



T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA KANSER HÜCRELERİNDE
LOMEGUATRİB'İN EPİTELİYAL MEZENKİMAL
DÖNÜŞÜMDEKİ ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emre SERT

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne Emre SERT tarafından savunulan “**GLİOBLASTOMA KANSER HÜCRELERİNDE LOMEGUATRİB’İN EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDEKİ ROLÜ**” isimli çalışma jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

İmza

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Bülent TURHAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe DURAN

KTO Karatay Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Funda ÇETİNKAYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

İmza

Emre SERT

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçiminden başlayıp çalışmaların yürütülmesi ve sonuçlandırılmasına kadar, çalışma sürecinin her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr. Mehmet TAŞPINAR hocama,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Bülent TURHAN hocalarıma, desteklerini esirgemeyen Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Doç. Dr. Can ATEŞ ve Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Filiz TAŞPINAR hocama,

Tezim süresince hep yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen; başta eşim MELTEM SERT olmak üzere annem ZELİHA SERT'e ve babam HASAN HÜSEYİN SERT'e ve sabırsızca yüksek lisans tezimi bitirmemi bekleyen çocuklarım HASAN HÜSEYİN SERT ve ÖZGE SERT'e teşekkür ederim.

Emre SERT
AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Kanser.....	3
2.2 Beyin Tümörü.....	3
2.3 Glioblastoma	5
2.3.1 Glioblastoma tedavi biçimleri.....	7
2.3.1.1 Cerrahi müdahale	7
2.3.1.2 Radyoterapi	7
2.3.1.3 Kemoterapi	7
2.3.1.4 Immunoterapi	8
2.3.1.5 Hedefe yönelik tedavi	8
2.3.2 Glioblastomada kemoterapide direnç	8
2.3.3 Kemoterapide alkilasyon ajanları	9
2.3.3.1 Kemoterapide alkilasyon ajanlarına direnç.....	10
2.3.4 O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) nedir?	11
2.3.4.1 MGMT inhibasyonun önemi.....	12
2.3.4.2 MGMT inhibitörleri ve etkisi.....	12
2.3.4.2.1 Lomeguatrib	13
2.3.4.2.2 Neden GBM’de lomeguatrib.....	13
2.3.5 Epitelyal-mezankimal geçiş (EMT) nedir?.....	14
2.3.5.1 EMT özellikleri	15
2.3.5.2 EMT’NİN tipleri	16
2.3.5.2.1 TİP I EMT: implantasyon, embriyogenez, gelişim	17
2.3.5.2.2 TİP II EMT: fibrosiz ve enflamasyon	17
2.3.5.2.3 TİP III EMT: kanser ve metastaz	18
2.3.5.3 EMT transkripsiyon faktörleri.....	18
2.3.5.4 EMT’NİN moleküler belirteçleri	20
2.3.5.4.1 Vimentin.....	22
2.3.5.4.2 E-kaderin	23
2.3.5.4.3 N-kaderin.....	23
2.3.5.4.4 Snail	23
2.3.5.4.5 Smail2	24
2.3.5.4.6 Twist.....	24
3. MALZEME VE YÖNTEM	25
3.1 Gereç	25
3.1.1 Hücre serileri	25
3.1.2 Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler.....	26
3.1.3 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) sitotoksisite testi	27
3.1.4 Total RNA izolasyonu	28
3.1.5 cDNA (Komplementer DNA) sentezi	28

3.1.6 Agaroz jel elektroforezi	29
3.1.7 Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)	30
3.1.8 Yara iyileşmesi deneyi.....	30
3.1.9 Çalışmada kullanılan alet/makineler.....	31
3.2 Yöntem	31
3.2.1 Hücre kültürü	31
3.2.2 Sitotoksosite testi	32
3.2.3 Hücre göçü deneyi (yara iyileşmesi, wound healing).....	33
3.2.4 RNA izolasyonu.....	34
3.2.5 RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi	34
3.2.6 cDNA (Complementer DNA) izolasyonu	35
3.2.7 Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)	34
3.3 İstatistiksel Analiz	37
4. SONUÇLAR	38
4.1 Lomeguatrib Sitotoksitesitesi	38
4.2 Yara iyileşmesi deneyi	39
4.3 Gen Ekspresyon Analizi.....	40
4.3.1 Epitelyal özellik için gen ekspresyonu	40
4.3.2 Mezenkimal özellik için gen ekspresyonu.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	46

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİOBLASTOMA KANSER HÜCRELERİNDE LOMEGUATRİB'İN EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDEKİ ROLÜ

Emre SERT

Aksaray Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

ÖZET

Glioblastoma, küratif tedavisi olmayan en malign beyin tümörüdür. Glioblastoma tedavisinde yeni ve etkin tedavi protokolleri geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Glioblastomada alkilasyon temelli tedavideki kemoterapötik direnç çoğunlukla MGMT isimli proteinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle MGMT inhibitörleri kullanılarak kemoterapiye duyarlılığın artırılması hedeflenmektedir. Lomeguatrib, bu MGMT inhibitörlerinden biridir. Kanserde terapötik direnç yollarından biri de Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) mekanizmasıdır. EMT ile hücreler göç kabiliyeti yüksek invaziv bir karakter kazanarak tedavide dirence neden olmaktadır. Terapötik direncin azaltılması amacıyla kullanımı planlanan lomeguatribin EMT sürecindeki rolü bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında lomeguatribin glioblastoma hücrelerinde EMT sürecini tetikleyip tetiklemediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla T98G ve U-87 MG hücre serisi kullanılmıştır. Lomeguatribin glioma hücrelerindeki sitotoksitesi MTT ile belirlendikten sonra lomeguatribin hücre göçüne etkisi yara iyileşmesi testi ile belirlenmiştir. Lomeguatribin EMT yolağında yer alan genlerin ekspresyonlarına olan etkisi qRT-PZR ile belirlenmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla IBM SPSS Versiyon 20.0. kullanılmıştır. Sitotoksite sonuçlarına göre U-87 MG hücre serisi T98G'ye göre daha sensitif bulunmuştur. U- 87 MG hücre serisinde lomeguatribin hücre göçüne etkisi T98G hücre serisine göre daha yüksek bulunmuştur. Lomeguatrib, MGMT ekspresyonu pozitif olan T98G hücre serisinde EMT genlerinin ekspresyonu istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azaltırken ($p<0.001$) MGMT ekspresyonu negative olan U-87 MG hücre serisinde ise istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde arttırmıştır ($p<0.001$). Lomeguatrib U-87 MG glioma hücresinde EMT yolağını tetikleyebilmektedir. Lomeguatrib MGMT ekspresyonu olan ve olmayan hücre serilerinde farklı fizyolojik etkiler gösterebilmektedir. Lomeguatribin klinik kullanımında MGMT proteinin varlığına ve olası EMT etkisine dikkat edilmelidir. Çalışmamız, lomeguatribin glioma hücre serisinde EMT genlerinin ekspresyonu arttırdığını gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Lomeguatrib, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş, Hücre Kültürü, Glioblastoma

Haziran, 2024; 57 sayfa

M.Sc. THESIS

GLİOBLASTOMA KANSER HÜCRELERİNDE LOMEGUATRİB'İN EPİTELİYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDEKİ ROLÜ

Emre SERT

Aksaray University
Graduate School of Health Sciences
Department of Tıbbi Biyoloji

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

ABSTRACT

Glioblastoma is the most malignant brain tumor with no curative treatment. Studies to develop new and effective treatment protocols for glioblastoma are ongoing. Chemotherapeutic resistance in alkylation-based treatment of glioblastoma is mostly due to a protein called MGMT. Therefore, the aim is to increase sensitivity to chemotherapy by using MGMT inhibitors. Lomeguatrib is one of these MGMT inhibitors. One of the therapeutic resistance pathways in cancer is the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) mechanism. Through EMT, cells acquire a highly migratory invasive character, leading to treatment resistance. The role of lomeguatrib, planned to be used to reduce therapeutic resistance, in the EMT process is unknown. This thesis aims to investigate whether lomeguatrib triggers the EMT process in glioblastoma cells. For this purpose, the T98G and U-87 MG cell lines were used. After determining the cytotoxicity of lomeguatrib in glioma cells using the MTT assay, the effect of lomeguatrib on cell migration was assessed using the wound healing assay. The effect of lomeguatrib on the expression of genes involved in the EMT pathway was determined by qRT-PCR. IBM SPSS Version 20.0 was used for the evaluation of the obtained data. According to the cytotoxicity results, the U-87 MG cell line was found to be more sensitive compared to T98G. The effect of lomeguatrib on cell migration in the U-87 MG cell line was found to be higher compared to the T98G cell line. Lomeguatrib significantly reduced the expression of EMT genes in the T98G cell line with positive MGMT expression ($p<0.001$), while it significantly increased the expression in the U-87 MG cell line with negative MGMT expression ($p<0.001$). Lomeguatrib can trigger the EMT pathway in U-87 MG glioma cells. Additionally, lomeguatrib shows different physiological effects in cell lines with and without MGMT expression. In the clinical use of lomeguatrib, attention should be paid to the presence of the MGMT protein and the potential EMT effect. Our study is the first in the literature to show that lomeguatrib increases the expression of EMT genes in glioma cell lines.

Keywords: Lomeguatrib, Epithelial-Mesenchymal Transition, Cell Culture, Glioblastoma

June, 2024; 57 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lomeguatrib.....	13
Şekil 2.2. Üç farklı EMT türü.	16
Şekil 2.3. EMT sürecine ve klasik gen belirteçlerine genel bakış.	20
Şekil 3.1. T98G ve U-87MG hücre serilerinden elde edilen Total RNA'nın görüntüsü.....	35
Şekil 3.2. Vimentin geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve).....	37
Şekil 3.3. ACTB geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve).....	37
Şekil 3.4. Lomeguatrib'in T98G ve U-87 MG hücre serilerindeki toksisiteleri (72.saat).....	38
Şekil 3.5. Hücrelerde oluşturulan yaranın hücre göçü ile kapanmasının mikroskop ile takibi ve yara büyüklüğünün piksel cinsinden ölçümü.	39
Şekil 3.6. Lomeguatribin T98G ve U-87 MG hücrelerinde hücre göçüne etkisi. Pozitif kontrol olarak TGF- β (5ng/ml) kullanılmıştır.	40
Şekil 3.7. E-kaderin genindeki ekspresyon değişikliği. Lome: Lomeguatrib.....	41
Şekil 3.8. T98G ve U-87 MG Hücrelerinde EMT Genlerinin Ekspresyon Değişimleri. Mavi bar: T98G hücre serisi, Sarı bar: U-87 MG hücre serisi, Lome: Lomeguatrib	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Epitel ve mezenkimal hücrelerin fenotipik özellikleri.....	15
Çizelge 2.2. Epitel ve mezenkimal hücrelerin moleküler belirteçleri.....	21
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan hücre serileri	25
Çizelge 3.2. Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler.	26
Çizelge 3.3. MTT testinde kullanılan gereçler.....	27
Çizelge 3.4. Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler.	28
Çizelge 3.5. cDNA eldesi için gerekli malzemeler.....	29
Çizelge 3.6. Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler.	29
Çizelge 3.7. RT-PZR için gerekli malzemeler.....	30
Çizelge 3.8. Yara iyileşme deneyi için gerekli malzemeler.....	30
Çizelge 3.9. Çalışma kapsamında kullanılan alet/makineler.	31
Çizelge 3.10. cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.	35
Çizelge 3.11. RT-PZR için reaksiyon içeriği.....	36
Çizelge 3.12. RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri.	36
Çizelge 4.1. Lomeguatrib Sitotoksitesitesi (72.saat)	38
Çizelge 4.2. EMT genlerinin ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTB	Actin beta
BCNU	Carmustine
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CCNU	Lomustine
cDNA	Komplementer DNA
DEA/NO	Dietilamin NONOate
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH₂O	distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoxynükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Ethylenediaminetetraasetik Asit
EMT	Epitelyal-Mezankimal Geçiş
FBS	Fötal Dana Serum
GBM	Glioblastoma Multiforme
HCl	Hidroklorik asit
IC₅₀	%50 İnhibitör doz
MET	Mezankimal Epitelyal Geçiş
MGMT	O ⁶ -Metilguanin- DNA-Metiltransferaz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MMP	Matriks Metalloproteinazlar
O⁶-BG	O ⁶ -Benzylguanin
O⁶-MeG	O ⁶ -metilguanin
PaTrin-2	Lomeguatrib
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PZR	Gerçek Zamanlı PZR
S	Sedimentasyon
S/G₂M	Sentez/Gap ₂
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TE	Tris EDTA
TMZ	Temozolomid
α- SMA	α - Düz Kas Aktini

1. GİRİŞ

Glioblastoma, en malign beyin tümörüdür (Zacharia vd., 2017) ve evre IV astrositom olarak sınıflandırılmıştır. Glioblastoma, hücrelerinin hızlı progresyonu, normal dokuya infiltre olabilmesi ve yüksek genetik heterojenite sebebiyle radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençli olmasından ötürü kötü prognoza sahip olan kanserlerden birisidir (Kanderi ve Gupta, 2022). Cerrahisi sonrasında kemoterapide en çok kullanılan ajan Temozolomid (TMZ)'dir. Ancak bu ilaca da direnç gelişebilmektedir. Bu direncin gelişmesinde O6-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz (MGMT) enzimi rol almaktadır. MGMT, hücrel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruyan en önemli DNA tamir proteinidir (Kaina vd., 2007).

Tümör hücrelerinde alkilasyon ajanlarına karşı gelişen hücrel dirençten yüksek MGMT aktivitesinin sorumlu olabileceğine ilişkin yapılan çalışmalar MGMT aktivitesini azaltabilecek yeni moleküllerin araştırılmasını cesaretlendirmektedir. Bu amaçla çeşitli MGMT inhibitörleri geliştirilmiştir. “O6-Benzylguanine (O6-BG)”, “Lomeguatrib” ve “Diethylamine NONOate DEA/NO” bugüne kadar MGMT enzim inhibisyonu yaptığı bilinen moleküllerdir (Yun vd., 2024 ; Bai vd., 2023) .

MGMT inhibitörleri, MGMT'yi inhibe ederek tümör hücrelerinin DNA tamir kabiliyetini azaltır ve böylece kemoterapiye duyarlılığı ve terapötik etkisini artırır (Weller et vd., 2019; Kaina vd., 2023). Lomeguatribin kullanımı ile ilgili birçok prelinik (Taspınar vd., 2013; Akcora-Yildiz vd., 2024) ve faz çalışmaları (Shaw vd., 2024) bulunmaktadır. Günümüzde, MGMT inhibitörlerinin glioblastoma tedavisindeki rolü üzerine yapılan araştırmalar, bu inhibitörlerin kullanımının tedavi sonuçlarını olumlu yönde etkileyebileceğini ve hastaların yaşam kalitesini artırabileceğini ancak daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiğine işaret etmektedir (Ranson vd., 2006; Shaw vd., 2024).

Kanser hücrelerinin invaziv karakter kazanarak tedavilere direnç geliştirme süreçlerinden biri de Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) mekanizmasıdır (Iwade Y., 2016; Majc vd., 2020). EMT ile kanser hücreleri epitelyal karakter özelliklerini kaybederek migrasyon yeteneği yüksek, invaziv (Kim vd., 2021), apoptoza ve kemoterapötik ilaçlara dirençli mezenkim karakterde yeni özellikler kazanır (Iwade Y., 2016).

EMT'nin önlenmesi veya tetiklenmesi tedavinin başarısında önemli rol oynar. Tedavi amaçlı kullanılan moleküllerin, ilaçların ve diğer yaklaşımların EMT sürecinin tetikleyip tetiklemediği bilinmesi gereken bir durumdur. Eğer verilen tedavi protokolü EMT sürecini tetikler ise tedavide başarısızlık ile sonuçlanma riski artar. Eğer tedavi protokolü EMT sürecinin inhibe ediyorsa bu durumda da kullanılan ajan veya ajanların toksik etkilerinin artması söz konusu olabilir. Bu nedenle tedavide kullanılma potansiyeli olan moleküllerin EMT'deki rollerini bilinmesi önemlidir. Toksisitesi düşük lomeguatribin birçok kanserde tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla kullanımı araştırılmaktadır (Kirstein vd., 2021; Yun vd., 2024; Akcora-Yildiz vd., 2024). Bu nedenle lomeguatribin EMT sürecindeki rolünün bilinmesi ve geliştirilmek istenen yeni tedavi protokollerinin buna göre belirlenmesi önem arz etmektedir. Lomeguatribin EMT sürecindeki rolü bilinirse, lomeguatribin tek başına veya farklı bir molekül ile kombine kullanımında karşılaşılabilecek klinik sonuçların öngörülmesine katkı sunacaktır. Bu tez çalışmasında da, lomeguatribin glioblastoma hücrelerinde EMT sürecini tetikleyip tetiklemediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, vücut hücrelerinin anormal ve kontrolsüz bir şekilde büyüüp çoğalmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır (Weinberg, 2013). Farklı organ ve dokularda ortaya çıkabilen bir dizi hastalık türünü içermektedir (American Cancer Society, 2020).

Genetik mutasyonlar, çevresel faktörler ve yaşam tarzı değişiklikleri gibi çeşitli etkenler kansere neden olabilir (Hanahan & Weinberg, 2011). Erken teşhis ve tedavi, kanserin yayılmasını önleyebilir ve hayatta kalma oranlarını da artırabilir (Allemani vd., 2018).

Tedavi seçenekleri, kanserin türü, evresi ve hastanın genel sağlık durumuna göre belirlenir (Hollenbeak vd., 2014). Sağlıklı bir yaşam tarzı benimsemek, kanser riskini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2018). Yapılan bilimsel araştırmalar ve ilaç geliştirme çalışmalarında, kanserle mücadelede yenilikçi tedavi yöntemlerinin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. (Garraway & Janne, 2012).

2.2 Beyin Tümörü

Beyin tümörleri, beyin dokusunda başlayan ve anormal hücre büyümelerini içeren bir hastalık kategorisidir (Louis vd., 2021). Bu tümörler, beyinde başlayabilir ve zamanla diğer dokulara veya organlara yayılabilir. Beyin tümörleri, baş ağrısı, nörolojik belirtiler, bilinç değişiklikleri ve diğer semptomlara neden olabilir (Quinn T Ostrom vd., 2018). Bu tür tümörler beyin fonksiyonlarını etkilemekte olup; primer ve sekonder (metastatik) beyin tümörleri olarak sınıflandırılmaktadır (Ostrom vd., 2020).

Primer beyin tümörleri, beyin dokusunun içinde başlayan ve genellikle beyinde oluşan tümörlerdir (Ostrom vd., 2015). Bu tür tümörler gliomlar, menenjiomlar ve medulloblastomlar gibi çeşitli alt tiplere ayrılan tümörlerdir (Louis vd., 2021). Semptomları ise baş ağrısı, görme sorunları, motor ve duyu kayıpları gibi çeşitli nörolojik belirtilerle yol açabilmektedir (Ostrom vd., 2015).

Sekonder beyin tümörleri ise, vücudun diğer bölgelerinden metastaz yoluyla beyne yayılan kanser hücreleri tarafından oluşturulur (Achrol vd., 2019). En sık görülen metastatik tümörler meme, akciğer, böbrek ve cilt kanseri gibi malign tümörlerdir (Nayak vd., 2012). Bu tür tümörler, beyin dokusunun içine yerleşerek çevresindeki dokuları etkileyebilir ve nörolojik belirtilere yol açabilmektedir (Nayak vd., 2012). Sekonder beyin tümörleri, genellikle prognozu kötüleştiren ve tedavi seçeneklerini kısıtlayan bir durumu işaret etmektedir (Nayak vd., 2012).

Beyin tümörlerin belirtileri ise; baş ağrısı, bulantı, kusma ve nörolojik bozukluklar gibi semptomlar, beyin tümörlerinin sık görülen belirtileridir (Ostrom vd., 2015). Görme problemleri, konuşma güçlükleri, denge kaybı ve duyu kayıpları gibi nörolojik bulgular da beyin tümörlerinin belirtileri arasında yer alır (Louis vd., 2016). Tümörün konumuna ve büyüklüğüne bağlı olarak, nöbetler, kas güçsüzlüğü ve davranış değişiklikleri gibi semptomlar da ortaya çıkmaktadır (Ostrom vd., 2015). Hafıza kaybı, dikkat eksikliği, zihinsel bulanıklık ve uyku bozuklukları gibi bilişsel ve duygusal değişiklikler de beyin tümörlerinin belirtileri arasında yer almaktadır (Louis vd., 2016).

Beyin tümörlerin teşhisi , genellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi görüntüleme teknikleri kullanılarak yapılmaktadır (Ostrom vd., 2015). Bu görüntüleme yöntemleri, tümörün boyutunu, konumunu ve dokusunu belirlemek için kullanılır ve tanıda önemli bir rol oynamaktadır (Louis vd., 2016). Beyin biyopsisi, tümörün histolojik özelliklerini ve malignite derecesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan başka bir teşhis yöntemidir (Louis vd., 2016). Görüntüleme bulguları ve biyopsi sonuçlarına dayanarak, beyin tümörlerinin tipi, evresi ve tedavi planı belirlenmektedir (Ostrom vd., 2015). Teşhis sürecinde, nörolojik muayene de semptomların değerlendirilmesinde ve tanının doğrulanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Ostrom vd., 2015). Beyin kanserleri köken aldıkları hücre türlerine göre çeşitlilik gösterebilmektedir. En yaygın beyin kanserileri ise şunlardır:

Oligodendroglioma: Oligodendroglioma, beyin ve omurilikte bulunan nadir bir primer merkezi sinir sistemi tümörüdür; bu tümör, oligodendrosit kökenli malign hücrelerin aşırı büyümesiyle karakterizedir ve genellikle frontal lob veya temporal lobda yer alır (Louis vd., 2016).

Schwannoma (Vestibüler Schwannoma): Akustik nörinom olarak da bilinen, Schwann hücrelerinden köken alan bir tür sinir kılıfı tümörüdür; genellikle işitme sinirinin (8. kraniyal sinir) Schwann hücrelerinden kaynaklanır ve iç işitme kanalında yer alır (Louis vd., 2016).

Medulloblastoma: Genellikle çocuklarda görülen nadir bir primer beyin tümörüdür; bu tür tümörler, küçük yaştaki bireylerde sıklıkla serebellumda bulunur ve agresif bir şekilde büyüyebilir, genellikle serebrospinal sıvıda spinal metastazlarla ilişkilidir (Louis vd., 2016).

Meningioma: Meningioma, genellikle meninkslerin (beyin zarlarının) kaynaklandığı, genellikle iyi huylu bir beyin tümörüdür; bu tümörler genellikle yavaş büyür ve çoğunlukla belirgin semptomlara neden olmaz, ancak büyüdükçe çevreleyen dokulara baskı yapabilir ve semptomlara yol açabilir (Louis vd., 2016).

Astrositomlar: Astrositomlar, astrosit adı verilen beyin hücrelerinden kaynaklanan bir tür primer beyin tümörüdür; bu tümörler, astrositlerin aşırı büyümesiyle karakterizedir ve genellikle çeşitli semptomlara, özellikle baş ağrısı, nörolojik bozukluklar ve motor işlev bozukluklarına neden olabilir (Louis vd., 2016).

Glioblastoma multiforme (GBM): Primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin sık görülen en agresif ve en kötü prognoza sahip olanıdır. Bu tür tümörler genellikle astroglial hücrelerden köken alır ve hızlı bir şekilde yayılır. GBM, genellikle yaşlı erişkinlerde görülür ve genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin birleşimi sonucu ortaya çıkabilir (Louis vd., 2021).

2.3 Glioblastoma

Glioblastoma, beynin en agresif ve yaygın primer tümörlerinden biridir (Louis vd., 2016). Genellikle yaşamı tehdit eden semptomlara yol açar, bunlar arasında baş ağrısı, nörolojik bozukluklar ve davranış değişiklikleri bulunur (Ostrom vd., 2015). Genellikle hızlı büyür ve beyin dokusuna invaze olur, bu da tedaviyi zorlaştırır (Stupp vd., 2005). Glioblastoma'nın gelişimi, çevresel faktörlerin, genetik mutasyonların ve radyasyon maruziyetinin kompleks etkileşiminden kaynaklanmaktadır (Ostrom vd., 2014). Özellikle, DNA hasarına neden olabilecek kimyasal maddeler, sigara içimi ve aşırı radyasyon maruziyeti gibi çevresel

faktörlerinde rolü bulunmaktadır (Louis vd., 2016). Ayrıca, belirli genetik mutasyonların, özellikle p53 ve EGFR gibi genlerin anormalliklerinin, glioblastoma riskini artırabileceği bilinmektedir (Louis vd., 2016). İmmün sistemini düzenleyen genlerdeki bozukluklar da glioblastomanın gelişimine katkı sağlamaktadır (Ostrom vd., 2014). Bununla birlikte, Glioblastoma'nın kesin nedenlerini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır ve bu alandaki çalışmalar devam etmektedir (Ostrom vd., 2014).

Glioblastoma, primer beyin tümörlerinin en yaygın formudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşa göre düzeltilmiş genel görülme sıklık oranı 100.000 kişi başına 3.22'dir ve tanı anındaki ileri yaş ve erkek cinsiyet ile artış gösterir. Son verilere göre, ABD veya Kanada'da insidans oranlarında artış gözlenmemekte, ancak İngiltere'den gelen veriler insidans oranlarının arttığını göstermektedir. Bu farklılıklar, farklı gözetim prosedürleri, kodlama ve zaman içinde glioblastoma sınıflandırmalarındaki değişiklikleri yansıtmaktadır (Weller vd., 2020).

Glioblastomalar, tanı anındaki yaş ve cinsiyete göre değişen 5 yıllık genel göreceli sağkalım oranı sadece % 6.8'dir. Kuzey Amerika'da glioblastomanın insidansı, 100.000 nüfus başına 5.0 olarak bildirilmiştir ve tüm primer intrakraniyal neoplazmların %15 ila %20'sini temsil eder. Glioblastoma oldukça agresiftir ve genellikle tanıdan sonraki ilk 15-16 ay içinde ölümle sonuçlanan son derece kötü bir prognoza sahiptir. 5 yıllık sağkalım oranı %5'tir (Oronsky vd., 2021).

Türkiye'de, tüm kanser vaka sayılarının %2'sini santral sinir sistemi kanseri oluşturmaktadır. Küresel verilere bakıldığında bu oran uyumlu bir şekilde olduğunu göstermektedir. Türkiye'deki hastaların %79,9'u histolojik olarak teyit edilirken , %11,3'ü radyolojik tanı , %2,4'ü ise ölüm raporuyla santral sinir sistemi kanseri tanısı konmuştur. Bu da istatistiklerin güvenilirliğini göstermektedir. GBM'nin ortalama tanı yaşı 64 olmakla birlikte insidansı yaşla birlikte artmaktadır. GBM'nin erkeklerde görülme insidansı kadınlara nispeten daha yüksektir (Özduman, vd., 2019).

Glioblastoma, hızlı büyümesi ve tedaviye dirençli olmasının sebebinden ötürü zorlu bir hastalık olarak kabul edilir. Glioblastoma ile ilgili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi için sürekli çaba gösterilmektedir.

2.3.1 Glioblastoma tedavi biçimleri

Glioblastoma da başlıca tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gelmektedir. Son yıllarda başta immunoterapi olmak üzere akıllı ilaç teknolojilerinin ve kişileştirilmiş tedavi yöntemlerine ait yaklaşımlar da kullanılmaktadır.

2.3.1.1 Cerrahi müdahale

Glioblastoma tedavisinde cerrahi müdahale, tümörün mümkün olduğunca çıkarılması için önemli bir adımdır. Cerrahi olarak çıkarılan tümörün miktarı, genellikle hastanın yaşam süresini etkiler. Ancak, glioblastoma, genellikle beyin dokusuna sıkıca yerleşir ve tamamen çıkarılması zor olabilir. Cerrahi işlem, tümörün mümkün olduğunca çıkarılması veya tümörün çevresindeki baskıyı azaltmak için yapılan bir girişimi içermektedir (Stupp vd., 2005).

2.3.1.2 Radyoterapi

Radyoterapi, glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Radyoterapi, tümör hücrelerinin DNA'sına zarar vererek hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını engeller. Bu şekilde, tümör hücrelerinin büyümesi durdurulur veya yavaşlatılır. Ancak, radyoterapi aynı zamanda sağlıklı beyin dokusuna da zarar verebilir, bu nedenle dozun dikkatli bir şekilde belirlenmesi ve tedavinin yan etkilerinin yönetilmesi önemlidir (Weller vd., 2017). Radyoterapi, cerrahi müdahale sonrası veya tümörün büyümesini kontrol altına almak için tek başına veya kemoterapi ile birlikte uygulanabilir (Stupp vd., 2005).

2.3.1.3 Kemoterapi

Kemoterapi, glioblastoma tedavisinde kullanılan önemli bir yöntemdir ve genellikle cerrahi ve radyoterapi ile kombine edilir (Yersal vd., 2017). Temozolomid (TMZ), glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır ve DNA hasarı yoluyla tümör hücrelerinin ölümünü indükleyerek etki gösterir (Çokluk, 2021).

Glioblastoma tedavisinde kemoterapi uygulamasının yanı sıra, hastaların yaşam kalitesini ve sağkalım sürelerini artırmak için yeni tedavi stratejileri üzerinde

alışmalar devam etmektedir. Yeni tedavi stratejileri arasında immunoterapi ve hedefe yönelik tedaviler yer almaktadır.

2.3.1.4 Immunoterapi

Glioblastoma tedavisinde immünoterapinin temel prensibi, tümör hücrelerini bağışıklık sistemi tarafından tanıtılarak ve hücresel bağışıklık tepkilerinin uyarılması yoluyla yok edilmesidir. Bu genellikle, tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan belirli antijenlerin tanınması ve hedeflenmesi ile gerçekleşir. Bununla birlikte, glioblastoma, bağışıklık sistemi tarafından "görünmez" olarak kabul edilir ve bu nedenle immünoterapi genellikle diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılır (Weller vd., 2017).

Aşılar da glioblastoma tedavisinde kullanılan immünoterapi yöntemlerinden biridir. Örneğin, Rindopepimut adlı aşı, EGFRvIII antijenine karşı geliştirilmiştir ve glioblastoma hastalarında immünojeniteyi artırarak bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanınmasını sağlamayı hedefler (Weller vd., 2017).

2.3.1.5 Hedefe yönelik tedavi

Hedefe yönelik tedaviler, GBM'nin moleküler biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla geliştirilmiş ve anjiogenez, büyüme faktörleri, hücre içi sinyal ileti yolakları gibi tümör patogenezinde önemli rol oynayan mekanizmaları hedef alır. Bu tedaviler, geleneksel kemoterapilere kıyasla daha düşük toksisiteye sahip olup, tedavi stratejileri bu hedefli ilaçlar ve kombinasyonlarına doğru kaymaktadır (Ekenel, 2017).

Glioblastoma için hedefe yönelik tedavi stratejileri, moleküler hedefleri vurgulayarak daha yüksek etkinliğe sahip tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu stratejiler, mevcut tedavi seçeneklerinin etkinliğini artırmayı ve hastaların sağkalım sürelerini uzatmayı hedeflemektedir (Erbayrakar vd., 2015).

2.3.2 Glioblastomada kemoterapide direnç

Kemoterapiye direnç, glioblastoma tedavisinde sık karşılaşılan bir sorundur. Tümör hücreleri, DNA hasarını onarmak için gelişmiş mekanizmalara sahip olabilirler ve bu

da ilacın etkisini azaltabilir. Ayrıca, glioblastoma hücreleri genetik veya epigenetik değişiklikler yoluyla ilaca karşı direnç geliştirebilirler (Hegi vd., 2005).

Glioblastomada ameliyat sonrası için standart tedavi (alkile edici kemoterapi ajanı temozolomid ile eşzamanlı uygulanan radyasyon ve ardından adjuvan temozolomid), on yıldan fazla bir süredir uygulanmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon, çift sarmallı ve tek sarmallı DNA kırıklarına, oksidatif hasara, mitotik hücre ölümüne ve sentrozom aşırı çoğalmasına aracılık ederken; temozolomid, özellikle O6-metilguanin (O6MeG) eklentilerinin replikasyonu uyararak sitotoksiteyi indirir. Bundan ötürü glioblastoma tekrar görülür ve daha sonraki kemoterapiye direnç geliştirir (Alexander vd., 2020).

2.3.3 Kemoterapide alkilasyon ajanları

Temozolomide (TMZ): Temozolomide, glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir alkileyici ajan olarak bilinir. DNA'yı alkile ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller (Stupp vd., 2005). Temozolomid, radyoterapi ile birlikte kullanıldığında daha etkili olabilir (Keskin, vd., 2021).

Lomustine (CCNU): Lomustine, glioblastoma tedavisinde kullanılan alkilasyon ajanlarından biridir ve nitrozüre türevlerinden biridir. Bu ilaç, tümör hücrelerinin DNA'sını alkile ederek ve onarılamaz hasar oluşturarak çalışır. Genellikle, tekrarlayan veya ileri evre glioblastoma vakalarında kullanılır. Lomustine, diğer tedavilere dirençli olan tümörlerde veya cerrahi müdahale ve radyoterapi sonrasında tümörün geri dönmesini önlemek için kullanılabilir. Ancak, lomustine'nin kullanımı bazı toksisite sorunlarına neden olabilir ve bu nedenle dikkatli bir şekilde izlenmesi gerekebilir. Hastanın genel sağlık durumu ve tümör özellikleri göz önünde bulundurularak tedavi planı belirlenir (Stupp vd., 2005).

Carmustine (BCNU): Glioblastoma tedavisinde uzun bir geçmişe sahip olan ve alkilasyon ajanlarından biri olarak sınıflandırılan bir ilaçtır. BCNU, tümör hücrelerinin DNA'sını alkile ederek ve onarılamaz hasar oluşturarak çalışır. Ancak, BCNU'nun kullanımı bazı toksisite sorunları nedeniyle sınırlıdır. Özellikle, kemik iliği baskılanması, karaciğer toksisitesi ve akciğer toksisitesi gibi ciddi yan etkiler riski vardır. Bu nedenle, BCNU genellikle diğer tedavi seçeneklerinin başarısız olduğu veya tolere edilemediği durumlarda tercih edilir. Tedavi planı belirlenirken

hastanın genel sağlık durumu, yaşam kalitesi ve yan etki riskleri dikkate alınmalıdır (Stupp vd., 2005).

Procarbazine: Procarbazine, glioblastoma gibi beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılan bir alkilasyon ajanıdır. Bu ilaç, tümör hücrelerinin DNA'sını alkile ederek ve onarılamaz hasar oluşturarak çalışır. Procarbazine genellikle temozolomid ve lomustine gibi diğer kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanılır. Bu ilaç kombinasyonları, birçok glioblastoma vakasında standart tedavi protokolleri olarak kullanılmaktadır. Ancak, procarbazine'nin kullanımı bazı yan etkilere neden olabilir, bunlar arasında kemik iliği baskılanması, mide bulantısı, kusma ve halsizlik gibi durumlar yer alabilir. Hastanın genel sağlık durumu ve tümör özellikleri dikkate alınarak tedavi planı belirlenir. Procarbazine'nin etkinliği ve yan etkileri, hastaların düzenli olarak izlenmesini gerektirebilir (Stupp vd., 2005).

2.3.3.1 Kemoterapide alkilasyon ajanlarına direnç

Alkilasyon ajanları, DNA'yı alkile ederek tümör hücrelerini öldürmeyi amaçlar. Ancak, GBM hücreleri bu ajanlara direnç geliştirebilirler. Direnç, tümör hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarının artırılması yoluyla veya alkilasyon ajanlarının hücre içine girişini azaltarak ya da etkisini engelleyerek gelişebilir. Bu direnç mekanizmaları, genellikle tümör hücrelerinin çeşitli sinyal yollarını daha çok aktive ederek veya inhibe ederek gerçekleşir. Örneğin, DNA onarım enzimlerinin ifadesinde ki artış, alkilasyon ajanlarının neden olduğu DNA hasarını onarmaya yönelik bir savunma mekanizması meydana gelmesine sebep olabilir. Bu nedenle, alkilasyon ajanlarına karşı direnç geliştiren GBM vakalarında tedavi seçenekleri kısıtlı kalmaktadır (Smith vd., 2017). Alkilasyon ajanlarına direnç mekanizmaları şunlardır:

DNA Onarım Mekanizmalarının Aktivasyonu: Tümör hücreleri, alkilasyon ajanlarının neden olduğu DNA hasarını hızla onaran DNA tamir mekanizmalarını aşırı şekilde aktive ederek direnç geliştirebilirler (Bao vd., 2006).

Moleküler Yol Değişiklikleri: Tümör hücreleri, ilacın hedef aldığı DNA onarım yollarının veya apoptozis yollarının aktivitesini değiştirerek veya etkisini azaltarak direnç kazanabilirler (Hegi vd., 2005).

Moleküler Mutasyonlar: Tümör hücrelerinde meydana gelen genetik veya epigenetik değişiklikler, alkilasyon ajanlarının hedef aldığı DNA bölgelerinde veya etkilediği moleküler hedeflerde mutasyonlara neden olabilir ve bu da ilacın etkinliğini azaltabilir (Weller vd., 2012).

İlaç Pompalarının Artışı: Tümör hücreleri, hücre dışına ilacı pompalayan ve içeriğini düzenleyen membran pompalarının aktivitesini artırarak ilacın hücre içine girişini azaltabilirler (Dean vd., 2005).

Hücre Metabolizma Değişiklikleri: Tümör hücreleri, ilacın hücre içindeki metabolik yollarını değiştirerek veya etkisini azaltarak direnç geliştirebilirler (Hegi vd., 2005).

Kemoterapi sırasında alkilasyon ajanlarına direnç geliştiren tümör hücrelerinde Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT) gelişebilir. EMT, tümör hücrelerinin agresifliğini ve metastatik potansiyelini artıran bir süreçtir. Alkilasyon ajanlarına dirençli hücrelerde EMT'nin başlaması, tümör hücrelerinin daha invaziv ve migrasyon hale gelmesine neden olabilir, böylece metastaz riski artar.

2.3.4 O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) nedir?

MGMT (O6-Metilguanin DNA Metiltransferaz), DNA'nın O6-pozisyonundaki guaninleri onaran bir enzimdir (Hegi vd, 2005). Glioblastomada MGMT (O6-Metilguanin DNA Metiltransferaz), DNA'nın O6-pozisyonundaki guaninleri onaran bir enzimdir. Bu enzim, tümör hücrelerinin kemoterapiye direnç geliştirmesinde kritik bir rol oynar. MGMT' nin promotor bölgesindeki metilasyon durumu, glioblastoma tedavisinde önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilir. MGMT promotorunun metillenmesi, MGMT proteininin düşük düzeylerde ifade edilmesine neden olabilir ve bu da alkilasyon ajanlarına duyarlılığı artırabilir bu sayede tedavi sonuçlarını olumlu yönde etkileyebilir. Örneğin, temozolomid gibi alkilasyon ajanlarına MGMT promotor metilasyonu ile duyarlılık artışı ilişkilendirilmektedir. MGMT promotorunun metilasyon durumu, glioblastoma hastalarının tedavi planlamasında ve prognoz belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Hegi vd., 2005).

2.3.4.1 MGMT inhibasyonun önemi

MGMT inhibitörleri, alkilasyon ajanlarının etkinliğini artırarak tümör hücrelerinin DNA onarım yeteneklerini azaltır ve böylece kemoterapinin etkisini güçlendirir (Weller et vd., 2019).

MGMT inhibitörlerinin, glioblastoma tedavisindeki önemi, tümör hücrelerinin kemoterapiye direnç kazanmasını engelleyerek, daha etkili bir tedavi sağlamaktadır (Stupp vd., 2021).

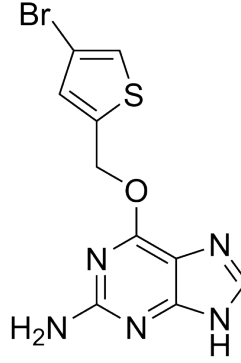
Günümüzde, MGMT inhibitörlerinin glioblastoma tedavisindeki rolü üzerine yapılan araştırmalar, bu inhibitörlerin kullanımının tedavi sonuçlarını olumlu yönde etkileyebileceğini ve hastaların yaşam kalitesini artırabileceğini göstermektedir (Wick vd., 2021).

2.3.4.2 MGMT inhibitörleri ve etkisi

MGMT inhibitörleri, glioblastoma tedavisinde kullanılan alkilasyon ajanlarının etkinliğini artırmak için tasarlanmıştır. Bu inhibitörler, genellikle MGMT enziminin aktif bölgesine bağlanarak onun aktivitesini engellerler. Bu şekilde, tümör hücrelerinin DNA onarım yetenekleri azalır ve alkilasyon ajanlarının neden olduğu DNA hasarı daha etkili bir şekilde birikir. MGMT inhibitörleri arasında temozolomid gibi ilaçlar yer alır (Stupp vd., 2005). Ayrıca, son araştırmalar, farklı kimyasal bileşiklerin MGMT inhibitörleri olarak potansiyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Hegi vd., 2005).

MGMT (O6-Metilguanin DNA Metiltransferaz) enziminin aktif bölgesine bağlanan MGMT inhibitörleri onun aktivitesini engellemektedir. Bu enzim, DNA'nın O6-pozisyonundaki guaninleri onararak tümör hücrelerinin kemoterapiye direnç geliştirmesinde kritik bir rol oynar. MGMT inhibitörleri sayesinde, tümör hücrelerinin DNA onarım yetenekleri azalır ve alkilasyon ajanlarının neden olduğu DNA hasarı daha etkili bir şekilde birikir. Bu durum, tümör hücrelerinin ölümüne ve tedaviye daha iyi bir yanıt verilmesine olanak tanır (Esteller vd., 2000).

2.3.4.2.1 Lomeguatrib



Şekil 2.1. Lomeguatrib

Lomeguatrib'in yapısı, 6-(benziloksi)-2-(metoksimetil)-9H-purin-9-il) metil karbamat olarak tanımlanır. Moleküler ağırlığı: 326.17 g/mol. Bu bileşik, MGMT (O6-Metilguanin DNA Metiltransferaz) inhibitörü olarak bilinir. Kimyasal formülü $C_{11}H_{14}N_4O_3$ Lomeguatrib, kanser tedavisinde potansiyel bir kullanım alanına sahip bir DNA tamir inhibitörüdür (Kaye vd., 2010).

Bu bileşik, özellikle DNA metiltransferaz enziminin (MGMT) inhibisyonu yoluyla tümör hücrelerinin DNA tamir kapasitesini hedefler (Kaye vd., 2010). Lomeguatrib, glioblastoma multiforme gibi MGMT aktivitesinin arttığı kanser türlerinde özellikle değerlendirilmiştir (Wick vd., 2012). Bu bileşiğin etkisi, kanser hücrelerinin DNA hasarının onarılmasını engelleyerek hücre ölümünü teşvik etmek üzerine odaklanmaktadır (Wick vd., 2012).

2.3.4.2.2 Neden GBM'de lomeguatrib

Kemoterapi uygulamaları GBM tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır ve en çok tercih edilen kemoterapi ajanı DNA alkilasyonu (metil ve etil eklentileri) yoluyla etki gösteren Temozolomid (TMZ)'tir. Hücrede bulunan MGMT isimli enzim DNA'da TMZ uygulaması sonrası oluşan metil eklentilerini kendi üzerine alarak DNA'nın metil gruplarından temizlenmesi sağlar (Marchesi, vd., 2007). Bu durumda, TMZ kemoterapötik etkisini gösteremediğinde hasta tedaviye yanıt veremez ve direnç geliştirmiş olur.

GBM’de, hücrede aşırı düzeyde MGMT enzimin bulunması ile ilişkili direnç yolağının üstesinden gelebilmek adına çeşitli MGMT inhibitörleri geliştirilmiştir (Shao vd.,2020). Lomeguatrib bu MGMT inhibitörlerinden biridir ve toksisitesi diğerlerine göre en düşük (Louis vd., 2016) ve inhibisyon gücü daha yüksek olan bileşik olarak bilinmektedir (Barvaux, vd., 2004).

EMT, kanser hücrelerinin hücre-hücre bağlantı proteinlerini, apikal bazal polaritesini ve bazal ile olan etkileşimini kaybettiği hücresel bir süreçtir (Coelho vd., 2020). EMT ile hücrelerin metastaz GBM mikroçevresinin hücrelerin ilk tedavi sonrası daha agresif ve infiltratif yapı kazanarak mezankimal karaktere bürünmesine önemli bir rol oynadığı ve mezankimal GBM hücrelerinin çoklu ilaç direnci (Kim vd., 2021) ve apoptoza direnç ile ilişkili ve olduğu belirtilmektedir (Majc vd., 2020).

2.3.5 Epitelyal-mezankimal geçiş (EMT) nedir?

Epitelyal Mezankimal Dönüşüm ’ ilk olarak E.Hay ’ın ilkel çizginin oluşum modelini kullanarak tavuk embriyosunda yapmış olduğu çalışmalar ile adlandırılmıştır.(Hay vd., 1995) ’Geçiş’ terimi bu süreçten neoplastik dönüşümden farklı olmasından dolayı ’Dönüşüm’ teriminin yerini almaktadır.(Kalluri,vd.,2003) Epitel mezankimal geçiş (EMT), hücrelerin epitel yapısından mezankimal fenotipe geçişini ifade eder (Thiery vd., 2009). Bu süreç, embriyonik gelişimde ve yetişkin organizmalarda önemli rol oynar (Nieto vd., 2016). EMT, hücrelerin morfolojik değişimleri, migrasyon yeteneklerinin artması ve invaziv özellikler kazanması ile karakterizedir (Lamouille vd., 2014). Aktivasyonu, hücreler arasındaki adezyonun azalması ve hücre-matriks etkileşimlerinin değişmesiyle gerçekleşir (Kalluri ve Weinberg, 2009).

EMT, kanser metastazı, fibroz ve doku rejenerasyonu gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynar (Nieto vd., 2016). Bu süreç, hücrelerin polarizasyonunu kaybetmesi ve epitel tabakanın yapısının değişmesiyle karakterizedir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Bu sürecin moleküler mekanizmaları arasında hücresel sinyal iletim yolları ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi bulunur (Lamouille vd., 2014). EMT'nin hücresel fenotipleri, hücre çoğalması, göçü ve apoptozu üzerinde etkili olabilir (Nieto vd., 2016). Bu mekanizmanın anlaşılması,

kanser biyolojisi ve dokusal rejenerasyon gibi alanlarda önemli terapötik ve araştırma fırsatları sunmaktadır (Thiery vd., 2009).

2.3.5.1 EMT özellikleri

Gelişimin ayrılmaz parçası olan EMT yara iyileşmesi, fibrosiz ve kanserde yeniden aktivite olmaktadır (Kalluri ve Weinberg, 2009; Thiery vd., 2009).

Çizelge 2.1. Epitel ve mezenkimal hücrelerin fenotipik özellikleri.

Epitel Hücreleri	Mezenkimal Hücreler
Sıkıca yapışan	Yapışkan olmayan
Apikal-bazolateral polarite	Polarize olmayan
Sabit hücre katmanı	Göçmen
Epitel hücre-hücre bağlantıları	Lamellipodial uzantı
Bağlı hücrelerin tabakaları veya tüpleri	Gevşek bir şekilde paketlenmiş bağlantısız hücreler

EMT esnasında; hücre iskeletinde yeniden düzenleme olur, hücreler apikal ve polaritelerini kaybeder. Gen ekspresyonunu sağlayan sinyal yollarında değişiklikler meydana gelmektedir. Gelen değişikliklerle birlikte hücrede fenotip kazanım olarak hareketlilik artar bu da invaziv özellik kazanımı sağlamaktadır (Thiery vd., 2006).

Adherens bağlantılarındaki bağlantıyı; epitel hücrelerinde, adhezyon molekülü ve kalsiyuma bağlı olan kaderin proteinleri gerçekleştirmektedir (Takeichi vd., 1991).

E-kaderin gen ekspresyonundaki azalış kanser hücresinin epitel kaynaklı olduğu invaziv ve farklılaşma göstermediği bir fenotiple ilişkilendirilmektedir (Richmond, vd., 1997; Yawhari vd., 1997). Farklı bir adhezyon molekülü N-kaderin (nöral kaderin) kanserde artış göstermesi invazivlik özelliği ile ilişkilendirilmektedir. Mezenkimal hücrelerde daha sık görülmektedir (Araki vd., 2011). Hücrelerdeki artan hareketlilik için kaderin proteinleri gerekli olmakta, fakat EMT’de görülen morfolojik değişiklikler için her zaman gerek duyulmamaktadır (Maeda vd., 2005).

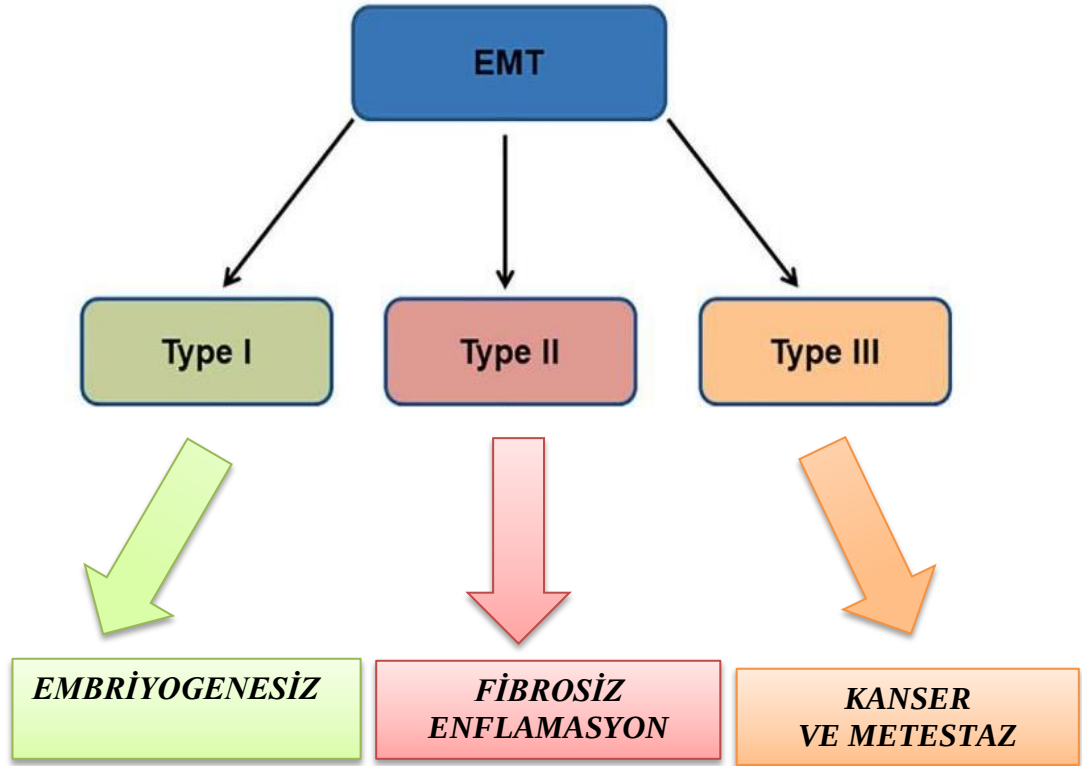
EMT süreçleri aynı zamanda fenotipik özellikleri bakımından epitelyal fenotipin baskılanması mezenkimal fenotipin aktivitesini gerçekleştiren gen ekspresyonu modifikasyonunu içermektedir (Lamouille vd., 2013; Puisieux vd., 2014). E-kaderin ve β -katenin bunların başında gelir. E-kaderin gen ekspresyonunun azalması EMT baskılayıcı transkripsiyon faktörleri (EMT-TF’ler) olan SNAIL, ZEB ve TWIST ile

gerçekleşmektedir (Vaquero vd., 2017). EMT-TF'lerin en önemli özellikleri E-kaderinin promotörünü baskılayarak gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Moyret-Lalle vd., 2014).

Aynı zamanda mezankimal fenotiple ilişkili genler; N-kaderin, Vimentin, Fibronectin, α -düz kas aktini (α -SMA), MMP'ler (Matriks Metolloproteinazlar) gen ekspresyonunda artış göstermektedir (Moyret-Lalle vd., 2014).

2.3.5.2 EMT'nin tipleri

Süreç bakımından EMT üç ayrı biyolojik olayı içermektedir. 3 ayrı biyolojik tiplendirmesine yönelik çalışmalar 2007'de Polonya ve 2008'de Cold Spring Harboi Laboratuvar'ında yapılmış olan EMT toplantılarında kabul edilmektedir (Zeisberg vd., 2009).



Şekil 2.2. Üç farklı EMT türü.

2.3.5.2.1 TİP I EMT: implantasyon, embriyogenez, gelişim

Tıp I EMT gastrulasyonun bir parçası olarak bulunmaktadır. İlkel epitelyal hücreleri mezankimal hücrelere geçişini sağlayabilen ve göç etme özelliklerine hakim olan nöral krest hücrelerini üreten nöral epitelyal hücrelerini bulundurmaktadır. EMT süreci sonunda üretilen hücre endodermal ve mezodermal organlarında mezankimal epitelyal geçiş (MET) sonunda tekrar ikinci epitelyal hücreye dönüşmektedir (Zeisberg vd., 2009).

Embriyonik morfogenez ile tek ilişkili EMT tip I EMT'dir (Acloque vd., 2009). Tip I EMT biyokimyasal olarak incelendiğinden gastrulasyon Wnt sinyal yolağı ile düzenlenmektedir. Nöroektodermi meydana getiren nöral krest hücreler göç etme özelliği tip I EMT ile ilişkilendirilmektedir (Liu vd., 1999; Duband vd., 1982).

2.3.5.2.2 TİP II EMT: fibrosiz ve enflamasyon

Organ Fibrosizi, epitel dokuda meydana gelmekte olup birden fazla inflamatuvar hücreyle birlikte fibroblastlar; kollajen, elastin, laminin ve teraksin vb. hücreler arası matriks bileşenleriyle birlikte gerçekleşmektedir (Kalluri vd., 2009).

Tip II EMT ile ilişkisi bulunan fibrosiz olaylarına örnek olarak; böbrek, karaciğer, akciğer ve bağırsakta meydana gelen fibrosizler tip II EMT ile ilişkilendirilmektedir (Potenta vd., 2008; Kim vd., 2006).

Tip II EMT iltihaplanmada da önemli bir rol oynar. Öncelikle iltihap; vücudun enfeksiyon ve yaralanmaya karşı koruyan savunma mekanizmadır. Yara iyileşmesi sırasında, keratinositlerin göçünü ve yeniden epitelizeasyonunu aktive etmek için sitokinleri ve büyüme faktörlerini harekete geçiren inflamatuvar yanıt başlatır. Bu yeniden epitelizeasyon, keratinositlerin yara kenarından derin – itelize bölgeye göçünü ve bu arada epitelyal özellikleri kaybetmesini içerir, ancak keratinositler, hücreler arası bağlantılara sahip yapışkan hücre tabakası olarak kalmaktadır. Slug, yara kenarlarını çevreleyen keratinositlerde buluna yara iyileşmesinde önemli bir role sahiptir. Slug eksikliği olan farelerde deri eksplantlarından epitelyal büyümenin azaldığı görülmektedir (Savagner vd., 2005).

2.3.5.2.3 TİP III EMT: kanser ve metestaz

EMT'nin kanserde ortaya çıkması, kanser hücresinin istilasını, plastisitesini, göçüne ve malignitesini artırır. Metestaz, birincil tümör büyümesi anjiogenez, EMT, komşu dokulara istila, kan damarına intravazasyon, dolaşımında hayatta kalma kan damarından eksrtavazasyon, uyku hali ve ikincil tümör büyümesi gibi birkaç adımı içerir. Epitel hücreleri apikal-bazal polariteyi kaybederek ön-arka polarite kazanır, komşu hücrelerle temasını kaybeder, hücre iskeleti değişikliğe uğrar ve proteazların aktivasyonu ile ekstraselüler matriksi istila eder.

Metestaz sırasında epitel hücreleri yassı, küboidal, kolumnner şeklini kaybedip, kanser kök hücresi özelliklerini kazanır ve metestaz sonrası kolaylıkla hareket edebilir hale gelir. Mezankimal fenotip kazanılması dolasıyla EMT'in kanser metastazında önemli bir rol oynadığı açıktır.

Hareket etmeye başladıklarında birincil bölgeden ayrılırlar ve çevredeki dokulara istila ederler. Daha sonra bu hücreler yani bölgede ikincil bir tümör oluşturur ve makroskobik metestazlar oluşturmak için MET'e yani mezankimalden Epitelyal Geçişe uğrar (Shibue vd., 2017; Kalluri vd., 2010).

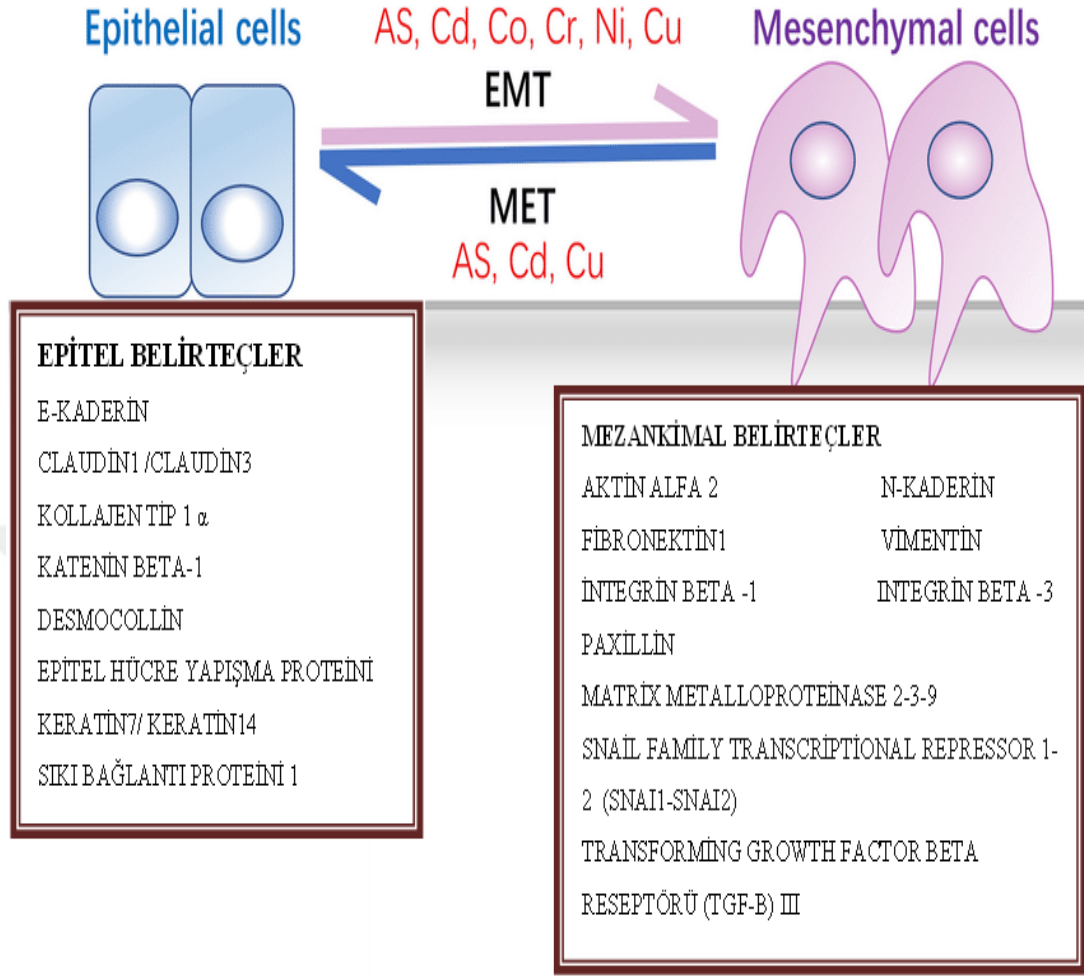
2.3.5.3 EMT transkripsiyon faktörleri

Epitelyal fenotipin baskılandığı, mezankimal fenotipin aktivetisini sağlanmasındaki gen ifadesi değişikliklerini kontrol eden transkripsiyonel faktörlerin başında; SNAIL, TWIST ve ZEB (çinko-parmak e kutu bağlama) gelmektedir (Lamouille vd., 2014).

SNAIL; EGF, HGF, FGF, BMP'ler, TGF- β , Wnt, Notch, PI3K-AKT, NK-k β ve TNF- α gibi çeşitli sinyal yolakları tarafından aktive edilir. Gelişim, fibroz ve kanser sırasında EMT aktivasyonu esas olarak SNAIL ve SLUG'a bağlıdır. SNAIL, E-Kaderini baskılar ve E-kaderinin promotor bölgesinin proksimaldeki E-kutuların bağlanarak E-kaderinin transkripsiyon tepkisini geri çevirerek EMT'yi baskılar. Mutant SNAIL aleli için homozigot olan fare embriyoları, mezoderm hücrede E-Kaderini tutar ve epitelyal özellikler gösterir bu da gastrulasyon aşamasında embriyo gelişiminin durmasına ve ölümüne yol açar (Ciruna vd., 2001).

TWIST; bHLH transkripsiyon faktörleri içerisinde yer almakta olup EMT ‘de önemli rolü bulunmaktadır (Peinado vd., 2007; Craene vd., 2013). bHLH transkripsiyon düzenleyicileri temel olarak hücre büyümesi, farklılaşma ve say belirleme gibi gelişimsel süreçlerde rol alır. Doku dağılımı, dimerizasyon yeteneği ve DNA bağlanma özellik bakımından 7 sınıfı vardır (Massari vd., 2000). EMT ile ilişkili bHLH transkripsiyon faktörü arasında TWIST1 ve TWIST2 bulunmaktadır (Peinado vd., 2007) TWIST; tümörlerde fazla bir şekilde gen ekspresyonu olur ve kötü prognozla birlikte ilişkilendirilir (Duagkumpha vd., 2014). TWIST, mezankimal gen ekspresyonunda baskılanmaktadır (Xu vd., 2009). Twist1 kanser hücrelerinde; N-kaderin gen ekspresyonunu SNAIL’den bağımsız baskılamaktadır. Ayrıca E-kaderin gen ekspresyonunda bastırır (Yang vd., 2010; Yang vd., 2012). ZEB; ZEB transkripsiyon faktörünün EMT ile ilişkili 2 ana transkripsiyon faktörleri ZEB1 ve ZEB2’dir. E-kaderinin promotöründeki E-kutularına bağlanarak gen ekspresyonunu azaltmaktadır (Zhang vd., 2015). ZEB2 ayrıca sıkı bağlantılarda, desmozomlarda ve boşluk bağlantılarında yer alan genler gibi hücre bağlantı komplekslerini koruyan genleride gen ekspresyonunda azaltmaktadır. Bu ekspresyon; mide, hepatoselüler, yumurtalık ve meme kansinimleri gibi birçok kanserde arttığı gösterilmektedir (Vandewalle vd., 2005).

2.3.5.4 EMT’NİN moleküler belirteçleri



Şekil 2.3. EMT sürecine ve klasik gen belirteçlerine genel bakış.

Çizelge 2.2. Epitel ve mezenkimal hücrelerin moleküler belirteçleri

Epitel Hücreleri	Mezenkimal Hücreler
E-Kaderin	N-Kaderin
Claudin1 /Claudin3	Vimentin
KOLLAJEN TİP 1 A	FİBRONEKTİN-1
Katenin Beta-1	İntegrin Beta -1
Desmokol	İntegrin Beta -3
Epitel Hücre Yapışma Proteini	Paxillin
Keratin7 Keratin14	Snail Family Transcriptional Repressor 12 (Snai1-Snai2)
SIKI BAĞLANTI PROTEİNİ 1	TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR BETA RESEPTÖRÜ (TGFB) - 3
	AKTİN ALFA 2

E-Kaderin, Zona occluden1, claudins, sitokeratin ve tip IV kollajen gibi epitel hücre belirteçlerinin ekspresyonu azalırken; N-kaderin, tip I ve III kollajen vimentin, Fibroblast spesifik protein-1 (FSP), α - Düz kas aktin, fibronectin gibi mezenkimal hücre belirteçlerinin ekspresyonu artar (Kovacic vd., 2012).

EMT sırasında meydana gelen hücre iskeleti değişikliklerine özellikle değinmek gerekirse, apiko-bazal polariteyi koruyan epitelyal hücrelerde mevcut olan güçlü hücre-hücre bağlantıları; sıkı bağlantılar, yapışık bağlantılar ve dezmozomlar ortadan kaybolurken, aktin açısından zengin çıkıntılar adı verilen filopodia ve lamellopodia göç eder, bu yapılar mezenkimal hücrelerin görünümünü temsil ettiği belirtilmektedir.

Ek olarak, desmozomlara bağlanarak hücreler arası yapışmayı destekleyen hayati ara filament keratinim ekspresyonu azaltmaktadır. EMT sırasında başka bir ara filament olan vimentinin gen ekspresyonu artmaktadır.

Ayrıca, Slug, Twist ve Snail1 gibi transkripsiyon faktörlerinde ve ECM degrede eden enzimlerin gen ekspresyonlarında artış, hücre iskeleti proteinlerinin yeniden düzenlenmesi yanı sıra spesifik bir takım miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikler de epitelyalden mezenkimal geçişi göstermektedir. Tek bir miRNA birden fazla mRNA'yı hedefleyebilir ve her mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Cai vd., 2009).

miR-200, ZEB1/ZEB2, β -katenin/Wnt sinyalini baskılayarak EMT'yi inhibe eder MDM4 böylece E-kaderini yukarı regüle eder ve N-kaderin, vimentin, MMP2 ve MMP9'u aşağı regüle eder; bu da tamamen EMT'nin baskılandığını gösterir (Korpal vd., 2008). Yapılan EMT ile ilgili çalışmalarda Glioblastoma da direnç geni olan MGMT inhibisyonunun tek başına kemoterapötik etkisi ve EMT üzerindeki etkisine ilişkin veri bulunmamaktadır.

2.3.5.4.1 Vimentin

Epitel mezankimal geçiş (EMT), bir hücrenin epitelyal özelliklerden mezankimal özelliklere doğru dönüşümünü ifade eder. Bu süreç, embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin organizmalarda doku onarımı, yara iyileşmesi ve kanser metastazı gibi durumlarda gerçekleşebilir. EMT sırasında, epitelyal hücrelerin fenotipi değişir ve vimentin gibi mezankimal proteinlerin ifadesi artar. Vimentin, tip III ara filament proteinlerinden biridir ve hücrelerin mekanik dayanıklılığını sağlamada ve şeklini korumada önemli bir rol oynar. Artan vimentin ifadesi, hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini artırır, böylece metastatik potansiyellerini artırabilir. Bu süreç, kanser metastazı gibi patolojik durumlar için önemlidir, çünkü metastatik hücreler EMT yoluyla daha invazif hale gelir ve bu da tümörün diğer dokulara yayılmasını kolaylaştırır (Johnson vd., 2020).

2.3.5.4.2 E-kaderin

E-kaderin, hücreler arasındaki bağlantıyı sağlayan ve doku bütünlüğünü koruyan bir protein molekülüdür. E-kaderin, epitel mezankimal geçiş (EMT) sürecinde kritik bir rol oynar. Normal koşullarda, epitel hücrelerde yoğun olarak bulunan E-kaderin, hücreler arasında sıkı bağlantıların korunmasında ve dokuların bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir rol oynar. Ancak, EMT sırasında, hücrelerin epitel hücrelerden mezankimal hücrelere dönüşmesiyle, E-kaderin 'in ifadesinde azalma görülür. Bu azalma, hücreler arasındaki bağlantının zayıflamasına ve hücrelerin birbirinden ayrılmasına yol açar. E-kaderin'in azalması, hücrelerin migrasyonu ve invazyonunu kolaylaştırarak, kanser metastazı gibi patolojik durumların gelişimine katkıda bulunur. Bu nedenle, E-kaderin, EMT sürecinin düzenlenmesinde ve kanser metastazının önlenmesinde önemli bir hedef olarak kabul edilir (Wheelock vd., 2008).

2.3.5.4.3 N-kaderin

Epitel mezankimal geçiş (EMT) sürecinde, N-kaderin 'in rolü oldukça önemlidir. Normal şartlarda, hücreler arasındaki bağlantıyı sağlayan E-kaderin gibi epitel kaderinler baskındır. Ancak, EMT sırasında, hücrelerin mezankimal fenotipe dönüşmesiyle N-kaderin 'in ifadesinde artış görülür. Bu artış, hücreler arasında bağlantının değişmesine ve sıkı yapışmalardan daha gevşek bağlantılara doğru bir geçişe neden olur. N-kaderin 'in artışı, hücrelerin migrasyon yeteneğini artırırken, invazyon yeteneğini de destekler. Bu, hücrelerin doku içinde hareket etme ve metastaz yapma yeteneklerini artırır. Dolayısıyla, N-kaderin, EMT'nin başlatılmasında ve hücrelerin mezankimal fenotipe geçişinde kritik bir rol oynar (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).

2.3.5.4.4 Snail

Epitel mezankimal geçiş (EMT) sürecinde, Snail transkripsiyon faktörü, hücrelerin epitel hücrelerden mezankimal hücrelere dönüşmesinde kritik bir rol oynar. Snail, gen ekspresyonunu değiştirerek hücrelerin yapısını ve işlevini dönüştürür; özellikle hücreler arasındaki bağlantıları zayıflatır ve hücrelerin migrasyonunu artırır. Bu süreç, invaziv hale gelmelerini ve sonunda metastaz yapmalarını sağlar. Ayrıca,

Snail'in embriyonal gelişim, doku rejenerasyonu ve fibrozis gibi diğer biyolojik süreçlerde de rol oynadığı gösterilmiştir (Lamouille, Xu & Derynck, 2014).

2.3.5.4.5 Smail2

Epitel mezankimal geçiş (EMT) sürecinde SMAİL2, hücrelerin fenotipik değişiminde önemli bir rol oynar. SNAI2 geninin transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bu protein, hücrelerin epitel hücrelerden mezankimal hücrelere dönüşümünü kolaylaştırır. Bu dönüşüm sürecinde, SMAİL2 hücrelerin morfolojik ve işlevsel özelliklerini değiştirir. Örneğin, hücreler arasındaki bağlantılar gevşer ve hücrelerin migrasyon yetenekleri artar. Ayrıca, SMAİL2'nin etkisiyle hücrelerin invaziv özellikleri artar, yani hücreler çevre dokulara yayılmaya ve metastaz yapmaya yatkın hale gelirler. SMAİL2'nin kanser metastazı gibi patolojik süreçlerdeki bu rolü, kanser ilerlemesi ve tedavisi üzerinde büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, SMAİL2'nin moleküler mekanizmaları ve etkileri üzerine yapılan çalışmalar, kanser biyolojisi ve tedavisi alanında önemli bilgiler sağlamaktadır (Gupta vd., 2019).

2.3.5.4.6 Twist

Epitel mezankimal geçiş (EMT) sürecinde, Twist transkripsiyon faktörü, hücrelerin epitel hücrelerden mezankimal hücrelere dönüşümünde kritik bir rol oynar. Bu süreçte, Twist gen ekspresyonunu düzenleyerek hücrelerin fenotipini değiştirir ve hücreler arasındaki bağlantıları gevşetir. Ayrıca, Twist'in etkisiyle hücrelerin migrasyon yetenekleri artar ve invaziv özelliklerini kazanırlar. Bu, hücrelerin doku içinde hareket etmesini kolaylaştırır ve metastatik yayılma potansiyelini artırır. Twist'in bu çok yönlü rolü, hem embriyonal gelişimde ve doku rejenerasyonunda normal fizyolojik süreçlerde hem de kanser metastazı gibi patolojik durumlarda önemli bir konu olmuştur (Yang, Hou, & Cai, 2020).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneylerinde Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları kullanılmıştır.

3.1 Gereç

3.1.1 Hücre serileri

Bu tez çalışmasında iki adet insan kökenli glioblastoma hücre serisi kullanılmıştır. İlgili hücrelere ait biyolojik bilgileri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan hücre serileri

	T98G	U87 MG
Organizma	İnsan	İnsan
Cinsiyet, yaş	Erkek, 61	Bayan, 44
Doku	Beyin	Beyin
Morfoloji	Fibroblast	Epitel
Yüzey tutunumu	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
Tümörijenik	Hayır	Evet
Karyotip	Hiperpentaploid	Hipodiploid
Besi yeri	DMEM (yüksek glukoz), %10 FBS	DMEM (yüksek glukoz), %10FBS
Besi yeri yenileme süresi	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez
Pasaj metodu	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA
Ayırma oranı	1:3- 1:10	1:2- 1:5
Biyogüvenlik düzeyi	1	1

3.1.2 Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler

Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Lomeguatrib	Sigma	SML0586-5gr
TGF- β 1	Sigma	T7039
Besi yeri	Capricorn Scientific	DMEM-HA (DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine) Lot No: CP18-2472
Fötal Bovine Serum	Capricorn Scientific	FBS-11B, 0.1 μ M filtre edilmiş
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific	100X, PS-B, (100 ml)
L-Glutamine	Capricorn Scientific	200 mM, GLN-B (100 ml)
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific	TRY-1B, DBPS içinde
Flask (25cm ²)	Biologix	Polystrene, 07-8025
Flask (75cm ²)	Biologix	Polystrene, 07-8075
15 ve 50 ml Tüp	Biologix	10-9151 (15 ml), 10-0502 (50 ml)
96 kuyucuklu plak	Biologix	331196/331296
12 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-12
6 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-6
Dondurma tüpleri	CryoKING	88-6200
Transfer pipeti	Biologix	30-135A1 (3ml)
Hücre sayım lamı	Neubauer (Haemocytometry)	68052-14, 68052-15
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck	102952
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417, Tablet, (pH: 7,4) (Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA):	Goldbio	E-210-100
Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%100)	Honeywell	32221-2.5
5 ml ve 10 ml serolojik pipet	Greiner Cellstar	P7615 (5 ml) ve P7740 (10 ml)
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2;0,5;1,5;2 ml tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüp

3.1.3 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) sitotoksikite testi

Tez kapsamında EMT etkisi araştırılan lomeguatribin sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT gerçekleştirilmiştir. MTT testi için kullanılan malzemeler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. MTT testinde kullanılan gereçler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M5655-1g
MTT stok solüsyonu		5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözöldü ve filtre edilerek (0,20 µm’lik) kullanıldı
MTT çalışma solüsyonu (96 kuyucuklu plakta bir kuyucuk için)		10 µl MTT solüsyonu (5 mg/ ml) 90 µl besi yeri karıştırılır ve her bir kuyucuğa eklenir
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck	102952
96 kuyucuklu plak	Biologix	331196
MTT lizis solüsyonu	Triton-X (Sigma) HCl (0,1 N Fischer Scientific) İsoopropanol (Merck)	Her bir kuyucuğa hazırlanan solüsyondan 100 ml eklenir. 100 ml lizis solüsyonu hazırlanması: Triton X (T8787) (1 ml) HCl (AC 12420-0010) 0,1 N (10 ml) İsoopropanol (109634) (89 ml)
Filtre	Sartorius Minisart	16532; 0,22 µm’lik
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml’lik), Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.4 Total RNA izolasyonu

Lomeguatrib uygulanan hücrelerdeki gen ekspresyon değişikliklerinin tespiti amacıyla lomeguatrib uygulaması sonrası total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Trizol	Geneall	RiboEx™, Cat No. 301-001
Kloroform	Merck	102445
İsopropanol (=Propanaol-2)	Merck	109634
Etil Alkol	Sigma	3221
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml’lik) tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758-50 ml %0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH ₂ O)’ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.5 cDNA (Komplementer DNA) sentezi

Total RNA izolasyonu sonrası cDNA sentez süreci tamamlanmıştır. cDNA sentezi için gerekli malzemeler Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. cDNA eldesi için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
cDNA izolasyon kiti	ABT	cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) C03-01-05 (C03-01-05)
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml'lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
PZR makinesi	Rotor Gene	Gerçek zamanlı PZR aleti cDNA sentezinde kullanılmıştır.
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.6 Agaroz jel elektroforezi

Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası elde edilen RNA ve cDNA'nın görüntülenmesi agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Tris baz	Goldbio	T-400-500
Borik asit	Vivantis	PR 0607
EDTA	Vivantis	E-210-100
10XTBE solüsyon (pH:7,5)		Tris baz (54 gr), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
Agaroz	Genedirex	MB755-0100
% 1'lik agaroz		1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 2,5 µl Etidyum bromür (10 mg/ml) karıştırıldı.
Etidyum Bromür	Biotium	40042
Brom fenol mavisi	Ambresco	115-39-9
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.7 Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)

Gen ekspresyon analizinde kantitatif RT-PZR yapılmıştır. RT-PZR için gerekli malzemeler Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. RT-PZR için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
ABT® RealAmp SYBR qPCR Master mix	ABT	Q05-02-01
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Primer	ABT	HPLC saflaştırma primer
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.8 Yara iyileşmesi deneyi

Yara iyileşme için kullanılan malzemeler Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Yara iyileşme deneyi için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
15 ml’lik tüp	Biologix	10-9151 (15 ml)
24 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-24
Hücre sayım lamı	Neubauer (Hemocytometer)	68052-14, 68052-15
Steril Tüp	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0.5ml, Polietilen mikrosantrifüj tüp
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Steril, temiz pipet ve mikropipet uçları (10 ve 200 µl büyüklüğünde)

3.1.9 Çalışmada kullanılan alet/makineler

Çalışma kapsamında yapılan deneylerde kullanılan alet/makineler Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Çalışma kapsamında kullanılan alet/makineler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Laminar Kabin	Demair	Clas II-TipA
CO2’li incubator	RWD	D180-P
Etüv	MIPRO	MLF-120
İnverted Mikroskop	Olympus	CKX53
Soğutmalı Santrifüj	MRC	CENLBR-600
Vortex	MRC	SI-100
Hassas Terazî	Dikoman	FGH
Hassas terazî	Radwag	AS220.R2
Isıtmalı plak	MRC	HSD-135
Mikrofüj	INOVIA	MINO-10K
Translimünatör	MRC	UV-26
Elektroforez Tankı	SCIE-PLAS	SVG-SYS Vari-gel
Güç Kaynağı	Consort	EV231
Mikrodalga Fırın	Arçelik	MD 574
Su banyosu	MIPRO	MCS-30
RT-PZR	Long gene	Q200B
Derin dondurucu (-80 °C)	GMS	ULT-587
Akım Sitometri	Beckman Coulter	EPICS XL MCL,

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre kültürü

T98G ve U87 MG hücre serileri 37°C’de, CO₂-li inkübatörde, steril kültür ortamında, standart kültür şartlarında çoğaltılmıştır. Hücreler, yapılan tüm deneylerde 15’in

altında olan düşük pasaj sayısına sahip hücrelerde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Standart kültür işlemleri aşağıda belirtilen süreçler takip edilmiştir.

Hücreler %10 FBS içeren yüksek glikozlu besi yerinde kültür flaskları içerisinde büyütülmüş ve çoğaltılmıştır. Flask içerisinde hücre yoğunlukları %70-80 oranına ulaştığında, hücrelerin üzerindeki besi yeri atılarak flasklar 1-2ml PBS (Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 25 cm^2 'lik flaska 0.4 ml, 75 cm^2 'lik flaska 1 ml Trypsin/EDTA eklenmiş, böylece yapışmış olan hücrelerin tripsinasyon işlemi ile birbirlerinden ve flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler steril serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüplerine toplanmıştır. Tüpler 1500 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün üst kısmı atılmış ve hücre pelletinin yoğunluğu da dikkate alınarak ortalama 2ml besi yeri eklenmiştir. Mikropipet yardımıyla (1000 μl 'lik) hücrelerin besi yeri ile karışması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve ardından pasaj ve diğer test süreçlerine geçilmiştir. Hücrelerin dondurularak stoklama yapılması sürecinde ise uygun sayıdaki hücre popülasyonunun üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve sonrasında özel dondurma tüplerine (cryovial) aktarılmıştır. Bu tüpler, buz içerisinde -20°C 'de 1 saat ve -80°C 'de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen bulunan tanklara aktarılmıştır.

3.2.2 Sitotoksikite testi

Sitotoksik etkileri araştırılan lomeguatribin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde ve inhibitör dozlarının (IC_{50}) saptanmasında klasik MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT yöntemi madde için 4 kez ve her bir deneyde 5 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

İlgili molekülün uygun konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle lomeguatrib DMSO'da çözülmüştür. Lomeguatrib için 100.000 μM ana stok hazırlanmıştır. Molekülün hücrelere uygulanacak en yüksek konsantrasyonunda DMSO oranının %5'in altında tutulması sağlanmıştır.

Çoğaltılan hücreler tripsinasyon ve sayım işlemleri sonucunda 96'lık plakta her bir kuyucuğa 8×10^3 olacak biçimde ekilmiştir. Ekim sonrası hücreleri plak tabanına yapışması ve uyum süreci için hücreler bir gece 37°C 'de CO_2 'li etüvde inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir hücre tipinin yer aldığı plaklar farklı konsantrasyonları hazırlanmış olan lomeguatrib ile muamele edilmiştir. Yukarıda belirtilen ana stoktan lomeguatrib için 1, 2, 3, 5, 7, 10, 25, 40, 500, 100, 200, 450, 600, 750, 1000, 5000, 15000 μM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar 96 kuyucuklu plakta her bir kuyucuğa 100 μl büyüme besi yeri içerisinde olacak biçimde verilmiştir.

Madde uygulanmasından 72 saat sonunda MTT süreci başlatılmıştır. 72 saat sonunda hücrelerin üzerindeki medyum atılmış ve her bir kuyucuğa MTT çalışma solüsyonunda 100 μl [10 μl MTT (5 mg/ml) +90 μl besi yeri] eklenmiştir. MTT çalışma solüsyonunun eklenmesinden sonra hücreler 37°C’de, CO₂ inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir. Üç saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri atılmış ve her bir kuyucuğa 100 μl lizing solüsyonu eklenerek yaşayan hücrelerce oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Formazan kristallerinin çözünmesinden sonra plak okuyucu spektrofotometrede plakların her bir kuyucuğunun 570 nm’deki absorbans değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri excel ve Graphad Prism programları kullanılarak IC₅₀ değerleri saptanmıştır.

3.2.3 Hücre göçü deneyi (yara iyileşmesi, wound healing)

Hücrelerde lomeguatribin hücre göçü üzerine olan etkisinin belirlenmesi için yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 24 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 5x10⁴ hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin uyum ve yapışması için plak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki medyum alınarak 200 μL ’lik pipet ucuyla kuyucuğun ortasından artı şeklinde yara oluşturulmuştur. Yaranın oluşması flastktan kalkan hücrelerin tam olarak ayrılması için medyumla hücreler yıkanmış ve medyum tekrardan ortamdan alınmıştır. Temizleme işlemini takiben hücrelere 5 ng/ml konsantrasyonlarında TGF- β 1; 5, 10 ve 25 μM konsantrasyonlarda lomeguatrib verilmiştir. Yara oluşumu sonrası oluşturulan yarada hücreler arası mesafe mikroskopun EPview programıyla ölçülmüş ve fotoğraflanmıştır. Yara oluşumu sonrası elde edilen ilk mesafe değeri 0.saat olarak kabul edilmiş ve her 24 saatte bir toplamda 48 saat takip edilmiştir. Burada lomeguatribin 5, 10 ve 25 μM konsantrasyonlarında kullanılmasının nedeni MTT

sonucuna göre bu değerlerde 24 ve 48.saatte proliferasyonlarında kontrol grubuna göre benzer proliferasyon değerlerine sahip olmasındandır.

3.2.4 RNA izolasyonu

IC₅₀ değeri saptanan lomeguatribin EMT genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla önce total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla ilgili molekülün IC₅₀ değerinde hücrelere uygulanmış ve IC₅₀ değeri saptanan sürede inkübe edildikten sonra total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için izlenilen Trizol temelli izolasyon protokolü aşağıda yer almaktadır.

Hücreler yukarıda belirtilen IC₅₀ değerlerinde hücrelere uygulanmıştır. Bu uygulama için oluşturulan gruplar sırasıyla hiçbir molekül uygulanmayan kontrol grubu ve lomeguatrib olmak üzere 2 farklı grup oluşturulmuştur.

25cm²'lik flasklara ortalama 1X10⁶ yoğunlukta ekilen hücreler bir gece (16/24 saat) flask tabanına tutunması ve uyum için bir gece inkübe edildikten sonra lomeguatrib için ise 200 µM hücrelere verildi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. Lomeguatrib'in 200 µM seçilme nedeni, sitotoksiste testinde ilgili molekülün hücrelerde %15-20 arasında ölüme neden olduğu doz olmasıdır. Lomeguatrib 200 µM olarak seçilerek Bu sayede eğer lomeguatrib EMT sürecini tetikliyorsa hem kısmi ölümün olduğu dozda bu tetiklenmeyi saptayabilmektir. 72. saatin sonunda hücreler tripsine edilerek, toplandı ve ardından Trizol-Koloroform-İzopropilalkol ve etilalkol prosedürü kullanılarak total RNA izole edilmiştir.

3.2.5 RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi

Total RNA'ların kalitatif değerlendirilmesi (parçalanma olup olmadığının anlaşılması gibi) amacıyla total RNA'lardan ortalama 3-5 µl RNA agaroz jel (%1'lik) elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme sonrası elde edilen görüntülerde 28S (Sedimentasyon), 18S ve 5S RNA net bir şekilde saptanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. T98G ve U-87MG hücre serilerinden elde edilen Total RNA'nın görüntüsü.

3.2.6 cDNA (Complementer DNA) izolasyonu

Hücrelerden elde edilen total RNA'dan ekspresyon analizi yapmak için öncelikle bu RNA'lardan cDNA elde edilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (C03-01-05) kullanılmıştır. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak her bir gruba ait örneklerin 1µg RNA'sından cDNA elde edilmiştir. cDNA sentezi için izlenilen protokol aşağıda yer almaktadır (Tablo 10).

Çizelge 3.10. cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.

10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free Water	3.5 µl
RNA Template	10 µl

0.2ml'lik steril tüp içerisinde hazırlanan reaksiyon içeriği PZR cihazı kullanılarak 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 85°C 5 dk ve 4°C 10 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PZR'da kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.7 Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)

Elde edilen cDNA'larda araştırılması planlanan genlerin ekspresyonlarının saptanması amacıyla RT-PZR yapılmıştır. Bu amaçla ABT® RealAmp SYBR qPCR Master mix kitinin protokolü izlenmiştir (Çizelge 3.11). Hedef genlere karşı kontrol geni olarak Actin Beta (ACTB) geni her iki serisi için de kullanılmıştır. Ekspresyonu araştırılan genlerin RT-PZR'da kullanılan primer dizileri Çizelge 3.12'de verilmiştir.

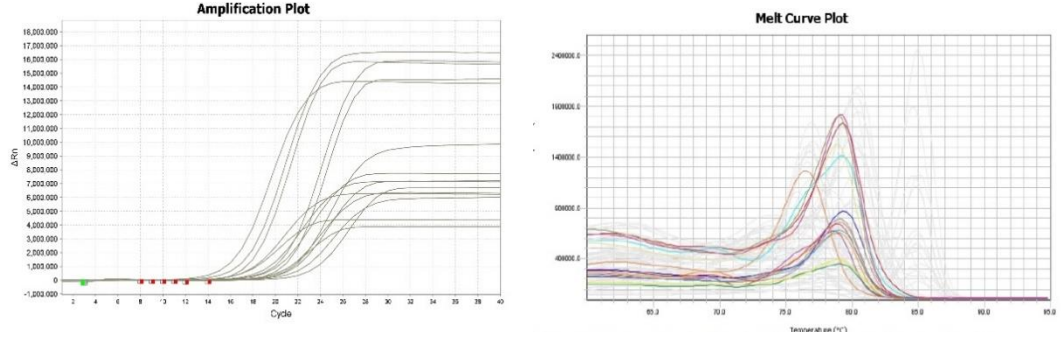
RT-PZR'de genlerin annealing sıcaklıkları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Her örnek için 3 bağımsız tekrar yapılmıştır ve her reaksiyonda amplifikasyon erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Örnek erime eğrileri Şekil 2 ve 3'te sunulmuştur. Ekspresyonlar arası rölatif farklılığın saptanmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülasyonu kullanılmış buradan ekspresyonlar arası kat değişimleri saptanmıştır. Reaksiyon içerikleri hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır.

Çizelge 3.11. RT-PZR için reaksiyon içeriği.

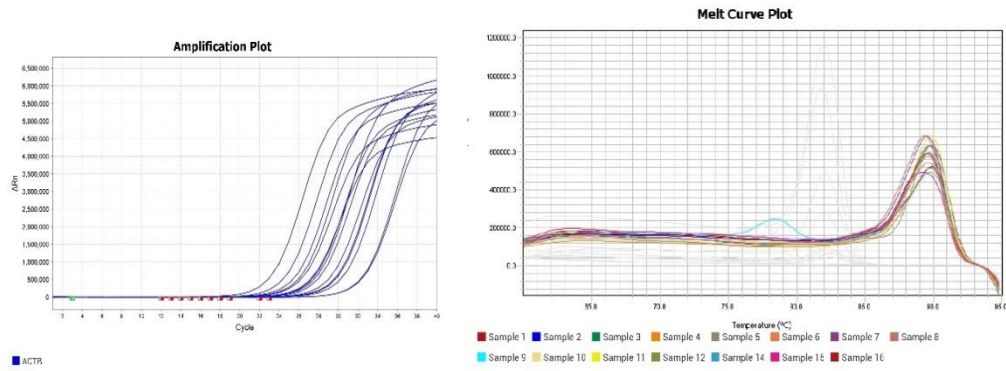
Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon Döngüsü (Genel)
Tampon (2X) SYBR qPCR master miks	10 µl	1-95°C 5' denatürasyon (1 döngü) 2-95°C 15" 3-55°C (54-62°C, gene göre değişkenlik gösterdi) 50" 4-72°C 30" 40 döngü (2'den 4'e) Meting Curve (erime eğrisi) Analizi Ramp: 50-99 (0.5°C artış, her basamakta 3 saniye) 90 °C 5 saniye
Primerler	Forward: 0.5 µl (10pmol/µl) Reverse: 0,5µl (10pmol/µl)	
dH2O	7 µl	
cDNA	2 µl	
Toplam	20 µl	

Çizelge 3.12. RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri.

Gen	Sense	Antisense	Ürün Büyüklüğü (bp)	NCBI Referans Kodu
E-Kaderin	F:5'-tacaacgaccaacccaaga	R: 5'-tcacacacgctgacctctaa	137	NM_001317185.
Vimentin	F:5'-ttgaacgcaaagtggatctt	R:5'-aggctcagcaaaacttggttgta	235	NM_003380.5
N-Kaderin	F:5'-tatttgcccccaatcctaa	R: 5'-ttttcacatttggtgattctcg	217	XM_054318138.1
SnailI	F:5'-tctaattcagagttaacctca	R: 5'-ttgttcagttattgcagttga	410	NM_005985.4
Snail2	F:5'-ttcaaggacacattgaactcaca	R: 5'-aaggttttggagcagtttttg	151	NM_003068.5
Twist1	F:5'tgtttccagagaaggagaaaatgg	R: 5'aatgcagaggtgtgaggatgggt	216	NM_000474.4
ACTB	F:5'-catcctcaccctgaagtacc	R: 5'tgaaggctctcaaactgatctg	194	NM_001101.5



Şekil 3.2. Vimentin geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve)



Şekil 3.3. ACTB geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve)

3.3 İstatistiksel Analiz

Denek sayısına bağlı olarak parametrik olmayan test yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla ikiden fazla bağımsız grubun sürekli değerler bakımından karşılaştırılması amacıyla Kruskal Wallis testinden faydalanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılığın bulunması durumunda, farklılığı yaratan grupların tespitinde Dunn'ın post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Frekans dağılımlarının gruplar arasındaki homojenliğinin test edilmesi amacıyla Ki-kare ve/veya Fisher'in exact testi kullanılmıştır. Sürekli değişkenler kullanılan test yöntemine uygun olarak ortanca (Minimum-Maksimum) ile kategorik değişkenler ise frekans dağılımları ve yüzdelikler ile özetlenmiştir. İstatistik anlamlılık sınırının $p < 0,05$ olarak alındığı çalışmada, elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. kullanılmıştır.

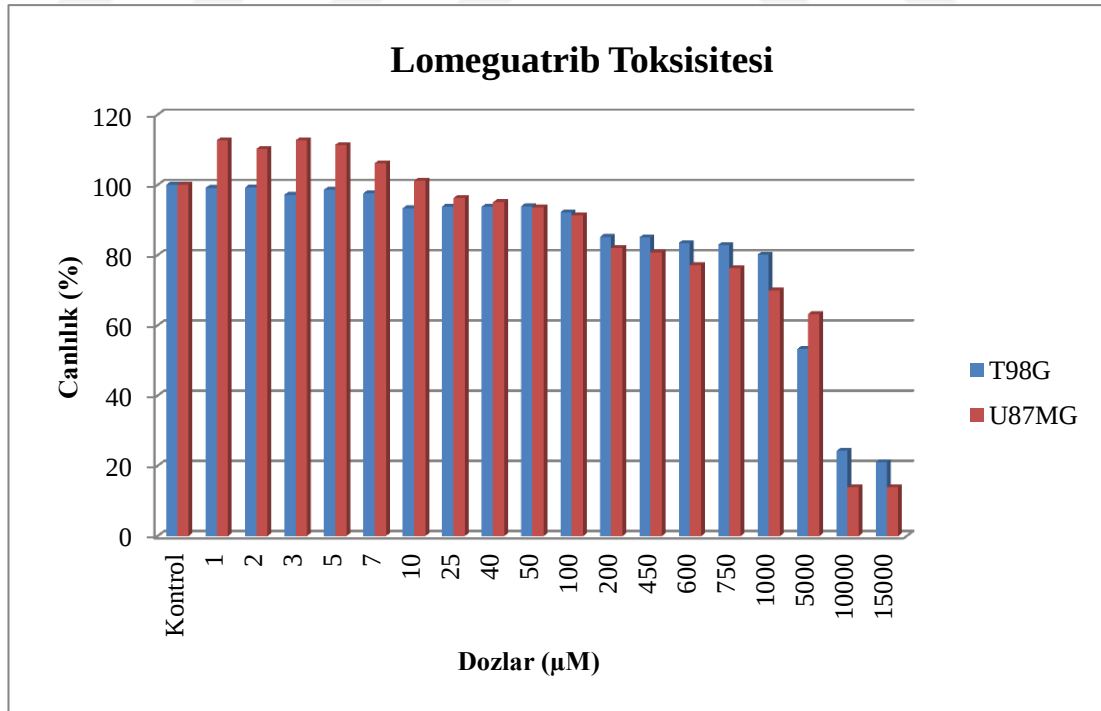
4. SONUÇLAR

4.1 Lomeguatrib Sitotoksitesi

Tez çalışmamızda kullanılan lomeguatribin T98G ve U87 MG hücre serileri üzerindeki sitotoksik değerleri (Çizelge 4.1) ve bu değerlerin elde edildiği canlılık eğrisi (Şekil 3.4) aşağıda sunulmuştur. Elde edilen verilere göre 72.saat lomeguatrib sitotoksitesi U87 MG için 7067,07 μ M, T98G için ise 5988,21 μ M olarak tespit edilmiştir. Sitotoksosite sonuçlarına göre hücrelerde hedef genlerin ekspresyonlarının analizinde Lomeguatribin 200 μ M olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Çünkü kısa süreli MGMT inhibisyonlarında nanomolar (nM) veya mikromolar kullanıldığı literatürde tespit edilmiştir. Bizim sonuçlara göre de hem uzun süre MGMT inhibisyonu hem de sitotoksitenin %15-20 arasında ölüme neden olduğu doz seçilmiştir.

Çizelge 4.1. Lomeguatrib Sitotoksitesi (72.saat)

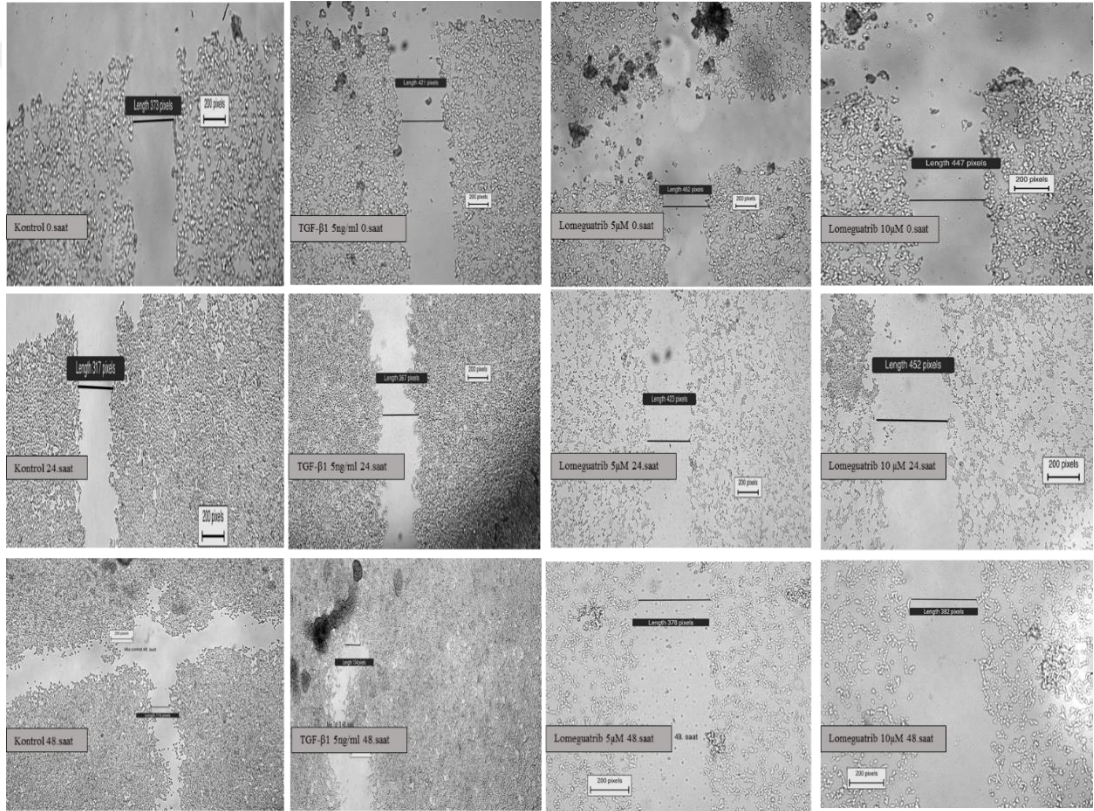
Hücre Serisi	Lomeguatrib IC ₅₀ (μ M)
T98G	5988,21
U-87 MG	7067,07



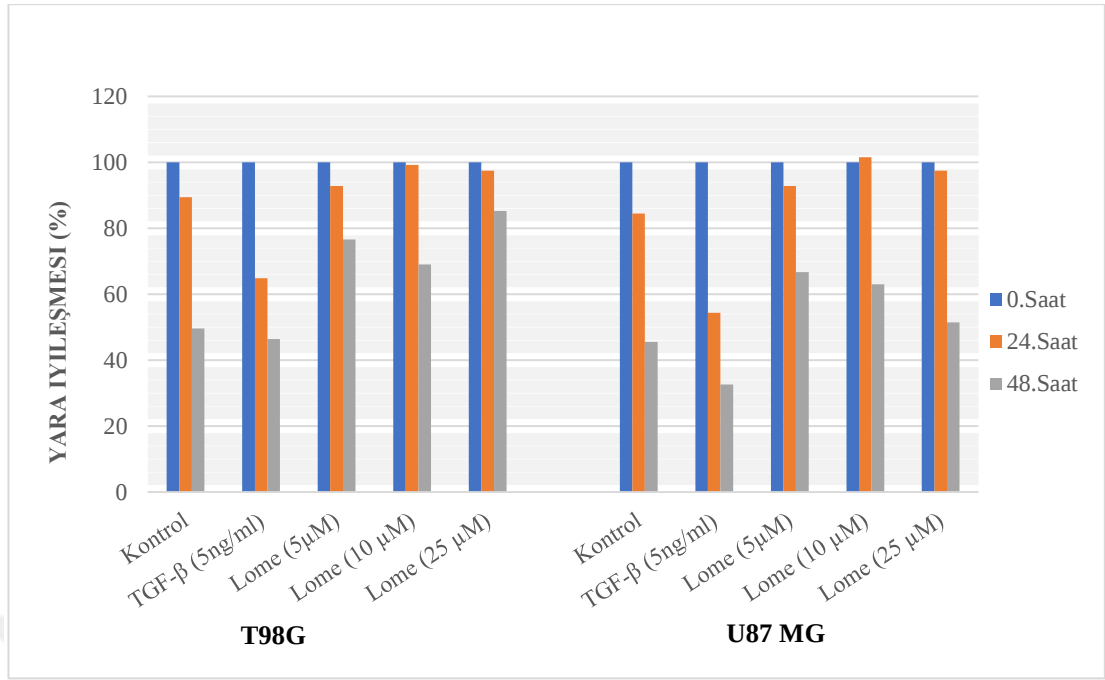
Şekil 3.4. Lomeguatrib'in T98G ve U-87 MG hücre serilerindeki toksisiteyi (72.saat)

4.2 Yara iyileşmesi deneyi

Hücrelerde mikropipet ucuyla oluşturulan çizik bölgesinin (yaranın) 0.,24. ve 48.saat ölçümü mikroskobun programı üzerinden piksel cinsinden yapıldıktan sonra (Şekil 3.5) yapıldıktan sonra elde edilen veriler kontrole göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. 5ng/ml TGF- β kullanılan hücrelerde hücre göçü kontrole ve diğer gruplara göre anlamlı düzeyde erken kapanmıştır. Her iki hücre serisinde lomeguatribin hücre göçü üzerindeki etkisi farklılık göstermiştir. U87 MG hücre serisinde lomeguatribin hücre göçüne etkisi T98G hücre serisine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 3.6)



Şekil 3.5. Hücrelerde oluşturulan yaranın hücre göçü ile kapanmasının mikroskop ile takibi ve yara büyüklüğünün piksel cinsinden ölçümü.



Şekil 3.6. Lomeguatribin T98G ve U-87 MG hücrelerinde hücre göçüne etkisi. Pozitif kontrol olarak TGF-β (5ng/ml) kullanılmıştır.

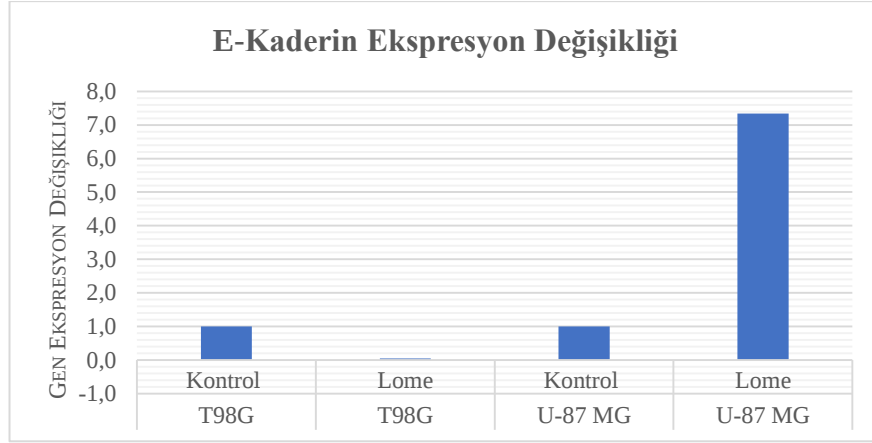
4.3 Gen Ekspresyon Analizi

4.3.1 Epitelyal özellik için gen ekspresyonu

Epitelyal karakterin analizi için E-kaderin genin ekspresyon değişikliği Şekil 8’de verilmiştir. T98G hücre serisinde lomeguatrib verilen hücrede ekspresyon kontrole istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalırken ($p < 0,001$) U87-MG hücre serisinde ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0,001$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. EMT genlerinin ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

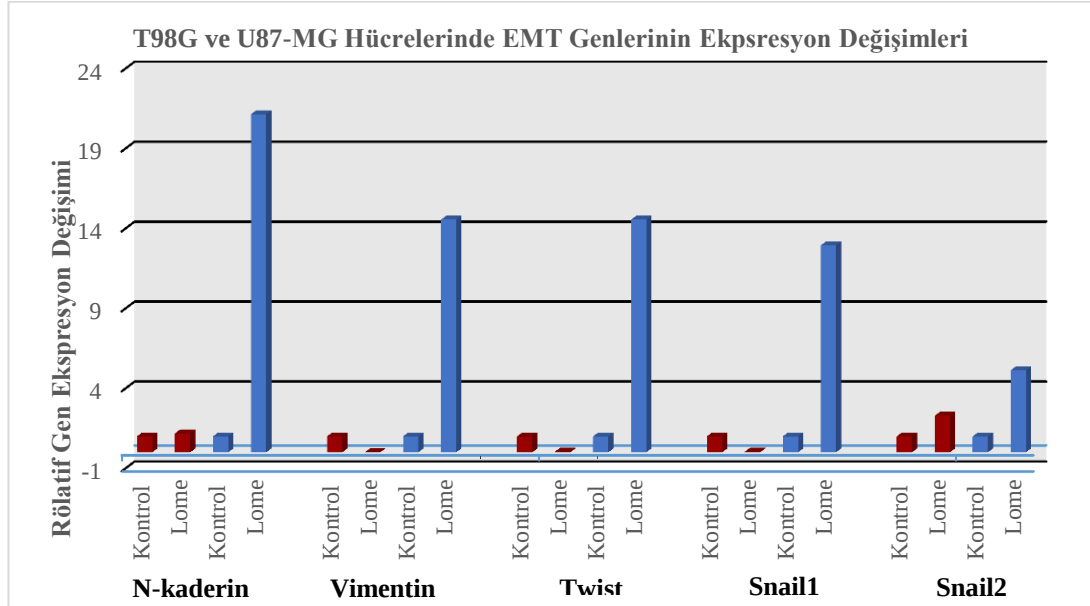
Genler	Kontrol	T98, Lome	U-87 MG, Lome	$p1$	$p2$
E-kaderin	1±0	0,05±0,04	7,34±0,51	<0,001	<0,001
N-kaderin	1±0	1,19±0,06	20,7±0,61	0,005	<0,001
Vimentin	1±0	0,03±0,03	13,66±1,09	<0,001	<0,001
Twist	1±0	0,04±0,03	13,66±1,09	<0,001	<0,001
Snail1	1±0	0,02±0,03	12,69±1,03	<0,001	<0,001
Snail2	1±0	2,12±0,17	5,26±0,35	<0,001	<0,001
$p1$: Kontrol vs T98 $p2$: Kontrol vs U-87 MG					



Şekil 3.7. E-kaderin genindeki ekspresyon değişikliği. Lome: Lomeguatrib

4.3.2 Mezenkimal özellik için gen ekspresyonu

Hücrelerde lomeguatrib uygulama sonrası meydana gelen gen ekspresyon analizi Şekil 9’da verilmiştir. U-87 MG hücre serisinde lomeguatrib verilen hücrelerde araştırılan EMT genlerinin tamamının ekspresyonu kontrole istatistiksel açıdan göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0,001$) (Tablo I). T98G hücrelerinde ise kontrole göre Snail2 genin ekspresyonu 2,11 kat ($p < 0,001$) ve N-kaderin ekspresyonu 1,19 kat artmıştır ($p = 0,005$). Lomeguatrib, U-87 MG hücrelerinde T98G hücrelerine göre EMT genlerinin ekspresyonlarında belirgin artışlara neden olmuştur.



Şekil 3.8. T98G ve U87 MG Hücrelerinde EMT Genlerinin Ekspresyon Değişimleri. Mavi bar: T98G hücre serisi, Sarı bar: U87 MG hücre serisi, Lome: Lomeguatrib

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında lomeguatribin glioblastoma hücrelerinde EMT sürecini indükleyip indükmediği lomeguatribin glioblastoma hücrelerindeki sitotoksitesi belirlendikten sonra hücre göçü deneyi ve EMT sürecinde yer alan genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi üzerinden araştırılmıştır ve değerlendirilmiştir.

Literatürde Lomeguatrib'in in vitro sitotoksik etkisine ilişkin çok az çalışma vardır. Bu çalışmalarda lomeguatribin sitotoksik IC50 verisinin araştırılması yerine kemoterapötik ajanlarla kombine edildiğinde terapötik etkisindeki değişiklik araştırılmıştır. Bu çalışmalarda da lomeguatribin 10 μ M (Clemons vd., 2005) veya 50 μ M konsantrasyonları kullanılmıştır (Taspınar vd., 2013, Uğur vd., 2014). Clemons vd., (2005), lomeguatrib'in (10 μ M) tek aşına MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunda inhibitör etkisi olmadığını bildirmiştir. Ayrıca Kirsten vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada lomeguatribin 1 ve 20 μ M konsantrasyonlarının glioma hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da lomeguatrib hem 10 μ M hem de 20 μ M konsantrasyonlarında herhangi bir proliferasyon inhibisyon etkisi saptanmamıştır. Leong vd (2024) tarafından yapılan çalışmada glioma dokularından nörosfer oluşturan hücrelerin izole edildiği ve, 5, 10 ve 20 μ M lomeguatrib uygulandığında 72. saat sonunda hücrelerin toksisitelerinin birbirinden farklı olduğu tespit edildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmayla (Leong vd., 2024) lomeguatribinde hücrelere göre farklı toksisite gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu tez çalışmasında da her iki hücre serimizin toksisite yanıtı birbirinden farklı bulunmuştur. Ayrıca, lomeguatribin konsantrasyon artışıyla sitotoksik etki gösterebileceği gösterilmiştir. Örneğin 200 μ M lomeguatribin kontrole göre ortalama %20 sitotoksitesi saptanmıştır. Kullanılan 200 μ M, Kirsten vd (2021)'nin çalışmasına göre 10 kat yüksektir ve bu konsantrasyonda kısmen de olsa sitotoksik olması bilimsel olarak elde edilebilecek bir sonuçtur.

St-Coeur vd. (2015) 20 μ M lomeguatrib uygulanan U373R ve U373S hücrelerinde MGMT ekspresyonu daha yüksek olan U373R hücrelerinin U373S hücrelerine göre daha duyarlı olduğunu bildirmiştir. Sonuçlarımıza göre lomeguatrib'in düşük konsantrasyonlarda (1-50 μ M arasında) T98G lomeguatribe daha duyarlı iken yüksek konsantrasyonlarda (100-15.000 μ M) MGMT proteinin eksprese etmeyen U87 MG'nin daha duyarlı hale geldiği tespit edilmiştir. Ancak IC50 hesaplamasında U87

MG'nin T98G'ye göre daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuç St-Coeur vd., (2015) ile uyumludur.

MGMT inaktivatörlerinin yüksek derecede toksik olması beklenmemesine rağmen hedef dışı toksisite meydana gelebilir (Signorell vd., 2018). Bizim çalışmamızda da MGMT negatif hücre (U87 MG) lomeguatribin MGMT pozitif (T98G) hücreye göre daha dirençli olması lomeguatribin hedef dışı toksisitenin varlığını ve hücre içinde MGMT inhibisyonu dışında fonksiyonel rollerinin olabileceğini göstermektedir.

Kirsten vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, 1 μ M and 20 μ M lomeguatribin LN-18, U118 ve T98G hücrelerine uygulandıktan 24 saat sonrasında, hücrelerin iki katına (doubling time) çıkma sürelerini Alamar mavisi testiyle (Alamar blue assay) incelemişlerdir. Kirsten vd (2021) lomeguatribin glioma hücrelerinin proliferasyonunu arttırmadığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise hücre göçü yara iyileşme testi kullanılmış ve lomeguatribin 5, 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarının hücre göçüne etkisi 24 ve 48 saat boyunca takip edilmiştir. Sonuçlarımıza göre 24. saatte her iki hücre serisinde de her hangi bir yara kapanması açısından konsantrasyonlar arası belirgin bir fark bulunmamaktadır. Ancak 48 saat sonunda MGMT ekspresyonu pozitif olan T98G hücre serisinde konsantrasyonlar arası yara kapanması açısından fark yok iken MGMT ekspresyonu negatif olan U-87 MG hücresinde ise yaranın daha hızlı kapandığı saptanmıştır. Sonuçlarımız 24 saat verileri açısından Kirsten vd., (2021) çalışmasıyla uyumludur. Kirsten vd., (2021) çalışmasında MGMT ekspresyonu negatif olan hücre hattı kullanılmamıştır. Bu tez çalışmasında ise lomeguatribin MGMT negatif olanlardaki olası etkisinin de saptanması için U-87 MG hücre serisi kullanılmıştır. Sonuçlarımıza göre 48 saat sonunda ise U-87 MG hücre serinde yaranın T98G'ye göre daha hızlı kapandığını göstermektedir. Literatürde lomeguatribin yara iyileşmesi ve hücre göçü etkisine ilişkin her hangi bir veri bulunmamaktadır ve ilk kez bu tez çalışmasıyla ortaya konmuştur. Bu sonuç, lomeguatribin MGMT inhibisyonu dışında da farklı bir fonksiyonu olabileceğini göstermektedir.

Kirsten vd. (2021) tarafından yapılan çalışmasında lomeguatribin 20 μ M konsantrasyonlarda hücre döngüsünü değiştirdiğini ve bu etkinin her bir glioma hücre serisinde farklı tespit edildiğini bildirilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada da lomeguatribin (30 ve 43 μ M) multiple myelom hücrelerinde MGMT pozitif

hücrelerde S faz girişini azalttığı belirtilmiştir (Akçora-Yildiz vd., 2024). Dolayısıyla lomeguatrib her hücrede aynı konsantrasyonlarda aynı etkiyi göstermemektedir. Bizim çalışmamızda da lomeguatrib her bir hücrede aynı hücresel etkiyi göstermemiştir. Ayrıca görüldüğü üzere çalışmalarda lomeguatribin hep MGMT ekspresyonu olan hücrelerdeki etkisi araştırılmış. Bu tez çalışmasında MGMT ekspresyonu negatif olan hücre serisi de kullanarak bu hücrelerde de farklı bir etkisinin olup olmayacağını ipuçları aranmıştır.

EMT, epitel kökenli hücrelerin birçok metabolik ve biyokimyasal olaylar sonucunda göç yeteneği yüksek, daha invaziv karakterli mezenkimal fenotip kazanma sürecidir. EMT mekanizması; yara iyileşmesi, farklılaşma, kök hücre fenotipi kazanma ve dokuların yeniden dizayn edilme süreçlerinde kullanılır (Majc vd., 2020). EMT, kanser hücrelerinin daha agresif karakter kazanması yanı sıra toksik ajanlara ve radyoterapiye direnç gelişimine katkı sunar (Iwade vd., 2016). EMT sürecinin başında hücre hücre bağlantılarında bozunma sonucu hücrelerin göç yeteneği artar. Bunu için E-kaderin genlerinde azalma ve N-kaderin, fibronektin, Vimentin, Twist, Snail 1 ve Snail 2 gibi genlerin ekspresyonlarında artış olur (Majc vd., 2020). Glioblastomada da bu genlerin yanı sıra kök hücre belirteçlerinin arttığı da bilinmektedir (Iwade vd., 2016).

Lomeguatribin EMT yolağı genlerini etkileyip etkilemediğine ilişkin yaptığımız bu tez çalışmasında EMT yolağı için hem U87 hem de T98G hücre serileri seçilmiştir. Her iki hücre serisinin de EMT yolağı indüklenmesine uygun olduğunu ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Kubelt vd., 2015; Ouanouki vd., 2018). Tez çalışmamızda, lomeguatrib uygulamasının U-87 MG hücrelerinde EMT genlerinden N-kaderin, Vimentin, Twist, Snail 1 ve Snail 2 genlerinin ekspresyonlarını arttırdığı T98G’de bu genlerin ekspresyonunun kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Lomeguatribin MGMT ekspresyonu yapmayan hücrede böyle bir etki göstermesi literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bu etkinin araştırılmasında olası hem canlılık hem de ölümün var olduğu bir konsantrasyon seçilmiş böylece olası proliferasyon ve EMT sürecine ilişkin veriye ulaşmak istenmiştir.

Deubiquitinasyon enzimi DUB3/USP17’nin anormal ekspresyonunun inflamasyon ve karsinogenez ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Yang vd., 2021). X vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada MGMT’nin DUB3’ün transkripsiyonunu aktive

ettiği ve lomeguatribin MGMT inhibisyonu ile DUB3'ün baskılanacağı bildirilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda lomeguatrib T98G hücre serisinde MGMT ve dolayısıyla DUB3 transkripsiyonunu baskılayarak T98G hücrelerinin proliferasyonunu azaltmış ve bu nedenle de EMT genlerinin ekspresyonlarının azalmasına neden olmuş olabilir. Benzer bir durum, Ducker ve Shaw (2021) tarafından yapılan derlemede de özetlenmiştir. Buna göre, USP17 aşırı ekspresyonunun meme kanseri hücrelerinin EMT sürecini tetiklediği ve lomeguatribinde USP17 ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu veri, lomeguatribin MGMT ekspresyonu pozitif hücrede EMT'yi inhibe etmesini sonucuna katkı sunmaktadır.

Literatürde lomeguatribin EMT sürecine olan etkisine ilişkin her hangi bir çalışma saptanmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışması lomeguatribin EMT sürecini tetikleyebileceğini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.

Sonuç

Bu tez çalışmasıyla;

- Lomeguatribin glioma hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olabileceği gösterilmiştir.
- Lomeguatrib'in MGMT eksprese eden ve etmeyen hücre serilerinde farklı etki gösterebileceği gösterilmiştir,
- Sitotoksiste testlerindeki farklılıkların temel nedenlerini, hücrelerin pasaj sayısı farklılığı, kullanılan medyum çeşidi, sitotoksiste metot farklılığı, hücrelerin genom, epigenom, proteom ve proliferasyon yapı farklılıkları olarak özetleyebiliriz. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerler bizim çalışmamıza özgü ve literatürle uyumludur.
- Lomeguatribin MGMT eksprese eden ve etmeyen hücre serilerinde farklı etkiler gösterebileceği ve EMT yolağını etkileyebileceği ilk defa gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aaliya, B., Sunooj, K. V. ve Lackner, M., 2021. Biopolymer composites: A review, *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 40-84.
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1438-1449.
- Ahmed, E. M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of advanced research*, 6(2), 105-121.
- Aizenberg, J., Weaver, J. C., Thanawala, M.S., Sundar, V.C., Morse, D.E. ve Fratzl, P., 2005. Skeleton of *Euplectella* sp.: structural hierarchy from the nanoscale to the macroscale, *Science*, 309(5732), 275-278.
- Akcora-Yildiz, D., Ozkan, T., Cetintav, B., Yukselten, Y., Calis, S., Sevim-Nalkiran, H., ... & Sunguroglu, A. (2024). Inhibition of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) by lomeguatrib reduces multiple myeloma cell viability and impairs DNA repair in MGMT-proficient cells. *Chemical Biology & Drug Design*, 103(2), e14465.
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., ... & Hood, M. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet*, 391(10125), 1023-1075.
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S. ve Elsabee, M. Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate polymers*, 77(2), 410-419.
- Araki, K., Shimura, T., Suzuki, H., Tsutsumi, S., Wada, W., Yajima, T., ... & Kuwano, H. (2011). E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *British journal of cancer*, 105(12), 1885-1893.
- Bai, P., Fan, T., Wang, X., Zhao, L., Zhong, R., & Sun, G. (2023). Modulating MGMT expression through interfering with cell signaling pathways. *Biochemical pharmacology*, 215, 115726. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115726>
- Bao, Z., Xian, C., Yuan, Q., Liu, G. ve Wu, J., 2019. Natural polymer-based hydrogels with enhanced mechanical performances: preparation, structure, and property.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., ... & Rich, J. N. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer research*, 66(16), 7843-7848.

- Barvaux, V., Lefebvre, T., & Paquet, C. (2004). Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by various alkylating agents. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 53(5), 209-212.
- Berx, G., Staes, K., van Hengel, J., Molemans, F., Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., & Van Roy, F. (1995). Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics*, 26(2), 281-289.
- Cai, X. Yu, S. Hu, J. Yu, A brief review on the mechanisms of miRNA regulation, *Dev. Reprod. Biol.* 7 (2009) 147–154.
- Chen, W., Liu, D., Liu, P., Kong, Z., Wang, Y., Wang, Y., & Ma, W. (2021). Yetişkin tekrarlayan glioblastoma için sistematik tedavilerin güncel kanıtları ve zorlukları: klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar. *Çin Kanser Araştırmaları Dergisi*, 33 (3), 417.
- Ciruna, B., & Rossant, J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Developmental cell*, 1(1), 37-49.
- Clemons, M., Kelly, J., Watson, A. J., Howell, A., McElhinney, R. S., McMurry, T. B., & Margison, G. P. (2005). O6-(4-bromophenyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *British journal of cancer*, 93(10), 1152–1156.
- Clinton, S. K., Giovannucci, E. L., & Hursting, S. D. (2020). The world cancer research fund/American institute for cancer research third expert report on diet, nutrition, physical activity, and cancer: impact and future directions. *The Journal of nutrition*, 150(4), 663-671.
- Coelho, B. P., Pereira, S. R., Monteiro, D., Oliveira, M. J., Moutinho, M., Silva, F., ... & Ribeiro, A. S. (2020). Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioblastoma Progression. *Cancers*, 12(1), 144.
- Craene, B. D., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), 97-110.
- Curigliano, G., Burstein, H. J., Winer, E. P., Gnant, M., Dubsky, P., Loibl, S., ... & Xu, B. (2017). De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Annals of Oncology*, 28(8), 1700-1712.
- Çokluk, C. (2021). Glioblastoma'nın tedavisi mikrocerrahi yöntemlerinin kullanılması: Glioblastoma tedavisinde mikrocerrahi yöntemlerin kullanılması. *Ondokuzmayıs Tıp Dergisi*, 1 (1).
- Dean, M., Fojo, T. ve Bates, S. (2005). Tümör kök hücreleri ve ilaç direnci. *Doğa İncelemeleri Kanseri*, 5(4)

- Derycke, L. D., & Bracke, M. E. (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), 463-476.
- Duangkumpha, K., Techasen, A., Loilome, W., Namwat, N., Thanan, R., Khuntikeo, N., & Yongvanit, P. (2014). BMP-7 blocks the effects of TGF- β -induced EMT in cholangiocarcinoma. *Tumor Biology*, 35, 9667-9676.
- Duband, J. L., & Thiery, J. P. (1982). Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Developmental biology*, 94(2), 337-350.
- Ducker, C., & Shaw, P. E. (2021). USP17-mediated de-ubiquitination and cancer: Clients cluster around the cell cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 130, 105886. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105886>
- Dünya Kanser Araştırma Fonu/Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü. (2018). *Diyet, beslenme, fiziksel aktivite ve kanser: Küresel bir bakış açısı. Sürekli Güncelleme Proje Uzman Raporu 2018*. Yeniden dene <https://www.wcrf.org/dietandcancer>
- Ekenel, M. (2017). Beyin tümörlerinde hedefe yönelik tedaviler. *Türk Nöroşir Dergisi*, 27(2), 218-222.
- ErbaYrakTar, Z., ErbaYrakTar, S., & Erkan, E. P. (2015). Glioblastoma İçin Hedefe Yönelik Tedavi: Mevcut Stratejilerin ve Yeni Hedeflerin Değerlendirilmesi. *Journal of Nervous System Surgery*, 5(2), 59-68.
- Esteller, M. (2000). Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *European journal of cancer*, 36(18), 2294-2300.
- Fares, J., Ahmed, A. U., Ulasov, I. V., Sonabend, A. M., Miska, J., Lee-Chang, C., ... & Lesniak, M. S. (2021). Neural stem cell delivery of an oncolytic adenovirus in newly diagnosed malignant glioma: a first-in-human, phase 1, dose-escalation trial. *The Lancet Oncology*, 22(8), 1103-1114.
- Fontham, E. T., Wolf, A. M., Church, T. R., Etzioni, R., Flowers, C. R., Herzig, A., ... & Smith, R. A. (2020). Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(5), 321-346.
- Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W., & Illmensee, K. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis: III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation*, 23(1-3), 43-59.

- Gallin, W. J., Sorkin, B. C., Edelman, G. M., & Cunningham, B. A. (1987). Sequence analysis of a cDNA clone encoding the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9), 2808-2812.
- Garraway, L. A., & Jänne, P. A. (2012). Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer discovery*, 2(3), 214-226.
- Goldie, K. N., Wedig, T., Mitra, A. K., Aebi, U., Herrmann, H., & Hoenger, A. (2007). Dissecting the 3-D structure of vimentin intermediate filaments by cryo-electron tomography. *Journal of structural biology*, 158(3), 378-385.
- Grunwald, G. B., Pratt, R. S., & Lilien, J. (1982). Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms: III.* Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells. *Journal of cell science*, 55(1), 69-83.
- Gupta, R., Sinha, S., Paul, R., Bhattacharjee, S., & Ghosh, A. (2019). Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Molecular Psychiatry*, 23(10), 2078-2089
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8-20
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., De Tribolet, N., Weller, M., ... & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003.
- Higgins, S. J., Young, P. ve Cunha, G. R., 1988. Tissue-specific gene expression during reprogramming of reproductive tract epithelium, 27(1), 2-10.
- Horbinski, C., McCortney, K. ve Stupp, R. (2021). MGMT promotör metilasyonu, IDH mutant gliomalarda hasta yaşı ve 1p/19q durumu ile ilişkilidir. *Nöro-onkoloji*, 23(5), 858-860.
- Iwadate, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology letters*, 11(3), 1615–1620. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>
- Jawhari, A., Jordan, S. U. Z. A. N. N. E., Poole, S., Browne, P. E. T. E. R., Pignatelli, M. A. S. S. I. M. O., & Farthing, M. J. (1997). Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology*, 112(1), 46-54.
- Johnson, A. B., Smith, C. D., & Brown, E. F. (2020). Epithelial-mesenchymal transition: Role of vimentin in enhancing migratory and invasive capacities. *Journal of Cellular Biology*, 25(3), 456-469.

- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair*, 6(8), 1079–1099.
- Kaina, B. (2023). Temozolomide, Procarbazine and Nitrosoureas in the Therapy of Malignant Gliomas: Update of Mechanisms, Drug Resistance and Therapeutic Implications. *Journal of clinical medicine*, 12(23), 7442. <https://doi.org/10.3390/jcm12237442>
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776–1784.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 120(5), 1786–1786.
- Kanderi, T., & Gupta, V. (2022). Glioblastoma Multiforme. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Kaye, S. B., Lubelska, K., & Kerr, D. J. (2010). Lomeguatrib: a methylguanine DNA methyltransferase inactivator for the treatment of cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 11(12), 1396–1405.
- Keskin, E., Elmas, Ö., Aydin, H. A., Şimşek, K., Gün, E., & Kalaycı, M. (2021). Glioblastoma Multiforme Epidemiyolojisi, Tedavi Seçenekleri ve Sağ Kalım Süresi: Retrospektif Tek Merkezli Çalışma. *Batı Karadeniz Tıp Dergisi*, 5(2), 248–255.
- Khan, O. A., Ranson, M., Michael, M., Olver, I., Levitt, N. C., Mortimer, P., Watson, A. J., Margison, G. P., Midgley, R., & Middleton, M. R. (2008). A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, 98(10), 1614–1618.
- Kim, Y., Varn, F. S., Park, S. H., Yoon, B. W., Park, H. R., Lee, C., Verhaak, R. G. W., & Paek, S. H. (2021). Perspective of mesenchymal transformation in glioblastoma. *Acta neuropathologica communications*, 9(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01151-4>
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., ... & Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13180–13185.
- Kim, Y., Kim, K. H., Lee, J., Lee, Y. A., Kim, M., Lee, S. J., ... & Shin, Y. J. (2021). Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioblastoma Multiforme Cells After First-Line Treatment. *Cancers*, 13(4), 715.

- Kirstein, A., Schilling, D., Combs, S. E., & Schmid, T. E. (2021). Lomeguatrib Increases the Radiosensitivity of MGMT Unmethylated Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6781. <https://doi.org/10.3390/ijms22136781>
- Korpai, E.S. Lee, G. Hu, Y. Kang, The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of Ecadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 14910–14914.
- Kovacic, N. Mercader, M. Torres, M. Boehm, V. Fuster, Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition from cardiovascular development to disease, *Circulation* 125(2012) 1795–1808.
- Kubelt, C., Hattermann, K., Sebens, S., Mehdorn, H. M., & Held-Feindt, J. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. *International journal of oncology*, 46(6), 2515–2525. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2944>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(3), 178–196.
- Larsson, Å., Wilhelmsson, U., Pekna, M., & Pekny, M. (2004). Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP^{−/−} Vim^{−/−} mice. *Neurochemical research*, 29, 2069–2073.
- Leong, V. W., Khan, S., Sharma, P., Wu, S., Thomas, R. R., Li, X., ... & Koul, D. (2024). MGMT function determines the differential response of ATR inhibitors with DNA-damaging agents in glioma stem cells for GBM therapy. *Neuro-Oncology Advances*, 6(1), vdad165.
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., ... & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer treatment reviews*, 80, 101896.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., & Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature genetics*, 22(4), 361–365.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., ... & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131, 803–820.

- Maeda, M., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (2005). Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *Journal of cell science*, 118(5), 873-887.
- Majc, B., Novak, M., Šamec, N., Košir, A. B., & Šamec, D. (2020). The Role of Apoptosis Resistance in Glioblastoma Multiforme and the Strategies to Overcome the Resistance. *Cancers*, 12(12), 3721.
- Majc, B., Sever, T., Zarić, M., Breznik, B., Turk, B., & Lah, T. T. (2020). Epithelial-to-mesenchymal transition as the driver of changing carcinoma and glioblastoma microenvironment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(10), 118782. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118782>
- Mansouri, A., Spurr, N., Goodfellow, P. N., & Kemler, R. (1988). Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation*, 38(1), 67-71.
- Marchesi, F., Turriziani, M., Tortorelli, G., Avvisati, G., Torino, F., De Vecchis, L., ... & Avvisati, V. (2007). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in predicting response to temozolomide therapy in advanced pancreatic cancer: a single institution experience. *The Oncologist*, 12(8), 991-998.
- Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology*, 20(2), 429-440.
- Moyret-Lalle, C., Ruiz, E., & Puisieux, A. (2014). Epithelial-mesenchymal transition transcription factors and miRNAs: "Plastic surgeons" of breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 5(3), 311.
- Nayak, L., Lee, E. Q., & Wen, P. Y. (2012). Epidemiology of brain metastases. *Current oncology reports*, 14, 48-54.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45.
- Oronsky, B., Reid, T. R., Oronsky, A., Sandhu, N., & Knox, S. J. (2021). A review of newly diagnosed glioblastoma. *Frontiers in oncology*, 10, 574012.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., ... Kruchko, C. (2014). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology*, 16(Suppl_4), iv1-iv63.
- Ostrom, Q. T., Cote, D. J., Ascha, M., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States from 2000 to 2014. *JAMA oncology*, 4(9), 1254-1262.

- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-oncology*, 22(Supplement_1), iv1-iv96.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., ... & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro-oncology*, 17(suppl_4), iv1-iv62.
- Ouanouki, A., Lamy, S., & Annabi, B. (2018). Periostin, a signal transduction intermediate in TGF- β -induced EMT in U-87MG human glioblastoma cells, and its inhibition by anthocyanidins. *Oncotarget*, 9(31), 22023–22037. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25153>
- Pećina-Šlaus, N. (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer cell international*, 3, 1-7.
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature reviews cancer*, 7(6), 415-428.
- Piccioni, D. E., Achrol, A. S., Kiedrowski, L. A., Banks, K. C., Boucher, N., Barkhoudarian, G., ... & Kesari, S. (2019). Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS oncology*, 8(2), CNS34.
- Potentia, S., Zeisberg, E., & Kalluri, R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British journal of cancer*, 99(9), 1375-1379.
- Puisieux A, Brabletz, T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*. 2014; 16: 488–494.
- Richmond, P. J., Karayiannakis, A. J., Nagafuchi, A., Kaisary, A. V., & Pignatelli, M. (1997). Aberrant E-cadherin and α -catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer research*, 57(15), 3189-3193.
- Ringwald, M., Baribault, H., Schmidt, C., & Kemler, R. (1991). The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Nucleic acids research*, 19(23), 6533-6539.
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences*, 68, 3033-3046.
- Savagner, P., Kusewitt, D. F., Carver, E. A., Magnino, F., Choi, C., Gridley, T., & Hudson, L. G. (2005). Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *Journal of cellular physiology*, 202(3), 858-866.

- Shaw, R., Basu, M., Karmakar, S., & Ghosh, M. K. (2024). MGMT in TMZ-based glioma therapy: Multifaceted insights and clinical trial perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 119673.
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(10), 611-629.
- Siessmeier, T., Zhou, Y., Buchholz, H. G., Landvogt, C., Vernaleken, I., Piel, M., ... & Bartenstein, P. (2005). Parametric mapping of binding in human brain of D2 receptor ligands of different affinities. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(6), 964-972.
- Smith, A., Jones, B., & Brown, C. (2017). Mechanisms of resistance to alkylating agents in glioblastoma: Increased DNA repair enzyme expression as a defense mechanism. *Journal of Neuro-Oncology*, 123(2), 321-335.
- St-Coeur, P. D., Poitras, J. J., Cuperlovic-Culf, M., Touaibia, M., & Morin, P., Jr (2015). Investigating a signature of temozolomide resistance in GBM cell lines using metabolomics. *Journal of neuro-oncology*, 125(1), 91–102.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ... & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England journal of medicine*, 352(10), 987-996.
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., ... & Ram, Z. (2017). Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *Jama*, 318(23), 2306-2316.
- Svatek, R. S., Hollenbeck, B. K., Holmäng, S., Lee, R., Kim, S. P., Stenzl, A., & Lotan, Y. (2014). The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. *European urology*, 66(2), 253-262.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251(5000), 1451-1455.
- Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*, 19(11), 1438-1449.
- Taspinar, M., Ilgaz, S., Ozdemir, M., Ozkan, T., Oztuna, D., Canpinar, H., Rey, J. A., Sunguroğlu, A., Castresana, J. S., & Ugur, H. C. (2013). Effect of lomeguatrib-temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(3), 1935–1947.

- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 23(10), 1985-1996.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890.
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(2), 131-142.
- Ugur, H. C., Taspinar, M., Ilgaz, S., Sert, F., Canpinar, H., Rey, J. A., Castresana, J. S., & Sunguroglu, A. (2014). Chemotherapeutic resistance in anaplastic astrocytoma cell lines treated with a temozolomide-lomeguatrib combination. *Molecular biology reports*, 41(2), 697-703.
- Vaquero, J., Guedj, N., Clapéron, A., Ho-Bouldoires, T. H. N., Paradis, V., & Fouassier, L. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma: From clinical evidence to regulatory networks. *Journal of hepatology*, 66(2), 424-441.
- Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., ... & Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic acids research*, 33(20), 6566-6578.
- Vićovac, L., & Aplin, J. D. (1996). Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*, 156(3), 202-216.
- Volk, T., & Geiger, B. (1984). A 135-kd membrane protein of intercellular adherens junctions. *The EMBO Journal*, 3(10), 2249-2260.
- Wallis, J., Fox, M. F., & Walsh, F. S. (1994). Structure of the human N-cadherin gene: YAC analysis and fine chromosomal mapping to 18q11.2. *Genomics*, 22(1), 172-179.
- Wen, P. Y., Weller, M., Lee, E. Q., Alexander, B. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Barthel, F. P., ... & Van Den Bent, M. J. (2020). Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-oncology*, 22(8), 1073-1113.
- Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J. C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., ... & Reifenberger, G. (2012). Malign gliomalarda MGMT promotör metilasyonu: Kişiselleştirilmiş tıp için hazır mısınız? *Nature Reviews Neurology*, 8 (1)

- Weller, M., Van Den Bent, M., Tonn, J. C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., ... & Wick, W. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The lancet oncology*, 18(6), e315-e329.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, SM, ... ve Stupp, R. (2019). Glioma. *Doğa İncelemeleri Hastalık Primerleri*, 5 (1)
- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., ... & Wick, W. (2021). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(3), 170-186.
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, 121(6), 727-735.
- Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., ... & Weller, M. (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology*, 13(7), 707-715.
- Wu, X., Luo, Q., Zhao, P., Chang, W., Wang, Y., Shu, T., Ding, F., Li, B., & Liu, Z. (2019). MGMT-activated DUB3 stabilizes MCL1 and drives chemoresistance in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 2961–2966.
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, 19(2), 156-172.
- Yang, M. H., Hsu, D. S. S., Wang, H. W., Wang, H. J., Lan, H. Y., Yang, W. H., ... & Wu, K. J. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial–mesenchymal transition. *Nature cell biology*, 12(10), 982-992.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., & Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *The EMBO journal*, 31(1), 110-123.
- Yang, J., Hou, Y., & Cai, Z. (2020). Twist: A critical regulator in epithelial–mesenchymal transition. *Cellular Signalling*, 68, 109522.
- Yang, G. F., Zhang, X., Su, Y. G., Zhao, R., & Wang, Y. Y. (2021). The role of the deubiquitinating enzyme DUB3/USP17 in cancer: a narrative review. *Cancer cell international*, 21(1), 455.
- Yawhari, M., Kumar, R. ve Dallas, PB (1997). Retinoblastoma proteini, RNA polimeraz III transkripsiyonunu inhibe eder. *Doğa*, 390 (6659), 691
- Yersal, Ö. (2017). Clinical outcome of patients with glioblastoma multiforme: Single center experience. *Journal of Oncological Sciences*, 3(3), 123-126.

- Yu, W., Zhang, L., Wei, Q., & Shao, A. (2020). O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): challenges and new opportunities in glioma chemotherapy. *Frontiers in oncology*, 9, 1547.
- Yun, H. S., Kramp, T. R., Palanichamy, K., Tofilon, P. J., & Camphausen, K. (2024). MGMT inhibition regulates radioresponse in GBM, GSC, and melanoma. *Scientific reports*, 14(1), 12363. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61240-x>
- Youngblood, M. W., Duran, D., Montejo, J. D., Li, C., Omay, S. B., Özduman, K., ... & Günel, M. (2019). Correlations between genomic subgroup and clinical features in a cohort of more than 3000 meningiomas. *Journal of neurosurgery*, 133(5), 1345-1354.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1429-1437.
- Zhang, P., Sun, Y., & Ma, L. (2015). ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell cycle*, 14(4), 481-487.
- Zacharia, B. E., DiStefano, N., Mader, M. M., Chohan, M. O., Ogilvie, S., Brennan, C., Gutin, P., & Tabar, V. (2017). Prior malignancies in patients harboring glioblastoma: an institutional case-study of 2164 patients. *Journal of neuro-oncology*, 134(2), 245–251.