKLER	H. pylori VacA	ΔCT	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Maks. Hata	Min. Hata
AGS	-	6,60	0,00	1	0,094	0,086
T1	S2/M2	6,53	-0,07	1,050	0,052	0,049
T2	S1/M1/İ1 S1/M2/İ1	11,88	5,28	0,026	0,002	0,002
T3	S1/M1/İ1 S1/M2/İ1	10,56	3,96	0,064	0,002	0,002
T4	S1/M2	8,57	1,97	0,256	0,039	0,033
T5	S2/M2/İ1	9,32	2,72	0,152	0,004	0,004
T6	S1/M2	8,55	1,95	0,260	0,004	0,004

H. pylori enfekte mide kanseri dokularından 5'inde mir-200a-5p ekspresyonunun baskılandığı tespit edildi. En düşük ekspresyon değerleri VacA s1/m1/i1 alleleline sahip dokularda gözlemlendi. VacA S2/m2 alleleline sahip dokuda ekspresyon seviyesi kontrole göre değişim göstermedi. VacA s2/m2/i1 alleleline sahip dokuda ekspresyonda baskılanma görüldü. S1/M2 alleleline sahip dokularda da baskılanma saptandı.



Şekil 5.3: miR-200a-5p ekspresyon değişim grafiği.

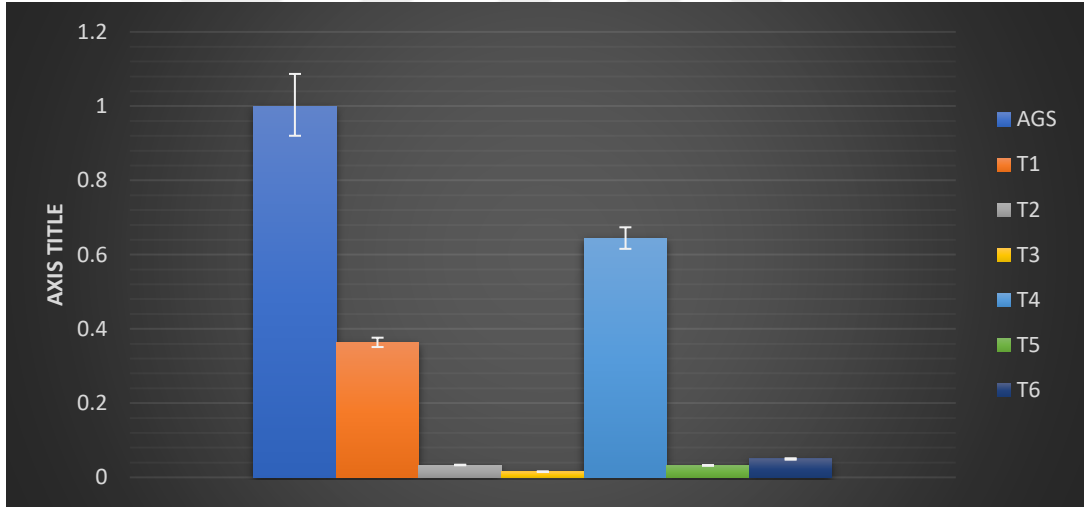
5.3 RT-PCR ile miR-29a-3p

Hsa-miR-29a-3p ekspresyon analizi yapılırken house keeping gen olarak RNU6-1 miRNA'sı kullanıldı. *H. pylori* negatif AGS hücre hattı kontrol olarak kullanıldı. Ekspresyon analizi sonuçları Çizelge 5.2 ve şekil 5.4 'de gösterilmiştir.

MiR-29a-3p ekspresyon analizi sonucunda, çalışmaya dahil edilen tüm *H. pylori* enfekte dokularda ekspresyon seviyesinde baskılanma gözlemlendi. VacA İ1 alleleline sahip olan dokularda ekspresyon seviyesi, i1 alleleline sahip olmayan dokulara göre düşük olduğu saptandı. VacA m1 alleleline sahip olan dokularda, m2 alleleline sahip olanlara göre ekspresyon seviyesinde azalma tespit edildi. S1 veya s2 allellerine sahip dokular arasında ekspresyon seviyesinde ilişki kurulamadı.

Çizelge 5.2: Mir-29a-3p ekspresyon analizi.

ÖRNEKLER	H. pylori VacA	Δ CT	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct	Maks. Hata	Min. Hata
AGS	-	4,01	0,00	1	0,086	0,079
T1	S2/M2	5,47	1,46	0,363	0,012	0,012
T2	S1/M1/İ1 S1/M2/İ1	8,92	4,91	0,033	0,001	0,001
T3	S1/M1/İ1 S1/M2/İ1	10,03	6,02	0,015	0,001	0,001
T4	S1/M2	4,65	0,64	0,643	0,029	0,028
T5	S2/M2/İ1	8,97	4,96	0,032	0,001	0,001
T6	S1/M2	8,35	4,34	0,050	0,002	0,002



Şekil 5.4: miR-29a-3p ekspresyon değişim grafiği.

5.4 RT-PCR ile Hsa-miR-223-3p Ekspresyon Analizi

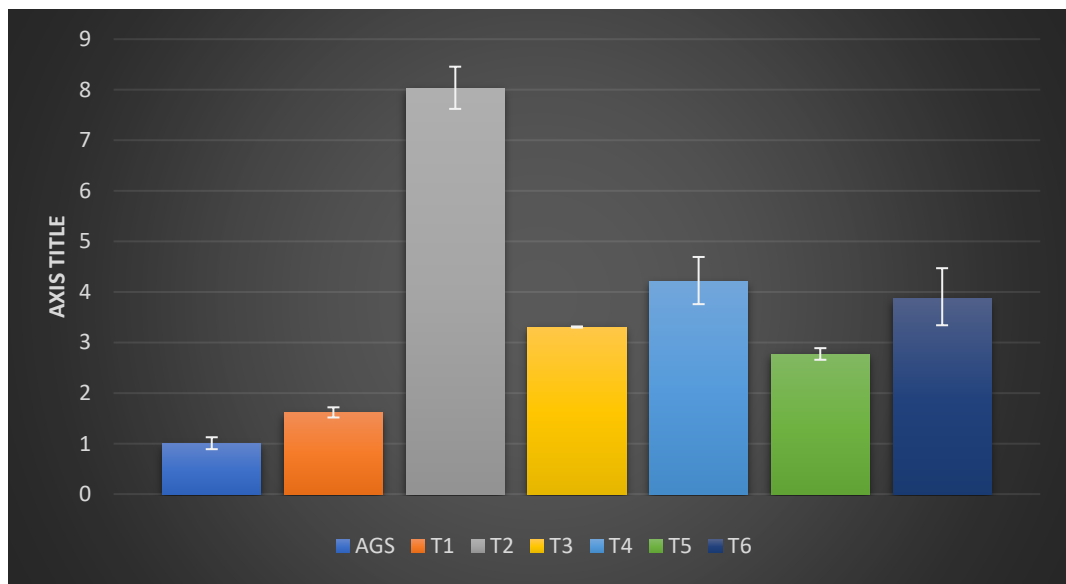
Hsa-miR-223-3p ekspresyon analizi yapılırken house keeping gen olarak RNU6-1 miRNA'sı kullanıldı. Ekspresyon analizi sonuçları çizelge 5.3 ve grafiği şekil 5.5'de verilmiştir.

MiR-223-3p ekspresyon analizi sonucunda, çalışmaya dahil edilen *H. pylori* enfekte dokular, *H. pylori* negatif AGS hücre hattı ile analiz edildiğinde ekspresyon seviyelerinde artış tespit edildi.

VacA s2 alleleline sahip dokularda, s1 alleleline sahip dokulara göre ekspresyon artma seviyesinin daha düşük olduğu görüldü. VacA m- ve i- bölge allellerinin arasında ilişki kurulamadı.

Çizelge 5.3: Mir-223-3p ekspresyon analizi

ÖRNEKLER	H. pylori VacA	Δ CT	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ CT	Maks. Hata	Min. Hata
AGS	-	13,44	0,00	1	0,125	0,111
T1	S2/M2	12,75	-0,69	1,613	0,103	0,097
T2	S1/M1/İ1 S1/M2/İ1	10,44	-3	8,02	0,428	0,406
T3	S1/M1/İ1 S1/M2/İ1	11,72	-1,72	3,305	0,011	0,011
T4	S1/M2	11,37	-2,07	4,198	0,492	0,440
T5	S2/M2/İ1	11,97	-1,47	2,770	0,117	0,112
T6	S1/M2	11,49	-1,95	3,863	0,605	0,523



Şekil 5.5 miR-223-5p ekspresyon değişimi grafiği.

6.TARTIŞMA

Mide kanseri küresel çapta yüksek etkiye sahip bir hastalıktır. Kanser ölümlerinde ikinci sırada yer almaktadır (Jemal ve diğ.,2011, Ferro ve diğ.,2014). Mide kanseri insidansında küresel çapta bir düşüş bulunmaktadır. Ancak mide kanseri hala kötü bir prognoz taşımaktadır (Sasako ve diğ.,2011, Bang ve diğ.,2012). Son yüz yılda varlığından haberdar olduğumuz *H. pylori*'nin mide kanserinde bir risk faktörü olduğu kabul görmüştür (Noormohammad ve diğ.,2016).

Dünya nüfusunun yaklaşık %50'sinde *H. pylori* enfeksiyonu görülmektedir (Hongqian ve diğ., 2016). Türkiye'de enfeksiyon oranı %80'e yaklaşmaktadır (Özaydın ve diğ., 2013). Duodenal ve gastrik ülser, nonülser dispepsi, gastrik karsinom ve MALT lenfomasına neden olabildiği bilinmektedir (Stephen ve diğ., 2014). *H. pylori* vakuol oluşturan bir protein salgıladığı tespit edilmiştir. Bu protein VacA adı verilen bir kromozomal gen tarafından kodlanmaktadır (Cover ve Blaser, 1992). VacA'dan kodlanan proteininin hücre içi yollarda birçok etkisi olduğu tespit edilmiştir (Boquet ve Ricci, 2012). VacA'nın 88 kDa'lık aktif toksin alanında üç farklı bölge bulunmaktadır. VacA allelleri s-, m ve i- bölgelerinin farklı kombinasyonunu içermektedir (Rhead ve diğ., 2007). Vakuol oluşturma aktivitesi ve toksisitesi en yüksek olan alellerin s1/m1/i1 formu olduğu bilinmektedir (Rhead ve diğ., 2007).

Bu çalışmada öncelikle enfekte mide kanseri dokularında yapılan PZR ile VacA allelleri belirlendi. *H. pylori* enfekte kanserli mide dokularında farklı VacA allellerinin çalışmaya dahil edilen miRNA'ların ifadeleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MiR-29a'nın mide kanserinde tümör süpresör rol aldığı bilinmektedir. VEGF-A'yı ve p42.3'ü hedefleyerek baskıladığı rapor edilmiştir (Ling ve diğ.,2014). Yapılan çalışma sonucunda *H. pylori* enfekte mide dokusunda miR-29a'nın ifadesini *H. pylori* negatif AGS hücre hattına kıyasla azaldığı RT-PCR ile gözlemlenmiştir. *H. pylori* VacA'nın farklı formlarına göre ekspresyon seviyesinin değiştiği düşünülmektedir. İ1 bölgesine sahip örneklerde miR-29a ekspresyon seviyesi i1 bölgesine sahip olmayan örneklere oranla düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Ortaya çıkan bulgular ışığında VacA geni üzerindeki i1 bölgesinin varlığı miR-29a ekspresyon seviyesini etkilediği düşünülmektedir. Çalışmaya dahil edilen *H. pylori* pozitif mide kanseri örneklerinde VacA m- bölgesi alellerinin miR-29a'nın ekspresyon seviyesini etkilediği düşünülmektedir. VacA m1 alleleline sahip formlar ile m2 alleleline sahip formlar kıyaslandığında, miR-29a'nın ekspresyon seviyesi m1 alleleline sahip formlarda düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ekspresyon seviyesinin VacA formlarına göre değişebileceği gözlemlenmiştir. Down regülasyon sonucunda miR-29a'nın etkisi azalacağından VEGF-A'da ve p42.3'de baskılanma ortadan kalkacaktır. Tümör gelişiminin tetiklenebileceğini düşündürmektedir.

MiR-200a'nın mide kanserinde ekspresyon seviyesi yapılan çalışmalarda tam olarak anlaşılammıştır. Mide kanserinde miR-200a'nın hem up regule hem de down regüle olduğu rapor edilmiştir (Chang ve diğ., 2015, Zhaofeng ve diğ., 2015). Mir-200a'nın EMT'yi inhibe ettiği bilinmektedir. Bu rolüyle tümör baskılayıcı olarak görülmektedir. MiR-200, EMT'yi baskılamak için ZEB1 ve ZEB2'yi hedef almaktadır (Cong ve diğ., 2013). *H. pylori* enfekte dokularda mir-200a seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir (Diogo ve diğ., 2015). Yapılan çalışmada altı *H. pylori* enfekte mide kanseri dokularından birtanesinin dışında ekspresyon seviyesinin AGS hücre hattına kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu sonucunda *H. pylori* enfeksiyonunun miR-200a ekspresyon seviyesini azalttığı düşünülmektedir. VacA'nın toksisitesi en yüksek olarak bilinen s1/m1/i1 formunda, miR-200a'nın ekspresyon seviyesi oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre VacA geninin farklı formlarının miR-200a regülasyonunu etkilediği düşünülmektedir. Özellikle s1 alleleline sahip dokularda ekspresyon seviyesi oldukça düşük olduğu görülmüştür. VacA'nın, miR-200a ekspresyon seviyesindeki etkisi ZEB1 ve ZEB2 ifadesinde artışa sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu görünen etki tümör gelişimini destekleyecektir.

MiR-223'ün hücre içi yolaklardaki etkileriyle hücrel apoptozu, proliferasyonu ve istilayı kontrol ettiği rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2012). Over ekspresyonu sonucunda NLRP3 proteininin birikimi ve IL-1 β üretimini engellemektedir (Haneklaus ve diğ., 2012). MiR-223'ün etki spektrumu çok geniştir (Wang ve diğ., 2016). *H. pylori* enfeksiyonu sonucunda miR-223 aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Aşırı ekspresyonu sonucunda hücre çoğalması ve göç tetiklenmektedir (Ma ve diğ., 2014). Çalışmaya dahil edilen örneklerdeki analizler sonucunda *H.*

pylori'nin enfeksiyonu miR-223 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Yapılan analizler ile VacA'nın m- ve i- bölgelerinin miR-223'ün ekspresyon seviyesi üzerinde bir ilişki kurulamamıştır. Ancak s1 ve s2 alellinin miR-223 ekspresyonunda etkisi olabileceği düşünülmektedir. S2 alleleline sahip formlarda ekspresyon seviyesi AGS hücre hattına kıyasla fazla bir değişim gözlemlenmiştir. Ortaya çıkan bu sonuç ile birlikte s1 alleleline sahip VacA formlarının miR-223'ün ekspresyonunu tetiklediği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda *H. pylori*'nin analiz edilen üç miRNA'nın seviyelerini etkilediği gözlemlenmiştir. Bulgular ışığında *H. pylori* VacA geninin polimorfik bölgelerindeki allel farklılıkları, çalışması yapılan üç miRNA'nın da ekspresyon seviyelerini etkilediğini düşündürmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun çalışması yapılan miRNA'lar üzerindeki etkisini anlamlı hale getirebilmek amacıyla daha fazla örnekle ilerki zamanlarda bu çalışma desteklenebilir. İstatistiksel veriler alabilecek kadar örnek toplandığı zaman VacA geninin miRNA'lar üzerindeki etkisi daha iyi anlaşılacaktır.

7.KAYNAKLAR

Amnon S, Richard H. Lash, Robert M. Genta A (2010). *National Study of Helicobacter pylori Infection in Gastric Biopsy Specimens*. December 2010 Volume 139, Issue 6, Pages 1894–1901.e2.

Atherton JC, Cao P, Peek RM JR ve diğ. (1995). *Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration*. J Biol Chem. 1995 Jul 28;270(30):17771-7.

Bang YJ, Kim YW, Yang HK, Chung HC, Park YK, Lee KH ve diğ. (2012). *Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): A phase 3 open-label, randomised controlled trial*. Lancet. 2012; 379:315–21.

Barber M, Murrell A, Ito Y, Maia AT, Hyland S, Oliveira C ve diğ. (2008). *Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer*. J Pathol. 2008; 216:295–306.

Bizzozero G (1893). *Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel der schleimhaut*. Arch f mikr Anat; 42:82

Boquet P, Ricci V (2012). *Intoxication strategy of Helicobacter pylori VacA toxin*. Trends Microbiol. 2012 Apr;20(4):165-74.

Calin GA1, Croce CM (2006). *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer. 2006 Nov;6(11):857-66.

Calore F, Genisset C, Casellato A ve diğ. (2010). *Endosome-mitochondria juxtaposition during apoptosis induced by H. pylori VacA*. Cell Death Differ. 2010 Nov;17(11):1707-16.

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

Chen Y, Blaser MJ (2007). *Inverse associations of Helicobacter pylori with asthma and allergy*. Arch Intern Med. 2007 Apr 23;167(8):821-7.

Chen Z, Saad R, Jia P, Peng D ve diğ. (2013). *Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma*. Cancer. 2013 Jun 1;119(11):1985-93.

Christian González-Rivera, Anne M. Campbell ve diğ. (2016) *A Nonoligomerizing Mutant Form of Helicobacter pylori VacA Allows Structural Analysis of the p33 Domain*. Infect Immun. 2016 Sep; 84(9): 2662–2670.

Cong N, Du P, Zhang A (2013). *Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the wnt/ β -catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma*. Oncol Rep. 2013 Apr;29(4):1579-87.

Corley D A, Mehtani K, Quesenberry C, Zhao W, de Boer J, Weiss NS (2013). *Impact of endoscopic surveillance on mortality from Barrett's esophagus-associated esophageal adenocarcinomas*. Gastroenterology. 2013 Aug;145(2):312-9.e1.

Cover TL, Blanke SR (2005). *Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality*. Nat Rev Microbiol. 2005 Apr;3(4):320-32.

Cover TL, Blaser MJ (1992). *Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori*. J Biol Chem. 1992 May 25;267(15):10570-5.

Cristina Pagliaccia, Marina de Bernard, Pietro Lupetti ve diğ. (1998). *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):10212-7.

Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao Z (1999). *The vacuolating toxin from Helicobacter pylori forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):2001-6.

D. P. Letley ve C. Atherton (2000). *Natural Diversity in the N Terminus of the Mature Vacuolating Cytotoxin of Helicobacter pylori Determines Cytotoxin Activity*. J Bacteriol. 2000 Jun; 182(11): 3278–3280.

De Martel C, Llosa AE, Farr SM, Friedman GD, Vogelmann JH, Orentreich N, Corley DA, Parsonnet J (2005). *Helicobacter pylori infection and the risk of development of*

esophageal adenocarcinoma. J Infect Dis 2005, 191:761-767.

Diogo Libânio, Mário Dinis-Ribeiro ve Pedro Pimentel-Nunes (2015). *Helicobacter pylori and microRNAs: Relation with innate immunity and progression of preneoplastic conditions*. World J Clin Oncol. 2015 Oct 10; 6(5): 111–132.

Ernest T. Chivero, Ming-Lei Guo, Palsamy Periyasamy ve diğ. (2017). *HIV-1 Tat primes and activates microglial NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation*. Journal of Neuroscience 7 March 2017, 3045-16.

Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, ve diğ. (2014). *Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype*. Eur J Cancer. 2014; 50:1330–44.

Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H ve diğ. (2003). *Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of Helicobacter pylori*. Nat Genet. 2003 Mar;33(3):375-81

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

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

Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P ve diğ. (2003). *Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC) Int J Cancer*. 2003; 107:629–634.

González-Rivera C, Algood HM, Radin JN, McClain MS, Cover TL (2012). *The intermediate region of Helicobacter pylori VacA is a determinant of toxin potency in a Jurkat T cell assay*. Infect Immun. 2012 Aug;80(8):2578-88.

Goodwin, CS, Armstrong, JA, Chilvers, T ve diğ. (1989). *Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen nov as Helicobacter pylori comb nov and Helicobacter mustelae com nov, respectively*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1989, p. 397-405

Gravalos C, Jimeno A (2008). *HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target*. Ann Oncol. 2008; 19:1523–9.

Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D'Emidio S ve diğ. (2011). Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29:4789–95.

Han YC, Park CY, Bhagat G, Zhang J, Wang Y ve diğ. (2010). *MicroRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia.* *J Exp Med.* 2010; 3:475–489.

Haneklaus M, Gerlic M ve diğ. (2012). *Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production.* *J Immunol.* 2012 Oct 15;189(8):3795-9.

Harris PR, Cover TL, Crowe DR, Orenstein JM, Graham MF, Blaser MJ, Smith PD (1996). *Helicobacter pylori cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells.* *Infect Immun.* 1996 Nov;64(11):4867-71.

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

Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J (2004). *Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: Increase in the signet ring cell type.* *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128:765–70.

Hideyuki Ishiguro, Masahiro Kimura ve Hiromitsu Takeyama (2014). *Role of microRNAs in gastric cancer.* *World J Gastroenterol.* 2014 May 21; 20(19): 5694–5699.

Hongqian Li, Yunfeng Zhou, Yufeng Zheng, Hong Guo ve diğ. (2016). *The Gastric Mucosa from Patients Infected with CagA+ or VacA+ Helicobacter pylori Has a Lower Level of Dual Oxidase-2 Expression than Uninfected or Infected with CagA–/VacA– H. Pylori.* *Dig Dis Sci.* 2016; 61: 2328–2337.

Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr ve diğ. (2010). *A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis.* *Cancer Res.* 2010;70:1441-1448.

I Szabò, S Brutsche, F Tombola ve diğ. (1999). *Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of Helicobacter pylori is required for its biological activity.* *EMBO J.* 1999 Oct 15; 18(20): 5517–5527.

IARC (1994). *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori IARC Monogr Eval Carcinog Risks*. Hum. 1994; 61:1–241.

Ik-Jung Kim ve Steven R. Blanke (2012). *Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA)*. Front Cell Infect Microbiol. 2012; 2: 37.

Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H ve diğ. (1998). *Full-length sequence analysis of the vacA gene from cytotoxic and noncytotoxic Helicobacter pylori*. J Infect Dis. 1998 Nov;178(5):1391-8.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin. 2011; 61:69–90.

Jennifer M Noto ve Richard M Peek (2011). *The Role of microRNAs in Helicobacter pylori Pathogenesis and Gastric Carcinogenesis*. Front Cell Infect Microbiol. 2011; 1: 21.

Jianjun Wang, Jianhong Wu, Yang Cheng ve diğ. (2016). *Over-expression of microRNA-223 inhibited the proinflammatory responses in Helicobacter pylori-infection macrophages by down-regulating IRAK-1*. Am J Transl Res. 2016; 8(2): 615–622.

Juan Su, A Zhang, Zhendong SH ve diğ. (2012) *MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin*. Int J Oncol. 2012 Apr; 40(4): 1162–1170.

Kathleen R. Jones, Jeannette M. Whitmire ve D. Scott Merrell (2010). *A Tale of Two Toxins: Helicobacter Pylori CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease*. Front Microbiol. 2010; 1: 115.

Khean-Lee Goh, Wah-Kheong Chan, Seiji Shiota ve Yoshio Yamaoka (2013). *Epidemiology of Helicobacter pylori Infection and Public Health Implications*. 2011 Sep; 16(0 1): 1–9.

Kinnosuke Yahiro, Mamoru Satoh, Masayuki Nakano (2012). *Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 (LRP1) Mediates Autophagy and Apoptosis Caused by Helicobacter pylori VacA*. J Biol Chem. 2012 Sep 7; 287(37): 31104–31115.

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

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Leonardo H. Eusebi, Rocco M. Zagari ve Franco Bazzoli (2014). *Epidemiology of Helicobacter pylori Infection.* Helicobacter ISSN 1523-5378.

Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR 1988. *Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori.* J Med Microbiol. 1988 Jun;26(2):93-9.

Li A, Omura N, Hong SM ve diğ. (2010). *Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels.* Cancer Res. 2010 Jul 1;70(13):5226-37

Li H, Zhou Y, Zheng Y, Guo H, Gao L ve diğ. (2016). *The Gastric Mucosa from Patients Infected with CagA+ or VacA+ Helicobacter pylori Has a Lower Level of Dual Oxidase-2 Expression than Uninfected or Infected with CagA-/VacA- H. pylori.* 2016 Aug;61(8):2328-37.

Li J, Guo Y, Liang X ve diğ. (2012). *MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4.* J Cancer Res Clin Oncol. 2012 May;138(5):763-74.

Li JH, Shi XZ, Lv S, Liu M, Xu GW (2005). *Effect of Helicobacter pylori infection on p53 expression of gastric mucosa and adenocarcinoma with microsatellite instability.* World J Gastroenterol. 2005; 11:4363–6.

Li X1, Zhang Y, Zhang H ve diğ. (2011). *miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3.* Mol Cancer Res. 2011 Jul;9(7):824-33.

Li Z1, Zou D, Ma X, Chen J, Shi X, Gong Y, Man X ve diğ. (2010). *Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China.* Am J Gastroenterol. 2010 Dec;105(12):2570-7.

- Ling Chen, Hong Xiao, Zong-Hua Wang ve diğ. (2014). *miR-29a suppresses growth and invasion of gastric cancer cells in vitro by targeting VEGF-A*. BMB Rep. 2014 Jan; 47(1): 39–44.
- Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY (2010). *Association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature*. Inflamm Bowel Dis. 2010 Jun;16(6):1077-84.
- Ma L, Chen Y, Zhang B, Liu G (2014). *Increased microRNA-223 in Helicobacter pylori-associated gastric cancer contributed to cancer cell proliferation and migration*. Biosci Biotechnol Biochem. 2014;78(4):602-8.
- Marianna Boncristiano, Silvia Rossi Paccani ve diğ. (2003). *The Helicobacter pylori Vacuolating Toxin Inhibits T Cell Activation by Two Independent Mechanisms*. J Exp Med. 2003 Dec 15; 198(12): 1887–1897.
- Mark S. McClain, Ping Cao, Hideki Iwamoto ve diğ. (2001). *A 12-Amino-Acid Segment, Present in Type s2 but Not Type s1 Helicobacter pylori VacA Proteins, Abolishes Cytotoxin Activity and Alters Membrane Channel Formation*. J Bacteriol. 2001 Nov;183(22):6499-508.
- Marshall B ve Warren JR (1983). *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. Lancet 1: 1273–1275.
- Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ (1985). *Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter*. Med J Aust. 1985 Apr 15;142(8):436-9. May;9(5):2317-2324
- Muniyappa MK, Dowling P, Henry M, Meleady P, Doolan P ve diğ. (2009). *MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines*. Eur J Cancer. 2009; 17:3104–3118.
- Nguyen VQ, Caprioli RM, Cover TL (2001). *Carboxy-terminal proteolytic processing of Helicobacter pylori vacuolating toxin*. Infect Immun. 2001 Jan;69(1):543-6.
- Nilufer O, Sinan A T ve Sanda C (2013). *Prevalence and risk factors of helicobacter pylori in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the 13C-Urea breath test*. BMC Public Health. 2013; 13: 1215.
- Ning-Bo Hao, Ya-Fei He ve diğ. (2017). *The role of miRNA and lncRNA in gastric*

cancer. *Oncotarget*. 2017 Oct 6; 8(46): 81572–81582

Niyaz Ahmed (2005). *23 years of the discovery of Helicobacter pylori: Is the debate over?* *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005, 4:17.

Noormohammad M, Sadeghi S, Tabatabaeian H, Ghaedi K, Talebi A, Azadeh M, Khatami M, Heidari MM (2016). *Upregulation of miR-222 in both Helicobacter pylori- infected and noninfected gastric cancer patients*. *J Genet*. 2016 Dec;95(4):991-995.

Nora J. Foegeding, Rhonda R. Caston ve diğ. (2016). *An Overview of Helicobacter pylori VacA Toxin Biology*. *Toxins (Basel)*. 2016 Jun; 8(6): 173.

Ozdil I, Sahin A, Kahraman R, Yuzbasioglu B, Demirdag H ve diğ. (2010). *Current prevalence of intestinal metaplasia and Helicobacter pylori infection in dyspeptic adult patients from Turkey*. 2010 Nov-Dec;57(104):1563-6.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F ve diğ. (2000). *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9.

Piazuelo MB, Correa P (2013). *Gastric cancer: Overview*. *Colomb Med (Cali)* 2013; 44:192–201.

Radin, J.N. ve diğ. (2011). *Helicobacter pylori VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells*. *Infect. Immun.* 79, 2535–2543.

Rajewsky N (2006). *microRNA target predictions in animals*. *Nat Genet*. 2006 Jun;38 Suppl: S8-13.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M ve diğ. (2000). *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M ve diğ. (2007). *A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer*. *Gastroenterology*. 2007 Sep;133(3):926-36.

Ricci V, Sommi P, Fiocca R, Romano M, Solcia E, Ventura U (1997). *Helicobacter pylori vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia*. *J Pathol*.

1997 Dec;183(4):453-9.

Richter JE, Folk GW, Vaezi MF (1999). *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease: the bug may not be all bad. *Am J Gastroenterol* 1999, 93:1800-1802.

Roche N, Ilver D, Angström J, Barone S, Telford JL, Teneberg S (2007). *Human gastric glycosphingolipids recognized by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin VacA*. *Microbes Infect.* 2007 Apr;9(5):605-14

Santanam U, Zanesi N, Efanov A, Costinean S, Palamarchuk A ve diğ. (2010). *Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 27:12210–12215.

Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, Kinoshita T, Furukawa H, Yamaguchi T, ve diğ. (2011). *Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer*. *J Clin Oncol.* 2011; 29:4387–93.

Sassen S, Miska EA, Caldas C (2008). *MicroRNA: implications for cancer*. *Virchows Arch.* 2008 Jan;452(1):1-10.

Satin B, Norais N, Telford J ve diğ. (1997). *Effect of helicobacter pylori vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation*. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25022-8.

Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H, Tamaki H (1998). *Vacuolation induced by cytotoxin from Helicobacter pylori is mediated by the EGF receptor in HeLa cells*. *FEBS Lett.* 1998 Jul 24;431(3):347-50.

Sewald X, Gebert-Vogl B, Prassl S ve diğ. (2008). *Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin*. *Cell Host Microbe.* 2008 Jan 17;3(1):20-9.

Shahab Akhoondi, Dahui Sun, Natalie von der Lehr ve diğ. (2007). *FBXW7/hCDC4 Is a General Tumor Suppressor in Human Cancer*. *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9006-12.

Smoot DT, Resau JH, Earlington MH, Simpson M, Cover TL (1996). *Effects of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells*. *Gut.* 1996 Dec;39(6):795-9.

- Stephen DHM, Ehud M, Malka A, Gabriel D ve Jacob Y (2014). *Helicobacter pylori: Friend or foe?* World J Gastroenterol. 2014 Jul 21; 20(27): 8979–8985.
- Su Youn Nam, MD, Il Ju Choi ve diğ. (2010). *Effect of Helicobacter pylori Infection and Its Eradication on Refl ux Esophagitis and Refl ux Symptoms.* Am J Gastroenterol 2010; 105:2153–2162.
- Tan S, Noto JM, Romero-Gallo J, Peek RM Jr, Amieva MR (2011). *Helicobacter pylori perturbs iron trafficking in the epithelium to grow on the cell surface.* PLoS Pathog. 2011 May;7(5):e1002050.
- Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M ve diğ. (1994). *Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease.* J Exp Med. 1994 May 1;179(5):1653-58.
- Terebiznik, M.R. ve diğ. (2009). *Effect of Helicobacter pylori's vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells.* Autophagy 5, 370–379.
- Tombola F ve diğ. (2001) *The Helicobacter pylori VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia.* J. Clin. Invest. 108, 929–937.
- Torres VJ, Ivie SE, McClain MS, Cover TL (2005). *Functional properties of the p33 and p55 domains of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin.* J Biol Chem. 2005 Jun 3;280(22):21107-14.
- Torres, V.J. ve diğ. (2007) *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocytes subsets.* J. Immunol. 179, 5433–5440.
- Tung L Nguyen¹, Tomohisa Uchida, Yoshiyuki Tsukamoto ve diğ. (2010). *Helicobacter pylori infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital based study.* BMC Gastroenterology 2010, 10:114.
- Utt M, Danielsson B, Wadström T (2001). *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin binding to a putative cell surface receptor, heparan sulfate, studied by surface plasmon resonance.* FEMS Immunol Med Microbiol. 2001 Mar;30(2):109-13.
- Vijay R. Gupta, Hetal K. Patel, Sean S. Kostolansky ve diğ. (2008). *Sphingomyelin Functions as a Novel Receptor for Helicobacter pylori VacA.* PLoS Pathog. 2008 May; 4(5): e1000073.

- Willhite DR ve Blanke SR (2004). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.* 2004 Feb;6(2):143-54.
- Wong ML ve Medrano JF (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005 Jul;39(1):75-85.
- Wotherspoon A.C(1996). *Gastric MALT lymphoma and Helicobacter pylori.* *Yale J Biol Med.* 1996 Jan-Feb; 69(1): 61–68.
- Xu H, Cheung IY, Guo HF, Cheung NK (2009). *MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors.* *Cancer Res.* 2009; 15:6275–6281.
- Yahiro K ve diğ. (2004). *Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin.* *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51013-21.
- Yahiro K, Wada A, Nakayama M ve diğ. (2003). *Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a Helicobacter pylori VacA receptor.* *J Biol Chem.* 2003 May 23;278(21):19183-9.
- Yamasaki E, Wada A, Kumatori A ve diğ. (2006). *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation.* *J Biol Chem.* 2006 Apr 21;281(16):11250-9.
- Yazıcıoğlu I B (2016). *Mechanisms of MicroRNA Deregulation and MicroRNA Targets in Gastric Cancer.* *Oncol Res Treat.* 2016; 39 (3): 136-9.
- Yongqiang Li, Zhi Wang, Yijiang Li ve Ruijun Jing (2017). *MicroRNA-29a functions as a potential tumor suppressor through directly targeting CDC42 in non-small cell lung cancer.* *Oncol Lett.* 2017 May; 13(5): 3896–3904.
- Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Yanoma S, ve diğ. (2000). *Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma.* *Cancer Lett.* 2000; 153:7–12.
- Yun Cui, Wen-Yu Su, Jing Xing ve diğ. (2011). *MiR-29a Inhibits Cell Proliferation*

and Induces Cell Cycle Arrest through the Downregulation of p42.3 in Human Gastric Cancer. PLoS One. 2011; 6(10): e25872.

Zhaofeng Chen, Xiaoguang Liu ve diğ. (2015). *Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer.* Oncol Lett. 2015 Jul; 10(1): 329–336.

İNTERNET

Türk Biyoinformatik Grubu, (2007), PCR Nedir? (Polimeraze Chain Reaction), <https://biyoinformatik.wordpress.com/2007/02/21/pcr-polimeraze-chain-reaction-nedir/>

6.ÖZGEÇMİŞ

Ferhat Erdoğan

Mevlana mah. Yıldırım Beyazıt cad. Profesörler sitesi A blok NO:36
ESEN YURT/İSTANBUL

Telefon: 0 (212) 503 49 48
Cep: 0 (538) 560 56 60
E-posta: frhterdgn92@gmail.com

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 15.09.1992
Doğum Yeri: Fatih/İSTANBUL
Medeni Hali: Bekar
Ehliyet: 10.10.2016 (B)

Eğitim

1998-2006 G.S.D. Vakfı İ.Ö Okulu
2006-2010 Füsün Yönder Lisesi
2010-2015 Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi

Teknik Bilgiler

PZR, PZR Optimizasyonu ve RT-PCR.
İzolasyon teknikleri (DNA, RNA, plazmid)
MS Office
Hücre kültürü çalışmaları.

Sertifikalar

Amerikan Kültür Dil Okulları B2 seviye İngilizce dili sertifikası
HACCP Eğitim Sertifikası
ISO 17025 Eğitim Sertifikası

Yabancı Diller

İngilizce (intermediate)