

DİDEM SEVEN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**GLİOBLASTOMA MULTİFORMELİ HASTALARDA
TRANSKRİPTOM ANALİZİ**

DİDEM SEVEN

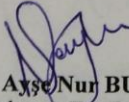
**DANIŞMAN
PROF.DR AYŞE NUR BUYRU**

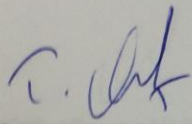
**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

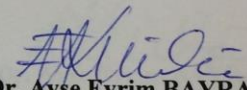
İSTANBUL-2018

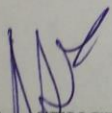
TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

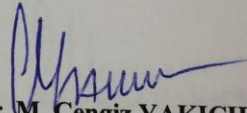
Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Didem SEVEN tarafından Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU'nun danışmanlığında hazırlanan "Glioblastoma Multiformeli Hastalarda Transkriptom Analizi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10/12/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU
İ.Ü. - Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Turgut ULUTİN
İ.Ü.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı


Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Prof. Dr. Altay SENCER
İstanbul Tıp Fak.
Nöroşirurji Anabilim Dalı


Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER
Acıbadem Üni. Fen-Edb. Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik B.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Didem Seven



ITHAF

Bu tez çalışmasını, glioblastoma ile bizi acı bir şekilde tanıştıran,
Genç yaşında bu hastalık sebebiyle kaybettiğimiz, canım ağabeyim,

MUSTAFA NACİ TANIK'a ithaf ediyorum.

Huzur içinde uyu...

TEŞEKKÜR

Bu zorlu doktora süreci boyunca ilgisinden güç aldığım danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU'ya,

2214 bursu ile Almanya'da geçirdiğim bir sene boyunca yaşam ve yol masraflarımı karşılayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Almanya'da geçirdiğim bir sene boyunca her imkanını benimle paylaşan, bana aile, arkadaş, danışman olan Dr. Arif Bülent EKİCİ'ye,

Doku toplama sürecini kolaylaştıran, hiçbir yardımını esirgemeyen, cerrahımız Prof. Dr. Altay SENCER'e ve ekibindeki tüm çalışanlara,

Doktora sürecimde ve Türkiye'den uzak olduğum süreçte ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sevgili laboratuvar ekibimizden; Asuman ÇELEBİ ve Ceren ORHAN başta olmak üzere, Elif DARBUKA, Seda EKİZOĞLU, Filiz ÖZDEMİR, Hikmet KÖSEOĞLU ve Ayşegül SOYSAL'a,

Her düşüşümde beni motive eden, can suyumuz, verdiği desteği ancak büyüdüğünde anlayacak olan canım yeğenim Elif Yaz BALABAN'a

Sabırla, inatla beni destekleyen canım AİLEM'e

Sonsuz teşekkürler....

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23629

(Bu proje TÜBİTAK 2214 bursu ile 1059B141601091 no'lu başvuru ile desteklenmiştir.)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. BEYİN TÜMÖRLERİ.....	2
2.1.1. Glioblastoma	2
2.1.2. Tarihçe	3
2.1.3. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3.1. Görülme sıklığı ve Risk Faktörleri.....	3
2.1.4. Biyolojik Davranış	4
2.2. GLİOMAGENEZ	4
2.2.1. <i>IDH</i> mutasyonu	4
2.2.2. <i>TERT</i> Mutasyonları	7
2.2.3. 1p/19q kaybı.....	7
2.2.4. <i>TP53</i> Mutasyonu	7
2.2.5. <i>ATRX</i> Mutasyonu	7
2.3. GLİOBLASTOMA PATOGENEZİ	7
2.3.1. Onkojenik Yolaklar.....	7
2.3.2. Glioblastomada Epigenetik	10
2.3.3. MGMT Geninin Promotorun Aşırı Metillenmesi	10
2.4. Glioblastomanın Moleküler Sınıflandırılması	11
2.5. GLİOMALARIN MOLEKÜLER TANISINDA KULLANILAN METODLAR.....	12

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. GEREÇ	14
3.1.1. Materyal	14
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	14
3.1.3. YÖNTEM.....	15
3.1.3.1. RNA İzolasyonu.....	15
3.1.3.2. DNase İşlemi.....	16
3.1.3.3. cDNA Çevrimi	17
3.1.3.4. Yeni Nesil Dizileme İşlemi için Kütüphane Oluşturma	17
3.1.3.5. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması.....	18
3.1.3.6. Primer Dizilerin Kesilmesi.....	19
3.1.3.7. Bağlanma Tepkimesi.....	19
3.1.3.8. Saflaştırma.....	20
3.1.3.9. Kütüphane Ölçümü	20
3.1.3.10. Emülsiyon PZR	20
3.1.3.11. Emülsiyon PZR Ürününün Zenginleştirilmesi.....	22
3.1.3.12. Dizileme	23
3.1.3.13. Analiz	24
3.1.3.14. Dizileme sonucu.....	25
3.1.3.15. Teknik Doğrulama ve Tekrarlama	26
3.1.3.16. Yeni Nesil Dizileme ile Gerçek Zamanlı PZR Karşılaştırması	27
3.1.3.17. Hedef Genlerin Doğrulanması	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Yeni Nesil Dizileme.....	30
4.2. IPA analizi	31
4.2.1. Üst düzenleyicilerin Seçilmesi.....	33
4.3. Aritmetik Ortalama Analizi	43
5. TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	58
HAM VERİLER	65
FORMLAR	66
ETİK KURUL KARARI	67
PATENT HAKKI İZNİ	68

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	69
ÖZGEÇMİŞ	71



TABLOLAR LISTESİ

Tablo 3-1: RNA İzolasyonu Akış Şeması.....	16
Tablo 3-2: DNase İşlemi.....	17
Tablo 3-3: cDNA çevrimi Tepkime İçeriği	17
Tablo 3-4: Hedef Bölge Çoğaltılması Tepkime İçeriği	18
Tablo 3-5: Hedef Bölge Çoğaltılması Termal Profili	19
Tablo 3-6: Barkod- Adaptör İçeriği	19
Tablo 3-7: Bağlanma Tepkimesi İçeriği	19
Tablo 3-8: Kütüphane Ölçümü Tepkime İçeriği.....	20
Tablo 3-9: Emülsiyon PZR Tepkime İçeriği	21
Tablo 3-10: Zenginleştirme Tepkimesi Kuyucuk Yerleşimi	22
Tablo 3-11: Örneklerin Yeni Nesil Dizileme Verileri	26
Tablo 3-12: Bir bölme içerisindeki gen yerleşimi	27
Tablo 3-13: Array Kart Tepkime İçeriği.....	27
Tablo 3-14: FAM180A, DMBX1, KCNV1, TOP1,TBP Genlerinin Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan Primer Dizileri.....	28
Tablo 3-15: Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Karışım İçeriği	28
Tablo 4-1: Yeni Nesil Dizilemeye Alınan Örneklerin Özellikleri.....	30
Tablo 4-2: Analizi gerçekleştirilen 9 örneğin özellikleri.....	31
Tablo 4-3: IPA Analizinde Elde Edilen İlk 5 Yolak.....	31
Tablo 4-4: IPA Analizinde Elde Edilen İlk 5 Üst Düzenleyici Gen.....	32
Tablo 4-5: Veri Seti ile İlişkili Hastalıklar	32
Tablo 4-6: En çok değişim gösteren Hücresel İşlev ve Sistemler	32
Tablo 4-7: IPA analizine göre ifadesi artan ve azalan hedef genler	33
Tablo 4-8: RNAseq verisinden RT-PZR için seçilen genler	35
Tablo 4-9: RT Çalışmasında kullanılan örneklerin özellikleri	36
Tablo 4-10: Üst Düzenleyici Genlerin RT-PZR Sonucu	37
Tablo 4-11: Üst Düzenleyici Genlerin Klinik Özelliklere Göre Değerlendirilmesi	43
Tablo 4-12: Ortalamalara Göre Değerlendirilen Genler.....	43
Tablo 4-13:DMBX1, KCNV2, FAM180A genlerinin Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları	43

Tablo 4-14: DMBX1, KCNV2, FAM180A genlerinin klinik özellikler açısından incelenmesi	44
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: “Glioblastomda IDH işlevi” (28)	5
Şekil 2-2: Birincil ve ikincil glioblastom oluşum mekanizması.....	5
Şekil 2-3: Yabanıl tip IDH ve mt IDH'ın özellikleri.....	6
Şekil 2-4: GBM patogeneğinde yer alan temel sinyal yolları	8
Şekil 3-1: Ampliseq Kütüphane Oluşturma İş Akış Şeması.....	18
Şekil 3-2: Emülsiyon PZR Tepkimesi	21
Şekil 3-3: Ion One Touch Zenginleştirme Sistemi	23
Şekil 3-4: Torrent Dizileme Sistemi ve pH temelli dizilemede Çip yapısı	24
Şekil 3-5: Dizileme Sonuçları.....	25
Şekil 3-6: Array Kart görüntüsü	26
Şekil 4-1: Temel Bileşenler Analiz sonucu	30
Şekil 4-2: Üst Düzenleyicilere ait Isı haritası	34
Şekil 5-1: MITF geninin etkileştiği genler	48
Şekil 5-2: NUPR1 - MYC ilişkisi	49
Şekil 5-3: CACNA1C ve hedef genleri	51
Şekil 5-4: TGFB1-CPXM1- POSTN etkileşimi	53
Şekil 5-5: FAM180A ve etkileştiği genler.....	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (Siklin Bağımlı Kinaz Baskılayıcısı 2A)

cDNA: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Etmeni Almacı)

EGFRvIII: Epidermal Growth Factor Receptor variant III (Epidermal Büyüme Etmeni Almacı varyant III)

GBM: Glioblastoma Multiforme

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase (Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz)

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase (Fosfatidilinozitol 3 Kinaz) **PIK3CA:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (Fosfatidilinozitol-4,5 bifosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa)

TGFB1: Transforming Growth Factor Beta 1

WHO: World Health Organisation

ÖZET

Seven D. Glioblastoma Multiformeli Hastalarda Transkriptom Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Genetik ABD., Doktora Tezi. İstanbul. 2018

Ortalama sağ kalım süresi yaklaşık 12 ay olan glioblastoma, beyin tümörleri arasında en agresif ve en yaygın olanıdır. İnsan sitomegalovirüs enfeksiyonu, iyonize ışınlar, petrokimyasal maddeler, lastik maddesine maruz kalmak glioblastomada risk artışına neden olur. Temel kanser yolları glioblastomada da değişim gösterse de, özel bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, glioblastomada ifadesi farklılaşan genleri tespit etmektir.

Tümör ve tümöre komşu olan normal beyin dokusu ameliyat sırasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji AD'da gerçekleşen cerrahi operasyonlarda alınmış, tümör ve normal doku değerlendirmesi patoloji uzmanı tarafından yapılmıştır. RNA izolasyonu ve cDNA çevriminin ardından yeni nesil dizileme yapılacak 12 çift örneğin kütüphaneleri hazırlanmış, çoğaltma ve dizileme gerçekleştirilmiştir. 26 çift örnekte RT PZR yöntemi ile doğrulama yapılmıştır.

RNA dizilemesi gerçekleşen 12 çift örneğin 3 çifti tümör- normal dokunun birbirine yakınlık göstermesi nedeniyle dışlanmıştır. 3062 anlamlı farklılaşmış ifade gösteren gen saptanarak ileri analizlere alınmıştır. IPA ile üst düzenleyiciler ve en çok değişiklik gösteren hedef genler, yollar tespit edilmiştir. Beyin dokusunda veya tümörde görevli olabilecek üst düzenleyici/hedef genler ve teknik doğrulama için seçilen 54 gen, RT PZR ile çalışılmıştır.

Glioblastomada en çok değişim gösteren yollar arasında, Aksonal Rehberli Sinyal İletim Yolu, GABA ve Glutamat reseptör sinyal iletim yolları bulunmaktadır. Bu yolların yanı sıra, tümör oluşumunda önemli etkiye sahip TGFB1, NUPR1, ANXA2 gibi temel düzenleyicilerin ifadesi değişmiştir. Glioblastoma yayılımında etkili, literatürde daha önceden belirtilmemiş olan hedef genlerden FAM180A ve DMBX1 genlerinin ifadesi artmıştır, KCNV1 geninin ise azalmıştır.

İfadesi değişen ve çalışmamızda tespit edilen genlerin bir biyobelirteç adayı olabileceğini ve fonksiyonel çalışmalarla bu genlerin doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, RNA dizileme, üst düzenleyiciler, TGFB1, FAM180A.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23629

ABSTRACT

Seven D. Transcriptome Analysis in glioblastoma multiforme. Istanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Genetics, PhD Thesis. İstanbul. 2018.

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive brain tumor malignancy with an average survival of approximately 12 months. Viruses like human cytomegalovirus, ionizing radiation, occupational exposure to rubber and petrochemical materials are associated with increased risk. To gain deeper insights into the molecular processes involved we aimed to detect differentially expressed genes in GBM.

Fresh paired normal and tumor tissue samples were obtained from patients. Immunostaining was performed to validate the nature of both tissue groups. After RNA extraction and reverse transcription, we prepared libraries for 12 pairs of tumors. Emulsion PCR and were sequencing were performed. qRT PCR was performed in 26 tissue pairs for verification.

Three of 12 pairs were excluded as a result of the PCA, as normal tissue from these patients showed tumor-like characteristics. 3,062 differentially expressed genes ($p < 0.001$). Detection of the most significant pathways, upstream regulators and target genes in glioblastoma was done by IPA. A total 54 genes were selected as candidates for their possible role in tumor development or technical validation and analyzed in 26 pairs. The results of RT PCR were in agreement with NGS using Pearson Correlation.

The pathways displaying most frequent changes were the Axonal Guidance Signaling, GABA and Glutamat receptor signaling pathways. Expression of known factors involved in glioblastoma formation as upstream regulators, such as ANXA2, TGFB1 and NUPR1. Besides these, DMBX1 and FAM180A were overexpressed and KCNV1 was downexpressed target genes in glioblastoma, which are not previously shown.

We suggest that the genes detected in this study may provide candidate biomarkers in glioblastoma which warrants further investigation by functional tests.

Key Words: Glioblastoma, RNAseq, upstream regulators, TGFB1, FAM180A.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 23629.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma multiforme, diğer bilinen adıyla Evre 4 Astrositoma, beyin tümörlerinin en habis olan türüdür. Tedavi seçenekleri olan cerrahi çıkarım, kemoterapi ve radyoterapi ile müdahale edildiğinde sağ kalımı yaklaşık 12 ay olan GBM, tüm intrakraniyal tümörlerin %15'ini oluşturmaktadır. Amerika'da her yıl 19 bin hastanın tanısını aldığı GBM, erkeklerde daha sık gözlenir. GBM'ler birincil glioblastomlar ve ikincil glioblastomlar olmak üzere ikiye ayrılır. Birincil glioblastomlar, tüm glioblastomların %90'ını oluşturup, IDH mutasyonu açısından yabani tip gösterirken, ikincil glioblastoma yaklaşık %10'unu oluşturur ve IDH mutasyonu taşır. IDH mutasyonu ikincil glioblastomlarda sağ kalım süresini uzatan ve daha genç hastalarda görülen bir belirteçdir. Glioblastoma patogeneğinde büyüme etmenlerinin, hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girmesiyle, RAS/Rb/MAPK/PI3K aracılı sinyal ileti yollarına göndererek, hücreyi çoğalmaya, bölünmeye, apoptozdan kaçmaya ve hücre göçüne sevk eder. Ancak belirtilen genler aracılı sinyal iletim yolları, birçok kanserde değişim gösterdiği bilinen temel genlerdir. Bu amaçla glioblastom patogeneğini aydınlatmak için, yeni nesil teknolojiler de kullanılarak, birçok çalışma yapılmış olsa da, ifade karşılaştırılması tümör ve normal taze dokusunda gerçekleştirilmemiştir. Normal örnek olarak kullanılanların genellikle hücre hatları olmasının yanı sıra, nadir olarak da epilepsi hastaları ve bir çalışmada parafine gömülü doku kullanılmıştır.

Bu çalışmada kanserde bilinen genlerin dışında birincil glioblastom patogeneğine neden olabilecek, beyin dokusunda ifadesi düzensizleşen genleri transkriptom düzeyinde saptamayı amaçladık. Bunun için glioblastomanın agresifliğine neden olabilecek, yollar, üst düzenleyici genler veya hedef genler tespit edilerek, birbirleri ile olası ilişkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BEYİN TÜMÖRLERİ

Birincil habis beyin tümörleri, her sene 250 binden fazla yeni tanı konan ve vaka sayısı açısından kanser tipleri arasında 17. sırada yer alan tümörlerden olup (Forman et al., 2013) %77'si glial hücrelerden köken alan gliomadır. Gliomalar; Pilositik astrositoma (Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organisation) (WHO Evre I), Difüz astrositoma (WHO Evre II), Oligodendroglioma (WHO Evre II), ependimoma (WHO Evre II), anaplastik oligodendroglioma (WHO grade II), anaplastik astrositoma (WHO Evre III), Anaplastik ependimoma (WHO Evre III), glioblastoma (WHO Evre 4) ve karışık gliomalardan oluşmaktadır (1). Amerika'da her yıl 19 binden fazla glioma tanısı konulmaktadır. Geçtiğimiz 30 yıl içerisinde tanı amaçlı görüntüleme ve tanıya yaklaşımın değişmesiyle beyin tümörlerinin görülme sıklığı da artmıştır. Glioblastoma (WHO Grade IV) yetişkinlerde gözlenen en yaygın glioma olup, yetişkin gliomalarının %67'sini oluşturur (2).

2.1.1. Glioblastoma

Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörlerinin en yaygın ve agresif türü olan glioblastoma multiforma (GBM yada glioblastoma), Dünya Sağlık örgütü sınıflandırmasına göre Astrositoma Evre 4 olarak da tanımlanmaktadır. Çıplak gözle incelemede, Glioblastoma vasküler proliferasyon/nekroz nedeniyle alacalı bir görüntü aldığından “multiforme” olarak adlandırılmaktadır. Ortalama sağ kalım süresi 15 ay olan Glioblastoma, birincil beyin tümörlerinin % 22,6–27'sini, tüm intrakranial tümörlerin % 12-15'ini ve astrositik tümörlerin % 50-60'ını oluşturmaktadır (3). Glioblastomalar; kendiliğinden oluşan, daha önce hiçbir habis özellik göstermeyen, daha çok yaşlı hastalarda gözlenen birincil glioblastomlar ile, düşük dereceli astositomlardan gelişen, daha çok genç hastalarda görülen ikincil glioblastom olmak üzere ikiye ayrılır (4). GBM'lerin %90'ı birincil tümörlerdir. Dünya Sağlık Örgütü, glioblastomları; dev hücreli glioblastoma, gliosarkoma ve epiteloid glioblastoma olmak üzere üçe ayırır. Çocuklarda daha yaygın olan epiteloid glioblastoma; büyük eozinofil hücreli, belirgin melanoma benzeri çekirdekli ve çoğunlukla rhabdoid hücreler ile karakterizedir.

Glioblastoma tüm beyin tümörleri arasında sağ kalımı en kısa olanıdır. Tanı sonrası ilk bir yılda sağ kalım %35 iken, ikinci yıl %13,7'dir (2). Tedavi edilmediğinde sağ kalım süresi ortalama 3 ay olan glioblastomların tedavisi de oldukça karmaşıktır. Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi glioblastom hastalarında sağ kalımı anlamlı bir şekilde artırır (5).

2.1.2. Tarihçe

Glioblastoma Multiforma terimi ilk kez 1926 yılında Bailey ve Cushing tarafından kullanılmıştır. Yapılan histolojik çalışmada, tümörün birincil öncü glioblast hücrelerinden köken aldığı ve nekroz, hemoraj, kist formlarından gelişen farklılaşmış hücrelerin bir arada bulunduğunu belirtmişlerdir. 400 örnekle yapılan araştırmada birbirinden farklı hücre çeşitleri içeren bu tümörün en habis ve sağ kalım süresi en kısa olanı olduğu belirtilmiştir (6). Birincil ve ikincil glioblastom ifadesi ilk kez Alman Nöropatolojist Hans Joachim Sherer tarafından kullanılmıştır (7).

2.1.3. Epidemiyoloji

2.1.3.1. Görülme sıklığı ve Risk Faktörleri

Amerika Birleşik Devletleri Beyin Tümörü Kayıt Merkezi'nin verilerine göre, 2010-2014 yılları arasında glioblastomada görülme sıklığı 100 binde 3,19'dur. Bu oran, merkezi sinir sistemi tümörleri arasındaki en yüksek oran olmakla birlikte, ortalama görülme yaşı 64'tür. 0-19 yaş arası beyin tümörlerinin %3 'ünde gözlenen glioblastomlar, 75-84 yaş aralığında % 15,24'e yükselmektedir. Genellikle yaş ile birlikte risk de artmaktadır (2). 50 yaş altındaki hastalarda sağ kalım, ortalama 8,8 ay iken, 50 yaş üstü hastalarda 4,1 aya kadar inmektedir (8).

Glioblastoma, erkeklerde kadınlara oranla 1,6 kat daha sık gözlenmektedir. Bu nedenle erkek cinsiyet glioblastoma için risk faktörü olarak görülmektedir. Birincil glioblastomalarda erkek/kadın oranı 133/100, ikincil glioblastomlarda ise 65/100 dür (8).

Glioblastomda en yüksek görülme sıklığı sırasıyla, beyaz ırk, siyah ırk, Asya/Pasifik adaları, Amerikan Hint/Alaskalılar'dır. 2006 yılından 2010 yılına kadar beyaz ırkta gözlenme oranı, siyah ırka göre 2 kat fazladır. Hispanik olmayan ırklarda, riskin Hispaniklere oranla artmış olduğu saptanmıştır (9).

Birçok çevresel etmen ve yaşam tarzının glioblastomaya neden olma riski araştırıldığında, atom bombası, tedavi amaçlı radyasyon, CT ve MRI taramaları ve x ışınlarından yayılan iyonize ışına maruz kalmanın risk etmeni olduğu kanıtlanmıştır (10). Astım, bahar nezlesi, egzama ve besin alerjileri gibi alerjik durumların, glioblastom riskini azalttığı öne sürülmüştür (11,12,13,14,15,16). Varicella Zoster virüsü enfeksiyonu geçirmiş kişilerde riskin azaldığı saptanmıştır. (17,18). Glioblastom ile sigara, alkol ve madde kullanımının ya da beslenme şeklinin ilişkisi olmadığı gösterilmiştir (19). Uzun süreli cep telefonu kullanımı ile glioblastom gelişimi arasında ise bir ilişki bulunamamıştır (20).

2.1.4. Biyolojik Davranış

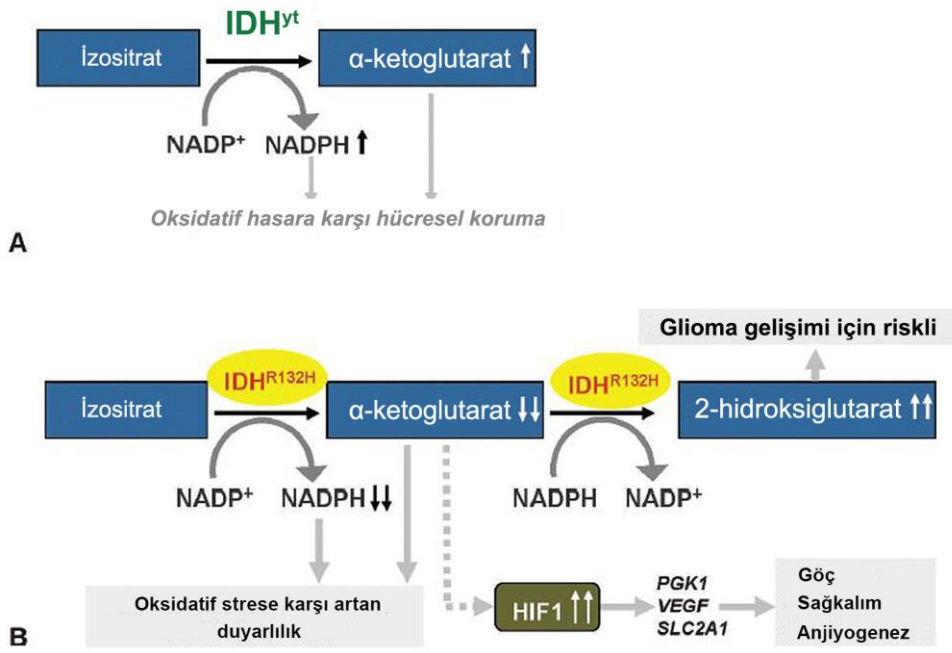
Sıklıkla beyin yarım küresinin supratentorial bölgesine (frontal, temporal, paryetal, oksipital loblar) yerleşen glioblastoma, farklı tümör davranışlarıyla nadir olarak serebellumda ve daha nadir olarak spinal kord içerisinde görülür (9). Sızarak büyüme gösterdiği için normal dokudan ayırt edilmesi oldukça zordur (21). Büyüyen tümörün, kafatası içerisinde basınca neden olabileceği gibi (22) bazen hidrocefali ile de sonuçlanabilir (23). Glioblastoma nadiren metastaz yapsa da, bu metastaz omurilik sıvısı veya kan aracılığı ile olduğundan dalak, karın zarı, akciğer, lenf nodları, karaciğer, kemik, pankreas ve ince bağırsağa metastaz yapma olasılığı bulunmaktadır (24,25). Glioblastomda metastaz potansiyelinin düşük olması, beyin zarının oluşturduğu bariyer ve tümör gelişiminin hızlı olması ile açıklanmaktadır (26).

2.2. GLİOMAGENEZ

2.2.1. IDH mutasyonu

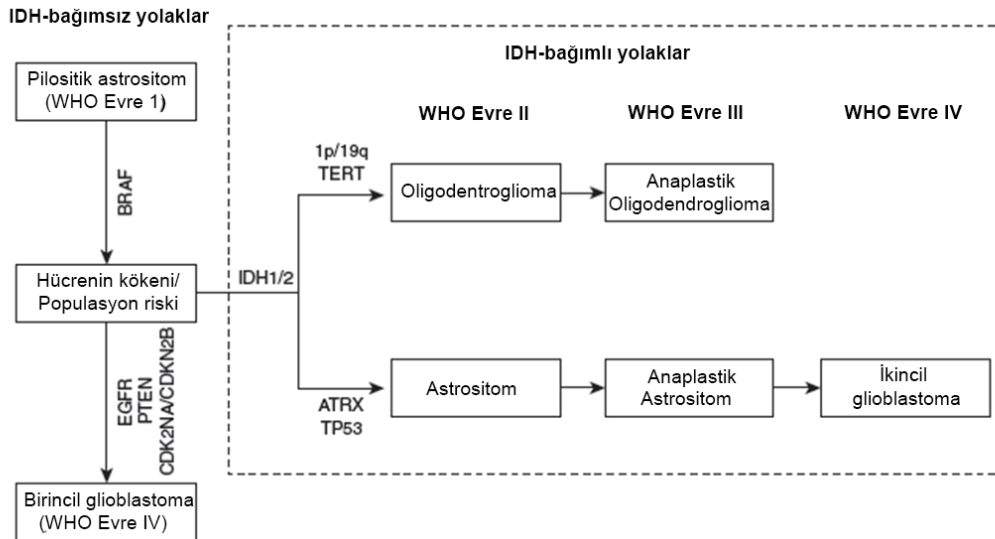
Gliomagenез, birkaç genetik mutasyonun farklı moleküler yolları etkilediği çok bileşenli bir süreçtir. Birincil glioblastom veya düşük evreli gliomadan gelişim gösteren ikincil glioblastom ayrımında, *IDH* mutasyonlarının önemli rolü vardır. *IDH1/2* genleri, sitrik asit döngüsünde önemli rolü olan, sitosol ve mitokondride bulunan, nikotinamid adenin dinükleotid fosfata (NADPH) bağlı izositrat dehidrogenaz (IDH) enzimi kodlar.

IDH enzimi, NADP⁺'ı NADPH'a çevirirken, izositratın alfa ketoglutarata (α -KG) dönüşümünü sağlar. Artan NADPH ve α -KG, hücreyi oksidatif hasara karşı korur. IDH geninde mutasyon olduğu zaman, α -KG ve NADPH düzeyi azalarak hücre oksidatif hasara açık hale gelir. IDH mutasyonu aynı zamanda işlev kazanım mutasyonu olduğundan protein, yeni bir enzim etkinliği kazanarak, α -KG yerine, 2-Hidroksiglutarat (2-HG) oluşmasına neden olur. Artmış 2-HG'nin habis huylu glioma gelişiminde rolü olduğu bildirilmiştir (27). IDH mutasyonu, kanser oluşumunda önemli rolü olan HIF1 düzeyinin de artmasına neden olur. Artan HIF1 düzeyi yayılım ve damarlanmaya yol açan *VEGF/PGK1/SLC2A1* genlerinin düzeyinin artmasına neden olur.



Şekil 2-1: “Glioblastomda IDH işlevi” (28)

IDH1/ IDH2 genlerinde meydana gelen (R132H/R172H) mutasyonları, ikincil glioblastomada bulunan, sağ kalım süresini uzatan ve genç yaş hastalarda görülen bir belirteçtir. Birincil glioblastomda IDH mutasyonlarına nadir olarak rastlanırken, pilositik astrositomlarda hiç görülmez. Bu nedenle glioblastoma, IDH’a bağlı ikincil glioblastom ve IDH’tan bağımsız birincil glioblastom olmak üzere farklı iki gruba ayrılır.



Şekil 2-2: Birincil ve ikincil glioblastom oluşum mekanizması

IDH mutasyonu bulunan hastalar, IDH mutasyonu olmayanlara göre gliomanın daha karakteristik özelliklerini taşır. The Cancer Genome Atlas Research Network, 'ün yaptığı çalışmaya göre Evre II/III glioma tanılı 615 olgunun %79'unda (29), başka bir gruba ait 457 evre II/III glioma hastasının %80,7'sinde (30), 282 WHO Evre II/III glioma hastasının %80,1 IDH mutasyonu saptandığı gösterilmiştir (31). Bu sonuçlara dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü IDH mutasyonlarını önemli bir biyobelirteç olarak glioma sınıflamasına dahil etmiştir.

Birincil ve ikincil glioblastomu ayırd etmek için, IDH mutasyonunu, R132H mutasyonuna özgü IDH1 antikoru ile immünohistokimyasal yöntem ile tespit etmek yeterlidir (32). IDH geninde mutasyon olmayan yetişkin glioblastom hastalarında, sıklıkla kromozom 7'de kopya sayısı artışı, kromozom 10'un kaybı, kromozom 10'da yer alan PTEN tümör baskılayıcı geninde mutasyonlar, CDKN2A/p14ARF ve CDKN2B genlerinde homozigot kayıplar ve TERT geninin promotor bölgesinde mutasyon olduğu bildirilmiştir. Her iki tipi birbirinden ayıran temel özellikler tabloda gösterilmiştir.

	IDH-yabanıl tip glioblastoma	IDH-mutant glioblastoma
Özellikler	Birincil glioblastoma, IDH-yabanıl tip	İkincil glioblastoma, IDH-mutant
Öncü lezyon	Tanımlanamaz; Kendiliğinden oluşur	Diffüz astrositom Anaplastik astrositom
Glioblastoma oranı	~%90	~%10
Tanı anındaki ortalama yaş	~62 yıl	~44 yıl
Erkek-Kadın Oranı	1.42:1	1.05:1
Klinik tarihin ortalama uzunluğu	4 ay	15 ay
Medyan genel sağkalım		
Ameliyat + radyoterapi	9.9 ay	24 ay
Ameliyat + radyoterapi + kemoterapi	15 ay	31 ay
Yer	Supratentorial	Tercihen ön
Nekroz	Yaygın	Sınırlı
TERT promotor mutasyonları	%72	%26
TP53 mutasyonları	%27	%81
ATRX mutasyonları	Nadir	%71
EGFR çoğalması	%35	Nadir
PTEN mutasyonları	%24	Nadir

Şekil 2-3: Yabanıl tip IDH ve mt IDH'ın özellikleri

2.2.2. *TERT* Mutasyonları

TERT geninin kodladığı protein, hücrelerin büyümesi için gerekli olan telomer devamlılığında işlev görür. *TERT* mutasyonları; birincil yetişkin glioblastomlarda ikincil yetişkin yada çocukluk çağı glioblastomlara göre daha sık gözlenen genetik değişimdir (33). Glioblastomlarda *TERT* mutasyonlarına *EGFR* amplifikasyonları eşlik ederken *TERT* mutasyonu olan olgularda *TP53* mutasyonuna rastlanmaz. *TERT* geninde mutasyon olan glioblastom hastalarının sağ kalımı, *TERT* mutasyonu olmayanlara göre daha kısadır (34).

2.2.3. 1p/19q kaybı

Gliomagenезin erken evrelerinde 1. Kromozomun kısa ve 19. Kromozomun uzun kolunun birlikte kaybı görülür. İkincil glioblastom hastalarında *IDH* mutasyonlarına 1p/19q kaybı eşlik eder (35).

2.2.4. *TP53* Mutasyonu

İkincil glioblastomanın %60-%70'inde, birincil glioblastomanın %25-30'unda *TP53* mutasyonu görülür ve sıklığı genç hastalarda daha fazladır (36). *TP53*'ün hastalığın seyri ile ilgili bir belirteç olup olmadığı henüz kesinlik kazanmamıştır (9).

2.2.5. *ATRX* Mutasyonu

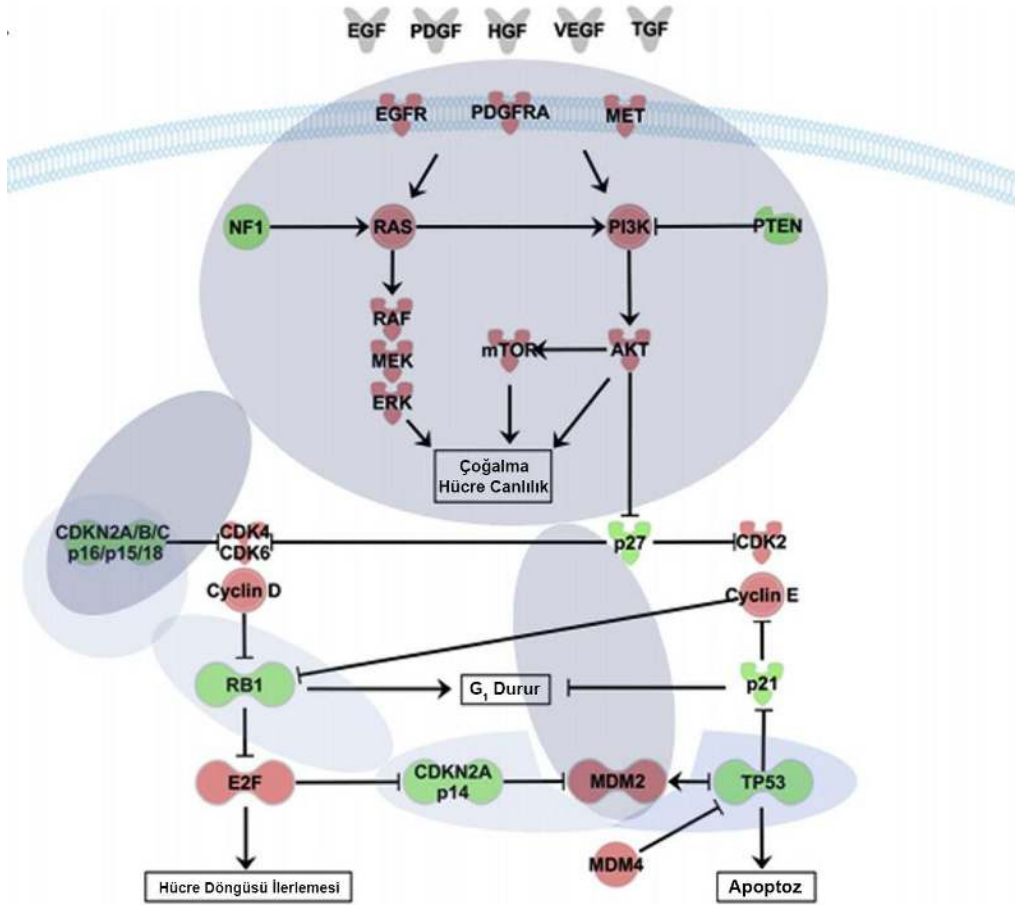
Birçok tümör tipinde görülen *ATRX* mutasyonu, genomik kararsızlığın öncüsü olduğu kabul edilen Alternatif Telomeraz Uzamasına (ALT) neden olur (37). *ATRX* değişimleri genellikle, *IDH1/2* ve *TP53* mutasyonu taşıyan astrositik tümörlerde görülür. İkincil glioblastomlarda (%57), birincil glioblastomlara (%4) göre daha yaygındır (38).

2.3. GLİOBLASTOMA PATOGENEZİ

2.3.1. Onkojenik Yolaklar

Glioblastomada, en sık değişiklik gösteren yolaklar Reseptör Tirozin Kinaz aracılı yolaklardır (RTK). RTK'lar büyüme etmenlerine bağlanan hücre yüzey almaçlarıdır. Büyüme etmenleri hücre yüzeyindeki almaçlara bağlanır ve reseptördeki tirozin aminoasitlerinin çapraz olarak birbirini fosforillemesini sağlayarak, RTKların etkinleşmesine yol açar. Epidermal Büyüme Etmeni Almacı (EGFR) sinyali, merkezi sinir sistem hücrelerinin çoğalma, göçme, farklılaşma ve sağ kalımında işlev gösterir (Şekil2-4). Glioblastom hücrelerinde, EGFR sinyali; almacın/bağlanan ligandın ya aşırı ifade edilmesi yada mutasyona uğraması sonucunda etkinleşir. Bazı tümörlerde her iki değişim aynı

zamanda görülebilir (39). EGFR'nın onkojenik özelliği fosforilleme etkinliğinin kontrolsüz artmasıyla ilişkilidir. Aşırı EGFR ifade eden çoğu glioblastom tümör hücrelerinin EGFR'i kodlayan geninde mutasyon bulunduğu gösterilmiştir. En yaygın görülen mutasyon, proteinin hücre dışı alanını oluşturan 267 aminoasidin kaybolmasına neden olan ekzon 2-7'nin kaybolmasına neden olan mutasyondur. Bu mutasyon sonucu yapılan EGFRvIII kısa proteini ikincil glioblastomalarda görülmez (40).



Şekil 2-4: GBM patogeneğinde yer alan temel sinyal yolları

Sıklıkla değişime uğrayan bir diğer yolak RAS aracılı sinyal yollarıdır. Etkin RAS, büyüme etmeni almaçlarından aldığı sinyali Raf/MAPK/ERK, PIK3/Akt veya PIK3/Rac/Roc yollarına ileterek, hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve sağkalımını düzenler (41). Ras bir guanosin bağlayan proteindir (G protein) ve GTP bağlı halde etkin, GDP bağlı halde ise etkinliğini kaybetmiştir. Ras aracılı yolların etkinleşmesi tüm GBM'lerde gözlense de, RAS mutasyonlarına nadir rastlanır (42). Etkin Ras, tümör başlaması, gelişmesi ve devamlılığı için gerekli olan EGFR/PDGR gibi RTK'ları artırır. Glioblastoma hücrelerinde MAPK/Erk

sinyalinde artış gözlenmesine rağmen (43), MAPK ifadesini etkileyen bir mutasyon bildirilmemiştir (44).

PI3K/PTEN/Akt yolağı da büyüme etmeni almaçlarının etkinleşmesiyle harekete geçer. Büyüme etmeni almaçlarının etkinleşmesi ile, PI3K hücre zarına girer ve PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)'yi, ikincil haberci PIP3'e (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) dönüştürür. PIP3 etkisi ile etkinleşen Akt, hücre çoğalması ve apoptozun engellenmesine yol açar. PTEN genel olarak PI3K'in bir negatif düzenleyicisi olup, PIP3 sinyalini sonlandırırsa da, glioblastomada PTEN'in tümör baskılayıcı işlevi sıklıkla heterozigotluk kaybı (LOH) nedeni ile ortadan kalkar ve bu durum PI3K seviyesinin artması ile sonuçlanır (45).

Retinoblastoma (Rb) aracılı sinyal ileti yolağının bileşenleri, büyümeyi baskılayan veya uyaran tüm sinyallerden etkilendiğinden hücre döngüsünde ve çoğalmasında anahtar rol oynar (46). Rb, bölünmeyen kararlı hücrelerde, fosforillenmemiş ve etkin durumda iken, yazılım etmeni E2F'e bağlıdır. RB'un E2F'e bağlanması, G1/S kontrol noktasında, mitoz ve hücre döngüsünü durduran genlerin yazılımını engeller. Bölünen hücrelerde büyüme etmenleri, Siklin D1 ve CDK/siklin karmaşımının etkinliğini artırır. Etkinleşen CDK/cyclin karmaşımının RB'ı fosforilleyerek, E2F'in serbest kalmasına neden olur. Serbest E2F, DNA sentezini teşvik eden genlerin yazılımını sağlar ve hücre çoğalması başlar. RB yolağının negatif düzenlenmesi INK4 ailesine ait, CDKN2A^{p16INK4a}, CDKN2B^{p15INK4b}, CDKN2C^{p18INK4c}, CDKN2D^{p19INK4d} proteinleri ile sağlanır. Bu genlerde meydana gelen değişimler CDK/cyclin karmaşımının RB'u fosforillemesini engeller ve kontrolsüz hücre döngüsü ve hücre çoğalması başlar (47). 206 glioblastoma hastasının %78'inde RB yolağı; ya RB'nın yada RB'un negatif veya pozitif düzenleyicilerinde meydana gelen değişimlerden etkilendiği bildirilmiştir (43).

TP53 aracılı sinyal ileti, hücre döngüsünün kontrolünde, DNA hasarında, hücre ölümünde ve farklılaşmasında görev alır. DNA hasarı gerçekleştiğinde hücre strese girerek TP53'ü etkinleştirir. TP53'ün *p21*'in yazılımını arttırmasıyla *CDKN*, siklin proteinlerine bağlanarak siklinleri engeller ve hücre döngüsünü G1 evresinde duraklatarak, hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer hızla onarılamayacak bir hasar var ise, TP53 hasarlı bu hücrelerin bölünmesini engellemek için hücre ölümünü başlatır. TP53, negatif düzenleme döngüsü içindedir. *TP53*, *MDM2*'nin yazılımını başlatır, *MDM2*, TP53'ün parçalanmasına ve DNA tamirine engel olan bir protoonkogendir. TP53 etkinliğinin devamı için, CDKN2A-*p14ARF*, *MDM2*'yi parçalayarak etkinliğinin ortadan kalkmasına neden olur. *MDM4* ise, bir

TP53 düzenleyicisidir ve *TP53*'ün yazılım etkinlik bölgesine bağlanarak etkisiz hale getirir (48). İnsan glioma hücrelerinde, *TP53* geninde, DNA bağlanması için önemli olan ekzonlarda yanlış anlamlı mutasyonlar görülür. Glioblastomada gözlenen değişimler; *MDM2*'de ifade artışı, *MDM4* amplifikasyonu ve *CDKN2A-p14ARF* kaybıdır (47).

Bu yolların herhangi biri veya birkaçındaki değişimler glioblastoma gelişimine neden olabilir. Her ne kadar bu yollar iyi tanımlanmış olsa da, farklı tümör tiplerinde farklı yolların etkilenmiş olması glioblastomanın moleküler mekanizmasının tam aydınlatılamamasına yol açmaktadır.

2.3.2. Glioblastomada Epigenetik

Gliomada; DNA dizisinde değişim olmadan gen ifadesinde değişikliğe neden olan, epigenetik düzenlemeler çeşitlilik gösterir. Mutasyonlara ek olarak, DNA metillenmesi, histon değişimleri, kromatin yeniden modellenmesi veya kodlamayan RNA ifade (miRNA'lar) düzeyi değişimleri gibi epigenetik değişimler tümör oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (49). Glioblastomada yapılan epigenetik çalışmalar, tümör baskılayıcı genlerin susması ile sonuçlanan CpG adacıklarının aşırı metillenmesi, onkogenlerin etkinleşmesine neden olan gene özgü metillenmede azalma, kromozomal kararsızlık, imprinting kaybı ile sonuçlanan genomik düzeyde metillenmede azalma çalışmalarını içeren araştırmalardır (50). Günümüze kadar, *CDKN2A-p16INK4a* ve *CDKN2B-p15INK4b* gibi hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan, *RB*, *VHL*, *EMP3*, *RASSF1A* ve *BLU* gibi tümör baskılayıcı, *MGMT* ve *MLH1* gibi DNA tamiri ve genom kararlılığında görevli, *DAPK1*, *TIMP3*, *CDH1*, *PCDHGA11* ve *TMS1/ASC* gibi apoptoz engellenmesi ve tümör yayılmasını düzenleyen genlerin glioblastoma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (51,52,53,54,55).

2.3.3. MGMT Geninin Promotorun Aşırı Metillenmesi

MGMT (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) geni, mutasyon oluşumuna ve zehirli alkilleyici ajanlara karşı hücrel savunmayı sağlayan bir DNA tamir proteinini kodlar ve bu protein öncül mutajen O(6)-methylguanin eklentisini DNA'dan siler. Alkilleyici ajanlar, hücre ölümü, mutasyon ve kansere neden olan karsinojenlerdir. Glioblastomada *MGMT*'nin (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) promotorunun metillenmesi en önemli prognostik faktördür ve hastaya temozolomid ve carmustine gibi alkilleyici ajanlar uygulandığında, hastanın tedaviye cevabını izlemek için kullanılır. DNA'da sitotoksik bileşenler için birkaç alkilenme bölgesi tanımlanmış olup, en sık karşılaşılan Guanin O-6 pozisyonudur. Temozolomid gibi alkali kemotropik ilaçların kullanılması O-6 guanin

pozisyonuna alkil grubunun bağlanmasını sağlar ve DNA yanlış eşleşmesi, DNA çift zincir kırıkları ve dolayısıyla çoğalan hücrelerin apoptozu ile sonuçlanır. MGMT proteinini temozolomidin öldürücü etkisine DNA tamirini gerçekleştirerek karşı koyar. Tümör örneklerinde MGMT aşırı metillendiğinde gen yazılımı engellenir ve temozolomidin zehirli etkisini arttırır. MGMT promotor bölgesi metillenmiş hastalara, ışın tedavisi ile birlikte temozolomid verilmesinin sağ kalımı anlamlı bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (56).

MGMT iyi bir prognostik belirteç olarak tanımlanmasına rağmen, tümör heterojenitesi ve MGMT promotor bölgelerinin kesin tanımlanamaması gibi teknik standardizasyon sorunları nedeni ile laboratuvar rutinlerinde sıklıkla kullanılan bir test değildir (57,58).

2.4. Glioblastomanın Moleküler Sınıflandırılması

Glial tümörler, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Merkezi Sisnir Sistemi Tümörleri 2007 sınıflamasına göre, ışık mikroskobu özellikleri temel alınarak, astrositik, oligoastrositik (karışık) veya ependimal tümör olarak sınıflandırılmaktadır (1). Ayrıca habis huylu hücrelere doğru farklılaşan hücrelerin mitotik etkinliği, damarlanması, çoğalması, nekrozu gibi biçimsel özelliklerine bağlı olarak, WHO sınıflamasına ek olarak, Evre 1'den Evre 4'e kadar olmak üzere düşük evreden yüksek evreye habis özelliğine göre derecelendirmiştir. Ancak histolojik özelliklere göre yapılan sınıflamanın, patoloğların bakışları ile kişiden kişiye değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (59). Son 20 yılda yapılan moleküler çalışmalar sonucu, biçimsel olarak tanımlanan her glioma için, çok geniş biyolojik ve klinik çeşitlilik olduğu anlaşılmıştır. Moleküler çalışmaların, bu çeşitliliğin, sınıflamada ve klinikte daha kesin bir biyobelirteç bulunması ve tümör biyolojisi temelli, kişisel tedaviye hizmet etmesi amaçlanmıştır. Uluslararası Nöropatoloji Derneğinin (ISN) yardımıyla, 10 ülkeden 27 nöropatoloğun katılımıyla Harlem'de gerçekleşen toplantıda, moleküler gelişmelerin rutin tümör sınıflamasına katılması tartışılmıştır (1). Harlem'de yapılan toplantı sonuçları, WHO 2016 sınıflamasında düzenlenmiştir. Günümüzde glioma, histolojik özellikler ve moleküler tipe göre sınıflandırılmaktadır. Güncellenen sınıflamaya göre glioblastoma moleküler olarak 3 gruba ayrılmaktadır:

- 1) **Glioblastoma, IDH Yaban Tip:** Hastaların %90'ından fazlasını oluşturan IDH yaban tip glioblastoma, birincil glioblastomadır. 55 yaş üstü hastalarda daha sık gözlenir.
- 2) **Glioblastoma, IDH mutant Tip:** Hastaların yaklaşık %10'unu oluşturan ikincil glioblastomadır, geçmişinde daha düşük evre gliomadan köken almaktadır. Yaş ortalaması 45 olan, genç hastalarda görülür.

- 3) **Glioblastoma, NOS (Not Otherwise Specified):** Moleküler testlerin sınırlı doku varlığı, düşük tümör içeriği, belirsiz test sonuçları gibi nedenlerden uygulanamaması durumunda, sınıflamanın sadece histolojik olarak yapıldığını belirtmek amacıyla “Not Otherwise Specified (NOS)” terimi ile tanımlanması tavsiye edilmiştir.

Kanser Genom Atlas Grubu’nun (TCGA) 2008 yılında glioblastoma hastalarında, gen ifadesini temel alarak yaptığı sınıflamaya göre glioblastoma 4’e ayrılmaktadır (60).

Klasik Glioblastoma: Hastaların %100’ünde kromozom 7 artışı ve kromozom 10 kaybı ve % 97’sinde *EGFR* gen artışı olan grup.

Mezenkimal Glioblastoma: *NF1* genini içeren 17q11.2 bölgesinde kayıp görülen grup

Pronöral Glioblastoma: *PDGFRA* ve *IDH1* geninde mutasyon bulunan grup.

Nöral Glioblastoma: *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1*, *SLC12A5* gibi nöron belirteçlerinin ifadesinde artış görülen grup.

2.5. GLİOMALARIN MOLEKÜLER TANISINDA KULLANILAN METODLAR

Rutin glioma sınıflamasında moleküler biyobelirteçler hem immünohistokimyasal hem de moleküler yöntem kullanılarak uygulanabilir. *IDH1*-R132H, *BRAF*-V600E, *H3K27M*, *ATRX* ifade kaybı genellikle moleküler yöntemler uygulanarak araştırılan biyobelirteçlerdir.

IDH Mutasyonlarının Saptanması: Günümüzde IDH mutasyonu, IDH-R132H’e karşı kullanılan çok hassas bir antikor ile immünohistokimyasal yöntemle tespit edilse de, PZR ile de saptanabilmektedir (61,62,63). *IDH1* R132H mutasyonu için immünohistokimya ile negatif bulunan vakalarda, dizileme ile farklı mutasyonlar da saptanabilir. IDH mutasyonları glioma sınıflamasında kritik rol oynadığı gibi, hastalığın seyri ile ilgili de yol gösterici olabilmektedir.

***EGFR* Amplifikasyonu ve *EGFRvIII* İfadesinin Saptanması:** Glioblastomada *EGFR* amplifikasyonları, double minus olarak görülür ve FFPE doku kesitlerinde FISH ile tespit edilir. Real Time PCR ve MLPA gibi teknikler de *EGFR* amplifikasyonu tespiti için kullanılır (64). *EGFR* amplifikasyonu görülen tümörlerde, MLPA yöntemi ile *EGFRvIII* düzenlenmesi tespit edilse de, RT-PZR ve immünohistokimyasal yöntem daha hassastır (65). Glioblastomada *EGFRvIII* ifadesi sıklıkla bölgesel olarak heterojen ve bazen de sınırlı alan içerisinde gözlemlendiğinden, yanlış negatif testten kaçınmak için tümör dokusunun örneklenmesi önemlidir.

***MGMT* Promotor Metillenmesinin Saptanması:** *MGMT* metillenme durumu sıklıkla, metillenmemiş sitozinin urasile bisülfid çevrimi temeline dayanan Metilasyon Özgü PCR ile

(MSP) veya Metilasyona özgü dizileme yöntemi ile saptanır (66). Metilasyona özgü Multiplex Ligand Probes amplifikasyonu (MS-MLPA), Kombine Bisülfid Kesim Analizi (COBRA) veya Metilasyona özgü yüksek çözünürlüklü erime analizi daha az sıklıkla kullanılır (67,68). MGMT ifadesinin immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi; kimi araştırmacılar tarafından hastalık seyri ile promotör metillenmesi açısından zayıf ilişki bulunduğu (69), kimisi için de uyumlu bulunduğu (70) tartışmalıdır. Genel olarak protein assay, RNA ifadesi analizleri veya MGMT enzim etkinliğine dayalı analizler, lenfositler, mikrogial hücreler ve makrofajların oluşturduğu tümör dokusu bulaşısı nedeni ile hatalı pozitif sonuç elde edilmesine neden olabilir. Bu durum klinik çalışmalarda MGMT metillenme durumuna bağlı olarak test sonuçları, metillenmiş veya metillenmemiş bölgeye giremez ve belirsiz gri bölgeye düşer. Her hastaya özel tedavi uygulanması gereken durumlarda, bu test rutin uygulamada doğru olmayacağından, birden fazla yöntem (MSP ve pyrosequencing yöntemi) uygulanmalıdır (66).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Materyal

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30/09/2016 tarihli 16 sayılı toplantısında etik açıdan uygun bulunan çalışmamız, hastaların gönüllü katılım sağlamasıyla gerçekleştirildi. İstanbul Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda yapılan ameliyat sırasında cerrahlar tarafından alınan yaklaşık 0,5cm³primer glioblastoma ve normal doku parçaları, içinde RNA koruma çözeltisi bulunan 1,5ml'lik tüplere konularak-80°C'de bekletildi. Dokulardan öncelikle bir parça, İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na tümör/normal doku içeriğinin tespiti ve güvenilirliği açısından incelenmesi için teslim edildi. İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilerek tümör ve normal doku ayrımı yapılan örneklerin taze dokularının kalan kısmı, izolasyon işlemine alındı. Çalışma sırasında aşağıdaki işlem basamakları takip edildi.

1. -80 °C'de bekletilen dokuların bir parçasının alınarak patolojiye doku tanımlanması için ayrılması
2. İmmünohistokimyasal boyama sonucu güvenilir olan dokuların belirlenmesi
3. Güvenilir taze dokulardan RNA eldesi
4. RNA'nın DNase ile Muamelesi
5. cDNA çevrimi
6. Yeni nesil dizileme işlemi için kütüphane oluşturma
7. Kütüphane Ölçümü
8. Emülsiyon PZR
9. Emülsiyon PZR Ürününün Zenginleştirilmesi
10. Dizileme
11. Analiz
12. Gerçek Zamanlı PZR Doğrulaması ve tekrarlanması

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

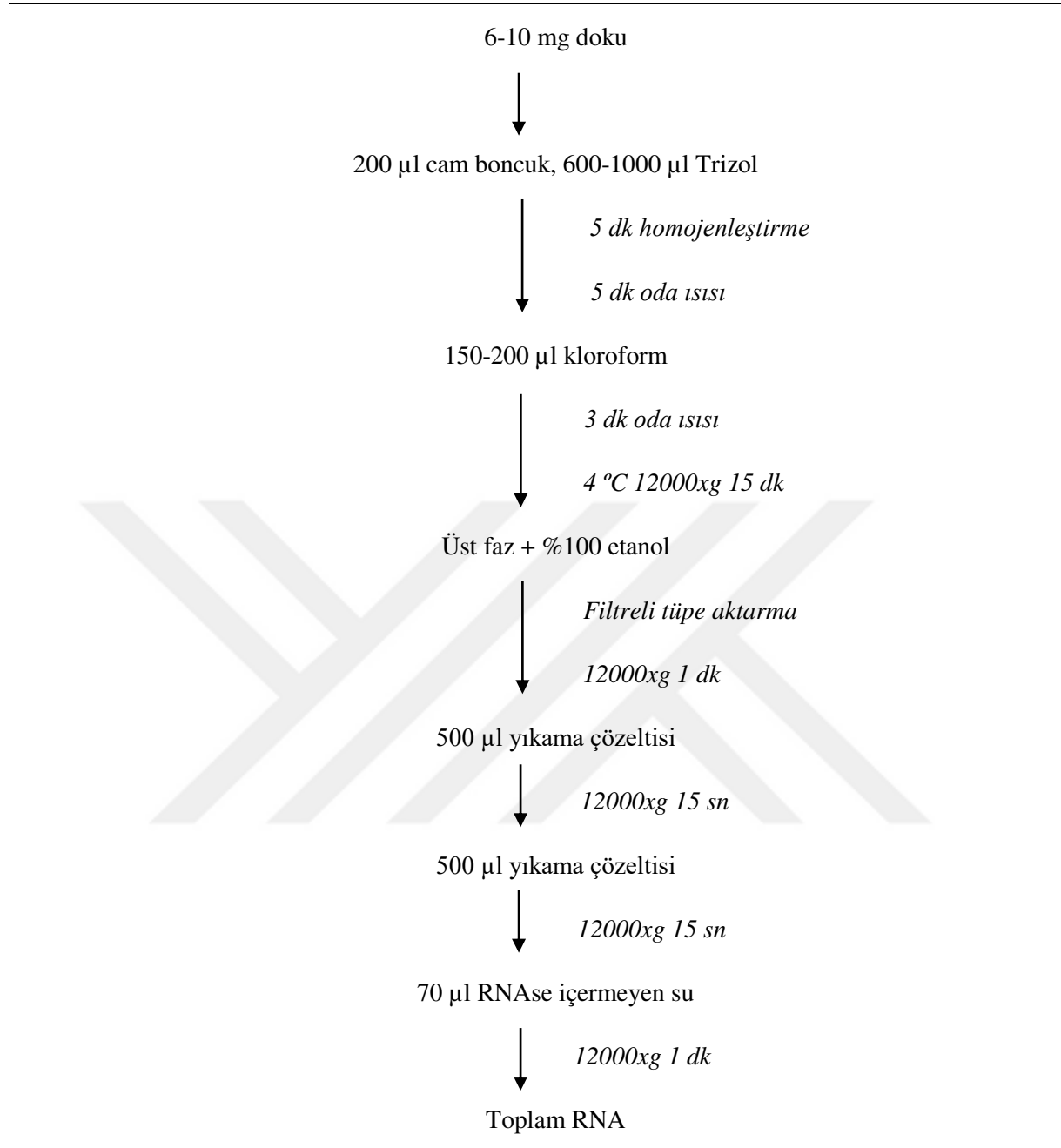
- -20°C Derin Dondurucu (İndensit, TÜRKİYE)
- -80°C Derin Dondurucu (Sanyo, JAPONYA)

- Distile Su Cihazı (Nüve, TÜRKİYE)
- Etüv (Hybaid, İNGİLTERE)
- Hassas Terazı (Shimadzu, JAPONYA)
- Bullet Blender Storm. Homojenizatör (Next Advanced, ABD)
- Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Qubit 3.0 Florometre (Thermofisher, ABD)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf , ABD)
- Otoklav (Hirayama, JAPONYA)
- Vorteks (Velp Scientifica, ABD)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, ALMANYA)
- Veriti Termal Döngü Cihazı (Thermofisher, SİNGAPUR)
- StepOne Plus Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Ion S5 Yeni Nesil Dizileme Cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Ion One Touch Emülsiyon PZR Cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Ion One Touch Enrichment Cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PZR System (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Manyetik rack , 96 kuyucuklu (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.1.3. YÖNTEM

3.1.3.1. RNA İzolasyonu

Doku miktarının az olması nedeniyle, kaliteli ve yüksek derişimli RNA elde edebilmek için, Trizol (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kitleri birlikte kullanıldı. Yöntem uygulamada Tablo1'deki adımlar takip edildi.



Tablo 3-1: RNA İzolasyonu Akış Şeması

Elde edilen RNA'ların yoğunluğu florometrik yöntem ile ölçüldü.

3.1.3.2. DNase İşlemi

50 µl RNA + 5µl DNase çözeltisi + 1µl TURBO DNase

↓ 37 °C 30 dk

5,5µl DNase İnaktifleştirme Çözeltisi

↓ 5 dk oda ısısı

10000xg 1,5 dk

Üst fazdan RNA

Tablo 3-2: DNase İşlemi

3.1.3.3. cDNA Çevrimi

cDNA çevrim tepkimesi SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile gerçekleştirildi.

	Hacim
Tepkime Tamponu	1 µl
10X SuperScript Enzim Karışımı	0,5 µ
RNA (10ng)	3,5µl
Su	5µl' ye tamamlanır.
Toplam	5 µl

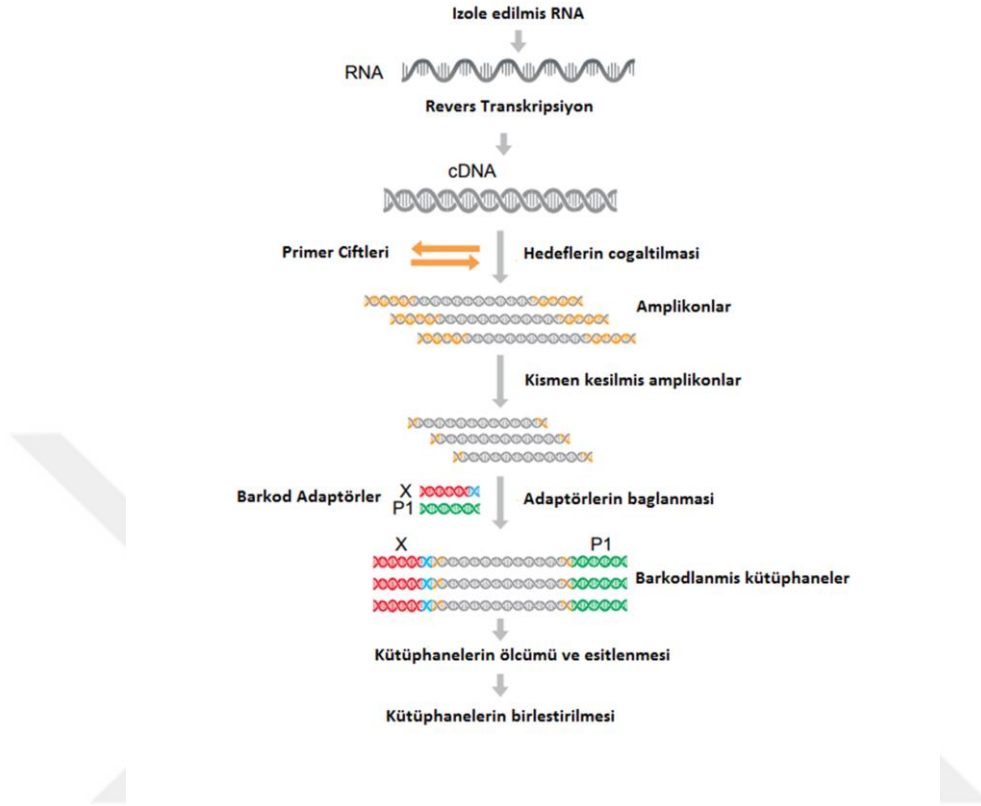
Tablo 3-3: cDNA çevrimi Tepkime İçeriği

Tepkime karışımının pipet ile iyice karıştırılmasının ardından termal döngü cihazında 42°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk, 4 °C'de 10 dk bekletilerek cDNA sentezi yapıldı..

3.1.3.4. Yeni Nesil Dizileme İşlemi için Kütüphane Oluşturma

Kütüphane oluşturma işlemi, *Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus*(Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3-1: Ampliseq Kütüphane Oluşturma İş Akış Şeması



3.1.3.5. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması

Ion Ampliseq Human Gene Expression Transcriptome Paneli ile hedeflenmiş RNA dizileme yapılır. Panel içerisinde 20802 primer çifti bulunmaktadır. Panelin ortalama baz uzunluğu 109 bazdır. Hedeflenmiş transkriptlerin çoğaltılması için aşağıdaki karışım hazırlandı.

	Hacim
5X Ion Ampliseq Hi Fi Karışımı	4 µl
Transkriptom Paneli	8 µl
Distile Su	3 µl
Toplam	15 µl

Tablo 3-4: Hedef Bölge Çoğaltılması Tepkime İçeriği

cDNA'ların üzerine yukarıda hazırlanmış olan karışım eklendi ve aşağıdaki sıcaklık profili uygulandı.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
Bekleme	99°C	2dk
12 Döngü	99°C	15 sn
	60°C	16 dk
Bekleme	10°C	∞

Tablo 3-5: Hedef Bölge Çoğaltılması Termal Profili

3.1.3.6. Primer Dizilerin Kesilmesi

Çoğaltılan örneklerle, 2µl FuPA çözeltisi eklenerek karıştırıldı, termal döngü cihazında, 50°C'de 10 dk, 55°C'de 10 dk, 60°C'de 10 dk ve 10°C 1 saat kadar bekletildi. Adaptör numaraları belirlenerek, hangi örneğin hangi barkod adaptörle bağlanacağı listelendi. Barkod adaptörler aşağıdaki miktarlara uygun olarak karıştırıldı.

	Hacim
Ion P1 Adaptör	2 µl
Ion Xpress Barcode X	2 µl
Distile Su	4 µl
Toplam	8 µl

Tablo 3-6: Barkod- Adaptör İçeriği

3.1.3.7. Bağlanma Tepkimesi

	Hacim
Switch Çözeltisi	4 µl
Sulandırılmış barkod adaptör karışımı	2 µl
Toplam (22 µl kesilmiş ampikon)	28 µl

Tablo 3-7: Bağlanma Tepkimesi İçeriği

Barkod adaptörlerin ampliconlara bağlanması için 2 µl DNA Ligaz eklendi ve 22°C’de 30 dk, 72°C’de 5 dk, 10°C’de 1 saat bekletildi.

3.1.3.8. Saflaştırma

Her örneğe 45 µl Ampure Xp Çözültisi eklenerek pipetleme yapıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra plaka, manyetik raf üzerine konularak, 2 dk bekletildi ve üzerinden üst sıvı alındı. 150 µl taze hazırlanmış %70’lik alkol eklendi ve tüpler çalkalandı, çözelti şeffaflaşana kadar bekletildi ve üst sıvı alındı. Son aşama tekrarlandı. Tüm çözelti ve damlalar pipet ile alındı. Manyetik boncuklar üzerindeki kütüphaneler, ölçüm için hazırlandı.

3.1.3.9. Kütüphane Ölçümü

Plaka içindeki manyetik boncuklar 50 µl Low TE içinde çözdürülerek, manyetik raf üzerine alındı ve 45 µl üst sıvı ayrıldı. Kütüphaneler 1/10000 oranda sulandırıldı. E.Coli DH10B Ion Control Library DNA’sından (~68pM) 10 kat seri seyreltme işlemi (6,8; 0,68; 0,068; 0,0068; 0,00068) yapıldı. Üç tekrarlı çalışılacak olan tepkime için aşağıdaki karışım hazırlandı.

	Hacim
2X TaqMan Enzim Karışımı	10 µl
20X Ion Taqman Assay	1 µl
Toplam	11 µl

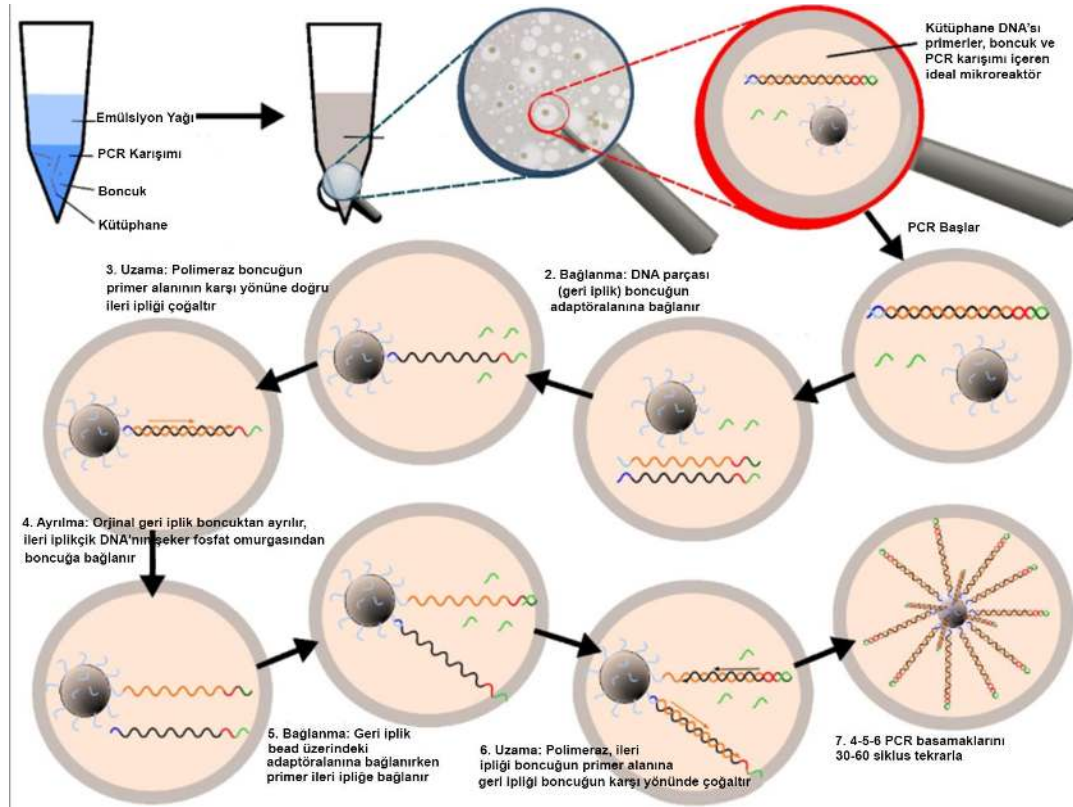
Tablo 3-8: Kütüphane Ölçümü Tepkime İçeriği

Hazırlanan karışım üzerine 9 µl kütüphane eklendi ve kontrol olarak sulandırılmış E.Coli DNA’sı kullanıldı. Hazırlanan reaktifler 5°C’de 2 dk, 95 °C’de 20 sn bekletildi ve 40 döngü 95 °C’de 1sn, 60°C’de 20 sn termal profilde işleme alındı. Elde edilen veriler sulandırılma katsayısı ile çarpılarak toplam derişim hesaplandı. Tüm kütüphaneler 100 pM’a eşitlenerek, aynı oranda karıştırıldı. Emülsiyon PZR aşamasına hazır hale geldi.

3.1.3.10. Emülsiyon PZR

Emülsiyon PZR, yağ hücreleri içerisindeki mikoreaktörler üzerinde bulunan kısa adaptör dizilerine bağlanan DNA’nın klonal şekilde çoğalma işlemidir. (Şekil:3-2)

Şekil 3-2: Emülsiyon PZR Tepkimesi



Seyreltilen kütüphaneler eşitlenerek, tepkime çözeltileri ile birlikte aşağıdaki hacimlerde klonal çoğalma için Ion One Touch System (Thermofisher Scientific, ABD) cihazına konuldu.

	Hacim
Distile su	80 µl
Ion S5 Enzim Karışımı	120 µl
Ion kürecikleri	100 µl
Dilüe edilmiş kütüphane	100 µl
Toplam	2400 µl

Tablo 3-9: Emülsiyon PZR Tepkime İçeriği

Karışım, tepkime filtresi içine yavaşça 1000'lik pipet yardımıyla bırakıldı. Üzerine 800 µl Tepkime yağı eklendi. Tepkime filtresi cihaza yerleştirildi ve tepkime başlatıldı.

3.1.3.11. Emülsiyon PZR Ürününün Zenginleştirilmesi

Klonal çoğaltma aşamasında, kütüphanelerin bağlanmadığı Ion küreciklerinin ortamdan uzaklaştırılması için gerekli basamakta Ion One Touch Enrichment System (Thermofisher Scientific, ABD) cihazı kullanıldı.

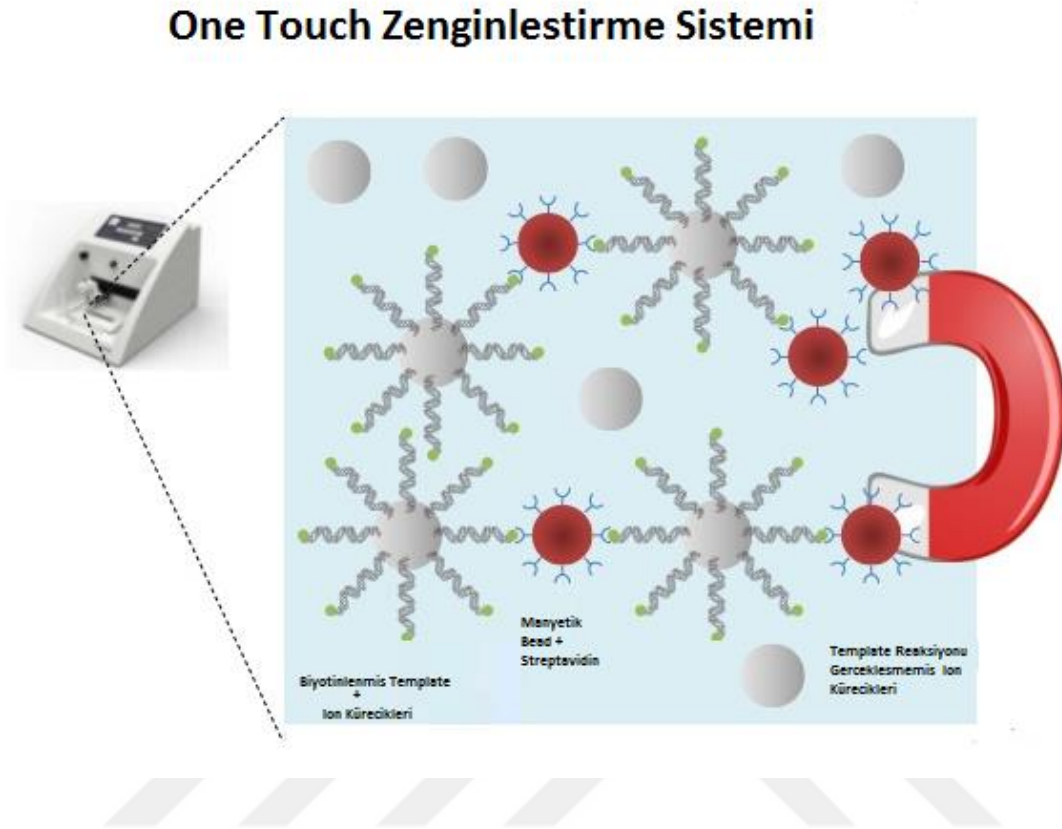
280 µl Tween çözeltisi ve 40 µl 1M NaOH karıştırılarak, Melt off çözeltisi hazırlandı. 100 µl *Enrichment Streptavidin C1* kürecikleri tüpe aktarıldı ve manyetik kuyucuklarda 2 dk bekletildi, sonra sıvı kısım alındı, küreciklerin üzerine 1000 µl yıkama tamponu eklendi. Manyetik rafa konuldu, üst sıvı uzaklaştırıldı ve boncuk yıkama çözeltisi eklendi.

Kuyucuk Numarası	Reaktif
1	ISP içeren örnekten 100 µl
2	Zenginleştirme boncuğu
3	Yıkama tamponu
4	Yıkama tamponu
5	Yıkama tamponu
6	Boş
7	300 ul Melt Off çözeltisi
8	Boş

Tablo 3-10: Zenginleştirme Tepkimesi Kuyucuk Yerleşimi

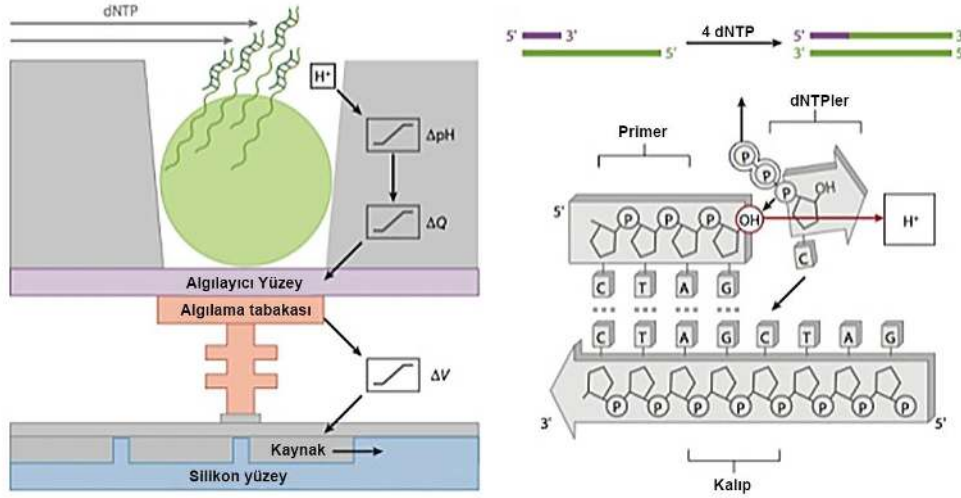
8 kuyucuklu tüplere sırası ile aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi çözeltiler yerleştirildi. Cihaz içerisinde gerçekleşen tepkime Şekil: 3-3'te belirtilmiştir.

Şekil 3-3: Ion One Touch Zenginleştirme Sistemi



3.1.3.12. Dizileme

Dizileme işlemi, Ion S5 Yeni Nesil Dizileme Cihazı'nda (Thermo Fisher Scientific, ABD) gerçekleştirildi. Bu yeni nesil dizileme platformunda dizileme prensibi, DNA'nın tıpkı yapım işlemine benzetilmiştir. DNA sentezlenmesi sonucu her bir nükleotidin eklenmesi ile açığa çıkan her bir H iyonunun, ortam pH'ını değiştirerek bir elektromanyetik sinyal olarak algılanması ilkesine dayanır.



Şekil 3-4: Torrent Dizileme Sistemi ve pH temelli dizilemede Çip yapısı

Cihazın PH ayarlamasının ardından, zenginleştirilmiş örnekler, çöktürülüp, denatüre edilerek, Ion 540 Çipi içerisine yüklendi. Dizileme işlemi şekildeki prensibe uygun olarak Ion S5 Dizileme cihazında gerçekleştirildi.

3.1.3.13. Analiz

Torrent Suite Serverdan elde edilen .bam uzantılı dosyalar bedtools versiyon 2.25.0 kullanılarak Fastq uzantılı dosyalara çevrildi. Okuma kaliteleri FastQC versiyon 0.11.5 kullanılarak değerlendirildi. Adaptör dizileri ve düşük kaliteli uzantıları cutadapt versiyon 1.9.3 kullanılarak kaldırıldı. Kit içindeki en uzun fragman olan 131 baza kadar okumalar kesildi. Referans genom olarak ENSEMBL GRCh37 (hg37 / UCSC hg19). versiyon 87 kullanıldı. Okumaların referans genoma hizalanması, bwa versiyon 0.7014-r1136 aracılığı ile yapıldı. Okumaların sıralanması samtools 1.3.1 ile yapılırken STAR v2.5.2, okumaların sayıları subread 1.5.2 aracılığı ile belirlendi. Deseq2 1.16.1 ile ifadesi değişen sinyaller değerlendirildi ve Benjamini-Höschberg FDR yöntemi kullanılarak genlerin anlamlılık değerleri belirlendi. Yaş ve cinsiyet parametreleri analizde kullanılarak, Limma 3.32.10 ile verilerde yığılma etkisi (batch effect) kaldırıldı. Genlerin farklılaşan ifadeleri ve değişim katsayıları R versiyon 3.4.1 kullanılarak belirlendi. $P < 0,001$ anlamlılık sınırı kullanılarak ifadesi en çok farklılaşmış 200-5000 gen seçildi. R programı paketlerinden pheatmap kullanılarak, ifadesi farklılaşan ($p < 0,05$) ve (üst basamak düzenleyici) üst düzenleyici ($p < 0,05$) genlerin ısı haritaları oluşturuldu.

Veride bulunan birçok boyutlu birbiri ile ilişkili olan değişkenin, boyutları indirgenerek daha hassas hale getirmeye yarayan bir istatistik yöntemi olan Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis) ile tümör ve normal doku arasındaki fark ortaya konularak, birbirine benzerlik gösteren örnek çiftleri dışlandı.

Farklılaşmış ifade gösteren genler, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 460209M (Qiagen, California, A.B.D) programı aracılığı ile değerlendirildi. IPA, yeni nesil dizileme veya mikroarray çalışmalarına ait RNA dizileme, proteomiks, metabolomik, tek nükleotid değişimleri, gen/ miRNA ifadesi gibi verilerin analizinde kullanılan programdır. Gene Ontology, Entrez Gene, NCBI, GNF, TarBase, PFAM, OMIM, GWAS gibi veritabanlarını kullanarak girilen veri seti ile ilişkili moleküler yollar, hastalıklar, hedef genlerin ifadesini etkileyen üst düzenleyiciler, farklılaşmış ifade gösteren genleri filtrelemeyi sağlar.

3.1.3.14. Dizileme sonucu

24 örnek 3 koşturmada dizilendi. 3 koşturmada ortalama %92 yükleme kapasitesi ve 82 milyon okuma elde edilmiştir. Dizilenen fragmanların ortalama uzunluğu 112 bazdır. Dizilemelere ait çip yükleme ısı haritası, iyon küreciklerin yüzdeleri ve parça uzunluğu aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

Şekil 3-5: Dizileme Sonuçları



Dizilenen her örneğe ait baz sayıları, bir fragman boyunca gerçekleşen %1 veya daha az hata payı ile başarılı olmuş okumaları ifade eden $Q \geq 20$ değeri, okuma sayıları ve okumaların ortalama uzunluğu Tablo: 3-11’de belirtilmiştir.

Hasta No	Baz Sayısı	Q>20	Okuma Sayısı	Ortalama Okuma Uzunluğu
10N	890,485,339	761,506,588	8,381,781	106 bp
10T	1,029,035,052	880,476,696	9,558,311	107 bp
39N	2,624,680,588	2,243,876,946	24,321,082	107 bp
39T	425,780,831	362,674,594	3,946,857	107 bp
42N	626,495,602	534,658,129	5,816,991	107 bp
42T	1,577,535,197	1,341,935,030	14,760,493	106 bp
49N	816,386,003	692,965,026	7,556,819	108 bp
49T	804,351,444	688,571,905	7,601,798	105 bp

25N	257,334,294	213,538,948	2,423,492	106 bp
25T	290,872,685	244,422,050	2,722,381	106 bp
16N	299,047,202	250,332,841	2,827,464	105 bp
16T	5,623,274,467	4,651,659,664	52,814,562	106 bp
43N	168,513,540	140,337,294	1,580,540	106 bp
43T	186,588,696	154,592,701	1,769,661	105 bp
48N	386,966,468	323,320,221	3,630,969	106 bp
48T	331,275,783	272,091,216	3,115,255	106 bp
22N	1,190,935,674	1,062,158,801	10,680,012	111 bp
22T	925,757,757	831,568,138	8,341,181	110 bp
29N	718,912,111	647,973,479	6,527,784	110 bp
29T	1,680,779,991	1,510,226,729	15,371,571	109 bp
45N	1,405,499,258	1,255,594,617	13,070,277	107 bp
45T	652,125,660	582,187,589	5,931,474	109 bp
7N	1,286,942,256	1,154,443,958	11,768,845	109 bp
7T	1,215,515,064	1,089,337,783	11,191,211	108 bp

Tablo 3-11: Örneklerin Yeni Nesil Dizileme Verileri

3.1.3.15. Teknik Doğrulama ve Tekrarlama

Seçilen düzenleyici genlerin Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile teknik doğrulaması ve daha fazla örnekte tekrarlanması için Quant Studio 12K Flex Real-Time PZR System (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanıldı. Normalizasyon için veri setinde ifadesi değişmeyen ve literatürde daha önce glioma için kullanılmış 5 gen seçildi. Bir array içerisinde, her bölümde 64 (8x8) küçük mikrokuyucuk içeren toplam 48 (4x12) bölme bulunmaktadır. Her 64'lü kuyucuk, 56 hedef gene ait primer prob (TaqMan Gene Expression Assay) içermektedir. 1 bölme içine yerleştirilmiş gen düzeneği tabloda gösterilmiştir. Her bir örnek aynı array kart içerisinde 4 kez tekrarlanarak çalışıldı.

Şekil 3-6: Array Kart görüntüsü



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FANCC	SYVN1	OCN	CNOT6L	DDB2	ESRRG	HIF1AN	CPXM1
B	UPF2	PRKAR1A	NRXN1	NFIX	REST	PGR	ANXA2	PRDM16
C	PTH1R	ACER3	HSPH1	POLDIP3	BRD2	NOC2L	RPS15	UBE3A
D	NELFA	FGF8	TSPYL5	NFYB	HSPD1	NUPR1	APOE	KDM3A
E	CACNA1C	POSTN	AMER1	ESR2	PPARG	E2F6	TSPYL2	CCT5
F	MITF	RABL6	ZFYVE16	CYBA	COL18A1	SMARCA1	TAL1	SBDS
G			ESR1	TREM1	MED1	RPL13A		
H			TBP	HMBS	HPRT1	TOP1		

Tablo 3-12: Bir bölme içerisindeki gen yerleşimi

İçerik	Hacim	Son Derişim
2X Open Array RT PZR Enzim Karışımı	132 µl	1X
RNAse içermeyen su	68,6 µl	-
PZR karışımı	200,6 µl	

Tablo 3-13: Array Kart Tepkime İçeriği

48 bölmeden oluşan 1 array karta ait, 12 örneği 4 tekrarlı çalışabilmek için tabloda belirtilen miktarlar kullanıldı. Her örnek için 5µl cDNA eklenerek, 384 kuyulu plakalara çoklu pipet ile aktarıldı. 384 kuyulu plakadan array karta *Accufill System* aracılığı ile her 64'lü mikro kuyucuğa 5µl gelecek şekilde otomatik olarak yüklendi. Yükleme sonrasında buharlaşmayı önlemek amacıyla array kart kapağı yapıştırılarak, immersiyeon sıvısı yüklendi ve bir vida yardımıyla kapatıldı ve QuantStudio 12K Flex Real-Time PZR System cihazına yüklendi. Tepkime sonunda elde edilen Ct değerleri analiz için kaydedildi. Analizde ddCT yöntemi kullanıldı. İstatistiksel analiz için, Wilcoxon Rank test, chi-square kullanıldı. Seçilen genlerin birbirleri ile korelasyonu için Spearman Korelasyon kullanıldı.

3.1.3.16. Yeni Nesil Dizileme ile Gerçek Zamanlı PZR Karşılaştırması

RNA dizileme verileri ile RT PZR'de kullanılan genlerin ifadesinin uyumu Pearson Korelasyon yöntemi ile incelendi. Pearson korelasyon, iki dizi arasındaki doğrusal ilişkinin yön ve kuvvet bakımından incelenmesidir.

3.1.3.17. Hedef Genlerin Doğrulanması

FAM180A ve *KCNV* ; IPA analizi sonucu elde edilen anlamlılığı ve değişim katsayısı yüksek olan genlerdir. Tümör ve normal örneklerin okumaları aritmetik ortalamalarına göre değerlendirildiğinde, tümör örneklerde okuması olup, normal örneklerde hiç olmayan genlerden *DMBX1* geni de RT-PZR ile çalışılmıştır. *DMBX1*, *FAM180A* ve *KCNV1* hedef genlerinin doğrulanması SYBR Green kullanılarak RT PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. Normalizasyon için *TBP* ve *TOP1* genleri kullanıldı. Her örnek 4 kez tekrar edilerek çalışıldı. Gerçek zamanlı PZR’de kullanılan primerlerin listesi tabloda yer almaktadır.

Gen	Primer Dizisi
<i>FAM180A</i>	5'- AGC TGC TCT ACG AGT TCC T -3' 5'- GGA TGT CTG GGA TGC TCT TG -3'
<i>DMBX1</i>	5'- CCA GAA GAC TCA CTA CCC AGA T -3' 5'- TTC TTG AAC CAC ACC TGC AC -3'
<i>KCNV1</i>	5'- TCT TCT GGT AGA GAG CCT AAG T -3' 5'- GAG CGT AAT CCT GTG GAA TGT -3'
<i>TBP</i>	5'- CTT CGG AGA GTT CTG GGA TTG -3' 5'- AGC AAA CCG CTT GGG ATT A -3'
<i>TOP1</i>	5'- CCC AGA TCG AAG CGG ATT T -3' 5'- ATG TTC ACT GTT GCT ATG CTT G -3'

Tablo 3-14: FAM180A, DBMX1, KCNV1, TOP1,TBP Genlerinin Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan Primer Dizileri

İçerik	Hacim	Son Derişim
SYBR Green	5 µl	1X
F Primer	0,2µl	0,2 pM
R Primer	0,2 µl	0,2 pM
cDNA	2 µl	50ng
RNAse içermeyen su	2,6 µl	-
Toplam Hacim	10 µl	

Tablo 3-15: Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Karışım İçeriği

Örnekler, Quant Studio Gerçek Zamanlı PZR cihazında, 95 °C’de 10 dk bekletildi. 40 döngü 95 °C’de 15sn, 60°C’de 1dk, termal profilde işleme alındı.

Hedef genlerin analizinde ddCT yöntemi, istatistiksel incelemede t-test kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Yeni Nesil Dizileme

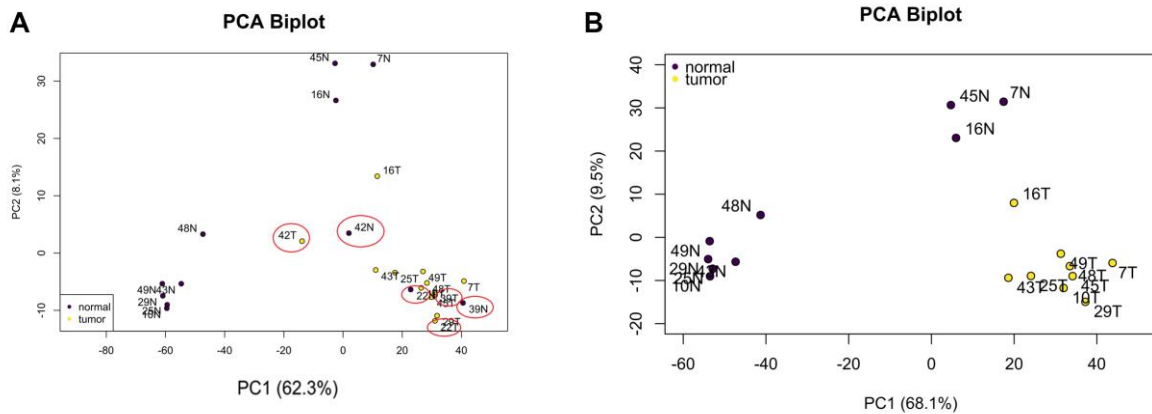
Her bir hastadan 1 tümör ve buna komşu 1 normal olmak üzere, 12 hastadan elde edilen toplam 24 örnek dizilemeye alınmıştır. Her tümör örneği, normal örneği ile aynı çip içerisinde dizilenmiştir. Yeni nesil dizilemesi yapılan örneklerle ait cinsiyet, yaş ve tümör yerleşim bilgileri Tablo 4-1’de yer almaktadır.

CİNSİYET	Erkek	7
	Kadın	5
YAŞ	<50	4
	50-60	4
	>60	4
TÜMÖR YERİ	Frontal	7
	Temporal	3
	Parietal	2

Tablo 4-1: Yeni Nesil Dizilemeye Alınan Örneklerin Özellikleri

Principal Component Analizi (PCA) sonucuna göre 22, 39 ve 42 no’lu hastalara ait tümör ve normal doku örneklerinin sonucu benzeşik olduğundan bu çiftler dışlanarak 9 çift örnek ile analize devam edilmiştir. Çıkarılan üç çift doku her ne kadar patolojik olarak tümör ve normal olarak saptanmışsa da, moleküler olarak benzeştiğinin gözlenmesi, tümör ve normal dokuların birbirine yakın konumlanmasından kaynaklanabilir. PCA analizi ile örnek çıkartmadan önce ve sonra elde edilen görüntüler Şekil 4-1’de gösterilmiştir.

Şekil 4-1: Temel Bileşenler Analiz sonucu



A) 12 çift örneğin PCA ile görüntüsü B) 22, 39 ve 42 no'lu örnekler dışlandıktan sonra PCA görüntüsü

Çıkarılan 3 çift örneğin ardından analiz edilen 9 çift örneğin özellikleri Tablo 4-2'de yer almaktadır.

CİNSİYET	Erkek	5
	Kadın	4
YAŞ	<50	3
	50-60	3
	>60	3
TÜMÖR YERİ	Frontal	6
	Temporal	2
	Parietal	1

Tablo 4-2: Analizi gerçekleştirilen 9 örneğin özellikleri

RNAseq analizi sonrası dizilenen 20802 hedef transkriptin 3062 tanesinde anlamlı ifade değişikliği olduğu saptanmıştır ($p < 0,001$). İleri analiz ve filtreleme için ifade değişikliği gösteren 3062 gen Ingenuity Pathway Analiz programı ile analiz edilmiştir.

4.2. IPA analizi

Anlamlı değişiklik gösteren 3062 genin, logaritmik değişim katsayıları ve p değerleri, Ingenuity Pathway Analyse (IPA) programı ile değerlendirilmiş ve veri seti ile ilişkili olup ifadesi değişen, ilk 5 yolak, üst düzenleyici gen ve hastalık saptanmıştır. Elde edilen yollar, sinir sistemi hücrelerinin iletişimini sağlayan nörotransmitter maddelerle ilişkilidir. IPA analizi sonucuna göre, ifadesi değişen ilk beş yolak aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Yolaklar	P değeri	Veri seti /Yolak Genleri
Aksonal Yönlendirmeli Sinyal İletisi	6,79E-11	26,3 % 117/445
Glutamat Almaç Sinyal İletisi	6,77E-08	44,6 % 25/56
cAMP'ta Dopamine-DARPP32 Dönüşüm Sinyal İletisi	1,89E-07	30,6 % 49/160
Kardiyak Hipertropide NFAT Rolü	2,78E-07	28,9 % 55/190
GABA Almaç Sinyal İletisi	3,85E-07	39,7 % 27/68

Tablo 4-3: IPA Analizinde Elde Edilen İlk 5 Yolak

IPA analizi sonucu elde edilen üst düzenleyici genler 415 tanedir. Üst düzenleyiciler, kendilerinden sonra gelen genlerin ifadesini düzenleyen genlerdir. Bu nedenle, kendi ifadeleri

değişebildiği gibi kendi ifadeleri değişmeden de kendinden sonraki genlerin ifade düzeylerini etkileyebilirler. IPA analizi sonucu elde ettiğimiz ifadesi değişen ilk 5 üst düzenleyici gen, kanserlerde daha önceden tanımlanmış yazılım etmenleridir ve Tablo4-4'te gösterilmektedir.

Üst Düzenleyiciler	p-değeri	Tahmini Etkinliği
ERBB2	2,54E-11	Etkinleşmiş
MITF	7,77E-09	Etkinleşmiş
Östrojen Reseptör (ESR1)	3,55E-08	Engellenmiş
AREG	3,80E-08	Etkinleşmiş
TGFB1	4,64E-08	Etkinleşmiş

Tablo 4-4: IPA Analizinde Elde Edilen İlk 5 Üst Düzenleyici Gen

RNA dizileme verileri IPA ile incelendiğinde, veri setinin en ilişkili bulunduğu ilk 5 hastalık tabloda yer almaktadır. Glioblastoma, sinir sisteminde gerçekleşen bir tümör olduğundan, aralarında kanser ve nörolojik hastalıklar bulunduğundan, bu hastalıkların saptanması olağandır.

Hastalıklar	p-değeri	Molekül Sayısı
Kanser	1,69E-04 - 7,67E-34	2681
Organizmal Yaralanma ve Anomaliler	1,87E-04 - 7,67E-34	2723
Gastrointestinal Hastalıklar	1,60E-04 - 1,14E-33	2393
Nörolojik Hastalıklar	1,84E-04 - 9,50E-28	974
Psikolojik Hastalıklar	1,99E-04 - 3,22E-27	582

Tablo 4-5: Veri Seti ile İlişkili Hastalıklar

Veride değişim gösteren genlerin hücresel işlevleri IPA aracılığı ile analiz edildiğinde, ifadesi en çok değişen genlerin ait olduğu ilk 5 sistem ve hücresel işlev tespit edilmiştir (Tablo 4-6). En çok değişim gösteren genlerin sinyal iletilsinde, hücre ölümünde görevli olduğu saptanmışken, sinir sistemine ait genler, en çok değişim gösteren fizyolojik sistemlerdir.

Hücresel İşlevler	p-değeri	Molekül Sayısı
Hücre-Hücre Sinyal İletisi ve Etkileşimi	1,36E-04 - 7,20E-13	204
Hücre Ölümü ve Sağkalımı	1,86E-04 - 6,70E-11	663
Hücre Hareket	1,60E-04 - 3,76E-10	449
Hücre Döngüsü	1,78E-04 - 1,46E-09	245
Hücresel Düzenleme ve Organizasyon	1,62E-04 - 1,96E-09	301
Fizyolojik Sistem Gelişimleri ve İşlevi	p-değeri	Molekül Sayısı
Sinir Sistemi Gelişimi ve İşlevi	2,66E-12 - 7,20E-13	54
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve İşlevi	3,55E-05 - 6,62E-08	150
Organizma Gelişimi	3,55E-05 - 6,62E-08	136
Bağ doku Gelişimi ve İşlevi	1,06E-04 - 2,32E-06	107
Doku Gelişimi	1,38E-04 - 2,32E-06	209

Tablo 4-6: En çok değişim gösteren Hücresel İşlev ve Sistemler

IPA analizi ile, veri setinde düzeyi en çok artan ve en çok azalan ilk 10 hedef gen Tablo 4-7’de gösterilmiştir. Veri setimizde ifadesi artan genlerde, nöral gelişim evresinde ifadesi artan homeobox genlerin sıklığı dikkat çekerken, ifadesi azalanlarda voltaj kapılı genler yer almaktadır.

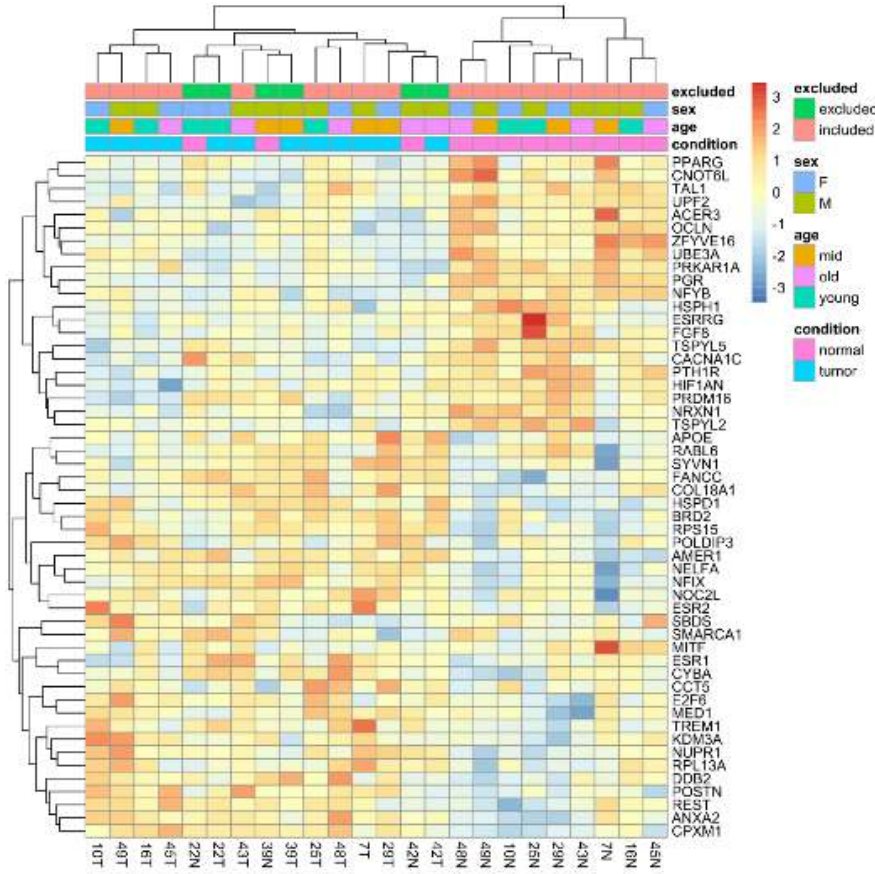
İfadesi Artan Hedef Genler		
Genler	Açık adı	P değeri
<i>HOXD10</i>	Homeo kutusu D10	2,84E-08
<i>HOXA5</i>	Homeo kutusu A5	3,99E-22
<i>CA9</i>	Karbonik Anhidraz 9	2,5E-25
<i>FAM180A</i>	Dizi Benzeri Ailesi 180 Member A	2,15E-09
<i>PLA2G2A</i>	Fosfolipaz A2 Grup IIA	9,69E-19
<i>SLN</i>	Sarkolipin	6,37E-14
<i>LIF</i>	LIF, Interlökin 6 Ailesi Sitokin	3,2E-11
<i>HOXD9</i>	Homeo kutusu D9	2,87E-08
<i>SPOCD1</i>	SPOC Domain İçeren 1	2,84E-23
<i>ABCC3</i>	ATP Bağlanma Kasedi Alt Ailesi C Üye 3	1,18E-10
İfadesi Azalan Genler		
<i>NEFM</i>	Nörofilament Medyum	1,1E-14
<i>WIF1</i>	WNT Baskılayıcı Faktör 1	8,1E-10
<i>KCNC2</i>	Potasyum Voltaj Kapılı Kanal Alt ailesi C Üye 2	0,0000213
<i>C1QL3</i>	Tamamlayıcı C1q Benzeri 3	4,11E-10
<i>GPR26</i>	G Protein-Birleşik Almaç 26	0,0000144
<i>HCN1</i>	Hiperpolarizasyon Aktifleştirici Siklik Nükleotid Kapılı Potasyum Kanalı 1	5,79E-08
<i>GABRG3</i>	Gamma-Aminobütirik Asit Tip A Almaç Gamma3 Alt Ünitesi	0,00000284
<i>RBFOX3</i>	RNA Bağlanma Fox-1 Homolog 3	7,61E-10
<i>PVALB</i>	Parvalbumin	3,65E-10
<i>KCNV1</i>	P Potasyum Voltaj Kapılı Kanal Değiştirici Alt Ailesi V Üye 1	0,00000877

Tablo 4-7: IPA analizine göre ifadesi artan ve azalan hedef genler

4.2.1. Üst düzenleyicilerin Seçilmesi

Üst düzenleyici analizi, verilerimizde bulunan yazılımsal düzenleyicilerin bilinen hedeflerini belirleyerek ve ifade değişiminin etkinleştiğini ya da engellendiğini belirlemeye yarar. Üst düzenleyiciler yazılım düzenleyicileri, enzimler, peptidler, sitokinler, kinazlar olabilir ve hedef genleri üzerindeki etkisi, ifadeyi etkinleştirme veya engelleme olabilir. Elde edilen tüm üst düzenleyicilerin her örnek çifti için ısı haritası Şekil4-3’te görülmektedir.

Şekil 4-2: Üst Düzenleyicilere ait Isı haritası



IPA analizi sonucu elde edilen 415 üst düzenleyici gen arasından 51 tanesi, sinyal iletişi, hücre göçü, hücre sağ kalımı gibi hücresel işlevlerine ve glioblastomada taze dokuda çalışılmamış olması göz önüne alınarak, RT yöntemi ile teknik doğrulama ve tekrarlamaya için seçildi. Seçilen genlerin bazıları anlamlılığı yüksek, beyin çalışmalarında önemi olabilecek genler iken, bazılarının ise, anlamlılığı çok değişmemiş, kontrol amaçlı seçilmiştir. Verilerimizde anlamlı değişiklik göstermeyen, glioblastoma-beyin ifade çalışmalarında kullanılmış, dokuya uyumlu 5 gen normalizasyon için kullanılmıştır. Değişim Katsayısı -0,5'ten küçük olan genler ifadesi azalmış, -0,5 ile 0,5 arası olanlar değişmemiş, 0,5'ten büyük olan genler ifadesi artmış olarak belirlenmiştir. Seçilen genlerin açık isimleri, logaritmik kat değişimleri ve ifadedeki değişim yönü, p değeri Tablo 4-8'de yer almaktadır.

Target Name	Değişim Katsayısı	Tanım	Değişim Yönü	p değeri
ACER3	-1,456	Alkaline ceramidase 3	Azalmış	0,004640041
FAM123B (AMER1)	1,129	APC membrane recruitment protein 1	Artmış	0,003578764
ANXA2	3,514	Annexin A2	Artmış	0,000000334
APOE	1,185	Apolipoprotein E	Artmış	0,0000555
BRD2	0,830	Bromodomain containing 2	Artmış	0,000921606
CACNA1C	-2,414	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C	Azalmış	0,016142084

CCT5	0,554	Chaperonin containing TCP1 subunit 5	Artmış	0,038052582
CNOT6L	-0,570	CCR4-NOT transcription complex subunit 6 like	Azalmış	0,015555794
COL18A1	1,493	Collagen type XVIII alpha 1 chain	Artmış	0,007699692
CPXM1	4,834	Carboxypeptidase X, M14 family member 1	Artmış	2,17E-09
CYBA	1,183	Cytochrome b-245 alpha chain	Artmış	0,006321442
DDB2	1,072	Damage specific DNA binding protein 2	Artmış	0,0037619
E2F6	0,814	E2F transcription factor 6	Artmış	0,006503635
ESR1	0,789	Estrogen receptor 1	Artmış	0,447780807
ESR2	2,594	Estrogen receptor 2	Artmış	0,000793996
ESRRG	-4,964	Estrogen related receptor gamma	Azalmış	0,02160056
FANCC	1,497	Fanconi anemia complementation group C	Artmış	0,001973508
FGF8	-2,496	Fibroblast growth factor 8	Azalmış	0,053929722
HIF1AN	-0,581	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit inhibitor	Azalmış	0,014231831
HSPD1	0,919	Heat shock protein family D (Hsp60) member 1	Artmış	0,000241812
HSPH1	-0,791	Heat shock protein family H (Hsp110) member 1	Azalmış	0,035318438
KDM3A	1,204	Lysine demethylase 3A	Artmış	0,0000679
MED1	0,490	Mediator complex subunit 1	Değişmemiş	0,01373104
MITF	-0,751	Melanogenesis associated transcription factor	Azalmış	0,078231759
WHSC2 (NELFA)	1,070	Negative elongation factor complex member A	Artmış	0,002070382
NFIX	1,499	Nuclear factor I X	Artmış	0,0000307
NFYB	-0,763	Nuclear transcription factor Y subunit beta	Azalmış	0,000991592
NOC2L	0,862	NOC2 like nucleolar associated transcriptional repressor	Artmış	0,013829711
NRXN1	-2,978	Neurexin 1	Azalmış	0,00000141
NUPR1	2,524	Nuclear protein 1, transcriptional regulator	Artmış	0,00000432
OCLN	-1,998	Occludin	Azalmış	0,000142729
PGR	-4,436	Progesterone receptor	Azalmış	6,21E-11
POLDIP3	0,652	DNA polymerase delta interacting protein 3	Artmış	0,026511638
POSTN	4,561	Periostin	Artmış	1,31E-12
PPARG	-2,195	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Azalmış	0,000491638
PRDM16	-2,224	PR/SET domain 16	Azalmış	0,00102914
PRKAR1A	-0,658	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha	Azalmış	0,0013944
PTH1R	-1,841	Parathyroid hormone 1 receptor	Azalmış	0,00000829
RABL6	-0,163	RAB, member RAS oncogene family like 6	Değişmemiş	0,687395748
REST	0,855	RE1 silencing transcription factor	Artmış	0,012204237
RPS15	0,912	Ribosomal protein S15	Artmış	0,00000017
SBDS	0,082	SBDS, ribosome maturation factor	Değişmemiş	0,779749565
SMARCA1	0,102	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	Değişmemiş	0,686359438
SYVN1	1,089	Synoviolin 1	Artmış	0,016164321
TAL1	-0,911	TAL bHLH transcription factor 1, erythroid differentiation factor	Azalmış	0,074528912
TREM1	3,531	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	Artmış	0,00000101
TSPYL2	-2,184	TSPY like 2	Azalmış	0,0000325
TSPYL5	-3,243	TSPY like 5	Azalmış	3,91E-14
UBE3A	-0,930	Ubiquitin protein ligase E3A	Azalmış	0,001295363
UPF2	-1,160	UPF2, regulator of nonsense mediated mRNA decay	Azalmış	0,0000161
ZFYVE16	-1,261	Zinc finger FYVE-type containing 16	Azalmış	0,0000284

Tablo 4-8: RNAseq verisinden RT-PZR için seçilen genler

ACER3, *CNOT6L*, *CYBA*, *HIF1AN*, *HSPD1*, *UBE3A* genleri enzim etkinliği olan protein kodlarken, *APOE*, *NRXN1*, *SYVN1*, *ZFYVE16*, *RABL6*, *UPF2* genleri taşıyıcı proteinler kodlar. *E2F6*, *KDM3A*, *MED1*, *MITF*, *NFIX*, *NFYB*, *NOC2L*, *NUPR1*, *PRDM16*, *REST*, *SMARCA1*, *TAL1* genlerinin ürünleri ise yazılım düzenleyicileridir. *OCN* ve *POSTN* genleri, hücre adezyon molekülü, *PTH1R*, G protein alması, *FGF8* büyüme etmeni, *CACNA1C* iyon kanalı proteini, *PRKAR1A* ve *BRD2* kinaz, *ESRRG*, *PGR*, *PPARG*, *ESR1* ve *ESR2* ligand bağlı çekirdek alması, *TSPYL2* ve *TSPYL5*, *CCT5* şaperon, *CPXM1* peptidaz, *RPS15*, *SBDS*, *POLDIP3* ribozom biyogenez proteini, *TREM1* transmembran alması, *HSPH1* nükleotid değişim etmeni kodlar. *FANCC*, *DDB2* DNA tamir geni iken, *NELFA* uzama etmeni, *AMER1*, *ANXA2* membran bağlanma proteini, *COL18A1* geni yapı proteini kodlar.

Gerçek Zamanlı PZR ile doğrulama 26 çift GBM örneğinde gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı ifade çalışmasında referans genlerde, en az 3 tekrarda ifade göstermeyen örnekler analizden dışlanmıştır. Buna göre doğrulama 20 çift örnekte gerçekleştirilmiştir. Hastaların cinsiyet, yaş ve tümör yerleşimlerine göre dağılım sayıları Tablo 4-9'da yer almaktadır.

CİNSİYET	Erkek	13
	Kadın	7
YAŞ	<50	8
	50-60	5
	>60	7
TÜMÖR YERLEŞİMİ	Frontal	13
	Paryetal	2
	Temporal	5

Tablo 4-9: RT Çalışmasında kullanılan örneklerin özellikleri

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri 0,9 ile 1,1 arasında olan örnekler için tümör ve normal dokular arasında ifadenin değişmediği, 0,9'dan düşük ise, azaldığı; 1,1'den büyük ise tümör dokusunda ifadenin normal dokuya oranla arttığı kabul edildi.

20 çift glioblastoma örneğinde Gerçek Zamanlı PZT sonuçları Tablo 4-10'da gösterilmiştir.

Gen Adı	2- $\Delta\Delta C_t$ ortalaması	Değişim	p değeri
<i>ACER3</i>	0,68717	Azalmış	0,060
<i>AMER1(FAM123B)</i>	1,756397	Artmış	0,191
<i>ANXA2</i>	4,245934	Artmış	0,001
<i>APOE</i>	1,056469	Değişmemiş	0,841
<i>BRD2</i>	1,201636	Artmış	0,244
<i>CACNA1C</i>	0,465334	Azalmış	0,014
<i>CCT5</i>	1,423699	Artmış	0,086

<i>CNOT6L</i>	1,208621	Artmış	0,057
<i>COL18A1</i>	1,395926	Artmış	0,266
<i>CPXM1</i>	2,949426	Artmış	0,044
<i>CYBA</i>	0,827389	Azalmış	0,446
<i>DDB2</i>	1,100769	Değişmemiş	0,670
<i>E2F6</i>	2,370164	Artmış	0,014
<i>ESR1</i>	0,404671	Azalmış	0,045
<i>ESR2</i>	1,139787	Artmış	0,862
<i>ESRRG</i>	0,452634	Azalmış	0,044
<i>FANCC</i>	1,073147	Değişmemiş	0,772
<i>FGF8</i>	0,609395	Azalmış	0,883
<i>HIF1AN</i>	0,696467	Azalmış	0,051
<i>HSPD1</i>	1,544344	Artmış	0,048
<i>HSPH1</i>	0,967759	Değişmemiş	0,876
<i>KDM3A</i>	1,42171	Artmış	0,041
<i>MED1</i>	1,226691	Artmış	0,237
<i>MITF</i>	0,606619	Azalmış	0,078
<i>NELFA (WHSC2)</i>	1,177603	Artmış	0,224
<i>NFIX</i>	1,14662	Artmış	0,376
<i>NFYB</i>	0,803449	Azalmış	0,182
<i>NOC2L</i>	1,225183	Artmış	0,207
<i>NRXN1</i>	0,307431	Azalmış	0,008
<i>NUPR1</i>	2,259239	Artmış	0,005
<i>OCN</i>	0,718402	Azalmış	0,200
<i>PGR</i>	0,955157	Değişmemiş	0,938
<i>POLDIP3</i>	0,907194	Değişmemiş	0,401
<i>POSTN</i>	5,601636	Artmış	0,008
<i>PPARG</i>	0,610432	Azalmış	0,021
<i>PRDM16</i>	0,446681	Azalmış	0,003
<i>PRKAR1A</i>	0,705026	Azalmış	0,009
<i>PTH1R</i>	0,605451	Azalmış	0,063
<i>RABL6</i>	0,699032	Azalmış	0,007
<i>REST</i>	1,396181	Artmış	0,034
<i>RPS15</i>	1,535243	Artmış	0,002
<i>SBDS</i>	1,006878	Değişmemiş	0,970
<i>SMARCA1</i>	0,891654	Azalmış	0,360
<i>SYVN1</i>	1,053446	Değişmemiş	0,757
<i>TAL1</i>	0,619714	Azalmış	0,036
<i>TREM1</i>	1,766592	Artmış	0,291
<i>TSPYL2</i>	0,440682	Azalmış	0,017
<i>TSPYL5</i>	0,925004	Değişmemiş	0,918
<i>UBE3A</i>	0,904464	Değişmemiş	0,406
<i>UPF2</i>	0,622374	Azalmış	0,051
<i>ZFYVE16</i>	0,59227	Azalmış	0,019

Tablo 4-10: Üst Düzenleyici Genlerin RT-PZR Sonucu

Genlerin ifade düzeyleri, cinsiyet, yaş ve tümör yerleşimlerine göre incelendiğinde, Tablo 4-11'deki sonuçlar elde edilmiştir.

GEN İFADESİ		CİNSİYET			YAŞ			TÜMÖR YERLEŞİMİ			
		Kadın n (%)	Erkek n (%)	*p	<60 n (%)	≥60 n (%)	*p	Frontal n (%)	Paryetal n (%)	Temporal n (%)	*p
ACER3	Azalmış	4 (20)	7 (35)	0,990	8 (40)	3 (15)	0,276	7 (35)	0 (0)	4 (20)	0,145
	Değişmemiş	1 (5)	2 (10)		2 (10)	1 (5)		2 (10)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	2 (10)	4 (20)		2 (10)	4 (20)		4 (20)	2 (10)	0 (0)	
AMER1	Azalmış	1 (5,9)	3 (17,6)	0,748	1 (5,9)	3 (17,6)	0,183	4 (23,5)	0 (0)	0 (0)	0,373
	Değişmemiş	1 (5,9)	1 (5,9)		2 (11,8)	0 (0)		1 (5,9)	0 (0)	1 (5,9)	
	Artmış	5 (29,4)	6 (35,3)		7 (41,2)	4 (23,5)		5 (29,4)	2 (11,8)	4 (25,5)	
ANXA2	Azalmış	0 (0)	3 (15)	0,372	1 (5)	2 (10)	0,535	3 (15)	0 (0)	0 (0)	0,622
	Değişmemiş	1 (5)	1 (5)		1 (5)	1 (5)		1 (5)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	6 (30)	9 (45)		10 (50)	5 (25)		9 (45)	2 (10)	4 (20)	
APOE	Azalmış	3 (15)	4 (20)	0,690	4 (20)	3 (15)	0,703	4 (20)	0 (0)	3 (15)	0,024*
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5)		1 (5)	0 (0)		0 (0)	1 (5)	0 (0)	
	Artmış	4 (20)	8 (40)		7 (35)	5 (25)		9 (45)	1 (5)	2 (10)	
BRD2	Azalmış	2 (10)	1 (5)	0,253	2 (10)	1 (5)	0,961	2 (10)	0 (0)	1 (5)	0,945
	Değişmemiş	1 (5)	6 (30)		4 (20)	3 (15)		4 (20)	1 (5)	2 (10)	
	Artmış	4 (20)	6 (30)		6 (30)	4 (20)		7 (35)	1 (5)	2 (10)	
CACBNA1C	Azalmış	4 (21,1)	8 (42,1)	0,579	8 (42,1)	4 (21,1)	0,405	7 (36,8)	0 (0)	5 (26,3)	0,111
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5,3)		0 (0)	1 (5,3)		1 (5,3)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (15,8)	3 (15,8)		4 (21,1)	2 (10,5)		4 (21,1)	2 (10,5)	0 (0)	
CCT5	Azalmış	2 (10)	4 (20)	0,896	4 (20)	2 (10)	0,901	4 (20)	0 (0)	2 (10)	0,000*
	Değişmemiş	1 (5)	1 (5)		1 (5)	1 (5)		0 (0)	2 (10)	0 (0)	
	Artmış	4 (20)	8 (40)		7 (35)	5 (25)		9 (45)	0 (0)	3 (15)	
CNOT6L	Azalmış	1 (5)	4 (20)	0,166	2 (10)	3 (15)	0,162	3 (15)	0 (0)	2 (10)	0,347
	Değişmemiş	3 (15)	1 (5)		4 (20)	0 (0)		2 (10)	0 (0)	2 (10)	
	Artmış	3 (15)	8 (40)		6 (30)	5 (25)		8 (40)	2 (10)	1 (5)	
COL18A1	Azalmış	2 (10)	5 (25)	0,638	3 (15)	4 (20)	0,418	5 (25)	1 (5)	1 (5)	0,830
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5)		1 (5)	0 (0)		1 (5)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	5 (25)	7 (35)		8 (40)	4 (20)		7 (35)	1 (5)	4 (20)	
CPXM1	Azalmış	1 (7,7)	3 (23,1)	0,150	3 (23,1)	1 (7,7)	0,489	2 (15,4)	1 (7,7)	1 (7,7)	0,403

	Değişmemiş	2 (15,4)	0 (0)		2 (15,4)	0 (0)		1 (7,7)	0 (0)	1 (7,7)	
	Artmış	2 (15,4)	5 (38,5)		4 (30,8)	3 (23,1)		6 (46,2)	1 (7,7)	0 (0)	
CYBA	Azalmış	1 (5)	4 (20)	0,166	2 (10)	3 (15)	0,162	3 (15)	0 (0)	2 (10)	0,347
	Değişmemiş	3 (15)	1 (5)		4 (20)	0 (0)		2 (10)	0 (0)	2 (10)	
	Artmış	3 (15)	8 (40)		6 (30)	5 (25)		8 (40)	2 (10)	1 (5)	
DDB2	Azalmış	2 (10)	6 (30)	0,492	5 (25)	3 (15)	0,454	5 (25)	1 (5)	2 (10)	0,960
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5)		0 (0)	1 (5)		1 (5)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	5 (25)	6 (30)		7 (35)	4 (20)		7 (35)	1 (5)	3 (15)	
E2F6	Azalmış	1 (5)	2 (10)	0,124	1 (5)	2 (10)	0,329	3 (15)	0 (0)	0 (0)	0,094
	Değişmemiş	2 (10)	0 (0)		2 (10)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	2 (10)	
	Artmış	4 (20)	11 (55)		9 (45)	6 (30)		10 (50)	2 (10)	3 (15)	
ESR1	Azalmış	2 (16,7)	6 (50)	0,098	6 (50)	2 (16,7)	1,000	8 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0,018*
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (25)	1 (8,3)		3 (25)	1 (8,3)		1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	
ESR2	Azalmış	1 (8,3)	4 (33,3)	0,079	3 (25)	2 (16,7)	0,310	4 (33,3)	0 (0)	1 (8,3)	0,598
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	5 (41,7)	2 (16,7)		6 (50)	1 (8,3)		4 (33,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	
ESRRG	Azalmış	3 (15)	8 (40)	0,338	7 (35)	4 (20)	0,588	6 (30)	1 (5)	4 (20)	0,741
	Değişmemiş	1 (5)	0 (0)		1 (5)	0 (0)		1 (5)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (15)	5 (25)		4 (20)	4 (20)		6 (30)	1 (5)	1 (5)	
FANCC	Azalmış	3 (15,8)	5 (26,3)	0,906	4 (21,1)	4 (21,1)	0,456	5 (26,3)	1 (5,3)	2 (10,5)	0,834
	Değişmemiş	1 (5,3)	1 (5,3)		1 (5,3)	1 (5,3)		2 (10,5)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (15,8)	6 (31,6)		7 (36,8)	2 (10,5)		5 (26,3)	1 (5,3)	3 (15,8)	
FGF8	Azalmış	1 (12,5)	5 (62,5)	0,035*	4 (50)	2 (25)	0,673	5 (62,5)	1 (12,5)	0 (0)	0,346
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (25)	0 (0)		1 (12,5)	1 (12,5)		1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0)	
HIF1AN	Azalmış	3 (15)	9 (45)	0,172	6 (30)	6 (30)	0,535	7 (35)	1 (5)	4 (20)	0,457
	Değişmemiş	1 (5)	3 (15)		3 (15)	1 (5)		4 (20)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (15)	1 (5)		3 (15)	1 (5)		2 (10)	1 (5)	1 (5)	
HSPD1	Azalmış	1 (5)	0 (0)	0,359	1 (5)	0 (0)	0,108	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0,871
	Değişmemiş	1 (5)	3 (15)		4 (20)	0 (0)		3 (15)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	5 (25)	10 (50)		7 (35)	8 (40)		9 (45)	2 (10)	4 (20)	

<i>HSPH1</i>	Azalmış	3 (15)	6 (30)	0,112	5 (25)	4 (20)	0,850	5 (25)	0 (0)	4 (20)	0,131
	Değişmemiş	2 (10)	0 (0)		1 (5)	1 (5)		1 (5)	1 (5)	0 (0)	
	Artmış	2 (10)	7 (35)		6 (30)	3 (15)		7 (35)	1 (5)	1 (5)	
<i>KDM3A</i>	Azalmış	2 (10)	4 (20)	0,919	2 (10)	4 (20)	0,111	4 (20)	2 (10)	0 (0)	0,033*
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	5 (25)	9 (45)		10 (50)	4 (20)		9 (45)	0 (0)	5 (25)	
<i>MED1</i>	Azalmış	1 (5)	2 (10)	0,286	1 (5)	2 (10)	0,530	2 (10)	0 (0)	1 (5)	0,945
	Değişmemiş	4 (20)	3 (15)		5 (25)	2 (10)		4 (20)	1 (5)	2 (10)	
	Artmış	2 (10)	8 (40)		6 (30)	4 (20)		7 (35)	1 (5)	2 (10)	
<i>MITF</i>	Azalmış	5 (26,3)	5 (26,3)	0,451	7 (36,8)	3 (15,8)	0,771	6 (31,6)	0 (0)	4 (21,1)	0,068
	Değişmemiş	1 (5,3)	3 (15,8)		2 (10,5)	2 (10,5)		4 (21,1)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	1 (5,3)	4 (21,1)		3 (15,8)	2 (10,5)		2 (10,5)	2 (10,5)	1 (5,3)	
<i>NELFA</i>	Azalmış	1 (5)	4 (20)	0,051*	1 (5)	4 (20)	0,101	3 (15)	1 (5)	1 (5)	0,795
	Değişmemiş	4 (20)	1 (5)		4 (20)	1 (5)		3 (15)	0 (0)	2 (10)	
	Artmış	2 (10)	8 (40)		7 (35)	3 (15)		7 (35)	1 (5)	2 (10)	
<i>NFIX</i>	Azalmış	3 (15)	4 (20)	0,072	5 (25)	2 (10)	0,733	4 (20)	1 (5)	2 (10)	0,658
	Değişmemiş	3 (15)	1 (5)		2 (10)	2 (10)		2 (10)	1 (5)	1 (5)	
	Artmış	1 (5)	8 (40)		5 (25)	4 (20)		7 (35)	0 (0)	2 (10)	
<i>NFYB</i>	Azalmış	4 (21,1)	6 (31,6)	0,423	7 (36,8)	3 (15,8)	0,473	6 (31,6)	1 (5,3)	3 (15,8)	0,611
	Değişmemiş	0 (0)	3 (15,8)		1 (5,3)	2 (10,5)		2 (10,5)	0 (0)	1 (5,3)	
	Artmış	2 (10,5)	4 (21,1)		3 (15,8)	3 (15,8)		5 (26,3)	1 (5,3)	0 (0)	
<i>NOC2L</i>	Azalmış	2 (10,5)	5 (26,3)	0,820	5 (26,3)	2 (10,5)	0,193	4 (21,1)	1 (5,3)	2 (10,5)	0,899
	Değişmemiş	1 (5,3)	1 (5,3)		2 (10,5)	0 (0)		1 (5,3)	0 (0)	1 (5,3)	
	Artmış	4 (21,1)	4 (21,1)		4 (21,1)	4 (21,1)		7 (36,8)	1 (5,3)	2 (10,5)	
<i>NRXN1</i>	Azalmış	5 (25)	7 (35)	0,638	7 (35)	5 (25)	0,703	6 (30)	1 (5)	5 (25)	0,324
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5)		1 (5)	0 (0)		1 (5)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (10)	5 (25)		4 (20)	3 (15)		6 (30)	1 (5)	0 (0)	
<i>NUPR1</i>	Azalmış	1 (5)	3 (15)	0,828	2 (10)	2 (10)	0,461	2 (10)	1 (5)	1 (5)	0,680
	Değişmemiş	1 (5)	1 (5)		2 (10)	0 (0)		2 (10)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	5 (25)	9 (45)		8 (40)	6 (30)		9 (45)	1 (5)	4 (20)	
<i>OCLN</i>	Azalmış	4 (21,1)	6 (31,6)	0,326	5 (26,3)	5 (26,3)	0,591	8 (42,1)	0 (0)	2 (10,5)	0,180
	Değişmemiş	1 (5,3)	0 (0)		1 (5,3)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	1 (5,3)	

	Artmış	2 (10,5)	6 (31,6)		5 (26,3)	3 (15,8)		4 (21,1)	2 (10,5)	2 (10,5)	
<i>PGR</i>	Azalmış	1 (16,7)	1 (16,7)	0,687	2 (33,3)	0 (0)	0,549	2 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0,558
	Değişmemiş	1 (16,7)	0 (0)		1 (16,7)	0 (0)		1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (33,3)	1 (16,7)		2 (33,3)	1 (16,7)		1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	
<i>POLDIP3</i>	Azalmış	4 (20)	8 (40)	0,896	8 (40)	4 (20)	0,189	9 (45)	1 (5)	2 (10)	0,364
	Değişmemiş	1 (5)	1 (5)		2 (10)	0 (0)		2 (10)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (10)	4 (20)		4 (20)	2 (10)		2 (10)	1 (5)	3 (15)	
<i>POSTN</i>	Azalmış	0 (0)	3 (20)	0,171	2 (13,3)	1 (6,7)	1,000	2 (13,3)	1 (6,7)	0 (0)	0,092
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	5 (33,3)	7 (46,7)		8 (53,3)	4 (26,7)		9 (60)	0 (0)	3 (20)	
<i>PPARG</i>	Azalmış	4 (25)	8 (50)	0,146	8 (50)	4 (25)	0,755	7 (43,8)	1 (6,3)	4 (25)	0,344
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (18,8)	1 (6,3)		3 (18,8)	1 (6,3)		3 (18,8)	1 (6,3)	0 (0)	
<i>PRDM16</i>	Azalmış	6 (31,6)	11 (57,9)	0,683	11 (57,9)	6 (31,6)	0,080	11 (57,9)	1 (5,3)	5 (26,3)	0,138
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	1 (5,3)	1 (5,3)		0 (0)	2 (10,5)		1 (5,3)	1 (5,3)	0 (0)	
<i>PRKARIA</i>	Azalmış	5 (25)	8 (40)	0,170	9 (45)	4 (20)	0,468	8 (40)	0 (0)	5 (25)	0,158
	Değişmemiş	0 (0)	4 (20)		2 (10)	2 (10)		3 (15)	1 (5)	0 (0)	
	Artmış	2 (10)	1 (5)		1 (5)	2 (10)		2 (10)	1 (5)	0 (0)	
<i>PTH1R</i>	Azalmış	5 (29,4)	7 (41,2)	0,660	10 (58,8)	2 (11,8)	0,040	9 (52,9)	1 (5,9)	2 (11,8)	0,425
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5,9)		0 (0)	1 (5,9)		1 (5,9)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (11,8)	2 (11,8)		1 (5,9)	3 (17,6)		1 (5,9)	1 (5,9)	2 (11,8)	
<i>RABL6</i>	Azalmış	3 (15)	9 (45)	0,386	8 (40)	4 (20)	0,574	7 (35)	1 (5)	4 (20)	0,469
	Değişmemiş	3 (15)	2 (10)		3 (15)	2 (10)		4 (20)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	1 (5)	2 (10)		1 (5)	2 (10)		2 (10)	1 (5)	0 (0)	
<i>REST</i>	Azalmış	3 (15,8)	4 (21,1)	0,324	3 (15,8)	4 (21,1)	0,466	4 (21,1)	0 (0)	3 (15,8)	0,562
	Değişmemiş	1 (5,3)	0 (0)		1 (5,3)	0 (0)		1 (5,3)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	3 (15,8)	8 (42,1)		7 (36,8)	4 (21,1)		7 (36,8)	2 (10,5)	2 (10,5)	
<i>RPS15</i>	Azalmış	1 (5)	2 (10)	0,163	1 (5)	2 (10)	0,528	2 (10)	0 (0)	1 (5)	0,625
	Değişmemiş	3 (15)	1 (5)		3 (15)	1 (5)		3 (15)	1 (5)	0 (0)	
	Artmış	3 (15)	10 (50)		8 (40)	5 (25)		8 (40)	1 (5)	4 (20)	
<i>SBDS</i>	Azalmış	5 (25)	5 (25)	0,227	7 (35)	3 (15)	0,659	6 (30)	0 (0)	4 (20)	0,157

	Değişmemiş	1 (5)	1 (5)		1 (5)	1 (5)		1 (5)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	1 (5)	7 (35)		4 (20)	4 (20)		6 (30)	2 (10)	0 (0)	
SMARCA1	Azalmış	2 (10)	6 (30)	0,742	4 (20)	4 (20)	0,213	6 (30)	0 (0)	2 (10)	0,787
	Değişmemiş	3 (15)	4 (20)		6 (30)	1 (5)		4 (20)	1 (5)	2 (10)	
	Artmış	2 (10)	3 (15)		2 (10)	3 (15)		3 (15)	1 (5)	1 (5)	
SYVNI	Azalmış	4 (20)	3 (15)	0,188	2 (10)	5 (25)	0,107	3 (15)	1 (5)	3 (15)	0,567
	Değişmemiş	2 (10)	3 (15)		4 (20)	1 (5)		4 (20)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	1 (5)	7 (35)		6 (30)	2 (10)		6 (30)	1 (5)	1 (5)	
TALI	Azalmış	3 (16,7)	8 (44,4)	0,065	8 (44,4)	3 (16,7)	0,152	8 (44,4)	0 (0)	3 (16,7)	0,152
	Değişmemiş	0 (0)	2 (11,1)		0 (0)	2 (11,1)		2 (11,1)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	4 (22,2)	1 (5,6)		3 (16,7)	2 (11,1)		2 (11,1)	2 (11,1)	1 (5,6)	
TREM1	Azalmış	1 (7,1)	4 (28,6)	0,091	4 (28,6)	1 (7,1)	0,255	3 (21,4)	1 (7,1)	1 (7,1)	0,944
	Değişmemiş	0 (0)	1 (7,1)		0 (0)	1 (7,1)		1 (7,1)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	6 (42,9)	2 (14,3)		6 (42,9)	2 (14,3)		5 (35,7)	1 (7,1)	2 (14,3)	
TSPYL2	Azalmış	4 (20)	8 (40)	0,099	7 (35)	5 (25)	0,450	8 (40)	0 (0)	4 (20)	0,132
	Değişmemiş	2 (10)	0 (0)		2 (10)	0 (0)		1 (5)	0 (0)	1 (5)	
	Artmış	1 (5)	5 (25)		3 (15)	3 (15)		4 (20)	2 (10)	0 (0)	
TSPYL5	Azalmış	5 (26,3)	6 (31,6)	0,566	7 (36,8)	4 (21,1)	0,383	6 (31,6)	1 (5,3)	4 (21,1)	0,789
	Değişmemiş	0 (0)	1 (5,3)		0 (0)	1 (5,3)		1 (5,3)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (10,5)	5 (26,3)		5 (26,3)	2 (10,5)		5 (26,3)	1 (5,3)	1 (5,3)	
UBE3A	Azalmış	2 (10)	5 (25)	0,042*	3 (15)	4 (20)	0,425	5 (25)	0 (0)	2 (10)	0,087
	Değişmemiş	4 (20)	1 (5)		4 (20)	1 (5)		2 (10)	0 (0)	3 (15)	
	Artmış	1 (5)	7 (35)		5 (25)	3 (15)		6 (30)	2 (10)	0 (0)	
UPF2	Azalmış	5 (25)	10 (50)	0,787	9 (45)	6 (30)	0,417	9 (45)	1 (5)	5 (25)	0,277
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2 (10)	3 (15)		4 (20)	1 (5)		4 (20)	1 (5)	0 (0)	
ZFYVE16	Azalmış	5 (25)	7 (35)	0,119	7 (35)	5 (25)	0,966	8 (40)	0 (0)	4 (20)	0,011*
	Değişmemiş	2 (10)	1 (5)		2 (10)	1 (5)		1 (5)	2 (10)	0 (0)	

	Artmış	0 (0)	5 (25)		3 (15)	2 (10)		4 (20)	0 (0)	1 (5)	
--	--------	-------	--------	--	--------	--------	--	--------	-------	-------	--

Tablo 4-11: Üst Düzenleyici Genlerin Klinik Özelliklere Göre Değerlendirilmesi

Yaptığımız çalışmada glioblastomada beynin frontal lobunda örneklerin %45’inde *APOE*, %45’inde *CCT5* ve %45’inde *KDM3A* genlerinin ifadeleri artmışken, örneklerin %66,7’sinde *ESR1* ve %40’ında *ZYFVE16* genlerinin düzeyleri azalmıştır ($p<0,05$). Erkeklerde *UBE3A* ve *NELFA* genlerinin ifadeleri artmışken, *FGF8* geni ifadesi azalmıştır. Yaptığımız çalışmada sadece *PTH1R* geni ifadesi 60 yaşın altındaki hastalarda azalmıştır ($p<0,05$).

4.3. Aritmetik Ortalama Analizi

Verilere aritmetik ortalamaları açısından da yaklaşılmıştır. 9 tümör ve 9 normal örneğin, her gene ait okumalarının aritmetik ortalamaları hesaplanmıştır. Tümörde 0 okuma gösterirken, normalde okuması olan ve tam aksine normal örneklerde okuması 0 olup, tümörde okuma gösteren genler belirlenmiştir. Bu genler Tablo 4-11’de gösterilmiştir.

Gen	Logaritmik Değişim	P değeri	Tümör Okuma Ortalaması	Normal Okuma Ortalaması
<i>DMBX1</i>	5,279342919	7,69E-07	9,833078035	0
<i>NKX2-5</i>	5,698814611	0,00000428	12,13968572	0
<i>OR2M4</i>	-6,455905083	1,53E-11	0	15,98435194
<i>MEPE</i>	-5,360765199	0,00012207	0	11,4070004

Tablo 4-12: Ortalamalara Göre Değerlendirilen Genler

IPA analizi sonucu elde edilen, glioblastomada düzeyi artan hedef genlerden *FAM180A*, düzeyi azalan genlerden ise *KCNV1* geni doğrulama için seçilirken, aritmetik ortalama analizinden *DMBX1*, anlamlılık değerlerinin yüksek olması ve tümör oluşumunda etkili olma olasılığı nedeni ile Gerçek zamanlı PZR ile değerlendirilmiştir. 20 çift örnekte çalışılan genlerin Gerçek zamanlı PZR sonuçları Tablo 4-12’de yer almaktadır.

Gen adı	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	P değeri	Değişim
<i>DMBX1</i>	-1,17	2,24	0.215	Artmış
<i>KCNV1</i>	3,82	0.07	0.009	Azalmış
<i>FAM180A</i>	-1.68	3,20	0.008	Artmış

Tablo 4-13:DMBX1, KCNV2, FAM180A genlerinin Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

Hedef genlerin hastaların yaş, tümör yerleşimi ve cinsiyet açısından özelliklerine göre incelenmesi sonucu anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 4-14)

GEN İFADESİ	Değişim	CİNSİYET		*p	YAŞ		*p	TÜMÖR YERLEŞİMİ			*p
		Kadın n (%)	Erkek n (%)		<60 n(%)	60 n(%)		Frontal n (%)	Paryetal n (%)	Temporal n (%)	
FAM180A	Azalmış	1(5)	1(5)	0,372	1(5)	1(5)	0,933	1(5)	0(0)	1(5)	0,631
	Değişmemiş	0(0)	3(15)		2(10)	1(5)		2(10)	1(5)	0 (0)	
	Artmış	6 (30)	9(45)		2(10)	4(20)		10(50)	2(10)	3(15)	
KCNV1	Azalmış	5(25)	10(50)	0,787	9(45)	6(30)	1,000	9(45)	3(15)	3(15)	0,540
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	2(10)	3(15)		3(15)	2(10)		4(20)	1(5)	0(0)	
DMBX1	Azalmış	0(0)	4(20)	0,101	1(5)	3(15)	0,110	3(15)	0(0)	1(5)	0,494
	Değişmemiş	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Artmış	7(35)	9(45)		11(55)	5(25)		10(50)	4(20)	2(10)	

Tablo 4-14: DMBX1, KCNV2, FAM180A genlerinin klinik özellikler açısından incelenmesi

5. TARTIŞMA

Beyin tümörlerinin %77'sini oluşturan glioblastoma multiforme, cerrahi operasyon, radyoterapi, kemoterapi veya bu tedavilerin birlikte uygulanmasına rağmen, ortalama 15 ay sağ kalım gösteren en habis tümör tipidir (71). Glioblastomlar, öncül herhangi bir lezyon göstermeden yeni bir oluşumla gelişim gösteren, IDH yaban tip ile karakterize olan birincil glioblastom ve yayılımcı astrositomdan veya oligodendrogliomadan gelişen IDH mutant tip ikincil glioblastom olmak üzere ikiye ayrılır. Yeni nesil teknolojiler ile DNA, RNA, protein düzeyinde yapılan araştırmalar, glioblastomanın karmaşık oluşumunun aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Bizim çalışmamızda, aynı hastadan çıkarılan tümör ve tümöre komşu olan normal doku örnekleri kullanılarak glioblastomda ifade düzeyi değişen genlerin saptanması amacıyla, 20802 transkriptin hedeflenmiş bölgeleri dizilenmiştir.

Glioblastomada, ifadesi değişen genleri tespit etmek için transkriptom düzeyinde çalışmalar yapılmış olsa da kullanılan kontrol örnekleri olguların taze dokuları olmayıp, epilepsi hastaları (72), hücre hatları veya parafine gömülü doku kesitlerinden elde edildiğinden ideal kontrol örnekleri ile karşılaştırma yapılmamıştır. Çalışmamızda örneklerin normal ve tümör doku içeriği patologlar tarafından doğrulanmış, kalan taze doku dizileme işlemine alınmıştır ve moleküler olarak da elde edilen veriler PCA analizi ile değerlendirilmiştir. PCA analizinde, tümör ve normal örnek çiftlerinin benzeşmesi incelenmiş, gen ifadeleri birbirine yakın görülen 3 çift çalışmadan dışlanmıştır. Bu durum, histopatolojik değerlendirmede normal olarak değerlendirilen dokularda, moleküler düzeyde değişimin başlamış olabileceğini göstermektedir.

Hedeflenmiş transkriptom verilerimizde yapılan DESeq analizinde, 3062 gen ifadesinde anlamlı düzey değişikliği tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu genler IPA programı aracılığı ile analiz edilerek, glioblastomada, genlerdeki ifade düzeyi değişen genler belirlenerek önemli sinyal iletim yolları, potansiyel yeni düzenleyici genler ve hedef genler saptanmıştır. IPA analizi sonucunda, ifadesi farklılaşan genlerden 415'inin Üst Düzenleyici olduğu belirlenmiştir. Ghosh ve arkadaşlarının normal astrosit ve astrositoma hücre hatlarında yaptığı çalışmada mikroarray ifade çalışmasında, $p < 0,05$ eşik değeri ile 5049 genin ifadesinin değiştiği gösterilmiştir (73). Çalışmamızda daha hassas bir eşik değeri ve glioblastomaya özgü örnekler kullanılması nedeniyle daha düşük sayıda gende ifade değişikliği saptanmıştır.

IPA ile gerçekleştirilen analizde, glioblastoma örneklerinde değişim gösteren en anlamlı sinyal ileti yolağı akson yönlendirmeli sinyal ileti yolağı olarak saptanmıştır. IPA

analizi sonucunda, bu yolağa ait 445 genin 117'sinde ifade düzeyinde değişiklik olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). Merkezi sinir sistemi gelişimi işlevinin yanı sıra, bazı kanserlerde hücre göçüne de neden olan akson yönlendirmeli moleküllerin, gliomada kanser hücresi göçüne ve gliomaya özgü yayılmaya neden olduğu bildirilmiştir (74). Nöral gelişimde rol alan akson yönlendirmeli sinyal ileti yolağı, nöronlardan iletilen sinyalin aksonlar aracılığı ile doğru hedefe yönlendirilmesini sağlar (75). Tümör yayılmasında etkin olan bu sinyal ileti yolağının, verilerimizde en anlamlı yolak olarak saptanması literatürdeki bilgileri destekler nitelikte ve beklenen bir sonuçtur (74,75).

Değişiklik gösteren sinyal ileti yollarının diğer ikisi ise Glutamat Reseptör ve cAMP'de Dopamin/DARP32 dönüşümlü sinyal ileti yolağıdır. Glutamat, Merkezi Sinir Sisteminin hücresel iç dengesini oluşturmada görev alır. Glioblastomada yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, glioblastom hücrelerinden, hücre dışına yüksek seviyede Glutamat salındığı gösterilmiştir. Salınan L-Glutamatın bir nörotropik etmen gibi davranarak, hücre büyümesini ve göçünü teşvik ederek habis tümöre neden olduğu gösterilmiştir (76,77). Yaptığımız çalışmada Glutamat reseptör sinyal ileti yolağında bulunan 56 üyenin 25 tanesinde ifade değişikliği olması, bu yolağın glioblastomada önemli olduğunu destekler niteliktedir ($p \leq 0,001$).

Dopamin, memeli beyinde bulunan önemli bir nörotransmitter maddedir ve bilinç, heyecan, besin alımı, endokrin düzenlenmesinde görev alır. Orta beyindeki nöronlardan salınan dopamin, dopamin reseptörlerini etkinleştirerek, cAMP üretimini düzenler. Dopamin aracılı gen etkinleşmesinde kontrolü sağlayan DARP32, Dopamin bulunan bütün hücrelerde aracı bir sinyal ileti molekülüdür ve iyon kanalları, salgı aparatları, hücre iskeleti gibi tüm hücresel sistemlerde sinaptik uyarıya cevabı kontrol eder (78). Çalışmamızda cAMP'de Dopamin/DARP32 dönüşümlü sinyal iletimini düzenleyen 160 genin 49'unun ifadesi değişiklik göstermiştir ($p \leq 0,001$). Dopaminin MAPK aracılığı ile glioma ilişkisi daha önce bildirilmiş olmasına rağmen (79), glioma üzerindeki mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (80). Yaptığımız çalışma sonucunda parkinson, Şizofreni, Turett Sendromu, psikiyatrik ve nörolojik bozukluklarda ifadesi değişiklik gösteren bu yolağın glioblastoma ile ilişkisi ilk kez gösterilmiştir (78). Bu sonuç Dopaminin gliomadaki MAPK aracılı etki mekanizmasına alternatif olarak, cAMP aracılığı ile DARRP32 üzerinden de olabileceğini göstermektedir.

GABA, memeli merkezi sinir sisteminde, sinir hücrelerinin iletişimini baskılayan nörotransmitter maddedir. GABA taşıyıcılar (GAT), sinir uçlarında ve glial hücrelerde bulunur ve sinaptik iletimin sonlandırılmasında rol oynar. GABA, GAT aracılığı ile hücreye

girer, sitrat döngüsünü başlatır. GABA sinyal iletinin nörotransmitter salınımı dışında, hücre farklılaşması, çoğalması ve göçünde de görevli olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız analiz sonucunda, glioblastomada GABA almaç sinyal ileti yolağını oluşturan 68 molekülün 27'sinin, anlamlı şekilde azaldığı ve bunların GABA almacı kodlayan genler olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). Verilerimizde GABA almaç sinyal iletinde görevli ifadesi azalan genler, GABA almaçları, taşıyıcı veya yüzey almacı görevi gören proteinler kodlar. Bu genlerden bazıları GABBR1, GABBR2, GABRA2, GABRB1, GABRD, SLC32A1, GPR37 genleridir. Her ne kadar GABA seviyesi çalışmamızda araştırılmamış olsa da, literatürde gliomada GABA seviyesinin arttığı bilinmektedir (81,82). Sonuçlarımızda GABA almaç kodlayan genlerin ise ifade düzeyi azalmıştır. Bu durum çevrimsel mekanizmada gerçekleşen bir değişimin etkisiyle gerçekleşmiş olabilir ve GABA seviyesinin ölçümü ve protein seviyesinde araştırmalarla aydınlatılmalıdır.

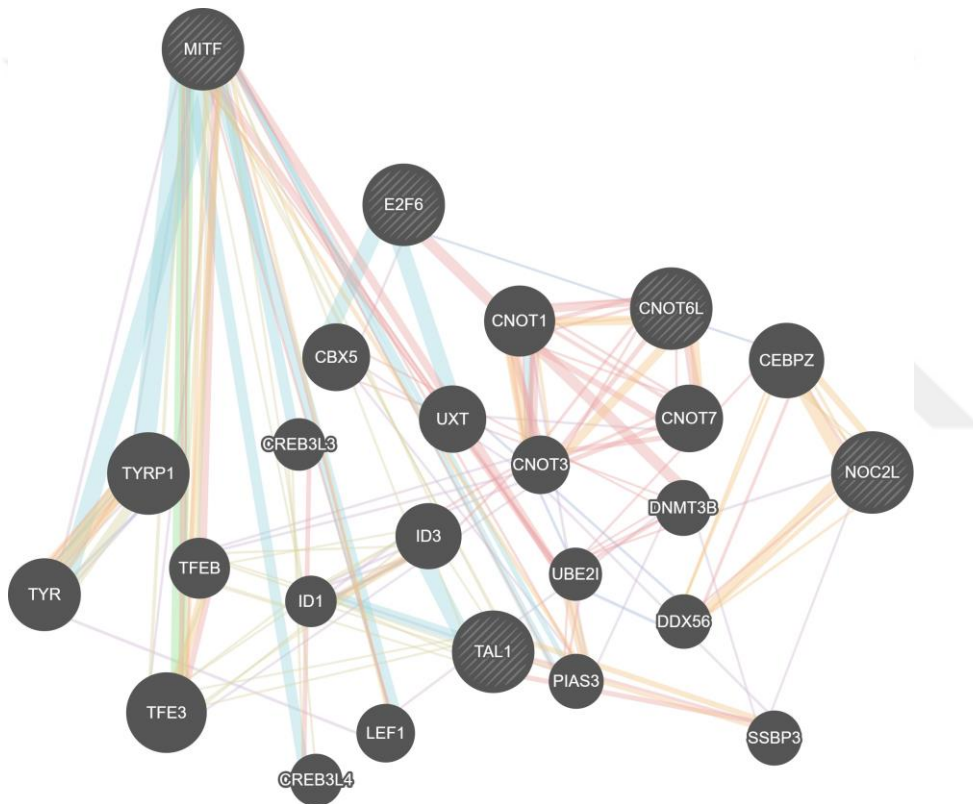
IPA analizinde, ERBB2, MITF, ESR1, TGFB1, AREG genleri glioblastomada ifadesi en çok değişen üst düzenleyiciler olarak saptanmıştır. ERBB2 bir onkogendir ve astrositoma preparatlarından mikro kesim ile elde edilen örneklerde yapılan proteom çalışmasında ERBB2 proteinin arttığı bildirilmiştir (83). Yine glioma biyopsi materyallerinde ERBB2 gen ifadesinin arttığı ve glioma gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (84). Yaptığımız çalışmada ERBB2 gen ifade düzeyi artmış olup literatür bilgisini desteklemektedir.

MITF (Melanogenez İlişkili Yazılım Etmeni), hücre farklılaşmasında, çoğalmasında ve sağ kalımında temel rol oynayan bir yazılım etmenidir. Tirozinaz ifadesinin düzenlenmesiyle melanosit gelişmesinde görev alır (85). Melanoma hücre kültürü örneklerinde yapılan mikroarray ve RT-PZR ifade çalışmasında çok yayılım gösteren melanoma hücrelerinde *MITF* ifadesi azalırken, daha az yayılım gösteren hücrelerde *MITF* ifadesi artmıştır (86). *MITF* geni RT-PZR için seçtiğimiz genlerdendir ve glioblastomada azalmış olduğu (%52,6) ve ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. Hoek KS ve arkadaşları melanoma hücrelerinde *MITF* geni ifadesindeki azalmanın tümör yayılımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (86). Benzer şekilde glioblastomada da azalmış ifade düzeyini saptadığımız *MITF* geninin, glioblastomanın yüksek yayılım özelliği ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. *MITF* ifadesi ile tümör yayılım ilişkisinin aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Seçtiğimiz genler birbirleri ile ilişkileri açısından da incelenmiştir ve ilişkili bulunan genler Genemania (87) etkileşim tahmin aracı ile değerlendirilmiştir. Yeni nesil verilerimizde anlamlı değişikliğini saptadığımız ve RT PZR'de daha fazla örnekte çalışmak için seçilen,

yazılımda görevli *CNOT6L*, *E2F6*, *TAL1* genleri ve nükleozom paketlemesinde görevli *NOC2L* geni ile *MITF* geninin ilişkili olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Osteoklast hücrelerinde yapılan RT PZR ve co-IP çalışmasında, *TAL1* geninin *MITF* ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (88). Çalışmamız glioblastoma örneklerinde *MITF* geni ve *TAL1* geni etkileşimini destekler niteliktedir ancak protein düzeyinde etkileşim araştırılmamıştır. *MITF* geni ile *CNOT6L*, *E2F6*, *NOC2L* genleri ilişkisi literatürde bulunmamaktadır. Her ne kadar Genemania veritabanı bu genler arası fiziksel etkileşimin % 67 olduğunu saptasa da bu ilişkinin protein etkileşim yöntemleri ile desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Şekil 5-1: MITF geninin etkileştiği genler



Yaptığımız RT PZR çalışmasında *ESR1* geninin ifadesinin azalmış olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). *ESR1* geni, hormon ve DNA bağlanmasında gerekli olan yazılım etmenlerinin etkinleşmesi için östrojen reseptörünü kodlar. Östrojen büyüme, farklılaşma ve üreme sistemini içeren birçok hücresel işlemi kontrol etmenin yanı sıra sinir sistemi ve kardiyovasküler sisteminin normal işlevini ve hücre iskeletinin temellendirilmesinden sorumludur (89). TCGA (The Cancer Genome Atlas) verilerinden 500 glioblastoma örneğinde 12 bin gen ifade düzeyinin incelenmesiyle gerçekleştirilen bir çalışmada, *ESR1* geninin kendinden sonraki birçok genin ifadesini düzenlediği ve ifadesinin arttığı ve bu artışın

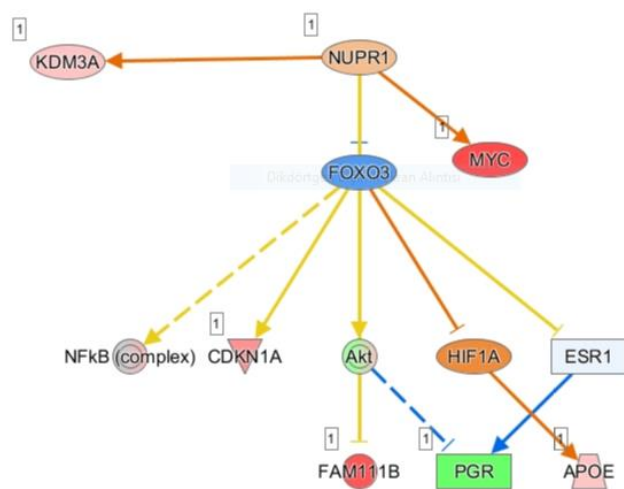
gliomagenez için önemli olduğu bildirilmiştir (90). Çalışmamızda *ESR1* geninin ifadesi taze glioblastoma örneklerinde azalmıştır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda çalışılan örneklerin taze dokudan elde edilmemesi veya örnek sayımızın az olması bu uyumsuzluğun nedeni olabilir. Çalışmamızda aynı zamanda *ESR1* ifadesinin beynin frontal lobunda anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır ($p=0,018$). Tümör yerleşimi ile *ESR1* geni ilişkisi ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir.

Daha önce birçok kanserde ifade artışı belirtilen *TGFB1* geninin, hücrelerin çoğalması, göçü ve yayılmasında görev aldığı ve glioblastomada tümör mikro çevresini oluşturan hücre dışı alanın temel düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (91,92). Glioblastomada ifade artışının hastalığın kötü seyri ile ilişkili olduğu saptanan *TGFB1* (93) gen düzeyi, çalışmamızda anlamlı bir şekilde artmıştır. Yüksek evreli gliomalarda düzeyi artan *TGFB1*'in hedeflenmiş tedavi için bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (94) ve taze dokularda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda üst düzenleyici olarak saptanan *TGFB1* geni literatürdeki bilgiyi desteklemektedir.

RT PZR çalışması sonucu düzeyi yaklaşık 5 kat artış gösteren genlerden (Nuclear Protein 1) *NUPR1*, bir yazılım düzenleyicidir. *P8* olarak da bilinen *NUPR1* geni ifade artışı, ilk kez pankreas kanserinde saptanmıştır (95), bunun yanı sıra meme kanser hücrelerinde (96), fibroblastlarda da arttığı saptanırken, prostat kanserinde azaldığı gösterilmiştir. Parafine gömülü glioblastoma dokularında *NUPR1* geninin ifadesinin arttığı (% 60,7) ve *NUPR1* ifadesinin glioblastoma hücrelerinde azalmasının hücre göçünü ve artışını baskılayarak hücre döngüsünün G0 ve G1 fazlarında tuttuğu bildirilmiştir (97). Daha önce literatürde belirtildiği gibi, pankreas ve glioblastoma dokularındaki *NUPR1* gen ifadesindeki artış (% 70) benzer şekilde çalışmamızda yine glioblastoma için teyit edilmiştir. Ancak, daha önceki çalışma qPCR analizi ve Western blot ile yapılmış olup bizim çalışmamızda farklı olarak qPCR ve RNA dizileme kullanılmıştır (97). Önceki çalışmada parafin doku kullanılmış olup çalışmamızda taze doku kullanılmıştır, yine de sonuçlar benzer olarak saptanmıştır.

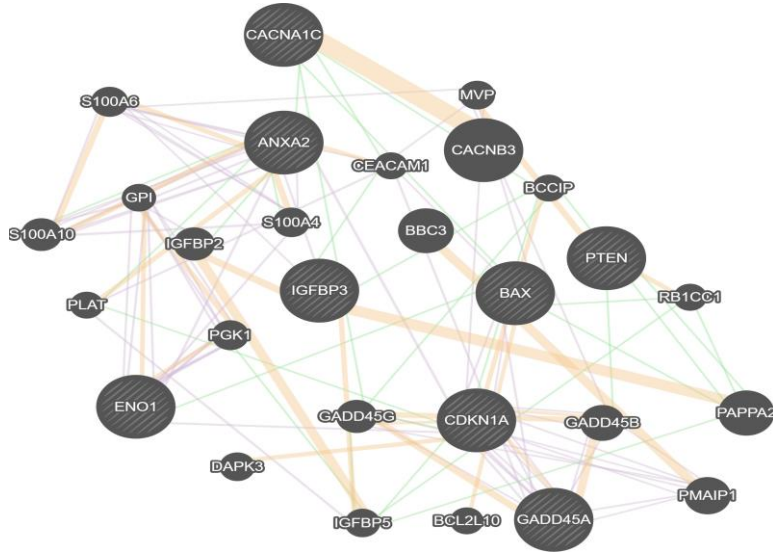
Bir üst düzenleyici olarak *NUPR1* geninin, başka genleri etkileyerek hücre artışına neden olduğu bilinmektedir. Kardiyak hipertrofi çalışmalarında *NUPR1* geninin bir proto-onkogen olan *MYC* ifadesini arttırdığı bildirilmiştir (98). *MYC* geni glioma hücrelerinin farklılaşması için de önemli bir gendir (99). Çalışmamızda *NUPR1* gen ifadesinin *MYC* ifadesinde artışı olabileceği IPA analizi ile saptanmış olsa da (Şekil5-2) genlerin ilişkilerinin mekanizmaları ileri çalışmalarda aydınlatılmalıdır.

Şekil 5-2: NUPR1 - MYC ilişkisi



RT PZR için seçilerek daha çok örnekte çalışılan genlerden, Annexin A2, (*ANXA2*) kalsiyuma bağlı, fosfolipid bağlanma protein ailesinden Annexin sentezler. Hücre büyümesinde ve sinyal iletilsinin düzenlenmesinde rol oynayan Annexin2, anyonik fosfolipidler tarafından zenginleştirilir. İki Ca iyonunu yüksek ilginlikte birbirine bağlar ve sıcaklık stresine cevapta işlev gösterir (100). Akciğer kanserinde aşırı ifade edildiği gözlenen *ANXA2* geninin, glioma örneklerinde tümör evresi arttıkça, ifadesinin de arttığı bildirilmiştir (101). Yeni nesil dizileme ve RT PZR çalışması sonucunda *ANXA2* geni ifadesi artmıştır ve literatürdeki bilgiyi destekler niteliktedir. IPA analiz sonucuna göre, *ANXA2* geni bir üst düzenleyicidir ve tümör oluşumunda etkili olan verilerimizde ifadesi anlamlı değişiklik gösteren 3062 genden *TP53*, *BAX*, *CDKN1A*, *GADD45A*, *IGFBP3* genlerinin düzeylerini arttırırken, *PTEN* geninin ise azalttığı görülmüştür. IPA analizinden elde edilen bu verilerin protein çalışmaları ile aydınlatılması gerekmektedir. IPA analizinden elde edilen bir diğer sonuç ise *ANXA2* geninin, *CACNA1C* geni tarafından düzenlendiğidir. *CACNA1C* geni, voltaj kapılı kalsiyum kanalları ailesindendir. Beyin tümörlerinde mikroarray verilerinin analizi ile gerçekleştirilen bir çalışmada *CACNA1C* geninin ifadesinin azaldığı saptanmıştır (102). Yaptığımız çalışmada glioblastoma dokularında hem hedeflenmiş transkriptom dizilemesi, hem de RT PZR yöntemi ile *CACNA1C* geni ifadesinin anlamlı şekilde azaldığını gösterildi. *CACNA1C* ve *ANXA2* genleri her ne kadar genler arası uyum analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı sonuç göstermese de, tahmin araçları ile analiz edildiğinde *CACNA1C*'nin *ANXA2* üzerinde temel düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. Tahmin aracı analizinden elde edilen etkileşim şekilde gösterilmektedir (Şekil: 5-3).

Şekil 5-3: *CACNA1C* ve hedef genleri



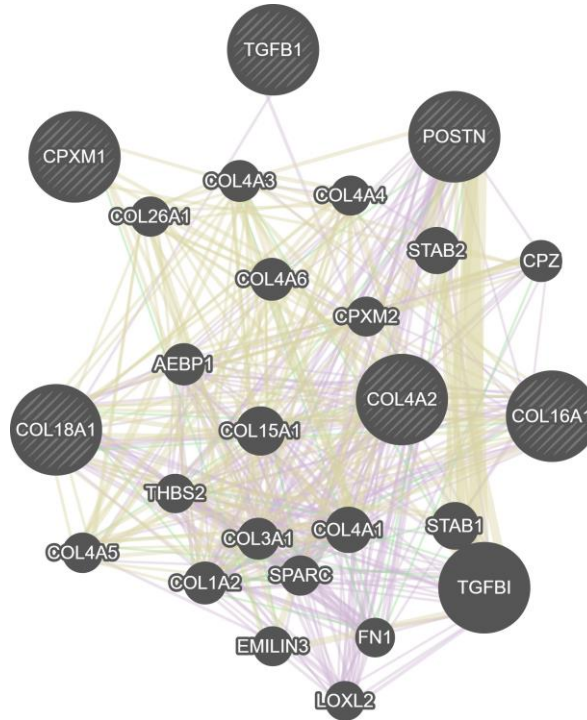
Tümör mikroçevresinin temel bileşenlerini, fibroblastlar, miyofibroblastlar, nöroendokrin, adipöz hücreler, immün ve infalamatuar hücreler, kan ve lenfatik damarlı ağlar ve hücre dışı alan oluşturur. Hücre dışı alanı oluşturan kollajenler, kollajen almaçları aracılığı ile hücre büyümesi, yayılması ve sağ kalımını düzenlemek için biyokimyasal ve mekanik güç sağlar. Kollajen seviyesi normal beyin dokularında düşük iken, gliomalarda artar. Kanser başlamasında, gelişiminde ve yayılmasında etkili olan tümör mikro çevresinin (103) oluşumunda *CPXM1* ve *POSTN* genleri görevlidir ve bu genler RT PZR’de doğrulama için seçilen genlerdendir.

Karboksilpeptidaz ailesinin yeni bir üyesi olan *CPXM1* genine ait çok az şey biliniyor olsa da, nöroendokrin peptidlerin işlenmesinde görev aldığı ve hücre- hücre etkileşimi yaparak gelişimde rol oynadığı düşünülmektedir (104). Yaptığımız çalışmada anlamlı artış gösteren *CPXM1* geni ($p<0,05$), kollajenlere bağlı bir salgı glikoproteindir (105). *CPXM1* susturulduğunda, hücre dışı alandaki kollajen düzeyi azalır (104). Yaptığımız IPA analizi sonucunda *CPXM1* geninin *COL16A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL6A1* genlerinin düzenleyicisi olduğu saptanmıştır ve bu genlerin ifadelerinin RNA dizileme sonuçlarımızda arttığı görülmüştür. Aynı zamanda seçtiğimiz genler arasından, kollajen ailesinin bir üyesi olan *COL18A1* geninin ifadesi glioma dokularında ve glioblastoma hücrelerinde arttığı ve anjiyogenez ile ilişkisi saptanmıştır (106,107). Yaptığımız çalışmada *COL18A1* geni glioblastoma taze dokularında da literatürdeki verilerle paralellik göstererek, artış göstermiştir. Seçtiğimiz genler arasında yaptığımız istatistiksel uyum hesaplamasında *CPXM1*’in *COL18A1* geni (Endostatin) ile de ilişkili olduğunu saptadık ($p<0,05$). Glioma

hücreleri tümör mikro çevresini oluştururken sadece kollajen yıkımı ve sentezini kullanmaz, aynı zamanda hücreyi çevreleyen kollajen matriksine fiziksel baskı uygulayıp genişleyerek de yayılma potansiyeli gösterir (103). Tüm bu bilgiler *CPXM1*'in glioblastomada tümör yayılımında önemli olduğunu düşündürmektedir.

Periostin (*POSTN*), başta kollajen yapımı olmak üzere, hücre dışı alanın yapısında ve organizasyonunda önemli rol oynar (108). *POSTN* ifadesi habis dönüşümlerde, inflamasyonda, doku tamirinde düzensizleşir. *POSTN* gen ifade düzeyinin artması prostat, over, akciğer, pankreas, kolorektal, hepatoselüler kanserlerde daha agresif tümör davranışı, artmış tümör evresi, hastalığın seyrinin kötüleşmesi ile ilişkilendirilmiştir ve bu sebeple yararlı bir biyobelirteç olacağı düşünülmektedir (109). Verilerimizde temel düzenleyici olarak saptanan *TGFB1* geninin, osteoblastlarda, ligament hücrelerinde, diş eti fibroblastlarında ve böbrek hücrelerinde *POSTN* ifadesini arttırdığı bilinmektedir (110,111). Yaptığımız çalışmada düzeyi anlamlı şekilde artan *POSTN* geni ($p<0,05$) glioblastoma dokularında ilk kez gösterilmiştir. Genlerin birbiri ile etkileşimi Genemania veri tabanı ile incelendiğinde *TGFB1*, *CPXM1* ve *POSTN* genlerinin birlikte ifadesi ve birlikte yerleşimi tespit edilmiştir (Şekil: 5-4). Tüm bu veriler, *CPXM1* ve *POSTN* genlerinin *TGFB1* etkisi ile glioblastoma tümör mikro çevresinde, etkili birer biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir.

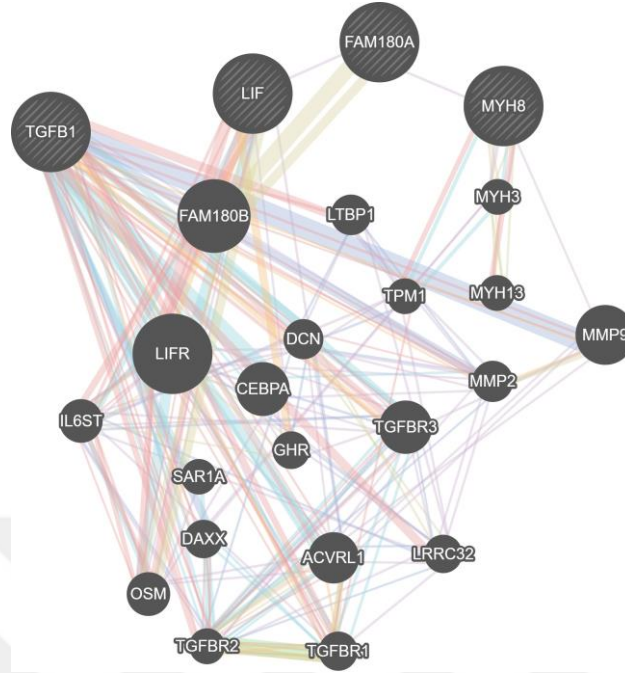
Şekil 5-4: TGFB1-CPXM1- POSTN etkileşimi



RNA dizileme verileri ile gerçekleştirilen IPA analizi sonucu, en az ifade gösteren ilk 10 hedef gen içerisinde yer alan genlerden *KCNVI*, daha önceden glioblastomada tanımlanmadığından RT PZR ile daha fazla örnekte de çalışılmıştır. Kv8.1 olarak da bilinen *KCNVI* geni, voltaj kapılı potasyum kanalları proteinleri alt ailesi V üyesinden birini kodlar (112). Yaptığımız çalışmada, glioblastoma dokularında *KCNVI* geninin ifadesi azalmıştır. Nörotransmitter salınımı, insülin salgısı, nöronal uyarılabilirlik, epitelyal elektrolit taşınması, düz kas kasılması ve hücre hacmi düzenlemede rol oynar (113). Çin’de yapılan bir çalışmada, temel olarak sadece beyinde ifadesi gözlenen *KCNVI* geninin, mesane kanserinde hipermetillenme gösterdiği ve tümör baskılayıcı gen olduğu gösterilmiştir (114). Daha öncede glioblastomada gösterilmemiş ve sonuçlarımıza göre ifadesi artan *KCNVI* geninin klinik bulgularla ilişkisi bulunmamaktadır. *KCNVI* geninin tümörde temel işlevi hala kesin olarak bilinmemektedir, ileri çalışmalarda aydınlatılması gerekmektedir.

IPA analizi sonucu, RNA dizileme verilerinde en fazla ifade gösteren ilk 10 hedef gen içerisinde yer alan genlerden biri daha önce tümörle ilişkilendirilmemiş olan *FAM180A*’dır. Bir salgı proteini kodladığı bilinen *FAM180A* (Family With Sequence Similarity 180 Member A) gen düzeyi, RT-PZR çalışmamızda glioblastomada anlamlı şekilde artmıştır ($p<0,05$). *FAM180A* geni ile ilgili yapılan tek çalışma tavuk embriyolarının dermal miyofibroblastlarında gerçekleştirilmiş ve *TGFB1* sinyal iletilişinde *FAM180A* geninin hücre dışı sinyal sağlayarak doku tamirinde görev aldığı öne sürülmüştür (115). Verilerimizde ifadesi anlamlı artan *TGFB1* (transforming growth factor-beta) geninin kodladığı salgı proteini, gen ifadesinin düzenlenmesinde, glioblastomada hücre göçü, yayılımı ve damarlanmayı kontrol etmede, immün baskılamada anahtar rol oynar (91,92). Glioblastoma hücrelerinde *TGFB1* geninin *LIF* gen düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (116). *LIF* geni, (Interleukin 6 Family Cytokine) normal kan hücrelerinin ve miyeloid lösemi hücrelerinin hematopoetik farklılaşması, nöronal hücre farklılaşmasının teşvik edilmesi, böbrek gelişiminde mezenkimal hücrelerin epitel hücreye dönüşümünün düzenlenmesinde görevli olduğu bildirilmiştir (117). RNA dizileme sonuçlarımızda *LIF* geninin ifadesinin arttığı saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan Genemania etkileşim analizlerinde *TGFB1*’nin *FAM180A* ve *LIF* genleri ile etkileşimde olduğu saptanmıştır (Şekil 5-5) ve glioblastomada *TGFB1*’in *FAM180A* ve *LIF* genlerini hedef alarak tümör gelişimini sağladığını düşündürmektedir. *FAM180* geni, glioblastoma hastalarının cinsiyet, yaş ve tümör yerlerine göre incelendiğinde anlamlı sonuçlar edilmemiştir. Bu genlerin birbirlerine etki etme mekanizmaları ve glioblastomadaki işlevsel etkisi ileri çalışmalarda aydınlatılmalıdır.

Şekil 5-5: FAM180A ve etkileştiği genler



RNA dizileme sonuçlarımız, okumaların aritmetik ortalamalarına göre de değerlendirilmiştir. Normal dokularda okuması hiç olmamasına rağmen, tümör dokularda okuması olan genlerden *DMBX1* (*OTX3*) geni, bir homeobox genidir. Homeobox genleri, gelişimsel işlemlerde hücre farklılaşması ve çoğalmasında görev alan özel bir sınıf yazılım etmeni kodlar. Beynin erken oluşum sürecinde, arka beyini oluşturan protein kodlayan *DMBX1* geni, merkezi sinir sisteminin gelişiminde, hücre kaderinin belirlenmesinde, orta beyin ve beyin kökünün farklılaşmasında ifade edilir (118). *DMBX1*'in sadece embriyonik dönemde ve tümörde ifadesinin bulunması, bir grup homeobox genlerinin karakteristik özelliğindendir ve bu özellik, hastalığın kötü seyri ve metastazı ile de ilişkilendirilmiştir (119). Normal örneklerde hiç okuması yokken, tümör örneklerde okuması bulunan *DMBX1* geni de bu yorumu destekler niteliktedir ve glioblastomada *DMBX1* ifade artışı hem RNA dizileme hem de RT-PZR yöntemi ile ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir.

Literatürde çalışmamıza yakın olarak, 13 çift glioblastom ve normal dokudan elde edilen parafin blok örneklerinden gerçekleştirilen bir çalışmada, 36 aydan daha fazla sağ kalım gösteren 4 uzun dönem hasta ile, daha kısa sağ kalım gösteren 9 hastanın transkriptom ve miRNA düzeyinde ifadeleri karşılaştırılmıştır (72). Bu çalışmaya göre TGFB sinyal ileti yolağı ve GABA sinyal ileti yolağı anlamlı değişiklik gösteren yolaklardandır ve çalışmamız da bu verileri destekler niteliktedir. Çalışmamızda, farklı olarak örnekler taze dokulardan elde

edilmiş, sadece transkriptom seviyesinde inceleme yapılmıştır. Çalışmaya katılan hastaların sağ kalım süreleri ile ilgili özelliklerine ulaşamadığından değerlendirilememiştir.

Merkezi sinir sistemi tümörlerinin en habisi olan glioblastoma, tümör hücrelerinin etrafındaki normal parankimi istila etmesi nedeniyle, cerrahi operasyonlarda klinisyenlere zorluk çıkartır. Bu nedenle çevre dokunun da çıkarılmasıyla tümörlü dokunun uzaklaştırılması sağlanır. Çıkarılan çevre dokunun dış kısmı, çalışmamızda kontrol dokusu olarak kullanılmış, normal doku olduğu patologlar tarafından onaylanmıştır. Glioblastomada ifadesi farklılaşan genleri tespit etmek için tümör ve kontrol dokunun aynı hastadan kullanılması ilk kez çalışmamızda gerçekleştirilmiştir. PCA analizi ile moleküler olarak birbirine benzeyen tümör-normal doku çiftlerinin çıkarılması sonucu farklılaşan genlerin tespiti daha etkili olmuştur. Buna göre, sinir iletiminde görevli olan aksonal yönlendirmeli sinyal iletim yolağı, ifadesi en çok değişen yolak olarak karşımıza çıkmaktadır. Sinir sistemi boyunca iki nöron arasında etkileşimi sağlayan nörotransmitter salınımı ile ilişkili Glutamat, Dopamin ve GABA sinyal iletim yollarında da değişiklikler saptanmıştır. IPA analizinde elde edilen en çok değişim gösteren üst düzenleyicilerden *MITF* geninin glioblastomada ifadesi ilk kez saptanmıştır. RT PZR’de doğrulama için seçilen genler de üst düzenleyici genlerdir. Yeni nesil dizilemede anlamlı sonuç bulunduğu için seçilen genlerin RT-PZR de anlamlılık göstermemesi, örnek sayısının artırılarak çalışmanın gerçekleşmesi gerektiğini göstermektedir. Çalışmamızda bazı üst düzenleyicilerin tespiti gerçekleşmiş, *NUPRI* geninin *MYC* onkogeni üzeri ile etkileşimi, *ANXA2* geninin *CACNA1C* tarafından düzenlendiği, *TGFBI*’in tümör mikroçevresinde etkili olan *CPXMI*, *POSTN* ve *COL18A1* genlerini düzenlediği ve böylece glioblastomada temel bir düzenleyici olduğu desteklenmiştir. Daha önce literatürde belirtilmemiş olan ve verilerimizde ifadesi artan *FAM180A* ve *DMBX1* genleri ve ifadesi azalan *KCNV1* geni glioblastomada ilk kez gösterilmiştir. Bu genlerin glioblastomanın hücre yayılımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada glioblastomada hedeflenmiş RNA düzeyinde ifadesi farklılaşan genleri tespit ettik. Bulunan genlerin, genlerin birbirleri ile olan etkileşimlerinin ve glioblastomadaki işlevsel etkilerinin ileriki çalışmalarda aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A ve ark. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2014; 24(5), 429-435. doi:10.1111/bpa.12171
2. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen YW, Dowling J ve ark. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology* 2014; 16, 1-63. doi:10.1093/neuonc/nou223
3. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ ve ark. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *Journal of Neuro-Oncology* 2012; 107(1), 207-212. doi:10.1007/s11060-011-0738-7
4. Lombardi MY, Assem M. Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story İçinde, editor. *Glioblastoma*. Australia; 2017. pp. 3-25.
5. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F ve ark. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95(2), 190-198. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190
6. MacKenzie DJ. A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. *Canadian Medical Association Journal* 1926; 16(7), 872-872.
7. Peiffer J, Kleihues P. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathology* 1999; 9(2), 241-245.
8. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL ve ark. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64(19), 6892-6899. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
9. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS ve ark. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(10), 1985-1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
10. Braganza MZ, Kitahara CM, Berrington de Gonzalez A, Inskip PD, Johnson KJ, Rajaraman P. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol* 2012; 14(11), 1316-1324. doi:10.1093/neuonc/nos208
11. Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Hepworth SJ, van Tongeren M, Muir KR, McKinney PA. History of allergic disease and risk of meningioma. *American Journal of Epidemiology* 2007; 165(5), 477-485. doi:10.1093/aje/kwk048
12. Wigertz A, Lonn S, Schwartzbaum J, Hall P, Auvinen A, Christensen HC ve ark. Allergic conditions and brain tumor risk. *American Journal of Epidemiology* 2007; 166(8), 941-950. doi:10.1093/aje/kwm203
13. Berg-Beckhoff G, Schuz J, Blettner M, Munster E, Schlaefter K, Wahrendorf J ve ark. History of allergic disease and epilepsy and risk of glioma and meningioma (INTERPHONE study group, Germany). *European Journal of Epidemiology* 2009; 24(8), 433-440. doi:10.1007/s10654-009-9355-6
14. Il'yasova D, McCarthy B, Marcello J, Schildkraut JM, Moorman PG, Krishnamachari B ve ark. Association between Glioma and History of Allergies, Asthma, and Eczema: A Case-Control Study with Three Groups of Controls. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2009; 18(4), 1232-1238. doi:10.1158/1055-9965.Epi-08-0995
15. Wiemels JL, Wiencke JK, Sison JD, Miike R, McMillan A, Wrensch M. History of allergies among adults with glioma and controls. *International Journal of Cancer* 2002; 98(4), 609-615. doi:10.1002/ijc.10239
16. McCarthy BJ, Rankin K, Il'yasova D, Erdal S, Vick N, Ali-Osman F ve ark. Assessment of Type of Allergy and Antihistamine Use in the Development of Glioma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2011; 20(2), 370-378. doi:10.1158/1055-9965.Epi-10-0948
17. Wrensch M, Weinberg A, Wiencke J, Masters H, Miike R, Barger G ve ark. Does prior infection with Varicella-Zoster virus influence risk of adult glioma? *American Journal of Epidemiology* 1997; 145(7), 594-597.

18. Wrensch M, Weinberg A, Wiencke J, Miike R, Sison J, Wiemels J ve ark. History of chickenpox and shingles and prevalence of antibodies to varicella-zoster virus and three other herpesviruses among adults with glioma and controls. *American Journal of Epidemiology* 2005; 161(10), 929-938. doi:10.1093/aje/kwi119
19. Hochberg F, Toniolo P, Cole P. Nonoccupational Risk Indicators of Glioblastoma in Adults. *Journal of Neuro-Oncology* 1990; 8(1), 55-60.
20. Yang M, Guo WW, Yang CS, Tang JQ, Huang Q, Feng SX ve ark. Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2017; 12(5). doi:ARTN e0175136
10.1371/journal.pone.0175136
21. Karcher S, Steiner HH, Ahmadi R, Zoubaa S, Vasvari G, Bauer H ve ark. Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *Int J Cancer* 2006; 118(9), 2182-2189. doi:10.1002/ijc.21648
22. de Castro-Costa CM, de Araujo RW, de Arruda MA, de Araujo PM, de Figueiredo EG. Increased intracranial pressure in a case of spinal cervical glioblastoma multiforme. Analysis of these two rare conditions. *Arq Neuropsiquiatr* 1994; 52(1), 64-68.
23. Mazzone D, Magro G, Lucenti A, Grasso S. Report of a Case of Congenital Glioblastoma-Multiforme - an Immunohistochemical Study. *Childs Nervous System* 1995; 11(5), 311-313. doi:Doi 10.1007/BF00301767
24. Mujic A, Hunn A, Taylor AB, Lowenthal RM. Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *J Clin Neurosci* 2006; 13(6), 677-681. doi:10.1016/j.jocn.2005.08.016
25. Robert M, Wastie M. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomed Imaging Interv J* 2008; 4(1), e3. doi:10.2349/bij.4.1.e3
26. Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol* 2001; 53(2), 129-147.
27. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102(13), 932-941. doi:10.1093/jnci/djq187
28. Nikiforova MN, Hamilton RL. Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(5), 558-568. doi:10.1043/2010-0649-RAIR.1
29. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H ve ark. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* 2015; 372(26), 2499-2508. doi:10.1056/NEJMoa1407279
30. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA ve ark. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* 2016; 164(3), 550-563. doi:10.1016/j.cell.2015.12.028
31. Brat DJ, Verhaak RGW, Al-Dape KD, Yung WKA, Salama SR, Cooper LAD ve ark. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *New England Journal of Medicine* 2015; 372(26), 2481-2498. doi:10.1056/NEJMoa1402121
32. Chen L, Voronovich Z, Clark K, Hands I, Mannas J, Walsh M ve ark. Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma. *Neuro Oncol* 2014; 16(11), 1478-1483. doi:10.1093/neuonc/nou097
33. Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA ve ark. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* 2014; 5(6), 1515-1525. doi:DOI 10.18632/oncotarget.1765
34. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2013; 126(6), 931-937. doi:10.1007/s00401-013-1163-0
35. Ludwig K, Kornblum HI. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol* 2017; 134(3), 505-512. doi:10.1007/s11060-017-2379-y
36. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170(5), 1445-1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011

37. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K ve ark. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012; 482(7384), 226-231. doi:10.1038/nature10833
38. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF ve ark. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012; 3(7), 709-722. doi:10.18632/oncotarget.588
39. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2009; 2(87), re6. doi:10.1126/scisignal.287re6
40. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(21), 8602-8606.
41. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(1), 11-22. doi:10.1038/nrc969
42. Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell* 2003; 12(4), 889-901.
43. Patil CG, Nuno M, Elramisy A, Mukherjee D, Carico C, Dantis J ve ark. High levels of phosphorylated MAP kinase are associated with poor survival among patients with glioblastoma during the temozolomide era. *Neuro Oncol* 2013; 15(1), 104-111. doi:10.1093/neuonc/nos272
44. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino Mdel C, Otero A, Lopes MC ve ark. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol* 2015; 185(7), 1820-1833. doi:10.1016/j.ajpath.2015.02.023
45. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P ve ark. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2000; 80(1), 65-72.
46. Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16(4), 1094-1099. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0787
47. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455(7216), 1061-1068. doi:10.1038/nature07385
48. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49, 223-241. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723
49. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128(4), 683-692. doi:10.1016/j.cell.2007.01.029
50. Kloosterhof NK, de Rooij JJ, Kros M, Eilers PH, Silveis Smitt PA, van den Bent MJ ve ark. Molecular subtypes of glioma identified by genome-wide methylation profiling. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52(7), 665-674. doi:10.1002/gcc.22062
51. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, Mori M ve ark. Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 2003; 22(49), 7862-7865. doi:10.1038/sj.onc.1207082
52. Martinez R, Schackert G, Esteller M. Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2007; 82(2), 133-139. doi:10.1007/s11060-006-9264-4
53. Mellai M, Piazzini A, Caldera V, Annovazzi L, Monzeglio O, Senetta R ve ark. Promoter hypermethylation of the EMP3 gene in a series of 229 human gliomas. *Biomed Res Int* 2013; 2013, 756302. doi:10.1155/2013/756302
54. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T ve ark. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005; 85(2), 165-175. doi:10.1038/labinvest.3700223
55. Stone AR, Bobo W, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG, Vertino PM. Aberrant methylation and down-regulation of TMS1/ASC in human glioblastoma. *Am J Pathol* 2004; 165(4), 1151-1161. doi:10.1016/S0002-9440(10)63376-7

56. Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology* 2009; 32(1), 21-29. doi:10.1159/000170088
57. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA ve ark. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol* 2009; 11(3), 281-291. doi:10.1215/15228517-2008-090
58. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W ve ark. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010; 6(1), 39-51. doi:10.1038/nrneurol.2009.197
59. van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* 2010; 120(3), 297-304. doi:10.1007/s00401-010-0725-7
60. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD ve ark. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17(1), 98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
61. Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jager D ve ark. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 2010; 20(1), 245-254. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00352.x
62. Horbinski C, Kofler J, Kelly LM, Murdoch GH, Nikiforova MN. Diagnostic use of IDH1/2 mutation analysis in routine clinical testing of formalin-fixed, paraffin-embedded glioma tissues. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68(12), 1319-1325. doi:10.1097/NEN.0b013e3181c391be
63. van den Bent MJ, Hartmann C, Preusser M, Strobel T, Dubbink HJ, Kros JM ve ark. Interlaboratory comparison of IDH mutation detection. *J Neurooncol* 2013; 112(2), 173-178. doi:10.1007/s11060-013-1056-z
64. Yoshimoto K, Dang J, Zhu S, Nathanson D, Huang T, Dumont R ve ark. Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples. *Clin Cancer Res* 2008; 14(2), 488-493. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1966
65. Weller M, Kaulich K, Hentschel B, Felsberg J, Gramatzki D, Pietsch T ve ark. Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. *Int J Cancer* 2014; 134(10), 2437-2447. doi:10.1002/ijc.28576
66. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A ve ark. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol* 2014; 10(7), 372-385. doi:10.1038/nrneurol.2014.100
67. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 2010; 120(5), 567-584. doi:10.1007/s00401-010-0736-4
68. Yang SH, Lee KS, Yang HJ, Jeon BH, Lee YS, Nam SW ve ark. O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase promoter methylation assessment by microdissection-assisted methylation-specific PCR and high resolution melting analysis in patients with glioblastomas. *J Neurooncol* 2012; 106(2), 243-250. doi:10.1007/s11060-011-0668-4
69. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC ve ark. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* 2008; 18(4), 520-532. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00153.x
70. Lalezari S, Chou AP, Tran A, Solis OE, Khanlou N, Chen W ve ark. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol* 2013; 15(3), 370-381. doi:10.1093/neuonc/nos308
71. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C ve ark. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 2015; 17 Suppl 4, iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189
72. Fazi B, Felsani A, Grassi L, Moles A, D'Andrea D, Toschi N ve ark. The transcriptome and miRNome profiling of glioblastoma tissues and peritumoral regions highlights molecular pathways

- shared by tumors and surrounding areas and reveals differences between short-term and long-term survivors. *Oncotarget* 2015; 6(26), 22526-22552. doi:10.18632/oncotarget.4151
73. Ghosh S, Dutta S, Thorne G, Boston A, Barfield A, Banerjee N ve ark. Core Canonical Pathways Involved in Developing Human Glioblastoma Multiforme (GBM). *Int J Sci Res Sci Eng Technol* 2017; 3(1), 458-465.
74. Ferrer VP, Neto VM, Mentlein R. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia* 2018; 66(8), 1542-1565. doi:10.1002/glia.23309
75. Mancino M, Ametller E, Gascon P, Almendro V. The neuronal influence on tumor progression. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 2011; 1816(2), 105-118. doi:10.1016/j.bbcan.2011.04.005
76. Pereira MSL, Klamt F, Thome CC, Worm PV, de Oliveira DL. Metabotropic glutamate receptors as a new therapeutic target for malignant gliomas. *Oncotarget* 2017; 8(13), 22279-22298. doi:10.18632/oncotarget.15299
77. Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Research* 1999; 59(17), 4383-4391.
78. Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P. DARPP-32: An integrator of neurotransmission. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2004; 44, 269-296. doi:DOI 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121415
79. Bartek J, Hodny Z. Dopamine signaling: target in glioblastoma. *Oncotarget* 2014; 5(5), 1116-1117. doi:10.18632/oncotarget.1835
80. Lan YL, Wang X, Xing JS, Lou JC, Ma XC, Zhang B. The potential roles of dopamine in malignant glioma. *Acta Neurol Belg* 2017; 117(3), 613-621. doi:10.1007/s13760-016-0730-2
81. El-Habr EA, Dubois LG, Burel-Vandenbos F, Bogeas A, Lipecka J, Turchi L ve ark. A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. *Acta Neuropathol* 2017; 133(4), 645-660. doi:10.1007/s00401-016-1659-5
82. Shibasaki T, Uki J, Kanoh T, Kawafuchi J. Composition of free amino acids in brain tumors. *Acta Neurol Scand* 1979; 60(5), 301-311.
83. Fang X, Wang C, Balgley BM, Zhao K, Wang W, He F ve ark. Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas. *J Proteome Res* 2012; 11(8), 3937-3946. doi:10.1021/pr300303t
84. Schwechheimer K, Laufle RM, Schmahl W, Knodlseder M, Fischer H, Hofler H. Expression of neu/c-erbB-2 in human brain tumors. *Hum Pathol* 1994; 25(8), 772-780.
85. Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest* 2017; 97(6), 649-656. doi:10.1038/labinvest.2017.9
86. Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R ve ark. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 2006; 19(4), 290-302. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x
87. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P ve ark. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(Web Server issue), W214-220. doi:10.1093/nar/gkq537
88. Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Gothert JR, Lausen J. Tal1 regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *FASEB J* 2012; 26(2), 523-532. doi:10.1096/fj.11-190850
89. Thomas C, Gustafsson JA. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26(9), 467-476. doi:10.1016/j.tem.2015.06.007
90. Ping Y, Deng Y, Wang L, Zhang H, Zhang Y, Xu C ve ark. Identifying core gene modules in glioblastoma based on multilayer factor-mediated dysfunctional regulatory networks through integrating multi-dimensional genomic data. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(4), 1997-2007. doi:10.1093/nar/gkv074
91. Roth P, Silginer M, Goodman SL, Hasenbach K, Thies S, Maurer G ve ark. Integrin control of the transforming growth factor-beta pathway in glioblastoma. *Brain* 2013; 136(Pt 2), 564-576. doi:10.1093/brain/aws351
92. Wick W, Naumann U, Weller M. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des* 2006; 12(3), 341-349.

93. Roy LO, Poirier MB, Fortin D. Differential Expression and Clinical Significance of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in GBM Tumors. *Int J Mol Sci* 2018; 19(4). doi:10.3390/ijms19041113
94. Bryukhovetskiy I, Shevchenko V. Molecular mechanisms of the effect of TGF-beta 1 on U87 human glioblastoma cells. *Oncology Letters* 2016; 12(2), 1581-1590. doi:10.3892/ol.2016.4756
95. Iovanna JL. Expression of the stress-associated protein p8 is a requisite for tumor development. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 31(1-3), 89-98. doi:10.1385/IJGC:31:1-3:89
96. Ree AH, Tvermyr M, Engebraaten O, Rooman M, Rosok O, Hovig E ve ark. Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. *Cancer Res* 1999; 59(18), 4675-4680.
97. Li J, Ren SY, Liu YJ, Lian ZG, Dong B, Yao YQ ve ark. Knockdown of NUPR1 inhibits the proliferation of glioblastoma cells via ERK1/2, p38 MAPK and caspase-3. *Journal of Neuro-Oncology* 2017; 132(1), 15-26. doi:10.1007/s11060-016-2337-0
98. Goruppi S, Kyriakis JM. The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(20), 20950-20958. doi:10.1074/jbc.M312401200
99. Swartling FJ. Myc proteins in brain tumor development and maintenance. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2012; 117(2), 122-131. doi:10.3109/03009734.2012.658975
100. Burgoyne RD, Geisow MJ. The Annexin Family of Calcium-Binding Proteins. *Cell Calcium* 1989; 10(1), 1-10. doi:Doi 10.1016/0143-4160(89)90038-9
101. Zhai HY, Acharya S, Gravanis I, Mehmood S, Seidman RJ, Shroyer KR ve ark. Annexin A2 Promotes Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. *Journal of Neuroscience* 2011; 31(40), 14346-14360. doi:10.1523/Jneurosci.3299-11.2011
102. Phan NN, Wang CY, Chen CF, Sun Z, Lai MD, Lin YC. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett* 2017; 14(2), 2059-2074. doi:10.3892/ol.2017.6457
103. Payne LS, Huang PH. The pathobiology of collagens in glioma. *Mol Cancer Res* 2013; 11(10), 1129-1140. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0236
104. Lei Y, Xin X, Morgan D, Pintar JE, Fricker LD. Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metallocarboxypeptidase gene family with highest similarity to CPX-2. *DNA Cell Biol* 1999; 18(2), 175-185. doi:10.1089/104454999315565
105. Kim YH, O'Neill HM, Whitehead JP. Carboxypeptidase X-1 (CPX-1) is a secreted collagen-binding glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 468(4), 894-899. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.053
106. Berger B, Capper D, Lemke D, Pfenning PN, Platten M, Weller M ve ark. Defective p53 antiangiogenic signaling in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010; 12(9), 894-907. doi:10.1093/neuonc/noq051
107. Morimoto T, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, Hori H, Duan L ve ark. Increased levels of tissue endostatin in human malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 2002; 8(9), 2933-2938.
108. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(5), 608-616.
109. Gonzalez-Gonzalez L, Alonso J. Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. *Front Oncol* 2018; 8, 225. doi:10.3389/fonc.2018.00225
110. Watanabe T, Yasue A, Tanaka E. Hypoxia-inducible factor-1alpha is required for transforming growth factor-beta1-induced type I collagen, periostin and alpha-smooth muscle actin expression in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 2014; 59(6), 595-600. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.03.003
111. Wen W, Chau E, Jackson-Boeters L, Elliott C, Daley TD, Hamilton DW. TGF-ss1 and FAK regulate periostin expression in PDL fibroblasts. *J Dent Res* 2010; 89(12), 1439-1443. doi:10.1177/0022034510378684
112. Ebihara M, Ohba H, Kikuchi M, Yoshikawa T. Structural characterization and promoter analysis of human potassium channel Kv8.1 (KCNV1) gene. *Gene* 2004; 325, 89-96.
113. Chiara MD, Monje F, Castellano A, Lopez-Barneo J. A small domain in the N terminus of the regulatory alpha-subunit Kv2. 3 modulates Kv2.1 potassium channel gating. *Journal of Neuroscience* 1999; 19(16), 6865-6873.

114. Zhao Y, Guo S, Sun J, Huang Z, Zhu T, Zhang H ve ark. Methylcap-seq reveals novel DNA methylation markers for the diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer in a Chinese population. *Plos One* 2012; 7(4), e35175. doi:10.1371/journal.pone.0035175
115. Kosla J, Dvorak M, Cermak V. Molecular analysis of the TGF-beta controlled gene expression program in chicken embryo dermal myofibroblasts. *Gene* 2013; 513(1), 90-100. doi:10.1016/j.gene.2012.10.069
116. Penuelas S, Anido J, Prieto-Sanchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I ve ark. TGF-beta Increases Glioma-Initiating Cell Self-Renewal through the Induction of LIF in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15(4), 315-327. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.011
117. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(5), 533-544. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.001
118. Broccoli V, Colombo E, Cossu G. Dmbx1 is a paired-box containing gene specifically expressed in the caudal most brain structures. *Mechanisms of Development* 2002; 114(1-2), 219-223. doi:Pii S0925-4773(02)00078-3

Doi 10.1016/S0925-4773(02)00078-3

119. Rodrigues MF, Esteves CM, Xavier FC, Nunes FD. Methylation status of homeobox genes in common human cancers. *Genomics* 2016; 108(5-6), 185-193. doi:10.1016/j.ygeno.2016.11.001

HAM VERILER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1147

Tarih : 04.10.2016

Konu : Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU

**Sayın Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU
Moleküler Genetik**

İlgi: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığının 03/10/2016 gün ve 352268 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Uzm. Biyolog Didem SEVEN' in yürüteceği 2016/1126 dosya numaralı "Glioblastoma Multiformeli Hastalarda Transkriptom Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 30/09/2016 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

**İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı**

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

PATENT HAKKI IZNI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

“GLİOBLASTOMA MULTİFORMELİ HASTALARDA TRANSKRİPTOM ANALİZİ”

Yazar Didem Seven

Gönderim Tarihi: 15-Kas-2018 10:48AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1039488883

Dosya adı: rmeli_Hastalarda_Transkriptom_Analizi__ntihal_De_erlendirme.docx (181.47K)

Kelime sayısı: 11016

Karakter sayısı: 76793

"GLİOBLASTOMA MULTİFORMELİ HASTALARDA TRANSKRİPTOM ANALİZİ"

ORJİNAL RAPORU

%3

BENZERLİK ENDEKSİ

%2

İNTERNET
KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%1

2

**"Abstracts from the 50th European Society of
Human Genetics Conference: Electronic
Posters", European Journal of Human
Genetics, 2018**

Yayın

<%1

3

www.cumhuriyet.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

4

**Ebru KORKMAZ, Yasemin BULUT, Adnan
SEYREK, İ. Hanifi ÖZERCAN, Zülal Aşçı
TORAMAN. "Investigation of the Prevalence of
HPV DNA Types 16, 18, 31 and 33 in Malignant
Lesions of the Upper Respiratory Tract",
Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences,
2010**

Yayın

<%1

5

journals.plos.org

İnternet Kaynağı

<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Didem	Soyadı	Seven
Doğ.Yeri	Siirt	Doğ.Tar.	26.06.1985
Uyruğu	TC	TC Kim No	34519710662
Email	didemseven@gmail.com	Tel	05353723845

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü	
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji	2012
Lisans	Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Beylikdüzü 75.Yıl Cumhuriyet Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar-Ge Sorumlusu	Medsantek Ltd. Şti	2012-2017
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi		
Almanca	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Word	İyi
MS Excel	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

YAYINLAR

1. Knaup KX, Hackenbeck T, Popp B, Stoeckert J, Wenzel A, Büttner-Herold M, Pfister F, Schueler M, **Seven D**, May AM, Halbritter J, Gröne HJ, Reis A, Beck BB, Amann K, Ekici AB, Wiesener MS. Biallelic Expression of Mucin-1 in Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease: Implications for Nongenetic Disease Recognition. J Am Soc Nephrol. 2018 Jul. ASN.2018030245
2. Ekizoglu S, **Seven D**, Ulutin T, Guliyev J, Buyru N. Investigation of the SLC22A23 gene in laryngeal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2018 Apr 27;18(1):477.
3. **Seven D**, Dogan S, Kiliç E, Karaman E, Koseoglu H, Buyru N. Downregulation of Rab25 activates Akt1 in head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Lett. 2015 Sep;10(3):1927-1931.
4. Ekizoglu S, Dogan S, Ulker D, **Seven D**, Gozen ED, Karaman E, Buyru N. The effect of LKB1 on the PI3K/Akt pathway activation in association with PTEN and PIK3CA in HNC. Clin Otolaryngol. 2015 Dec;40(6):622-8.
5. **Seven D**, Yavuz E, Kilic E, Baltaci E, Karaman E, Ulutin T, Buyru N. DLEC1 is not silenced solely by promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. Gene. 2015 May 25;563(1):83-6.
6. Tigli H, **Seven D**, Tunc M, Sanli O, Basaran S, Ulutin T, Buyru N. LKB1 mutations and their correlation with LKB1 and Rheb expression in bladder cancer. Mol Carcinog. 2013 Aug;52(8):660-5.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Aletli dalış, yürüyüş.