



***LRP5* SUSTURMA İŞLEMİNİN GLİOBLASTOM
HÜCRELERİNDEKİ ANTI-KANSER ETKİNLİĞİNİN
TANIMLANMASI**

Ashhan KÜÇÜK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR**

**2024
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***LRP5* SUSTURMA İŞLEMİNİN GLİOBLASTOM HÜCRELERİNDEKİ ANTİ-
KANSER ETKİNLİĞİNİN TANIMLANMASI**

Aslıhan KÜÇÜK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2024

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

19/07/2024

İmzası

Aslıhan KÜÇÜK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***LRP5* SUSTURMA İŞLEMİNİN GLİOBLASTOM HÜCRELERİNDEKİ ANTI-KANSER ETKİNLİĞİNİN TANIMLANMASI**

Aslıhan KÜÇÜK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR

Glioblastom (GBM) agresif davranış sergileyen malign bir beyin tümörüdür. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı GBM tümörlerinin gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun bileşeni olan Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein 5 (*LRP5*) ifadesinin GBM ve insan Beyin Kanser Kök Hücre (BCSC) hücrelerinde baskılanması sonrası olası anti-kanser etkinin tanımlanmasıdır. Bununla birlikte, *LRP5* ifadesi baskılanmış hücrelere Temozolomid (TMZ) uygulandıktan sonra oluşan anti-kanser etkinlik de incelenmiştir. Çalışma U87MG, T98G ve (BCSC) hatları üzerinde gerçekleştirildi. Belirtilen hücre hatlarında *LRP5* ifadesi siRNA aracılığıyla susturuldu. Susturma işlemi sonrası *LRP5*, Wnt/ β -katenin yolağı hedefi olan ve G0/G1 hücre döngüsü düzenleyici genlerinin mRNA ve protein düzeyindeki ifade değişimleri sırasıyla kantitatif PCR (qPCR) ve Western-Blot yöntemleri ile tanımlandı. Baskılama işlemi ve/veya TMZ uygulanan hücre hatlarında proliferasyon değişimi Hücre Canlılığı Tespiti Kiti-8 (CVDK-8) testi ile incelendi. Uygulamaların apoptoz üzerindeki etkisini belirlemek için DNA fragment oluşum testi kullanıldı. Baskılanmış *LRP5* ifadesi ve/veya TMZ'nin koloni oluşturma ve invazyon kapasiteleri üzerindeki etkileri yara iyileşme ve klonojenik testler ile tanımlandı. Baskılama işlemi sonrası GBM ve BCSC hücrelerinde *LRP5* ve Wnt/ β -katenin yolağının hedefinde olan genlerin ifadeleri azaldı. Benzer bir biçimde, hücre döngüsünün G0/G1 evresini düzenleyen genlerin ifadelerinde de azalma saptandı. GBM ve BCSC hücrelerinde *LRP5*'in baskılanması hücre proliferasyonunu azalttığı gibi TMZ ile birlikte uygulanması anti-proliferatif etkinliği arttırdı. *LRP5* ifadesinin baskılanması tek başına ve TMZ ile birlikte GBM ve BCSC hücrelerinin invaziv özelliklerini anlamlı olarak azalttı. Sonuçlar, baskılanmış *LRP5* ifadesinin GBM ve BCSC hücrelerinde anti-kanser etki oluşturduğuna ve *LRP5*'in baskılanması durumunda TMZ etkinliğinin artabileceğine dikkat çekmektedir. *LRP5*, GBM tedavisi için umut verici terapötik bir hedef olabilir.

2024, 59 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glioblastom, *LRP5*, Temozolomid, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı

ABSTRACT

MS. Thesis

IDENTIFICATION OF THE ANTI-CANCER EFFECT OF SILENCING OF *LRP5* IN GLIOBLASTOMA CELLS

Aslıhan KÜÇÜK

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR

Glioblastoma (GBM) is a malignant brain tumor exhibiting aggressive behavior. The Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a critical role in the development of GBM tumors. This study aims to identify the potential anti-cancer effects following the suppression of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (*LRP5*) expression, a component of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, in GBM and human brain cancer stem cell (BCSC) cells. Additionally, the anti-cancer effects after the Temozolomide (TMZ) treatment with the suppression of *LRP5* expression were examined. The study was conducted on U87MG, T98G, and BCSC lines. In these cell lines, *LRP5* expression was silenced via siRNAs. Following the silencing process, changes in the mRNA and protein expression levels of *LRP5*, Wnt/ β -catenin pathway targets, and G0/G1 cell cycle regulatory genes were identified using quantitative PCR (qPCR) and Western Blot methods, respectively. The cell proliferation after silencing and/or TMZ treatment were examined using the Cell Viability Detection Kit 8 (CVDK-8) assay. The DNA fragmentation test was used to determine the effects of the treatments on apoptosis. The effects of suppressed *LRP5* expression and/or TMZ on colony formation and invasion capacities were identified using wound healing and clonogenic assays. After the silencing process, the expression levels of *LRP5* and target genes of the Wnt/ β -catenin pathway decreased in GBM and BCSC cells. Similarly, a decrease was observed in the expression levels of genes regulating the G0/G1 phase of the cell cycle. Suppression of *LRP5* in GBM and BCSC cells not only reduced cell proliferation but also increased the anti-proliferative effect when combined with TMZ. Suppression of *LRP5* expression alone and in combination with TMZ significantly reduced the invasive properties of GBM and BCSC cells. The results indicate that suppressed *LRP5* expression exerts an anti-cancer effect in GBM and BCSC cells and that TMZ efficacy may be enhanced when *LRP5* is suppressed. *LRP5* could be a promising therapeutic target for GBM treatment.

2024, 59 Page

Keywords: Glioblastoma, *LRP5*, Temozolomide, Wnt/ β -catenin signaling pathway

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 3501 kariyer programı kapsamında 122Z063 numaralı proje ile desteklenmiştir. Yüksek lisans öğrenciliğim süresince TÜBİTAK tarafından sağlanan burs desteğinden dolayı TÜBİTAK'a

Yüksek lisans eğitimim sürecince, laboratuvar çalışmalarım ve tez sürecimin her aşamasında anlayışı ve sabrı ile desteği ve ilgisini asla esirgemeyen, çalışma disiplini ile lisansüstü eğitimimde yol gösteren çok kıymetli ve saygıdeğer hocam Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR'a

Tez çalışmalarım süresince desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a

Yüksek Lisans eğitimimin ve tez çalışmalarımın başladığı andan itibaren, bu uzun ve zorlu süreçte her birinden ayrı ayrı çok şey öğrendiğim, aynı laboratuvar ortamını paylaştığım, her koşulda çekinmeden, aklıma takılan her soruyu rahatça sorabildiğim ve olumsuz her durumda beni rahatlatıp motive eden başta kıymetli hocam Öğr. Gör. Dr. Neslişah BARLAK olmak üzere Dr. Fatma ŞANLI, Abdülmelik AYTATLI, Ahsen KILIÇ, Dr. Özel ÇAPIK, Mesut AKYÜZ, M. Süleyman ÇELİK'e ve lisansüstü eğitimine başladıkları andan itibaren benimle beraber öğrenen ve yardımlarını esirgemeyen Mustafa KARABABA ve Kübra YILDIRIM'a

Bu süreçte desteğini ve sevgisini asla esirgemeyen kıymetli ev arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Nergis ULAŞ'a ve son olarak bugünlere kadar beni sonsuz anlayış ve sevgi ile getiren, bu zorlu süreçte desteklerini hiç eksik etmeyen, bana ve emeğime daima güvenen kıymetli annem, babam ve daima yanımda olan kardeşlerime

Sonsuz teşekkürler...

Aslıhan KÜÇÜK
Temmuz 2024

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. GBM’de Tedavi Yaklaşımları.....	1
1.2. GBM’de Temozolomid Uygulamaları	2
1.3. Wnt Sinyal Yolağı.....	3
1.4. GBM’de Wnt Sinyal Yolağının Rolü.....	5
1.5. TMZ’nin Wnt Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi.....	8
1.6. GBM’de Wnt Sinyal Yolağına İlişkin “ <i>In-Silico</i> ” Analiz.....	8
1.7. Gen İfadesinin Baskılanmasına Yönelik Girişimler	9
1.8. GBM Hücrelerinde Wnt/ β -katenin’in siRNA Aracılığıyla Baskılandığı Çalışmalar	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Mikrodizin Veri Analizi.....	19
3.2. Protein-Protein Etkileşim Ağının Oluşturulması ve Aday Genlerin Belirlenmesi ..	19
3.3. TCGA GBM Veri Setinde Aday Gen İfadelerinin Tanımlanması.....	20
3.4. GBM Olgularında <i>LRP5</i> ve <i>MYC</i> İfadeleri Arasındaki Birlikteliğin Saptanması ...	20
3.5. Hücre Kültürü.....	20
3.6. siRNA Aracılığıyla <i>LRP5</i> Gen İfadesinin Baskılanması	20
3.6.1. Susturma işlemi sonrası tüm RNA izolasyonu.....	22
3.6.2. cDNA sentezi	22
3.6.3. Susturma işlemi sonrası <i>LRP5</i> ve diğer genlere ait mRNA ifadelerinin tanımlanması	23
3.6.4. Susturma işlemi sonrası genlerin protein düzeyindeki ifadelerinin tanımlanması	25

3.7. Hücre Canlılık Testi	27
3.8. Genomik DNA Fragment Testi	28
3.9. Yara İyileşme Testi	29
3.10. Klonojenik Test	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	30
4.1. GBM Kanseri Kök Hücreleri Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu İlişkili Genleri Yüksek Düzeyde İfade Eder	30
4.2. Aday Genlerin Belirlenmesi	31
4.3. <i>FZD7</i> , <i>LEF1</i> ve <i>LRP5</i> Genleri GBM Tümörlerinde Yüksek Düzeyde İfade Edilir	32
4.4. GBM Olgularında <i>MYC</i> ve <i>LRP5</i> İfadeleri Arasında Pozitif Yönde Bir Korelasyon Vardır	34
4.5. <i>LRP5</i> 'in GBM ve BCSC Hücrelerinde Baskılanması Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu İnkaktif Eder	35
4.6. GBM ve BCSC Hücrelerinde <i>LRP5</i> 'in Baskılanması Proliferasyonu Azaltır	37
4.7. GBM ve BCSC Hücrelerinde Baskılanmış <i>LRP5</i> İfadesinin Apoptoz Üzerindeki Etkisi	39
4.8. Baskılama İşlemi GBM ve BCSC Hücrelerinde Hücre Döngüsü Düzenleyici Genlerin İfadesini Değiştirir	40
4.9. Azalan <i>LRP5</i> İfadesi GBM ve BCSC Hücrelerinin İnvazyon Kapasitesini Azaltır	43
4.10. Baskılanmış <i>LRP5</i> İfadesi GBM ve BCSC Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyelini Düşürür	45
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

w/v	Ağırlık/Hacim
β	Beta
°	Derece
rpm	Devir/dakika
Gy	Gray
v/v	Hacim/Hacim
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonu
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

ALL	Akut lenfoblastik lösemi
APC	Adenomatöz polipozis koli
BCSC	Beyin kanseri kök hücresi
BER	Baz çıkarma onarım mekanizması
CK1	Kazein kinaz 1
CVDK-8	“Cell Viability Detection Kit 8”
DAAM1	“Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1”
DvL	“Disheveled”
FZD	“Frizzled”
GBM	Glioblastom

GEO	<i>“Gene Expression Omnibus”</i>
<i>GOLM1</i>	Golgi membran proteini 1
GSK-3 β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
IDH	İzositrat dehidrogenaz
JAK1	Janus kinaz 1
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KKH	Kanser kök hücresi
<i>LRP5</i>	<i>“Low-density lipoprotein receptor-related protein 5”</i>
MCC	<i>“Maximal Clique Centrality”</i>
MCODE	Moleküler kompleks tanımlama modülü
<i>MGMT</i>	O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
MMR	DNA hata onarım mekanizması
NKD1	<i>“Naked cuticle 1”</i>
PBS	Fosfat Tampon Salın
PKC	Protein kinaz C
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
PPI	Protein-protein etkileşim ağı
qPCR	Kantitatif PCR
RNAi	RNA interferans
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi
siRNA	Küçük interferan RNA
TCF/LEF	<i>“T-cell factor/lymphoid enhancer factor”</i>
TCGA	<i>“The Cancer Genome Atlas”</i>
TMZ	Temozolomid
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Wnt	<i>“Wingless/Int1”</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyal yolağı.....	4
Şekil 4.1. GSE7181 mRNA mikroarray veri setinde Wnt sinyal yolağı için farklı şekilde ifade edilen genlerin CD133+ GBM hücrelerinde belirlenmesi. LogFC değeri 1'den büyük ve -1'den küçük olan genler tanımlandı (a). Gen ifadelerinin P değerlerine (-Log10) göre dağılımı (b). CD133+ ve CD133- hücrelerdeki gen ifadelerinin “heat-map” sunumu (c)	31
Şekil 4.2. CD133+ GBM hücrelerinde ifade artışı gösteren Wnt sinyal yolağı ilişkili genlerin arasında kurulan PPI ağı (a). MCODE analizine göre ağ içerisinde birbirleriyle etkileşim derecesi yüksek olan alt kümeler (b)	32
Şekil 4.3. Aday genlere ilişkin ifade değişimlerinin GBM tümör ve normal beyin dokusu örneklerinde karşılaştırılması (a). On aday gen içinde sadece <i>FZD7</i> , <i>LEF1</i> ve <i>LRP5</i> genlerine ait ifadenin GBM tümörlerinde artmış olduğu bulundu (b) .	33
Şekil 4.4. “Glioblastoma multiforme TCGA, Firehose Legacy” veri setindeki GBM örneklerinde <i>LRP5</i> ve <i>MYC</i> genlerinin mRNA ifadeleri arasındaki pozitif yönde kolerasyon.....	34
Şekil 4.5. U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında susturma işlemi için optimize edilen siRNA 1 ve siRNA 2 konsantrasyonlarının protein ifadesi üzerindeki etkisi	36
Şekil 4.6. U87MG (a), T98G (b) ve BCSC (c) hücre hatlarında <i>LRP5</i> ifadesi baskılandıktan 72 saat sonra, <i>LEF1</i> , <i>MYC</i> , <i>CCND1</i> ve <i>LRP5</i> gen ifadelerindeki değişim	36
Şekil 4.7. U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında <i>LRP5</i> ifadesi baskılandıktan 72 saat sonra, <i>LEF1</i> , <i>MYC</i> , <i>CCND1</i> ve <i>LRP5</i> protein ifadelerindeki değişim.....	37
Şekil 4.8. Baskılanmış <i>LRP5</i> ifadesinin U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri	38
Şekil 4.9. GBM ve BCSC hücre hatlarında TMZ'nin IC50 konsantrasyonlarının tanımlanması (a) ve TMZ/siRNA kombine uygulamasının GBM ve BCSC proliferasyonu üzerindeki etkisi (b)	38
Şekil 4.10. Baskılama işlemi gerçekleştirilen hücre hatlarında genomik DNA fragmentlerinin farklı uygulama gruplarında gösterilmesi.....	40

Şekil 4.11. siRNA ile <i>LRP5</i> ifadesi baskılanan ve siRNA ile birlikte TMZ uygulanan U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında hücre döngüsü düzenleyici genlerin mRNA ifade düzeylerindeki değişimler.....	41
Şekil 4.12. <i>LRP5</i> ifadesinin baskılandığı T98G, U87MG ve BCSC hücre hatlarında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ifade seviyelerindeki değişim	43
Şekil 4.13. Baskılama işlemi gerçekleştirilen hücre hatlarında yara iyileşme testine ait nitel (a) ve nicel (b) sonuçlar.....	44
Şekil 4.14. <i>LRP5</i> ifadesi baskılanan hücre gruplarına ait kolojenik test sonuçları.....	46



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 3.1. GBM ve BCSC hücrelerine ait transfeksiyon içeriği.....	21
Tablo 3.2. cDNA sentezi reaksiyon içeriği	23
Tablo 3.3. cDNA sentezi ısı koşulları	23
Tablo 3.4. qPCR reaksiyonu ısı koşulları.....	24
Tablo 3.5. qPCR reaksiyonu ısı koşulları.....	25
Tablo 3.6. Poliakrilamid konsantrasyonlarına göre jel içerikleri	26



1. GİRİŞ

Glioblastom (GBM) erişkinlerde sık olarak gözlenen ve oldukça agresif davranışa sahip bir beyin tümördür. Merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaklaşık %14,5'ini ve bunlardan malign olanlarının ise yaklaşık %50'sini GBM oluşturmaktadır (Grochans et al. 2022). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre malign özellik gösteren gliomalar; anaplastik astrositom, anaplastik oligoastrositom, anaplastik oligodendrogliom ve anaplastik ependimomlar olarak sınıflandırılmaktadır (Louis et al. 2021). GBM, anaplastik astrositom grubunda yer alan dördüncü evre beyin tümörüdür. Bu hastalığın yıllık insidansı yaklaşık %4 iken tedavi sonrası 5 yıllık genel sağkalım oranı ise %5'in altındadır (Grochans et al. 2022). GBM tümörleri oldukça nadir gözlenmesine rağmen hastaların tedaviye verdikleri yanıt oldukça düşüktür (Yalamarty et al. 2023). GBM tümörleri nekroz, mikrovasküler proliferasyon ve nükleer atipi gibi histolojik özellikleri içermektedir (D'Alessio et al. 2019). Bunlara ek olarak, GBM'in histopatolojik kriterlerinin tanımlanmasında genetik değişimlerde dikkate alınmaktadır. İzositrat dehidrogenaz (*IDH*) gen mutasyonları GBM olgularının yaklaşık %12'sinde gözlenmektedir (Han et al. 2017). Farklılaşmış GBM tümörlerinde *IDH* gen mutasyonları daha sık gözlenir. Bununla birlikte, *IDH* mutasyonlarına sahip olan GBM tümörleri olmayanlara göre daha iyi bir prognoz sergiler (Shibahara et al 2015). Tüm olguların yaklaşık %90'ında bu gen mutasyon içermeyen yabanıl formda bulunmaktadır (Nelson et al. 2023). İlgili gene ait mutasyonu içermeyen tümörlerin çoğu tedavi sonrasında primer bölgede tekrar ortaya çıkar (Shibahara et al. 2015). Bu bakımdan, *IDH* gen mutasyonları GBM hastalarının tedavi yanıtı ve tedavi sonrası rekürens gelişimi hakkında bilgi veren önemli bir prognostik belirteçtir (Kim et al. 2012). *IDH1* mutasyonları çok hızlı gelişip yayılabilen birincil GBM tümörlerinde oldukça nadirdir bu nedenle *IDH1* nokta mutasyonlarına spesifik inhibitörlerin kullanımı sınırlıdır.

1.1. GBM'de Tedavi Yaklaşımları

Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi GBM tümörlerinin tedavisinde kullanılan genel yöntemlerdir (Wu et al. 2021). Bu bakımdan GBM tedavisi aslında agresif multimodal tedavi girişimlerini barındırmaktadır. Cerrahi müdahalenin amacı tümörün primer bölgeden çıkartılmasıdır ancak tümörün yerleşim yeri ve normal dokuya

aşırı invazyonu gibi nedenlerle cerrahi müdahalenin başarısı sınırlanabilir (Wu et al. 2021). Bu gibi durumlarda, radyoterapi ve kemoterapi birlikte uygulanarak cerrahi müdahale ardından geride kalan tümörün (rezidü tümör) kontrol altına alınması amaçlanmaktadır.

GBM tedavisinde sıklıkla tercih edilen yöntemlerden birisi de radyoterapidir. Bu yöntem, cerrahi operasyon sonrasında iyonize radyasyon kullanarak bölgede kalan kanser hücrelerini kontrol altına almayı, yok etmeyi veya nüks ihtimalini azaltmayı amaçlamaktadır (Rončević et al. 2023). İyonize radyasyon sayesinde GBM tümör hücrelerinin DNA'sında hasar oluşturulur ve bu sayede hücrelerde apoptoz indüklenir (Wang et al. 2018). Radyoterapi GBM'in yerleşim gösterdiği yer ve hastanın genel sağlık durumu göz önünde bulundurularak kişiye özel tedavi planı ile uygulanmaktadır (Amelio and Amichetti 2012). Geleneksel olarak fraksiyone radyoterapi, radyasyonun iletilmesi için en sık kullanılan yöntemdir ve radyoterapi sıklıkla standart fraksiyonda (30 fraksiyonda 60 Gy doz) uygulanmaktadır (Villà et al. 2014).

1.2. GBM'de Temozolomid Uygulamaları

Temozolomid (TMZ), GBM tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir alkilleyici ajandır (Zhang et al. 2012a). Bu kemoterapi ajanı, tümör hücrelerinin DNA'sını metilasyon yoluyla modifiye ederek DNA hasarına neden olur (Zhang et al. 2012a). Hücre DNA'nın hasara uğraması ise programlı hücre ölümü olan apoptozu indükler (Plesca et al. 2008). TMZ, DNA molekülünün guanin nükleobazına metil grubu aktararak iplik kırıklarına neden olur (Zhang et al. 2012a; Wesolowski et al. 2013). Dolayısıyla, TMZ'nin DNA üzerinde oluşturduğu iplik kırıkları, hata onarım mekanizmaları (MGMT, MMR ve BER) tarafından geri döndürülemeyecek kadar fazla ise hücre apoptoza sürüklenmektedir (Singh et al. 2021).

TMZ, kan beyin bariyerini (KBB) geçebildiği için merkezi sinir sistemi tümörlerinin tedavisinde özellikle etkilidir. TMZ'nin radyoterapi ile kombine olarak kullanılması, GBM hastalarının genel sağkalım sürelerini uzatmaktadır (Stupp et al. 2005). TMZ tedavisi sırasında GBM hastalarında kemik iliğinin baskılanması, nötropeni ve trombositopeni gibi yan etkiler ortaya çıkabilmektedir (Singh et al. 2021).

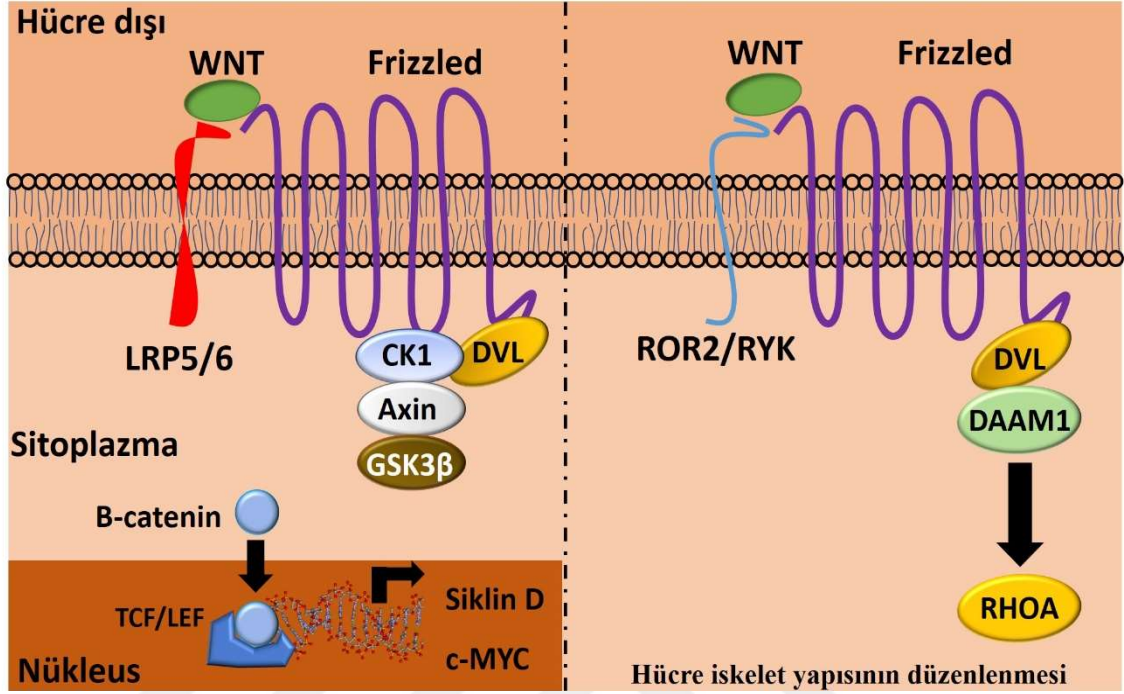
KBB'den geçebilmesi gibi önemli bir avantaja sahip olmasına rağmen, TMZ tedavisi birtakım dezavantajlara sahiptir. TMZ etkin bir anti-kanser ajanıdır ancak tedavi sonrasında bazı hastalarda tümörün nüks etmesi söz konusudur (Tseng et al. 2017). Tedaviyi olumsuz etkileyen bir diğer dezavantaj ise GBM tümörlerinin TMZ'ye karşı direnç geliştirmesidir (Lee 2016). GBM'de tümör davranışı ile birliktelik gösteren genlerden biri O-6-metilguanin-DNA-metiltransferaz'dır (*MGMT*). *MGMT*, alkilleyici ajanlardan dolayı kaynaklanabilecek mutajenik etkiyi ortadan kaldıran bir DNA tamir proteini (Pegg 2000). Promotör metilasyonuna bağlı olarak düşen *MGMT* ifadesi, GBM tedavisinde standart olarak kullanılan TMZ'nin etkinliğini arttırmaktadır (Hegi et al. 2005; Fan et al. 2013). *MGMT* promotörü hipermetile olan GBM tümörleri, hipometile olanlara göre TMZ'ye karşı daha duyarlıdır (Kitange et al. 2009). Çalışmalar, yüksek *MGMT* ifade profiline sahip olan GBM tümörlerinin TMZ'ye karşı direnç geliştirdiğini göstermektedir (Kitange et al. 2009; Perazzoli et al. 2015). Ayrıca uzun süreli TMZ kullanımında özellikle akut lenfoblastik lösemi (ALL) gibi ikincil malignitelerin meydana geldiği rapor edilmiştir (Momota et al. 2013). Bu nedenle, alternatif tedavi potansiyeline sahip yeni terapötik hedeflerin GBM'de tanımlanması oldukça önemlidir.

1.3. Wnt Sinyal Yolağı

“*Wingless/Int1*” (Wnt) sinyal yolağı β -katenin varlığında hedef genlerin ifadesini düzenleyip düzenlenmemesine göre kanonik ve kanonik olmayan şeklinde ikiye ayrılır (Miller et al. 1999; Komiyama and Habas 2008; MacDonald et al. 2009; Nayak et al. 2016). Kanonik sinyal yolağında, bir uyarıcı olarak WNT glikoproteini frizzled transmembran (FZD) reseptörüne bağlanır (Şekil 1.1.). Bu birlikteliğe “low-density lipoprotein receptor-related protein 5” (LRP5) veya LRP6 katılarak üçlü bir protein kompleksi meydana gelir. Birinci mesajcının olmadığı durumda, β -katenin proteini adenomatöz polipozis koli (APC), glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β), Axin, kazein kinaz 1 (CK1) ve “*dishevelled*” (Dvl) proteinlerinin oluşturduğu bir kompleks içerisinde. Bu yapı içerisinde GSK-3 β , β -katenin'i fosforile ederek proteozomal ubiquitinasyon sürecine sokar ve yıkımına neden olur. Ancak, Wnt aktivasyonu sonrası Axin ve Dvl proteinleri sitoplazmada bulundukları birliktelikten ayrılarak hücre membranındaki WNT-FZD-LRP kompleksine katılır. Böylece, β -katenin GSK-3 β protein kinaz tarafından fosforile edilemez ve hücre çekirdeği içerisine geçerek sinyal yolağı hedef genlerinin ifadesi için TCF/LEF ailesi transkripsiyon

1. GİRİŞ

faktörüne bağlanır (Miller et al. 1999; Komiya and Habas 2008; MacDonald et al. 2009; Nayak et al. 2016).



Şekil 1.1. Kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyal yolağı (Çağlar 2023)

Kanonik olmayan yolda ise, Wnt uyarımı sonucu gerçekleşen genlerin ifadesi β -katenin ve LRP proteinlerinin işlevlerinden bağımsız olarak gerçekleşir. Bu alternatif yolda DAAM1 aktif hale gelerek Rho üzerinden hücre iskeletinin düzenlenmesi veya Ca^{+2} iyon konsantrasyonu artışına bağlı olarak protein kinaz C (PKC) üzerinden çeşitli genlerin ifadesi gerçekleşmektedir (Miller et al. 1999; Komiya and Habas 2008; MacDonald et al. 2009; Nayak et al. 2016). Wnt sinyal yolağı merkezi sinir sisteminin gelişiminde rol oynar. Beyin gelişiminde bu sinyal yolağı nöral öncül hücrelerde bölünme, kendi benzerini oluşturma ve farklılaşma gibi süreçleri doğrudan düzenler (Knotek et al. 2020). Dolayısıyla, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla bu sinyal yolağında meydana gelebilecek yeniden düzenlenmeler GBM gibi patolojik bir olguyla sonuçlanabilir.

1.4. GBM’de Wnt Sinyal Yolağının Rolü

Beyin gelişiminde önemli bir role sahip olan Wnt sinyal yolağında meydana gelebilecek olası bir hata GBM gelişimine neden olabilir (Zhang et al. 2011). Wnt sinyali, sinir sistemiyle birlikte farklı dokuların ve organların embriyonik gelişiminde kilit bir rol oynamaktadır (Ciani and Salinas 2005). Wnt sinyali yolağı, merkezi sinir sisteminde farklı bölgelerin gelişiminde rol oynayan kortikal ve dopaminerjik öncül hücrelerin köken aldığı nöral kök hücrelerde homeostazı düzenler (Hirabayashi et al. 2004; Castelo-Branco et al. 2010). Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonu, beyin gelişiminin erken dönemlerinde nöronal öncül hücrelerin proliferasyonunu ve ilerleyen süreçte nöronal farklılaşmayı düzenler (Pei et al. 2012; Pöschl et al. 2013). Malign özellik sergileyen gliomlarda Wnt sinyal yolağında rol oynayan genlerin mutasyona uğradığı bilinmektedir (Lee et al. 2016). Denysenko et al. (2016)’ın glioma tümör doku örnekleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, Wnt-3a, β -katenin ve TCF4’ün protein düzeyindeki ifadelerini normal doku örnekleri ile kıyaslanarak incelenmiştir. Evre II ve III astrositomlarda Wnt-3a protein ifadesi düşük düzeyde iken GBM örneklerinde bu proteinin ifadesi oldukça yüksek düzeydedir. Bu sinyal yolağında hedef genlerin ifadesini düzenleyen β -katenin ve sinyali başlatan Wnt-3a protein ifadeleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmektedir. Bununla birlikte, yüksek TCF4 protein ifadesi sergileyen GBM örneklerinde, belirtilen sinyal yolağı hedeflerinden biri olan siklin D1 protein ifadesinin de yüksek olduğu tanımlanmıştır. Bu GBM tümörlerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aşırı aktive olduğunu gösteren önemli çalışmalardan biridir (Denysenko et al. 2016). Bununla birlikte, gliom kanser kök hücrelerinde (KKH), Wnt-3a’nın fonksiyonel olarak baskılanması TMZ direnci, proliferasyon ve migrasyon etkinliğini düşürmektedir (Kaur et al. 2013). TCGA veri setinin kullanıldığı “*in silico*” analiz temelli bir başka çalışmada ise, 13 farklı LRP reseptörünün mRNA düzeyindeki ifadesi 10 farklı türdeki solid tümörde incelendi (Gonias et al. 2017). GBM, hepatosellüler karsinom ve pankreatik adenokarsinoma örneklerinde *LRP1* yüksek düzeyde ifade edilirken; hepatosellüler, kolorektal, akciğer ve pankreatik karsinomlarda *LRP5* ifadesi oldukça yüksektir (Gonias et al. 2017). Çalışmanın devamında, LRP reseptörlerinin ifade düzeyleri ve GBM hastalarının sağkalım süreleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (Gonias et al. 2017). Bu çalışmalar sinyal yolağının başlangıcında rol oynayan proteinlerin GBM’de anormal aktivasyon oluşturabileceğini göstermektedir.

İlgili sinyal yolağında, diğer aracı proteinlerinde GBM'de yeniden düzenlendiği rapor edilmiştir. Wnt sinyal yolağında görev alan *DKK3* genine ait ifade seviyesindeki artış GBM'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Han et al. 2022). GBM tümörleri düşük bir oranda KKH'leri içerirler. Bu hücreler, GBM tümörlerinin tedaviye karşı direnç geliştirmesinden ve tedavi sonrasında tümörün aynı bölgede nüksetmesinden büyük ölçüde sorumludurlar (Wen and Kesari 2008; Jackson et al. 2015). Shevchenko et al. (2019)'ın çalışmasında, APC proteininin GBM KKH'lerde akış-yukarı yeniden düzenlendiği gösterilmiştir. Pećina-Slaus et al. (2011) toplam 42 GBM örneğinde Axin I protein ifadesini ve hücre içi lokalizasyonunu tanımladı. Normal beyin dokusu ile kıyaslandığında, örneklerin yaklaşık %30'unda Axin I ifadesinin anlamlı olarak azaldığı ve örneklerin bir kısmında Axin I proteininin yanlış lokalizasyon nedeniyle nükleus içerisinde var olduğu bulundu (Pećina-Slaus et al. 2011). Wnt sinyali, Frizzled ilişkili protein (sFRP) ailesine ait bir dizi antagonist (inhibitör) tarafından düzenlenebilir. sFRP'ler, Frizzled reseptörlerinin hücre dışı alanlarına veya doğrudan Wnt ligandına bağlanabilen proteinlerdir (Shi et al. 2007). GBM hücre hatlarında aşırı DNA metilasyonundan dolayı sFRP'lerin ifadesi düşüktür (Schiefer et al. 2014). Normal doku ile karşılaştırıldığında, GBM tümörlerinde SFRP1 ifadesi anlamlı olarak düşüktür (Chang et al. 2016). Bununla birlikte, bu proteinin ifadesi yüksek olan tümörlerde hastaların genel sağkalım süreleri anlamlı olarak daha uzundur (Chang et al. 2016). GBM tümör ve normal doku örneklerinin kıyaslamasından farklı olarak, gliom KKH'leri ve nöral kök hücreleri arasındaki gen ifade düzeyindeki farklılıkların tanımlanması, *SFRP1*'in gliom KKH'lerinde de anlamlı olarak daha düşük düzeyde ifade edildiğini göstermiştir (Kierulf-Vieira et al. 2016). Gliom örneklerinden elde edilen primer hücre hatlarına rekombinant SFRP1 proteini uygulandığında, nüklear β -katenin miktarı düştüğü için proliferasyon ve tümörosfer oluşumu azalır (Kierulf-Vieira et al. 2016). NKD1, Wnt sinyalini negatif düzenleyen bir diğer inhibitördür (Angonin and Van Raay 2013). *NKD1*'in mutasyona uğraması, gen ürününün Dvl proteinlerine kararsız bir biçimde bağlanmasına sebep olur. Bundan dolayı, Wnt sinyalinin inhibe edilmesi engellenmektedir (Guo et al. 2009; Angonin and Van Raay 2013). Düşük NKD1 ifadesi GBM'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Li et al. 2023). GBM hücre hatlarında bu Wnt antagonistinin aşırı ifadesi hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (Li et al. 2023). GBM'de Wnt sinyal yolağında mesajı ileten proteinlerin çeşitli nedenlerle anormal aktivasyonu kadar sinyalin durdurulmasına yönelik baskılayıcı sistemlerin inaktivasyonu da söz konusudur.

Kanonik olmayan sinyal yolağında yer alan Wnt-5a proteini RhoA GTPaz'ları aktive etmektedir (Wu et al. 2019). Bununla birlikte, DAAM1'in aktivasyonundan da sorumlu olan Wnt-5a GBM hücrelerinin migrasyon ve invazyonu teşvik eder (Liu et al. 2018a). GBM dokularında Wnt-5a ifadesinin ve RhoA aktivasyonunun aşırı bir biçimde meydana geldiği rapor edilmiştir (Liu et al. 2018a). Kanonik olmayan sinyal yolağında görev alan bir diğer protein WNT6, GBM hücrelerinin canlılık, kök hücre kapasitesi, invazyon, göç ve TMZ direnci dahil olmak üzere birçok özelliği üzerinde etkiye sahiptir (Gonçalves et al. 2018). Yüksek *WNT6* ifadesi, kötü prognoz ve artan tümör agresifliği ile ilişkilendirilmiş olup GBM hastalarında prognostik belirteç olarak tanımlanmıştır (Gonçalves et al. 2018). Düşük dereceli gliomlar ve normal beyin dokusu karşılaştırıldığında, GBM'lerde *WNT6*'nın mRNA ve protein düzeyinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Gonçalves et al. 2018). Wnt-5a ve Fzd2 gibi kanonik olmayan sinyal yolağındaki proteinler, Wnt-3a ve β -katenin gibi kanonik sinyal yolağında yer alan proteinlere göre GBM tümörlerinin tüm moleküler alt gruplarında yüksek düzeyde ifade edilmektedir (Tomba et al. 2019). İlginç bir biçimde, GBM tümörleri için her iki yolağa ait proteinler arasında pozitif anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır (Tomba et al. 2019). Primer GBM ve nüks etmiş GBM örnekleri karşılaştırıldığında, nüks etmiş GBM örneklerinde Fzd-2, Wnt-3a ve β -katenin ifadelerinin arttığı, Wnt-7b ifadesinin ise anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, *FZD10* için DNA metilasyon seviyesinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (Tomba et al. 2021). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, GBM'de kanonik olan ve olmayan Wnt sinyal yollarının anormal bir biçimde aktivasyonunu sağlayan bir takım yeniden düzenlenmelerin meydana geldiği gözlenmektedir. Bu bakımdan, GBM tedavisi için ilgili sinyal yolağı birçok terapötik hedef barındırabilir.

Ruxolitinib, JAK1/2 inhibitörüdür ve KBB'den geçebilme yeteneğine sahiptir (Ajayi et al. 2018; Haile et al. 2016). Bu inhibitör, TMZ'nin GBM ve BCSC hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptotik etkiyi arttırmaktadır (Bagca et al. 2022). Bu anti-kanser ajanlarının tek başına ve birlikte uygulandığı "*in vitro*" çalışmalarda, GBM ve BCSC hücrelerinde Wnt ilişkili genlerin ifadesi değişmektedir. Bu bakımdan, Wnt sinyal yolağının GBM'de TMZ etkinliğini artırma potansiyeli bulunmaktadır.

1.5. TMZ'nin Wnt Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi

GBM tedavisinde uygulanan TMZ'nin etki mekanizması ile Wnt sinyal yolağı arasında doğrudan bir bağlantı bulunmamaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun, GBM tümör oluşumu ve progresyonunda rol oynadığı ayrıca TMZ direncine neden olabileceği rapor edilmiştir (Tomar et al. 2020). Bazı çalışmalar, TMZ uygulanan GBM hücrelerinde Wnt sinyal yolunun aktive olduğunu ve devamında TMZ'ye karşı direnç geliştiğini vurgulamaktadır (Singh et al. 2021). Sitozolik bir adaptör protein ve Wnt sinyal yolağı düzenleyicisi olan *FERMT3*'ün ifade seviyesine bağlı olarak GBM'de TMZ direnci gelişmektedir (Lu et al. 2017). Normal doku karşılığına kıyasla, GBM tümör dokularında *FERMT3*'ün ifadesi anlamlı olarak yüksektir. Bu gen ifadesinin fonksiyonel olarak baskılanması ise glioma hücrelerinin proliferasyonunu ve TMZ direncini anlamlı olarak azaltır (Lu et al. 2017). Bir diğer çalışmada ise, baskılanmış DOC-2/DAB2 etkileşimli protein (DAB2IP) ifadesinin *ATG9B* üzerinden GBM hücrelerinde TMZ direnci meydana getirdiği bildirilmiştir (Yun et al. 2020). DAB2IP, Wnt/ β -katenin sinyal yolunu bloke ettiğinde *ATG9B* ifadesi negatif olarak düzenlenmektedir ve böylece GBM hücreleri TMZ'ye karşı daha duyarlı hale gelmektedir (Yun et al. 2020). Genel olarak, GBM hücrelerinde Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun TMZ direncine yol açtığı görülmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, eğer TMZ uygulanan GBM hücrelerinde bu sinyal yolağı aktive oluyor ve ardından direnç gelişimi meydana geliyor ise, Wnt sinyal yolağının baskılanması GBM hücrelerini TMZ'ye karşı duyarlı hale getirebilir.

1.6. GBM'de Wnt Sinyal Yolağına İlişkin “*in-silico*” Analiz

Wnt sinyal yolağı oldukça fazla genin dahil olduğu kompleks bir sinyal yolağıdır. GBM'de Wnt sinyal yolağı ile ilişki terapötik hedef olarak kullanılabilecek bir belirtecin tanımlanabilmesi için *in-silico* analizler gerçekleştirildi. Wnt sinyal yolağı genel olarak kanser kök hücrelerinde anormal bir biçimde aktive olmaktadır. Bu nedenle, GBM KKH ve GBM hücre örnekleri içeren mikrodizin veri setleri incelendi. GBM KKH'lerde ifade artışı sergileyen genlerin tanımlanması için “Gene Expression Omnibus” (GEO) veri tabanında bulunan GSE7181 mRNA mikroarray veri seti (Beier et al. 2007) kullanıldı. Wnt sinyal yolağı ile ilişkili toplamda 28 gene ait ifadenin artış gösterdiği bulundu. Aday gen sayısını düşürmek için ifadesi GBM KKH'lerde artmış 28 gen arasındaki protein-

protein etkileşim (PPI) ağı oluşturuldu. Ardından MCODE yöntemi ile 10 aday gen belirlendi. Aday genlerin GBM TGCA olgularına ait tümör örneklerindeki ifadesi GEPIA2 ağ sunucusu kullanılarak analiz edildi. Belirlenen on aday genden sadece *FZD7*, *LEF1* ve *LRP5*'in sadece GBM KKH'lerde değil aynı zamanda GBM hücrelerinde de yüksek ifade düzeyine sahip olduğu saptandı. Literatürdeki çalışmalar dikkate alındığında, GBM hücrelerinde susturma işlemi için *LRP5* aday gen olarak seçildi. “*In silico*” analizlere ait yöntem ve sonuçlar ilgili kısımlarda sunulmuştur.

1.7. Gen İfadesinin Baskılanmasına Yönelik Girişimler

Gen baskılama, hücresel düzeyde belirli bir genin ifadesini azaltmak veya tamamen engellemek amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Ghosh and Tabrizi 2017). Bu tür bir girişimde, ifadesi baskılanmak istenen geninin mRNA'sı veya DNA dizisinin kendisi ile spesifik etkileşimler gösteren çeşitli moleküller kullanılmaktadır. Gen susturma işlemi için RNA interferans (RNAi), anti-sense oligonükleotidler, CRISPR-Cas9 sistemi ve RNA aptamerleri yaygın olarak kullanılan araçlardır (Feng et al. 2021). Gen susturma tekniklerine fonksiyonel gen çalışmalarında sıklıkla başvurulmaktadır. Bir genin fonksiyonel olarak baskılanması, genin DNA dizisi veya o genden sentezlenen mRNA dizisinde kesimin yapılması veya hedef mRNA'ya bağlanan bir RNA molekülünün protein sentezini durdurması stratejilerini içerir (Feng et al. 2021). Spesifik olarak bir genin baskılanması aslında gen ürününün etkisini ortadan kaldırarak doğrudan hücre içi sinyal yolları veya metabolik süreçlerin yeniden düzenlenmesini sağlar. Bu nedenle, gen baskılama teknikleri, hücresel biyoloji ve genetik araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır ve potansiyel terapötik uygulamalarda da büyük bir ilgi görmektedir.

Küçük interferan RNA'lar (siRNA'lar), gen ifadesini hücresel düzeyde spesifik olarak baskılayan güçlü araçlardır (Kang et al. 2023). Bu çift iplikli RNA molekülleri, hücre içindeki RNA interferans (RNAi) yollarını etkinleştirerek, hedeflenen mRNA'nın parçalanmasına veya translasyonunun bloke edilmesine neden olurlar (Dana et al. 2017). Bu, belirli genlerin ifade düzeyinde baskılanması yoluyla hücresel fonksiyonların modülasyonunu mümkün kılar. Bu özelliği, siRNA'ları, özellikle kanser gibi kompleks hastalıkların tedavisinde ve hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasında güçlü bir araç haline getirir (Friedrich and Aigner 2022). siRNA'lar,

kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasına neden olan kritik sinyal yollarının baskılanmasını sağlayarak anti-kanser etkinlik gösterirler (Guo et al. 2013).

1.8. GBM Hücrelerinde Wnt/ β -katenin'in siRNA Aracılığıyla Baskılandığı Çalışmalar

Protein, enzim ve reseptörlerin kansere bağlı aşırı bir şekilde ifade edilmesi ile ilgili genler, bir RNA susturma tekniğinin kullanılması ile baskılanabilir. RNAi'ler ile yapılan baskılama işlemi GBM tedavisinde potansiyel terapötik uygulamaların sağlanmasında önemli bir yere sahiptir. Ding et al. (2019) GBM örneklerinde sağlıklı örneklerle kıyasla Golgi membran proteini 1'in (*GOLM1*) mRNA ve protein ifade seviyelerinde artış olduğunu saptamış ve GBM hücrelerinde *GOLM1* ifadesini susturmak için siRNA kullanmışlardır. siRNA ile baskılama sonucunda, hücrelerin çoğalması azalmış ve hücre döngüsü G1/S fazında duraklamıştır. GBM hücrelerinde anormal seviyede ifade olan Tankiraz1 (*TNKS1*)'in Wnt/ β -katenin ile ilişkisi siRNA baskılama yöntemiyle ortaya konmuştur (Chen et al. 2019). GBM hücrelerinde *TNKS1*'in siRNA ile baskılanması sonucunda ifade düzeyi anlamlı bir şekilde azalmıştır. Buna bağlı olarak hücre canlılığı ve invazyon yeteneğinde azalma ayrıca β -katenin ifade seviyesinde düşüş olduğu saptanmıştır (Chen et al. 2019). Wnt ligand ve reseptörlerinin mRNA ve protein düzeyindeki ifadeleri, farklı evrelerdeki astrositik gliomalarda tanımlanmıştır (Pu et al. 2009). *WNT2*, *WNT5A* ve *FZD2*'nin mRNA düzeyindeki ifadeleri normal beyin hücreleri ile kıyaslandığında glioma hücrelerinde anlamlı olarak yüksektir. Bununla birlikte, her iki grup arasında *CTNNB1* ifadesi mRNA düzeyinde anlamlı bir farklılık sergilemese de protein düzeyinde glioma'larda yüksek ifade sergiler. Sinyal yolu için birer hedef olan Siklin D1, PCNA, PI3K, MYC ve fosforile-AKT protein ifadelerinin glioma hücrelerinde anlamlı artış sergilediği ve Wnt2 ifadesinin bu proteinlerle pozitif yönde korelasyon gösterdiği saptanmıştır. *WNT2* ve *CTNNB1*'in siRNA'lar aracılığıyla ifadesel düzeyde baskılandığı glioma hücrelerinde, canlılık ve göç yetenekleri uygulamanın 24. saatinden itibaren azalmaya başlamaktadır. Bu sonuçlar, baskılanmış Wnt/ β -katenin sinyal yolağının malign glioma hücrelerinde agresif davranışı azalttığını göstermektedir. *In vitro* çalışmalar neticesinde elde edilen bulgular ayrıca "*in vivo*" olarak ksenograft fare modellerinde de doğrulanmıştır. Deney grubu farelerinde *WNT2* ve *CTNNB1*'i hedef alan siRNA'lar ile baskılama yapıldığında tümör hücrelerindeki büyüme kontrol gurubuna

kıyasla daha azdır. Sonuç olarak, bu genlerin siRNA aracılığıyla baskılanması malign glioma hücrelerinin büyümesinde anlamı bir azalma oluşturmaktadır (Pu et al. 2009). *CTNNB1*'in GBM hücrelerinde baskılanmasının ardından elde edilen bu sonuçlar Liu et al. (2011) ve Yue et al. (2010)'ın çalışma sonuçlarıyla tutarlılık sergilemektedir.

Nager et al. (2018) GBM hücrelerinde Wnt sinyalinin inhibe edilmesi sonucunda otofajinin nasıl etkilendiğini araştırmışlardır. *CTNNB1* ve *SQSTM1* ifadeleri GBM olgularında negatif kolerasyon sergilemektedir. GBM hücre hatlarında *CTNNB1*'in siRNA aracılığıyla baskılanması Sekestozom 1 (*SQSTM1*) ifade düzeyini TCF'ye bağımlı bir şekilde yükseltmektedir. Bununla birlikte mekanizma içerisinde TCF4'ün doğrudan baskılanması otofajik akışın ana düzenleyicisi olan Transkripsiyon Faktörü EB (TFEB)'nin translokasyonunu arttırmaktadır. Bu nedenle, GBM hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının baskılanması ayrıca otofajik degradasyon aktivitesini indüklemektedir. Genel olarak belirtilen sinyal yolağının GBM hücrelerinde baskılanması proliferasyonu ve migrasyon kapasitesini azaltmaktadır. Bu sinyal yolağının otofoji mekanizması ile birlikte baskılanması ise *SQSTM1* üzerinden kaspaz-8'i aktive ederek apoptozu indüklemektedir. Gen düzeyinde fonksiyonel bir yaklaşım, GBM hücrelerinde otofaji ve Wnt sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmıştır. Gen baskılama çalışmalarına göre, *SQSTM1*'in ifade düzeyindeki artış, otofaji blokerleri tarafından GBM hücrelerinin ölümünü teşvik etmek için kullanılabilir (Nager et al. 2018).

Spermatogenez ve oogeneze spesifik bHLH proteini 1'in (Sohlhl1) ifadesindeki artış astrositomlarda tümörün malignitesini düşürmektedir (Liu et al. 2018b). Bununla birlikte, GBM'de β -katenin ifadesi Sohlhl1'in ifadesi ile negatif korelasyon göstermektedir. Bu nedenle, Sohlhl1 ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için Liu et al. (2018b) baskılama tekniği üzerinde kurgulanmış bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. GBM hücre hatlarında *SOHLH1* ifadesini arttıracak bir ifade vektörü ve var olan ifadeyi baskılayacak bir siRNA'nın kullanıldığı iki grup oluşturulmuştur. *SOHLH1*'in baskılandığı durumda GBM hücrelerinin göç ve istila yetenekleri artarken, aşırı ifadesi bunun tam tersi bir etki göstermiştir. GBM hücrelerinde *SOHLH1*'in baskılanması Wnt/ β -katenin sinyal yolağının hedefi olan Siklin D1 ve MYC ifadelerinde artışa neden olmaktadır. Diğer taraftan, Sohlhl1'in ifadesinde görülen artış ise, GBM hücrelerinde β -katenin'in nükleer translokasyonunu ve birikimini

azaltmaktadır. Bu veriler, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun Sohlh1 tarafından negatif yönde düzenlendiğini ve bunun GBM hücrelerinin hücrel aktivitelerini inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Liu et al. 2018b).

Zheng et al. (2013) fosforile STAT3'ün ifade artışının GBM dokularındaki varlığını göstermiştir. Protein kinaz 2 (*CK2*), JAK/STAT3 aktivasyonundan ve IL-6 ifadesinden sorumlu olmasının yanı sıra NF- κ B ve PI3K/AKT sinyallerini de pozitif yönde düzenleyerek hücrelerin hayatta kalmasını sağlamaktadır (Duncan et al. 2008). Zheng et al.'ın çalışmasında, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının pozitif düzenleyicisi olan *CK2*'nin GBM için terapötik bir hedef olup olamayacağı incelenmiştir. Biyoinformatik veri tabanından elde edilen veriler, *CSNK2A1*'in GBM tümörlerinin yaklaşık %33,7'inde amplifiye olduğunu göstermektedir. *CK2* alt tiplerinin (*CK2 α* , *CK2 α '* ve *CK2 β*) siRNA yardımıyla GBM hücrelerinde baskılanması, IL-6 aracılı STAT3 aktivasyonunu azaltmaktadır. GBM hücrelerinde *CK2*'nin inhibitörü olan CX-4945 ve siRNA ile baskılanması, aktin düzeyinde yetersizliğe bunula birlikte hücrelerin tutunamaması ve morfolojilerini kazanamamasına neden olmaktadır. “*In vivo*” koşullarda, CX-4945 inhibitörü ile *CK2*'nin baskılanması GBM tümör dokusunun büyüklüğünde ve hücrelerin hayatta kalmasında anlamlı bir azalma meydana getirmektedir (Zheng et al. 2013).

GBM üzerinde yapılan araştırmalar, KKH'lerin tümör gelişimindeki rolünü ortaya koymuştur (Lathia et al. 2015). Bu alanda yapılan birçok çalışma, KKH'lerin kendine ait özelliklerinin korunmasında Wnt sinyal yolağının önemini vurgulamaktadır (Fodde and Brabletz, 2007). *LEF1*'in GBM KKH'leri üzerindeki etkisi tanımlanmıştır (Gao et al. 2014). *LEF1*'in GBM hücrelerindeki ifadesini baskılamak için, *LEF1* mRNA'sını hedef alan bir kısa saç tokası RNA (sh*LEF1*) kullanılmıştır. Baskılama gerçekleştirilen GBM hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla, göç ve invazyon kabiliyetlerinin azaldığı rapor edilmiştir. Benzer bir biçimde, baskılanmış *LEF1* ifadesi GBM KKH'lerde nestin ve CD133 ifadelerini düşürerek bu hücrelerin kendini yenileme özelliğini ve tümörosfer oluşturma kapasitesini azaltmaktadır (Gao et al. 2014). Radyoterapi direnci kazandırılmış GBM hücrelerinde Wnt sinyal yolağı ile ilişki genlerin ifadesel değişimleri tanımlanmıştır (Kim et al. 2012). Bu tür hücrelerde ilgili sinyal yolağının doğrudan baskılanması, KKH özelliklerini azaltarak radyasyona dirençli GBM hücrelerini tekrar

hassas hale getirmektedir (Kim et al. 2012). Wnt sinyal yolağı GBM KKH özelliklerinin gelişmesinde önemli bir unsurdur.

Liu et al. (2018a) Wnt5a aktivasyonunun Dishevelled ilişkili morfogenez 1 (Daam1)/RhoA sinyal yolu üzerinden GBM hücrelerinin istila yeteneğini desteklediğini ortaya çıkarmışlardır. Kanonik olmayan sinyal yolağının aktivasyonunda rol oynayan Wnt-5a Rho-GTPazları aktive ederek, hücre iskeletinin oluşumunu ve polaritesini düzenlemekle görevlidir (Santos et al. 2010). İnvaziv olmayanlara kıyasla, invaziv GBM dokularında Wnt5a ifade seviyesi anlamı olarak yüksektir. Bununla birlikte, bu dokularda RhoA ve Wnt5a ifade seviyeleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır. Wnt5a'nın ifadesi indüklendiğinde, GBM hücrelerinde RhoA ifadesi de indüklenmekte ve devamında GBM hücrelerinin istila yetenekleri güçlü bir şekilde uyarılmaktadır. Wnt5a'nın neden olduğu RhoA aktivasyonu DAAM1 ile düzenlenir. GBM'de *DAAM1* siRNA ile baskılandığında, Wnt5a'nın neden olduğu RhoA aktivasyonu bloke olmaktadır. Bu durum GBM hücrelerinin agresif özelliklerinin önemli ölçüde azalması ile sonuçlanmaktadır (Liu et al. 2018a). GBM hücrelerinde sadece kanonik sinyal yolağının değil aynı zamanda kanonik olmayan Wnt sinyal yolağının da baskılanması anti-kanser etki oluşturmaktadır.

“Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 3” (Dkk-3), *LRP5/6*'ya bağlanarak Wnt sinyalini inhibe etme yeteneğine sahiptir (Krupnik et al. 1999; Grotewold et al. 2002). Birçok kanser türünde *REIC/DKK-3* ifadesinin azaldığı ve bu nedenle de malign davranışa sebep olduğu düşünülmektedir. Mizobuchi ve arkadaşları (2008) insan malin glioma hücreleri ile sağlıklı beyin hücrelerini karşılaştırdıklarında, *REIC/DKK-3* ifadesinin sağlıklı beyin hücrelerinde daha yüksek seviyede ifade edildiğini bulmuşlardır. Bu durumda, *REIC/DKK-3* ifade seviyesi ile GBM malignite derecesi arasında ters korelasyon olduğu göstermektedir. Yapılan immünohistokimyasal analizlerde normal insan astrositlerinde *REIC/DKK-3* yüksek seviyede ifade edildiğini; malin glioma hücrelerinde ise ifade edilmediği sonucuna varmışlardır. *REIC/DKK-3* baskılandığı ve aşırı ifade edildiği çalışmalarda, *REIC/DKK-3* ifadesindeki artışın apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu bağlamda, *REIC/DKK-3* ifadesindeki azalmanın, GBM gelişiminde Wnt sinyalini aktive ettiğini ve artan sitoplazmik β -katenin seviyesi ile apoptozu inhibe ederek malignite derecesini arttırdığı sonucuna varılmaktadır (Mizobuchi et al. 2008).

Bu tez çalışmasında, GBM hücrelerinde *LRP5* ifadesi baskılandıktan sonra meydana gelecek olası anti-kanser etkinin tanımlanması amaçlanmaktadır. Literatürdeki çalışmalar, GBM’de Wnt/ β -katenin sinyal yolağının yeniden düzenlendiğini ve bu sinyal yolağının herhangi bir noktada baskılanması durumunda anti-kanser özellik oluşturduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, literatürde yer alan çalışmalar hipotezimizi güçlendirmektedir. *LRP5*’in GBM veya BCSC hücrelerinde susturulmasına yönelik herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Wnt modölatörlerinin ifade durumları ve glioma gelişimindeki rolü Denysenko et al. (2016) tarafından araştırılmıştır. Normal beyin, glioblastom ve I.-III. derece gliomaya sahip hastalardan alınan dokularda yapılan araştırmalar sonucunda Wnt3a modölatörünün sağlıklı dokularda ifadesinin azaldığı, tümör dokularında ise ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. β -katenin ifade düzeyinin normal beyin dokularında, artan histolojik dereceye kıyasla daha az ifade gösterdiği belirtilmiştir. β -katenin ifadesindeki azalma, yıkım kompleksinde görev alan GSK-3 β 'nın yüksek ifadesi ile ilişkilidir. TCF4'ün ifadesi de elde edilen diğer sonuçlarla pozitif korelasyon göstermektedir. Düşük ve yüksek dereceli gliom tiplerinde Wnt3a ve β -katenin ifadelerinin hasta sağkalım süresi üzerindeki etkisi de belirtilen çalışmada değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde, kanonik Wnt yolunda gerçekleşen anormal ifade artışının düşük sağkalım süresi ve prognozda rol oynadığı bulunmuştur. Bu bağlamda, Wnt sinyalinin önemli bileşenleri olan Wnt3a ve β -katenin proteinlerinin ifade düzeyleri gliom tümörleri açısından prognostik bir belirteç olma potansiyeli taşımaktadır. Belirtilen çalışmada, Wnt/ β -katenin sinyal yolunda rol oynayan ana düzenleyici elemanlarının (Wnt3a, β -katenin, TCF4 ve GSK-3 β) ifade düzeylerindeki değişimleri GBM'de tanımlanmıştır (Denysenko et al. 2016).

Gonias et al. (2017), GBM'de dahil farklı kanser türlerinde LDL reseptör ilişkili proteinleri (LRPs) kodlayan genlerin mRNA düzeyindeki ifade seviyelerini ve bu ifade seviyelerinin sağkalım süreleri arasındaki korelasyonu belirlemeyi amaçlamışlardır. TCGA verilerine dayanan "*in silico*" analizler sonucunda, kanser türlerinde genel olarak ifadesi en fazla artan LRP'lerin, *LRP1*, *LRP2*, *LRP5* ve *LRP10* olduğu bulunmuştur. Normal dokuya kıyasla GBM tümör dokularında ifadesi en fazla artan reseptör *LRP1*'dir. Bununla birlikte, GBM hastalarında *LRP1* ifadesi ve sağkalım oranları arasında ters korelasyon bulunmaktadır. Ayrıca Wnt aktivasyonunu düzenleyen *LRP5* ve *LRP6* ifadelerinin GBM hastalar üzerindeki sağkalım etkileri de incelenmiş fakat anlamlı bir etki raporlanmamıştır. Bu nedenle, çalışmada *LRP1*'in GBM için terapötik bir hedef olabileceği vurgulanmaktadır (Gonias et al. 2017).

Schiefer et al. (2014), farklı GBM hücre hatlarında, Wnt sinyal baskılayıcıları olan sFRP'leri kodlayan genlerin metilasyon örüntülerindeki değişimleri araştırmışlardır.

GBM hücrelerinde DNA demetilasyonunu indüklemek için, 5-azasitidin (5-Aza) uygulamışlardır. Artan konsantrasyon ve süreyle uygulanan 5-Aza, 48 saatlik inkübasyon sonunda, hücre canlılığında kayda değer bir azalma meydana getirmiştir. Epigenetik olarak sFRP'leri kodlayan genlere ait ifadelerin GBM'de baskılanması, Wnt sinyalinin aktive olmasıyla beraber hücre çoğalmasına etki edebilir. Bu durum tümör kitlesinin büyümesini, maligniteyi ve kanser hücrelerinin apoptozdan kaçışını teşvik edebilir. Promotör bölgelerinin demetilasyona uğraması sonrası proteinlerin ifade seviyelerindeki artış, anormal bir şekilde işleyen hücresel süreçlerin inhibe edilmesiyle tümör gelişimini yavaşlatabilir. Schiefer et al. elde ettiği sonuçlar, sFRP'leri kodlayan genlerin epigenetik olarak baskılanmasının GBM gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Tompa et al. (2019), GBM'in moleküler alt tiplerinde (*IDH-1 R132H* mutasyonu, *EGFRvIII* mutasyonu, *NF-1* null mutant ve belirtilmemiş) kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyal yolu bileşenlerinin ifade seviyelerini araştırmışlardır. İnceledikleri gruplar TCGA veri setinde yer alan pronöral, klasik ve mezenkimal alt gruplarla tutarlıdır. Bu alt gruplar içerisinde, *IDH-1 R132H* mutasyonunu taşıyan GBM hastalarına ait sağkalım oranlarının, mutasyonu taşımayan hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. *IDH-1 R132H* mutant GBM örneklerinde Wnt3a, Wnt5a ve Fzd2 ifade seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir fakat diğer moleküler alt tiplerde Wnt sinyal yolu bileşenlerinin ifade değişimleri anlamı bulunmamıştır. Çalışmada elde edilen veriler, GBM'in moleküler alt tipine bağlı olarak Wnt sinyal yolağının aşırı aktive olduğu görüşünü ileri sürmektedir.

Yun et al. (2020), GBM'nin kemoterapiye verdiği yanıtı ve bu yanıtın mekanizmasını araştırmışlardır. DOC-2/DAB2 etkileşimli protein (*DAB2IP*), kanser gelişiminde tümör baskılayıcı olarak görev almaktadır. GBM hücrelerinde *DAB2IP*'nin ifade seviyesindeki azalışın TMZ'ye karşı direnç oluşturduğu tespit edilmiştir. GBM hücrelerinde *DAB2IP*'nin indüklenmiş ifadesi TMZ direncini azaltmakta ve hücrelerin G2/M fazında tutuklu kalmasına neden olmaktadır. *DAB2IP*'nin yer aldığı moleküler mekanizmaya bakıldığında; *DAB2IP*'nin ifadesindeki azalma GBM'de TMZ direncini arttırırken, ifade artışı olduğunda ise Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile ifadesi düzenlenen *ATG9B*'nin ifadesi baskılanmaktadır. *ATG9B* otofajinin erken basamaklarında rol almaktadır. *ATG9B*'nin GBM hücrelerinde baskılanması sonucunda TMZ'ye karşı

hassasiyetin arttığı gözlemlenmiştir. Kanonik Wnt sinyal yolu, GBM’de *ATG9B*’nin *DAB2IP* aracılığıyla düzenlenmesinde görev alır.

Pu et al. (2009), Wnt sinyalinin gliomagenezdeki rolünü anlayabilmek için Wnt sinyal yolunda görev alan farklı elemanları hedeflemişlerdir. Normal beyin dokusu ile karşılaştırıldığında Wnt2, Wnt5a ve Fzd2 ifadelerinin gliomalarda arttığı tanımlanmıştır. Wnt2, Fzd2, β -katenin, siklin D1, MYC, PI3K ve p-AKT protein ifade seviyelerinin astrositik gliomalarda daha yüksek olduğu ve artan malignite ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. GBM hücrelerinde *WNT2* ve *CTNNB1* siRNA aracılığı ile baskılandığında, MYC haricindeki diğer tüm bileşenlerin ifade seviyesinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Baskılama işlemi sonrasında malign hücrelerin canlılığının azaldığı, apoptozun indüklendiği ve invaziv özelliklerin azaldığı görülmektedir. Ksenograft model üzerinde gerçekleştirdikleri deneylerde ise, kontrol grubuna kıyasla *WNT2* ve *CTNNB1*’i hedefleyen siRNA tedavisi sonrası tümör kitlesinde anlamlı olarak küçülme meydana gelmiştir. Sonuç olarak çalışmada, Wnt sinyal yolunun inhibisyonu ile malign glioma hücrelerinin çoğalmasının engellendiği gösterilmiştir.

Gao et al. (2014), GBM hücrelerinde *LEF1*’in shRNA aracılığıyla baskılanmasının, hücre göçü, invazyonu ve hücre çoğalmasını inhibe ettiğini belirtmiştir. *LEF1*’in baskılandığı gruplarda kontrole kıyasla tümör çaplarının küçülmesinde anlamlı bir farklılık olmuştur. Matriks metalloproteinaz (MMP) 9 ifadesi *LEF1* tarafından düzenlenmekte ve hücre invazyonunu etkilemektedir. Sonuç olarak, *LEF1* GBM hücrelerinin çoğalmasında, göç etmesinde, invazyonunda ve GBM kök benzeri hücrelerinin kendini yenilemesinde düzenleyici olarak rol oynadığı ortaya konmuştur.

Han et al. (2022) kanonik Wnt sinyali ile ilişkili olan ve GBM’in bağışıklık sisteminde yer alan genlerin, GBM pronozunda ve hastalığın ilerlemesinde rol alabileceğini varsaymıştır. Çalışmada, çeşitli veri tabanlarından aldıkları gen setlerine göre bir sınıflandırma (yaş, cinsiyet, hayatta kalma süresi, radyasyon tedavisi, vs.) yapılmıştır. “*In silico*” analiz sonucunda, GBM tümörlerinde yüksek düzeyde ifade edilen 31 adet genin kanonik Wnt sinyali ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu genlerden en yüksek ifade seviyesine sahip olan gen *DKK3*’tür. Yüksek *DKK3* ifadesinin, artan anti-tümöral bağışıklık ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. *DKK3*’ün bağışıklık hücrelerini

düzenlemede ve ayrıca, invazyon, malignite ve apoptozla ilgili diğer sinyal yolları ile doğrudan veya dolaylı yoldan ilişkili olduğu CytoScape aracılığıyla gösterilmiştir. Kanserde İlaç Hassasiyeti Genomikleri (GDSC)'den alınan verilere göre *DKK3* ifadesine sahip olan GBM hücre hatlarına yönelik ilaç duyarlılık analizi yapılmıştır. *DKK3*'ü hedefleyen ilaçlardan biri olan Navitoclax'ın *DKK3* ifadesi yüksek olan GBM hücre hatlarındaki büyümeyi inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma, GBM'de gözlenen yüksek *DKK3* ifade düzeyinin yüksek mortalite oranı, ileri prognoz ve kemoterapi direnci ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir.

Mizobuchi et al. (2008), *REIC/DKK-3* ifade seviyelerini beyin tümörlerinde tanımlamıştır. *REIC/DKK-3*'ün ifade seviyesi normal dokulara oranla malign gliomalarda daha düşüktür. Normal beyin dokularında *REIC/DKK-3*'ü ifade eden hücrelerin birçoğu glial fibriler asidik protein açısından pozitifdir. siRNA ile *REIC/DKK-3* ifadesi baskılanan malign glioma hücrelerinde proliferasyon artmaktadır. Bu malign gliomalarda hücrelerinin proliferasyonunun *REIC/DKK-3* ifade seviyesi tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Kontrol grubuna kıyasla ifadesi baskılanan grupta hücreler G1 fazında tutuklu kalmaktadır. *REIC/DKK-3*'ün malign gliomalarda kanonik Wnt sinyali üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda *REIC/DKK-3*'ün ifadesindeki artış ile β -katenin ifadesindeki değişim ters orantılı olarak gözlemlenmiştir. Elde ettikleri bulgular, *REIC/DKK-3* mRNA seviyesindeki azalmanın gliom oluşumu ve maligniteyi arttırdığını göstermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Mikrodizin Veri Analizi

Wnt sinyal yolağındaki genler Reactome veri tabanında tanımlanmış “signaling by WNT” (R-HSA-195721) modülünde incelendi (Fabregat et al. 2016). Sinyal yolağı ile ilişki toplamda 298 gen tanımlandı. Ardından, mikrodizin analizi gerçekleştirildi. “Gene Expression Omnibus” (GEO) veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) bulunan GSE7181 mRNA mikroarray veri seti (Beier et al. 2007) kullanıldı. GSE7181 veri seti “Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array” platformuna dayanmaktadır. Veri setinde CD133⁺ GBM hücreleri (3 örnek) ve CD133⁻ GBM hücreleri (3 örnek) arasındaki mRNA ifade farklılıkları Orange v.3.36.1 programı ile tanımlandı (Demsar et al. 2013). Wnt sinyal yolağında tanımlanan toplam 289 gen bu veri setinde incelendi. Log katsayı değişim değeri (LogFC) 1’den büyük olan genler aşırı ifade edilen olarak kabul edildi.

3.2. Protein-Protein Etkileşim Ağının Oluşturulması ve Aday Genlerin Belirlenmesi

Cytoscape 3.8.2 programında String veri tabanının güncel sürümü üzerinden (v.11) GBM CD133⁺ hücrelerinde ifadesi artmış genler arasında protein-protein etkileşim (PPI) ağı oluşturuldu (Shannon et al. 2003; Szklarczyk et al. 2019). PPI ağı oluşturulurken güven sınır değeri (Confidence Cutoff) 0,4 ve üzeri seçildi. Sadece belirtilen genlere ait proteinlerin arasındaki etkileşimi ortaya çıkarmak için maksimum dış etkileşici değeri 0 olarak seçildi. Aday gen sayısını düşürmek için “Maximal Clique Centrality” (MCC) ve “Molecular Complex Detection” (MCODE) yöntemleri birlikte uygulandı (Bader and Hogue 2003; Chin et al. 2014). MCODE yöntemi ile PPI ağı üzerinde etkileşim derecesi en yüksek olan üç protein kümesi tanımlandı. MCODE analizindeki parametreler sırasıyla: Node Score Cutoff: 0,2, K-Core değeri: 2 ve Max Depth from Seed: 100 olarak seçildi. PPI ağı içerisindeki etkileşim sayısına göre en fazla sayıda etkileşimi gerçekleştiren proteinleri tanımlamak için ayrıca “Maximal Clique Centrality” (MCC) yöntemi kullanıldı. Her iki yöntemde ortak olarak bulunan genler aday listesine alındı.

3.3. TCGA GBM Veri Setinde Aday Gen İfadelerinin Tanımlanması

Aday genlerin GBM TGCA olgularına ait tümör örneklerindeki ifadesi GEPIA2 ağ sunucusu kullanılarak analiz edildi. Değişken olarak hastalık durumuna (tümör veya normal doku) bağlı tek yönlü ANOVA testi istatistiksel analiz için kullanıldı (Tang et al. 2017). Aday genlerin tamamına ait ifade verisi 163 tümör ve 207 normal beyin doku (TGCA ve GTEx) örneklerinde karşılaştırılmalı olarak incelendi. Gruplar arasında, tümör grubunda artmış gen ifadesine ait P değerinin 0.01’den küçük olması anlamlı kabul edildi.

3.4. GBM Olgularında *LRP5* ve *MYC* İfadeleri Arasındaki Birlikteliğin Saptanması

GBM’de *LRP5* ve *MYC* gen ifadeleri arasındaki birliktelik “cBioPortal for cancer genomic” veri tabanı kullanılarak incelendi (Cerami et al. 2012). “Spearman's correlation” kolerasyon analizi “Glioblastoma multiforme TCGA, Firehose Legacy” veri setinde gerçekleştirildi (Cerami et al. 2012). Veri setinde mRNA ifade verisini içeren toplam 136 GBM örneği vardı. 0,05’ten küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5. Hücre Kültürü

U87MG ve T98G GBM hücre hatları, %10 FBS, 100 µg/ml penisilin-streptomisin (Sigma, USA) ve %1 oranında L-Glutamin içeren RPMI 1640 besi ortamında (EcoTech, Erzurum, Türkiye) kültür edildi. Beyin kanseri kök hücre (BCSC) hattı (CelProgen, USA) %10 FBS, 100 µg/ml penisilin-streptomisin (Sigma, USA), %1 oranında L-Glutamin ve yüksek glukoz içeren DMEM besi ortamında (EcoTech, Erzurum, Türkiye) kültür edildi. Hücreler %5 CO₂ içeren nemli atmosfer ortamında idame edildi.

3.6. siRNA Aracılığıyla *LRP5* Gen İfadesinin Baskılanması

U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinde *LRP5* gen ifadesi siRNA (Ambion Silencer Select, ThermoFisher) aracılığıyla baskılandı. Baskılama işleminde insan genomunu hedeflemeyen negatif kontrol siRNA (Ambion Silencer Select, Negative Control, Cat: 4390843) ve *LRP5*’i hedefleyen iki adet (Ambion Silencer Select, ID: s501339, Cat:

3. MATERYAL ve YÖNTEM

4392420 ve ID: s8293, Cat: 4390824) olmak üzere üç farklı siRNA kullanıldı. siRNA'lar, Lipofectamine 3000 transfeksiyon ajanı (Invitrogen, USA) ile üretici firmanın talimatlarına göre hücrelere aktarıldı. Geni hedefleyen siRNA'ların susturma etkinliği her bir siRNA için ayrı olarak tanımlandı. Bu nedenle, siRNA-1 (ID: s8293) ve siRNA-2 (ID: s501339) ile yapılan baskılama işleminde karışımlar ayrı ayrı hazırlandı. Baskılama işlemi öncesinde, T98G ve BCSC hücreleri altı-kuyulu plakalara her bir kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde ekildi. U87MG hücreleri ise kuyu başına 35.000 hücre olacak şekilde ekildi. siRNA'ların GBM ve BCSC hücrelerine transfeksiyonu Tablo 3.1.'de yer alan içeriğe göre gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. GBM ve BCSC hücrelerine ait transfeksiyon içeriği

Karışım 1a	U87MG	T98G	BCSC
SiRNA-Negatif Kontrol	SiRNA-1	SiRNA-1	SiRNA-1
3nM	5nM	15nM	15nM
1µl	1,5µl	4,5µl	4,5µl
Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl
Karışım 1b			
Lipofectamine 1 µl	Lipofectamine 1µl	Lipofectamine 2,5µl	Lipofectamine 2,5µl
Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl
Karışım-1a ve 1b bir araya getirildi ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.			
Karışım 2a	U87MG	T98G	BCSC
SiRNA-Negatif Kontrol	SiRNA-2	SiRNA-2	SiRNA-2
3nM	5nM	5nM	5nM
1µl	1,5µl	1,5µl	1,5µl
Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl
Karışım 2b			
Lipofectamine 1 µl	Lipofectamine 1µl	Lipofectamine 1µl	Lipofectamine 1µl
Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl	Opti-MEM 150µl
Karışım-2a ve 2b bir araya getirildi ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.			

Hazırlanan 300µl'lik karışımlar altı kuyulu plakalara ekilmiş hücrelere uygulandı. Baskılama işlemi yapıldıktan sonra hücreler 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücrelerden tüm RNA izolasyonu yapıldı.

3.6.1. Susturma işlemi sonrası tüm RNA izolasyonu

Tüm RNA izolasyonu için “EcoPure Total RNA Kit” (EcoTech, Erzurum, Türkiye) üretici firmanın talimatlarına göre uygulandı. Hücreler yüzeyden 1X tripsin solüsyonu yardımıyla kazınarak alındıktan sonra eppendorf tüplerine aktarıldı ve 1.350 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet üzerine 400µl “EcoPure Lysis/Binding Buffer” ile 4µl “β-mercaptoethanol” karıştırılıp eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Devamında 10 saniye boyunca vorteks uygulandı. Elde edilen lizata 400µl saf etanol eklendi. Örnekler vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra, içerik filtreli tüpe aktarıldı. Tüpler 1.350 rpm'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Alt haznedeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, tüpün filtre içeren kısmına 400µl “Wash Buffer I” eklendi. Santrifüj basamağı tekrarlandı. Tüpün hazne kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, filtreli bölüme 500µl “Wash Buffer II” eklendi ve santrifüj basamağı 30 saniyelik süre için tekrarlandı. Alt haznede toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, filtreli kısma 200µl “Wash Buffer II” eklendi. Örnekler iki dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi. Filtreli kolonu içeren kısım steril “DNase/RNase free eppendorf” tüpüne transfer edildi. Filtre üzerine 30µl elüsyon tamponu eklendi ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Tüpler 1.350 rpm'de (maksimum hız) 1 dakika boyunca santrifüj edildi. İşlem sonunda *LRP5*'in susturulduğu ve susturulmadığı hücre hatlarından tüm RNA örnekleri izole edildi. İzole edilmiş tüm RNA örneklerinden cDNA sentezlendi.

3.6.2. cDNA sentezi

İzole edilen tüm RNA örneklerinin tamamından cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezinde “A.B.T. cDNA Synthesis Kit with RNase Inh.” kiti (A.B.T. Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) üretici firmanın talimatlarına göre kullanıldı. Revers transkriptaz reaksiyon hacmi toplamda 20µl'idi. Belirtilen reaksiyonun içeriği Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için Tablo 3.3.'te sunulan ısı koşulları uygulandı.

Tablo 3.2. cDNA sentezi reaksiyon içeriği

İçerik	Miktar
10X Reaction Buffer	2µl
dNTP (2,5mM)	1µl
Random Hexamer (50µM)	2µl
Reverse Transcriptase	1µl

cDNA sentez reaksiyonları 1.000 ng/µl tüm RNA konsantrasyonu üzerinden gerçekleştirildi. Konsantrasyona bağlı olarak kullanılan tüm RNA hacmine göre toplam reaksiyon hacmi DNase/RNase free su ile 20µl'ye ayarlandı.

Tablo 3.3. cDNA sentezi ısı koşulları

Basamak sırası	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
1	25	10 dakika	1
2	37	120 dakika	1
3	85	5 dakika	1
4	4	Devamlı	1

U87MG, T98G ve BCSC hücrelerine ait cDNA örnekleri -20°C'ye kaldırıldı. Elde edilen cDNA örneklerinden kantitatif PCR (qPCR) reaksiyonu gerçekleştirildi.

3.6.3. Susturma işlemi sonrası *LRP5* ve diğer genlere ait mRNA ifadelerinin tanımlanması

siRNA ile susturma işlemi sonrası, U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinde *LRP5* ifadesi qPCR yöntemi ile tanımlandı. *LRP5* ifadesi kontrol siRNA uygulanan kontrol grubuna göre siRNA1 ve siRNA2'nin ayrı olarak uygulandığı deney grubunda tanımlandı. qPCR reaksiyonu için "A.B.T. 2X qPCR SYBR-Green Master Mix" kit (A.B.T. Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) üretici firmanın talimatlarına göre kullanıldı. PCR reaksiyon hacmi toplamda 10µl idi. 2X qPCR SYBR-Green Master Mix

karişımından 5µl alındı. Bu karişımın üzerine 1µl ileri ve 1µl geri primer (her biri 10µM konsantrasyonda), 2µl cDNA ve 2µl DNase/RNase free su eklendi. İçerik pipetaj yapılarak homojen hale getirildi ve PCR reaksiyonu kuruldu. PCR reaksiyonları, Rotor-GeneQ Real-Time PCR platformu (Qiagen, Germany) üzerinde gerçekleştirildi. Reaksiyona ait ısıl koşullar Tablo 3.4.’te verilmiştir.

Tablo 3.4. qPCR reaksiyonu ısıl koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bařlangıç denatürasyonu	95°C	5 dakika
Döngü 40X		
Denatürasyon	95°C	15 saniye
Baęlanma	60°C	20 saniye
Uzama	72°C	20 saniye
Erime eğrisi	75°C-95°C	2 saniye

LRP5 ifadesi Livak ve Schmittgen’in (2001) tanımladığı rölatif kantifikasyon yöntemine göre belirlendi. Veri analizinde kontrol siRNA uygulanan hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri dış normalizasyon faktörü olarak kullanıldı. İ normalizasyon için *HPRT-1* geni, “housekeeping” olarak seçildi. Belirtilen hücre hatlarında *LRP5* ifadesi baskılandıktan sonra, Wnt/β-katenin yolağı yanıt genleri olan *CCND1*, *LEF1* ve *MYC* ayrıca hücre döngüsü ile ilişki *CDK2*, *CDK4* ve *CCNE1* genlerinin ifadeleri tanımlandı. İlgili genlere ait primer dizileri Tablo 3.5.’de verilmiştir.

Tablo 3.5. qPCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri

Gen	Yön	Primer dizisi	%GC	Kaynak*
<i>LRP5</i>	İleri	5'-GAAGCTCTACTGGGCTGACG-3'	%60	
	Geri	5'-TCCAGTACAGAGTGTCCCCG-3'	%60	
<i>LEF1</i>	İleri	5'-TCACGGGTGGATTTCAGGCAA-3'	%55	
	Geri	5'-GCTGGATGAGGGATGCCAGT-3'	%60	
<i>CCND1</i>	İleri	5'-ACCTGAGGAGCCCCAACAAC-3'	%60	
	Geri	5'-GACTCCAGCAGGGCTTCGAT-3'	%60	
<i>MYC</i>	İleri	5'-GAAAACCAGCAGCCTCCCG-3'	%63,2	
	Geri	5'-GCACCGAGTCGTAGTCGAGG-3'	%65	
<i>CCNE1</i>	İleri	5'-CCCCATCATGCCGAGGGAG-3'	%68,4	
	Geri	5'-CGCCGTCCTGTCGATTTTGG-3'	%60	
<i>CDK4</i>	İleri	5'-TTGCGGCCTGTGTCTATGGT-3'	%55	
	Geri	5'-ATCAAGGGAGACCCTCACGC-3'	%60	
<i>CDK2</i>	İleri	5'-CTGGGCTGCATCTTTGCTGA-3'	%55	
	Geri	5'-AAATCTTGCCGGGCCCCACTT-3'	%55	
<i>HPRT1</i>	İleri	5'-TGAGGATTTGGAAAGGGTGT-3'	%45	Valente et al. 2009
	Geri	5'-GAGCACACAGAGGGCTACAA-3'	%55	

Primerlerin *T_m* dereceleri 60°C'dir. *Kaynak gösterilmeyen primer dizileri tasarlanmıştır.

3.6.4. Susturma işlemi sonrası genlerin protein düzeyindeki ifadelerinin tanımlanması

Susturma işlemi sonrasında U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinden protein izolasyonu yapıldı. Hücreler soğutulmuş 1XPBS tamponu ile yıkandıktan sonra yüzeyden kazındı. Tüpe alınan hücreler, %1 fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific, ABD) içeren 1X RIPA lizis tamponu (EcoTech, Erzurum, Türkiye) içerisinde sıvı azot kullanılarak parçalandı. Protein lizatlarının konsantrasyonu "Coomassie Plus (Bradford) Assay" (ThermoFischer Scientific, USA) kit kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre ölçüldü. Son konsantrasyonları 25µg/mL-2.000µg/mL olacak şekilde albümin standartları oluşturuldu. Standart ve konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin her birinin 5µl'si 96'lık kuyulu plakalara alındı. Her bir örneğin ve standardın üzerine 250µl "Coomassie Plus Reagent" eklendi ve 30 saniye boyunca kuyulu plaka yavaşça çalkalandı. Örnekler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir

3. MATERYAL ve YÖNTEM

örneğin 595nm'deki absorbans ölçümü alındı. BSA standart eğrisi, ortalama kör düzeltilmiş 595nm absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) değerlerine göre hazırlandı. Deney gruplarında protein lizatları eşit konsantrasyonlarda SDS-PAGE jeline yüklendi. SDS-PAGE örneklerinin hazırlanmasında 4X Laemmli yükleme tamponu (EcoTech, Erzurum, Türkiye) kullanıldı. Protein örnekleri 70°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilerek denatüre edildi. Poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan çözelti içerikleri ve kullanım hacimleri Tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Poliakrilamid konsantrasyonlarına göre jel içerikleri

İçerik	Ayırıcı Jel (%10)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
ddH ₂ O	1,4ml	2,175ml
4x Tris.HCl/SDS Tamponu pH:6,8 (0,5M Tris)	-	375 μl
4x Tris.HCl/SDS Tamponu pH:8,8 (1,5M Tris)	1,875ml	-
29:1 Akrilamid/Bisakrilamid	1,65ml	397,5 μl
%10 SDS	50 μl	30 μl
%10 APS	50 μl	30 μl
TEMED	2 μl	7,5 μl

Ayırıcı jel hazırlanırken, falkon tüpte TEMED hariç Tablo 3.6.'da yer alan diğer bütün içerikler karıştırıldı. TEMED eklendikten sonra karışım hazırlanan düzeneğe aktarıldı. Jel döküldükten sonra izopropanol eklendi. Ayırıcı jel 40-45 dakika boyunca oda sıcaklığında donmaya bırakıldı. Ardından, izopropanol döküldü ve su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Sıkıştırıcı jel hazırlandı ve ayırıcı jelin üstüne döküldü. Tarak takıldıktan sonra jel 40-45 dakika donmaya bırakıldı. Denatüre edilmiş protein örnekleri SDS-PAGE jelde 120V akımda 3 saat yürütüldü. SDS-PAGE jeline yürütülen proteinler 14 dakika boyunca 25V akımda nitroselüloz membrana transfer edildi (Trans-Blot Transfer System, Bio-Rad, USA). Transfer sonrasında membran bloklama tamponuna (1XPBS içerisinde %1 kazein) alındı ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben bloklama tamponu uzaklaştırıldı ve membran birinci antikör ile muamele edildi. LRP5 protein ifadesinin tanımlanması için anti-LRP5 birinci antikoru (Affinity Biosciences, Cat No: AF4645) 1:1.000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Beta-aktin proteininin tanımlanması için ilgili antikör (Affinity Biosciences, Cat No: AF7018) 1:1.000 oranında kullanıldı. Birinci antikörler membran ile gece boyu +4°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon

sonrasında, birinci antikor uzaklaştırıldı. Membran 1XPBST (%0,1 Tween 80 içeren 1X PBS) ile beş dakika süreyle 3 kez yıkandı. Ardından 1:2.000 oranında dilüe edilen ikinci antikor (HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Abclonal, Cat No: AS014) membran ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İkinci antikor uzaklaştırıldıktan sonra membran 1XPBST ile beş dakika süreyle 3 kez yıkandı ve ardından 1XPBS ile yıkandı. Membran ChemiDoc XRS+ görüntüleme sistemi (Bio-RAD, USA) ile görüntülendi. Susturma işlemi sonrası diğer proteinlerin ifadesi anti-CCND1 (Affinity Biosciences, Cat No: AF0931), anti-LEF1 (Affinity Biosciences, Cat No: DF7570), anti-MYC (Affinity Biosciences, Cat No: AF6054), anti-CDK2 (Affinity Biosciences, Cat No: AF6237), anti-CDK4 (Affinity Biosciences, Cat No: DF6102) ve anti-CCNE1 (Affinity Biosciences, Cat No: AF0144) primer antikorları ile tanımlandı. ImageJ yazılımı kullanılarak β -aktin protein ifadesine göre veri normalizasyonu yapıldı (Taylor et al. 2019).

3.7. Hücre Canlılık Testi

Baskılanmış *LRP5* ifadesinin U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi CVDK-8 testi (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile tanımlandı. Hücreler her bir kuyuda 5.000 hücre olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi. siRNA'lar 100 μ l ortam içerisinde bulunan hücelere son konsantrasyonları değişmeyecek bir biçimde uygulandı. Transfeksiyonun ardından hücreler 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüm ortam çekildi ve hücelere yeni ortam verildi. Her bir kuyuya 10 μ l CVDK-8 ajanı eklendikten sonra hücreler 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Mikroplaka okuyucu kullanılarak örneklerin 450nm dalga boyundaki absorbans değerleri her yarım saatte bir okutuldu. Temozolomid'in (TMZ) GBM ve BCSC hücrelerinin canlılığı üzerindeki inhibe edici konsantrasyonları (IC₅₀) tanımlandı (Goker Bagca et al. 2020). Her bir hücre hattında TMZ IC₅₀ konsantrasyonlarının tanımlanması için hücreler her bir kuyuda 5.000 hücre olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi. TMZ, son konsantrasyonu 192mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözüldü. Ana stok, konsantrasyonları 0.5-1-2-4-6-8-10mM olacak şekilde çalışma solüsyonlarına dilüe edildi. Belirtilen TMZ konsantrasyonları hücelere uygulandı. Kontrol grubundaki hücelere TMZ uygulanmadı. Hücreler 72 saat boyunca TMZ ile muamele edildikten sonra CVDK-8 testi ile canlılık ölçümleri alındı. Ölçüm sonuçları, GraphPad

programında “log(inhibitor) vs normalized response- Variable slope” yöntemine göre analiz edilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.8. Genomik DNA Fragment Testi

siRNA, TMZ ve TMZ+siRNA uygulanan GBM ve BCSC hücrelerinde DNA fragment oluşumu “DNA ladder detection kit” (Invitrogen, Kat. No: KHO1021) ile tanımlandı. Hücreler her bir kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde 6-kuyulu plakalara ekildi. Her bir hücre hattı için tanımlanan IC₅₀ konsantrasyonundaki TMZ hücrelere uygulandı. siRNA’lar, optimize edilmiş konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı. Kombine olan çalışmalarda, hücrelere önce TMZ içeren besi ortamı verildi ardından siRNA transfeksiyonu yapıldı. Hücreler 37°C’de 72 saat boyunca inkübe edildi. Takiben, hücreler 250µl 1X tripsin ile yüzeyden kaldırıldı ve ependorf tüplerine alındı. Hücrelerin üzerine 500µl serum içeren besi ortamı eklenerek tripsin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Hücreler 1.350 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 1X PBS ile yıkandı ve santrifüj basamağı aynı koşullar altında tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 35µl lizis tamponu ile vorteks kullanılmadan parçalandı. Örnekler 2,5µl enzim A solüsyonu eklendi ve ardından örnekler 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Devamında, örnekler 2,5µl enzim B solüsyonu eklendi ve 50°C’de 30 dakika inkübasyon uygulandı. Örnekler 2,5µl amonyum asetat solüsyonu ve -20°C’de soğutulmuş absolut etanolden 50µl eklendi. Örnekler vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra -20°C’ye alındı ve 15 dakika boyunca bekletildi. Ardından, örnekler 14.000rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir biçimde örneklerden uzaklaştırıldı. DNA pelletinin üzerine soğutulmuş %70’lik etanolden (-20°C) 250µl eklendi ve santrifüj basamağı tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve örnekler açık havada kurumaya bırakıldı. Tüm alkol uçtuktan sonra DNA örneklerine 15µl dilüsyon tamponu eklendi ve birkaç kez pipetajlandıktan sonra çözünen DNA %1,2’lik agaroz jele yüklendi. Örnekler 80V’da 1,5 saat yürütüldü. Apoptoza uğrayan hücrelerde farklı boyutlarda DNA bantları ve/veya DNA “smear” paterni gözlenmektedir (Hennige et al. 2005).

3.9. Yara İyileşme Testi

Susturma işlemi öncesinde T98G, BCSC ve U87MG hücreleri altı-kuyulu plaklara her bir kuyuda 300.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelere siRNA ve TMZ ayrı ayrı uygulandığı gibi birlikte kombine olarak da uygulandı. siRNA transfeksiyonu ve ilaç uygulandıktan sonra hücrelerin bulunduğu yüzeyde 200µl'lik pipet ucuyla çizikler oluşturuldu ve fotoğraflandı. Aynı alanların 24 saat sonra fotoğrafları çekildi. BCSC hücre hattı için fotoğraf çekim süresi 72 saattir. Yara açık yüzey yüzdeleri Image J programı ile hesaplandı (Caglar et al. 2024).

3.10. Klonojenik Test

Gen baskılanma ve TMZ uygulaması sonrası U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerine ait değişimler klonojenik test ile tanımlandı. Klonojenik test daha önce Franken et al. (2006) tanımladığı protokol temel alınarak uygulandı. T98G ve BCSC hücreleri altı-kuyulu plakalara her bir kuyuda 1.500 hücre olacak şekilde ekildi. U87MG hücreleri ise kuyu başına 350 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelere siRNA ve TMZ ayrı ve birlikte uygulandı. Koloniler oluşana kadar hücreler 10 gün boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin bulunduğu kuyulardan ortam çekildi ve hücreler 1XPBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 2ml saf metanol eklendi ve beş dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak hücreler yüzeye fiks edildi. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin bulunduğu kuyulara 2ml kristal violet solüsyonu (%6 v/v, %0,5 w/v 1X PBS içerisinde) verildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek hücreler boyandı. İnkübasyon sonrası solüsyon uzaklaştırıldı ve koloniler 1XPBS ile iyice yıkandı. Koloniler, fotoğraflandı ve ImageJ yazılımı ile sayısal veri haline getirildi (Caglar et al. 2024).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

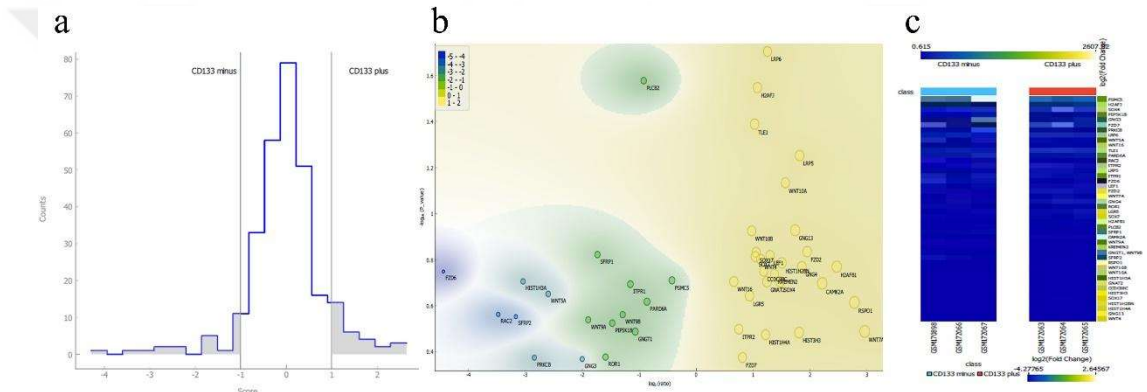
4.1. GBM Kanseri Kök Hücreleri Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu İlişkili Genleri Yüksek Düzeyde İfade Eder

GBM agresif davranışa sahip kötü huylu bir beyin tümörüdür. GBM tümörlerinin tedavisinde temozolomid bir kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır (Zhang et al. 2012a). GBM tümörleri bu anti-kanser ajanına direnç geliştirdikleri için GBM hastalarının tedavi sonrası sağkalım oranları düşüktür (Lee 2016). Bu nedenle, GBM tedavisinde kullanılabilecek yeni potansiyel hedeflerin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görev alan genlerin bir kısmına ait ifade değişimleri daha önce GBM’de tanımlanmıştır (Denysenko et al. 2016). Bununla birlikte, ilgili sinyal yolağının GBM hücrelerinde baskılanması anti-kanser etki meydana getirmektedir (Pu et al. 2009). Bu bakımdan, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı GBM tedavisinde kullanılabilecek terapötik hedefleri barındırabilir. Kanonik Wnt sinyal yolağında oldukça fazla gen birbirleriyle koordineli bir şekilde çalışmaktadır. Bu nedenle, GBM’de baskılanması durumunda anti-kanser özellik gösterebilecek Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ilişkili potansiyel gen adaylarını belirlemek için biyoinformatik analiz yapıldı.

Tümör dokusu içerisinde oldukça az bir oranda bulunan ve kök hücre benzeri özellikleri barındıran KKH’ler GBM’de kemoterapiye karşı gelişen direnç ve rekürrens ile oldukça ilişkilidir (Auffinger et al. 2015). Wnt sinyal yolağında yer alan genlerin ifade düzeyleri GBM kök hücrelerinde oldukça yüksektir (Lottaz et al. 2010; Shevchenko et al. 2019; Shevchenko et al. 2020). Bu nedenle, GBM tedavisinde potansiyeli olan hedefleri ortaya çıkarabilmek için Wnt sinyal yolağı ilişkili genlere ait ifade değişimleri GBM kök hücre örneklerini içeren mikrodizin veri setinde incelendi. GEO veri tabanında GBM KKH örneklerinin bulunduğu dört farklı veri seti (GSE7181, GSE23806, GSE20736, GSE44561) bulunmaktadır. GSE23806 veri seti, GBM tümörlerinden zenginleştirilmiş kültür ortamıyla oluşturulan GBM KKH’leri içermektedir (Gunther et al. 2008). GSE20736 veri setinde GBM KKH’ler ve bunlara NF κ B uygulanarak farklılaştırılan hücre örnekleri bulunmaktadır (Nogueira et al. 2011). GSE44561 veri setinde ise, GBM KKH’ler ve NOTCH1 uygulanan GBM KKH’lere ait örnekler yer almaktadır (Guichet et

al. 2015). GSE23806, GSE20736 ve GSE44561 veri setlerinde kontrol grubunun oluşturulması dış uyaranlara bağlıdır. GSE7181 veri setinde ise mRNA ifade profili doğrudan GBM CD133⁺ ve CD133⁻ hücre gruplarının karşılaştırılması ile elde edilmiştir (Beier et al. 2007). Bu nedenle, GSE7181 veri seti biyoinformatik analiz için seçildi.

Farklı ifade edilen genler GSE7181 veri setinde tanımlandı (Şekil 4.1.a). Ardından, Wnt sinyal yolağındaki genler Reactome veri tabanında bulunan “signaling by WNT” (R-HSA-195721) modülünde incelendi. İlgili modülde toplam 298 protein bulunmaktadır.



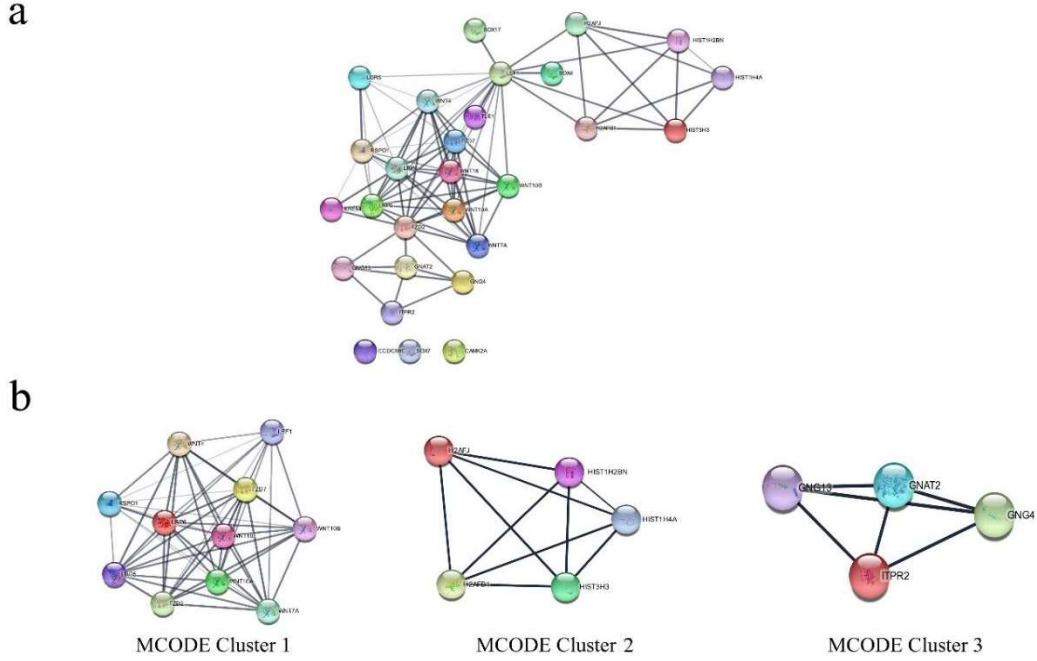
Şekil 4.1. GSE7181 mRNA mikroarray veri setinde Wnt sinyal yolağı için farklı şekilde ifade edilen genlerin CD133+ GBM hücrelerinde belirlenmesi. LogFC değeri 1’den büyük ve -1’den küçük olan genler tanımlandı (a). Gen ifadelerinin *P* değerlerine (-Log10) göre dağılımı (b). CD133+ ve CD133- hücrelerdeki gen ifadelerinin “heat-map” sunumu (c).

İlgili modülde tanımlanan proteinlerin gen sembolleri, farklı ifade edilen genlere ait sonuçla eşleştirildi. CD133+ GBM hücrelerinde, LogFC değeri 1’den büyük toplam 28 gen tanımlandı (Şekil 4.1.c). Bu genler ifade artmış olarak kabul edildi.

4.2. Aday Genlerin Belirlenmesi

Kansere özgü terapötik hedeflerin tanımlandığı mikrodizin analizine dayalı biyoinformatik çalışmalarda, farklı ifade edilen genler için protein-protein ağının kurulması ve bu ağ içerisinde birbirleriyle etkileşim derecesi en yüksek genlerin seçilmesi yaygın bir yaklaşımdır (Caglar and Duzgun 2023; Hu et al. 2023). Etkileşim derecesini belirleyen farklı analiz yöntemlerinde ortak tanımlanan genler ise aday gen olarak kabul

edilmektedir. CD133⁺ GBM hücrelerinde aşırı ifade edilen 28 gen için protein-protein ağı kuruldu (Şekil 4.2.a). Bu ağ içerisinde birbirleriyle en fazla etkileşim gösteren genler MCODE ve MCC yöntemleri ile belirlendi. MCODE yönteminde üç etkileşim kümesi tanımlandı (Şekil 4.2.b).



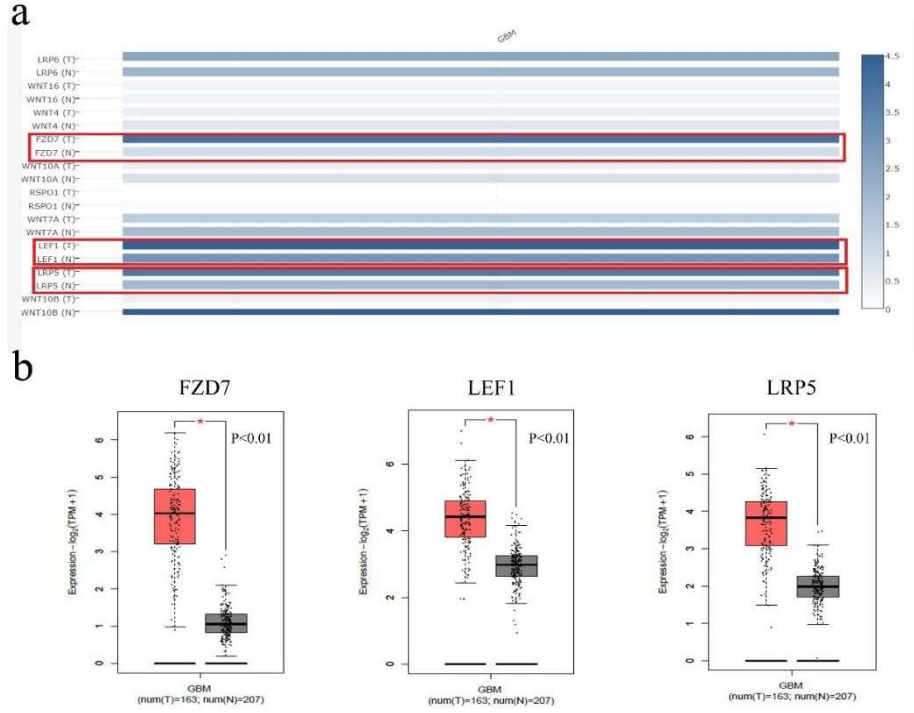
Şekil 4.2. CD133⁺ GBM hücrelerinde ifade artışı gösteren Wnt sinyal yolağı ilişkili genlerin arasında kurulan PPI ağı (a). MCODE analizine göre ağ içerisinde birbirleriyle etkileşim derecesi yüksek olan alt kümeler (b).

Etkileşim kümesi 1’de yer alan genler aynı zamanda MCC yönteminde de bulundu. Her iki yöntemin ortak bulduğu aday genler ise *FZD7*, *LEF1*, *RSPO1*, *LRP5*, *LRP6*, *WNT4*, *WNT7A*, *WNT10A*, *WNT10B* ve *WNT16* idi.

4.3. *FZD7*, *LEF1* ve *LRP5* Genleri GBM Tümörlerinde Yüksek Düzeyde İfade Edilir

Wnt/β-katenin sinyal yolağının baskılanmasına yönelik aday genler belirlenirken GBM KKH örneklerini içeren mikrodizin veri seti seçildi. GBM KKH’leri, heterojen tümör dokusu içerisinde oldukça az oranda bulunan özel hücre popülasyonudur (Bradshaw et al. 2016). Çalışmalar, bu popülasyona ait gen ifade profili tümör dokusunun genelinden farklı olduğunu göstermektedir (Mazzoldi et al. 2020; Lottaz et al. 2010). Bu bakımdan, CD133⁺ GBM hücrelerinde yüksek ifade edilen aday genlerin GBM tümörlerindeki ifade seviyesi düşük olabilir. Hem GBM KKH’leri hem de GBM

tümörlerinin genelinde ifade profili yüksek olan genler terapötik hedef potansiyeli taşımaktadır. Tanımlanan aday genlerin ifadesi ayrıca GBM TGCA olgularını içeren veri setinde incelendi (Şekil 4.3.a). Aday genlerden sadece *FZD7*, *LEF1* ve *LRP5* genlerine ait ifadelerin GBM tümörlerinde artmış olduğu saptandı (Şekil 4.3.b, $P<0.01$).

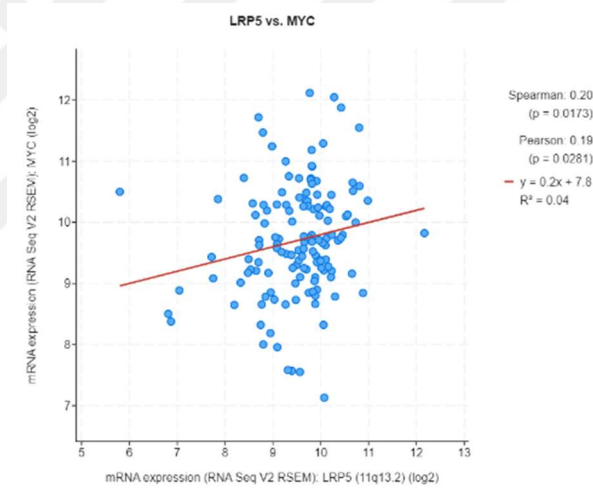


Şekil 4.3. Aday genlere ilişkin ifade değişimlerinin GBM tümör ve normal beyin dokusu örneklerinde karşılaştırılması (a). On aday gen içinde sadece *FZD7*, *LEF1* ve *LRP5* genlerine ait ifadenin GBM tümörlerinde artmış olduğu bulundu (b).

Liu et al. (2019) miR-504 ifadesinin GBM hücrelerinde düşük düzeyde olduğunu göstermiştir. GBM hücrelerinde miR-504'ün indüklenmiş ifadesi invazyon ve kanser kök hücre özelliklerini baskıladığı gibi epitelyal-mezenkimal geçişi de indükler. Belirtilen çalışmada, miR-504'ün *FZD7*'yi hedeflediği deneysel olarak göstermiştir. Benzer bir biçimde, yüksek miR-206 ifadesinin *FZD7* ifadesini baskılaması GBM hücreleri üzerinde anti-kanser etki oluşturmaktadır (Zhou et al. 2019). *LEF1*'in shRNA aracılı baskılanması GBM hücrelerinin göçünü, invazyonunu ve hücresel büyümesini engeller (Gao et al. 2014). Dolayısıyla, GBM hücrelerinde *FZD7* ve *LEF1*'in baskılanması sonucu anti-kanser etkinin meydana geldiği bilinmektedir. *FZD7* ve *LEF1*'in GBM hücrelerinde baskılanması sonrası oluşturduğu etki *LRP5*'in GBM'de terapötik bir hedef olma ihtimalini güçlendirmektedir.

4.4. GBM Olgularında *MYC* ve *LRP5* İfadeleri Arasında Pozitif Yönde Bir Kolerasyon Vardır

Wnt/ β -katenin sinyal yolağında birinci mesajcı olan WNT glikoproteini hücre membranı üzerinde yer alan LRP/FZD kompleksi üzerinden sinyali hücre içerisine iletir (Komiya and Habas 2008). Aktivasyona bağlı olarak β -katenin, nükleus içerisinde TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörlerine bağlanarak *MYC* ve *CCND1* gibi genlerin transkripsiyonu gerçekleştirir (Zhang et al. 2012b; Shtutman et al. 1999). Dolayısıyla, GBM hücrelerinde *LRP5* ifadesi ile Wnt/ β -katenin sinyal yolu hedefinde olan genin ifadesi arasında pozitif kolerasyon beklenebilir. GBM’de *LRP5* ve *MYC* gen ifadeleri arasındaki birliktelik “*cBioPortal for cancer genomic*” veri tabanı kullanılarak gösterildi (Şekil 4.4.).

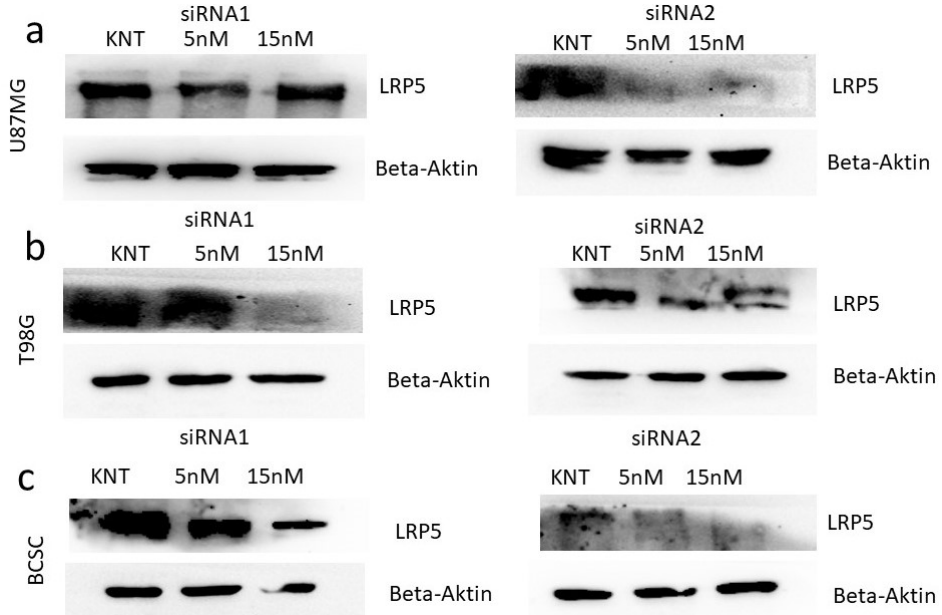


Şekil 4.4. “Glioblastoma multiforme TCGA, Firehose Legacy” veri setindeki GBM örneklerinde *LRP5* ve *MYC* genlerinin mRNA ifadeleri arasındaki pozitif yönde kolerasyon.

GBM’de *MYC* ve *LRP5* mRNA ifadeleri arasında pozitif yönde anlamlı bir kolerasyon saptandı ($P=0.0173$). Bu sonuç, GBM’de *LRP5* üzerinden Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktive olabileceğini göstermektedir. “*In silico*” analizlere dayanan sonuçlar neticesinde GBM’de Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inaktivasyonu için siRNA hedefi olarak *LRP5* seçildi.

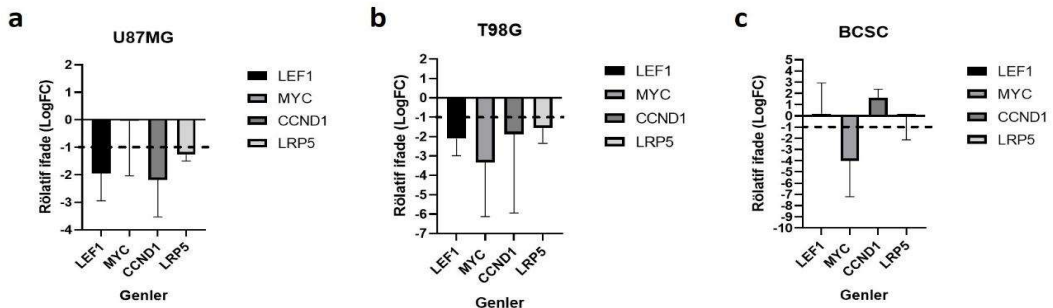
4.5. *LRP5*'in GBM ve BCSC Hücrelerinde Baskılanması Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağını İnaktive Eder

Küçük müdahale edici RNA ("*small interfering RNA*", siRNA) 20-25 baz çifti uzunluğunda kodlama yapmayan çift sarmal yapıda bir RNA molekülüdür (Dana et al. 2017). Bu RNA molekülü, protein kodlayan bir genin transkripsiyon sonrası baskılanmasına neden olan RNA interferaz mekanizmasında merkezi bir rol oynar. Sentetik siRNA'ların hücrelere doğrudan transfeksiyonu ise RISC yapısı üzerinden hedef genin susturulmasını sağlar (Amarzguioui et al. 2005). Bu nedenle, susturma işleminden sonra hedef genin mRNA ve protein düzeylerinde gerçekleşen ifade azalışı doğrulanmalıdır. Bu çalışmada, GBM ve BCSC hücreleri siRNA'lar ile transfekte edildikten 72 saat sonra, *LRP5*'in protein düzeylerindeki ifadesi tanımlandı. Optimizasyon çalışmasında, valide edilmiş siRNA (siRNA1) ile baskılama işlemi sonrasında U87MG hücrelerinde *LRP5* ifadesinde azalma gözlemlendi. *LRP5*'i hedefleyen diğer siRNA'nın (siRNA 2 ID: s501339) 72 saat boyunca uygulanması, *LRP5* ifadesini U87MG hücrelerinde düşürdü. U87MG hücrelerinde *LRP5*'in baskılanması için uygun konsantrasyon her iki siRNA için 5nM olarak saptandı. T98G ve BCSC hücre hatlarında *LRP5*'in baskılanması için optimize edilen siRNA 1 ve siRNA 2 konsantrasyonları sırasıyla 15nM ve 5nM idi. Hücre hatlarında baskılama işlemi sonrası *LRP5* ifadesinde meydana gelen azalma Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında susturma işlemi için optimize edilen siRNA 1 ve siRNA 2 konsantrasyonlarının protein ifadesi üzerindeki etkisi.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağında, LRP5 proteininin yer aldığı kompleks hücre dışından gelen sinyalin algılanmasında rol oynar. Sinyal yolağı aktive olduğunda β -katenin nükleus içerisine geçerek TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörleriyle hedef genlerin ifadesini gerçekleştirir (Komiya and Habas 2008). Çalışmalar, *CCND1*, *MYC* ve *LEF1* genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağına bağlı olarak ifade edildiğini göstermektedir (Zhang et al. 2012b; Shtutman et al. 1999; Hao et al. 2019). GBM ve BCSC hücre hatlarında *LRP5* ifadesi baskılandıktan sonra, bu genlerin mRNA düzeyindeki ifade değişimleri qPCR ile tanımlandı (Şekil 4.6.).

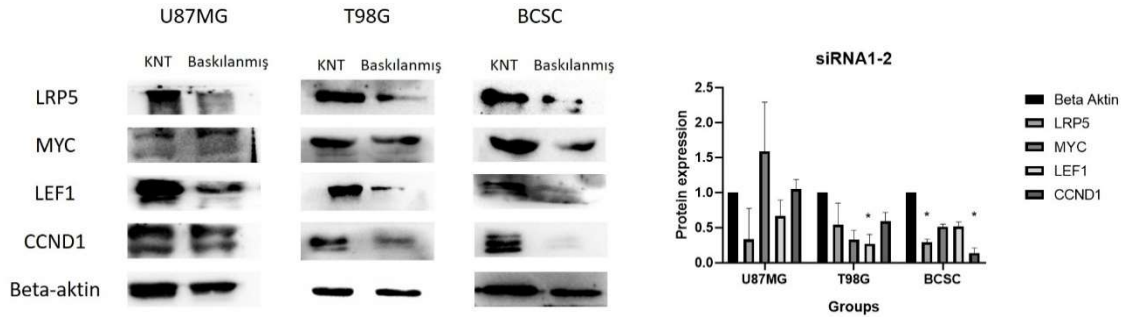


Şekil 4.6. U87MG (a), T98G (b) ve BCSC (c) hücre hatlarında *LRP5* ifadesi baskılandıktan 72 saat sonra, *LEF1*, *MYC*, *CCND1* ve *LRP5* gen ifadelerindeki değişim.

U87MG hücrelerine siRNA'lar optimize edilen konsantrasyonlarda uygulandıklarında, *LEF1* ve *CCND1* genlerine ait ortalama LogFC değerlerinin -1'in

altında olduğu bulundu. U87MG hücrelerinde *LRP5*'in susturulması *LEF1* ve *CCND1* gen ifadelerini düşürdü. T98G hücrelerine siRNA'lar uygulandığında, her üç hedef genin (*LEF1*, *MYC* ve *CCND1*) mRNA düzeyindeki ifadeleri azaldı. mRNA ifadelerine ait ortalama LogFC değerleri -1'in altında idi. BCSC hücrelerinde mRNA düzeyinde ifade azalışı sergileyen tek gen *MYC* idi.

Susturma işlemi sonrasında Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hedefindeki genlerin protein seviyesindeki ifade değişimleri U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında Western-Blot yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.7.). U87MG hücre hattında LEF1 protein ifadesi susturma işlemi sonrasında azaldı. T98G hücre hattında her üç hedef genin protein ifadeleri siRNA uygulamasına bağlı olarak düştü. Benzer bir biçimde, BCSC hücrelerinde de baskılanmış *LRP5* ifadesi hedef genlerin ifade ettiği protein seviyelerinde azalmaya neden oldu. Bununla birlikte, *LRP5*'in her üç hücre hattında da protein düzeyinde baskılandığı doğrulandı.



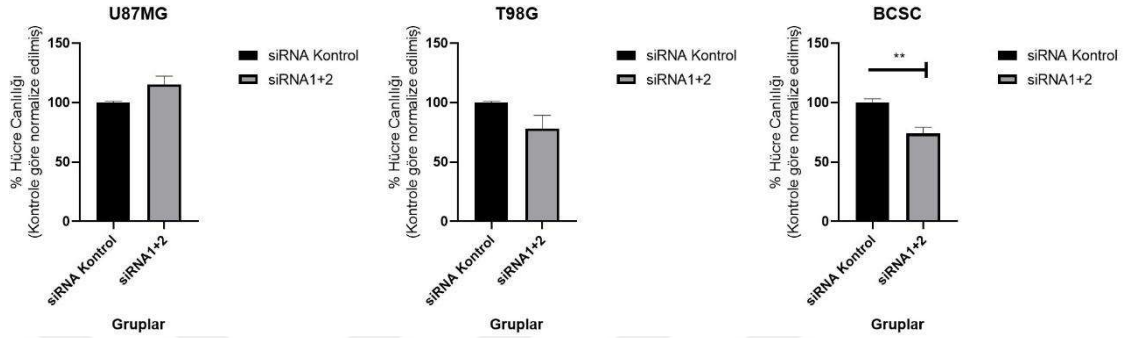
Şekil 4.7. U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında *LRP5* ifadesi baskılandıktan 72 saat sonra, LEF1, MYC, CCND1 ve *LRP5* protein ifadelerindeki değişim.

Sonuçlar, GBM ve BCSC hücrelerinde baskılanmış *LRP5* ifadesinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ettiğini göstermektedir.

4.6. GBM ve BCSC Hücrelerinde *LRP5*'in Baskılanması Proliferasyonu Azaltır

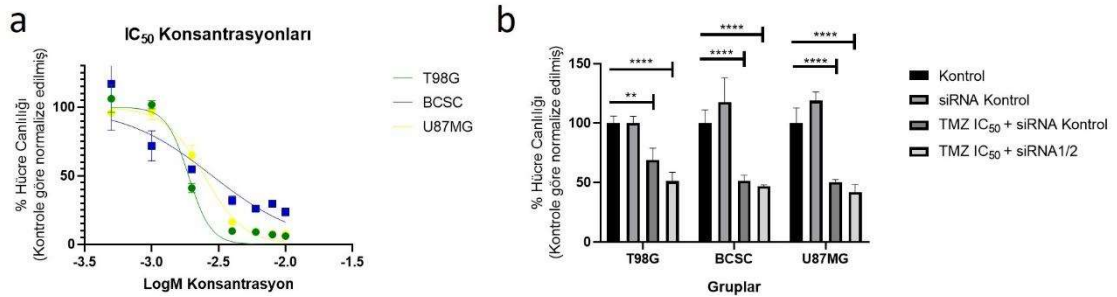
Wnt/ β -katenin sinyal yolağının GBM hücrelerinde baskılanması hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (Chen et al. 2019; Gao et al. 2014). Bu nedenle, susturma işleminden 72 saat sonra GBM ve BCSC hücre hatlarında proliferasyon değişimleri tanımlandı. U87MG hücrelerinde baskılama işleminden sonra beklenenin aksine proliferasyon arttı (Şekil 4.8.). Buna karşın, T98G ve BCSC hücrelerinde baskılama

işleminin 72 saat sonra proliferasyonda azalma saptandı. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu ve ilgili elemanların ifadesi KKH'lerde daha yüksektir (de Sousa E Melo and Vermeulen 2016). Bu nedenle, BCSC hücrelerinde baskılama işleminden sonra hücre proliferasyonundaki düşüşün diğer hücre hatlarına göre daha fazla olması, BCSC hücrelerine özgü sinyal yolaklarının etkinliğine bağlı olabilir.



Şekil 4.8. Baskılanmış *LRP5* ifadesinin U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri.

Susturma işleminin ve TMZ'nin birlikte kombine edileceği çalışmalar için belirtilen hücre hatlarında TMZ'nin IC_{50} konsantrasyonları belirlendi. Susturma işleminin etkisi 72. saate kendini gösterdiği için TMZ'nin IC_{50} konsantrasyonları ilaç uygulamasından 72 saat sonra yapıldı. T98G, BCSC ve U87MG hücrelerine 72 saat uygulanan TMZ'nin IC_{50} konsantrasyonları sırasıyla 1,9mM, 2,836mM ve 2,472mM idi (Şekil 4.9.a).



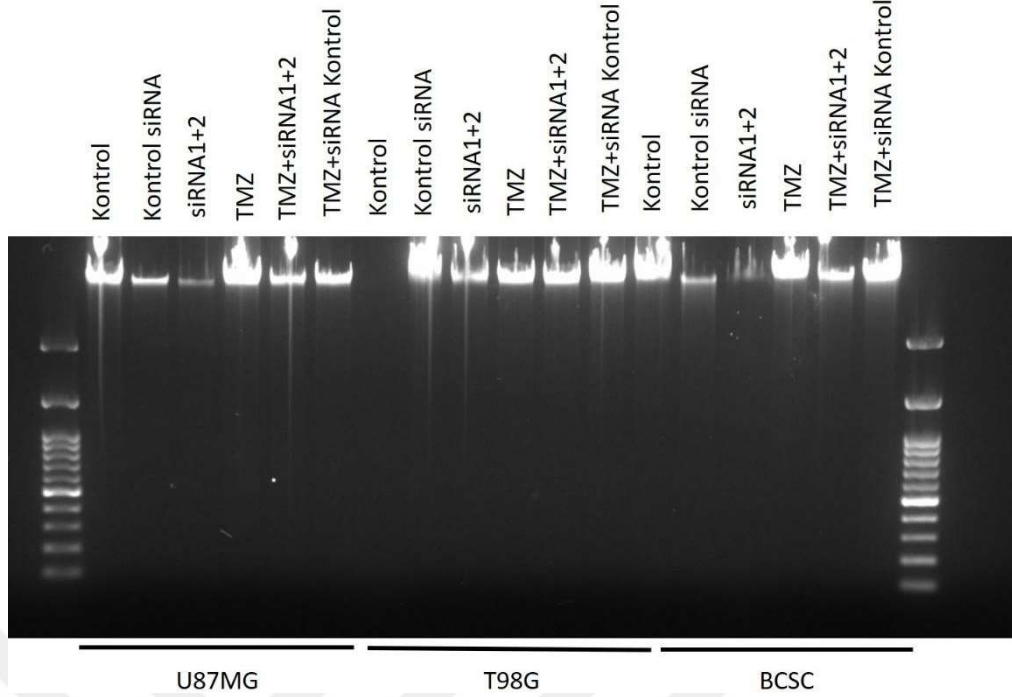
Şekil 4.9. GBM ve BCSC hücre hatlarında TMZ'nin IC_{50} konsantrasyonlarının tanımlanması (a) ve TMZ/siRNA kombine uygulamasının GBM ve BCSC proliferasyonu üzerindeki etkisi (b).

TMZ ve siRNA kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi U87MG, T98G ve BCSC hücrelerinde değerlendirildi (Şekil 4.9.b). TMZ'nin kombine edildiği ve tek başına kullanıldığı çalışmalarda tanımlanan IC_{50} konsantrasyonları uygulandı.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol siRNA uygulanan hücrelerde canlılık anlamlı olarak değişmedi. TMZ'nin tek ve siRNA'lar ile kombine olarak uygulandığı gruplarda hücre canlılığı anlamlı olarak azaldı. Bununla birlikte, TMZ'nin siRNA1+2 ile kombine edildiği gruptaki hücre canlılığı TMZ'nin kontrol siRNA ile birlikte uygulandığı gruba göre daha azdı. Bulgular, GBM'de Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibisyonunun TMZ etkinliğini artırabileceğini göstermektedir.

4.7. GBM ve BCSC Hücrelerinde Baskılanmış *LPR5* İfadesinin Apoptoz Üzerindeki Etkisi

Apoptoz ile ilişkili karakteristik özelliklerden biri DNA'nın parçalanmasıdır (Bortner et al. 1995). Hücrelerde meydana gelen DNA fragmentlerinin tanımlanması apoptoz hakkında bilgi sağlamaktadır (Zhang and Xu 2000). GBM hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının baskılanması apoptozu indüklemektedir (Xu et al. 2019). Bu çalışmada, U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında TMZ ve siRNA uygulamalarının apoptoz üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, agaroz jel üzerinde smear görüntüsü varlığına göre gözlemsel olarak yorumlandı. T98G hücre hattının kontrol grubuna ait DNA örneği jele yüklenemedi (Şekil 4.10.). U87MG hücre hattında TMZ uygulanan gruplarda “*smear*” daha yoğun bir biçimde gözlemlendi. U87MG hücre hattında, TMZ uygulanan gruplarda gözlenen yoğun “*smear*” görüntüsü, TMZ'ye bağlı apoptotik etki nedeniyle meydana gelebilir. T98G ve BCSC hücre hatlarında ise hemen hemen tüm gruplarda “*smear*” görüntüsü saptandı. Kontrol gruplarında, siRNA'nın tek başına uygulandığı ve TMZ ile birlikte uygulandığı gruplarda belirtilen görüntü paterninin gözlenmesi nedeniyle, DNA fragment oluşumunun hücrelere uygulanan etkenlere bağlı olarak geliştiği tam olarak anlaşılamamıştır. Kontrol grubuna göre, baskılanmış *LRP5* ifadesi veya *LRP5*'i hedef alan siRNA'lar ile TMZ'nin kombine edildiği gruplara özgü apoptotik etki saptanamamıştır.



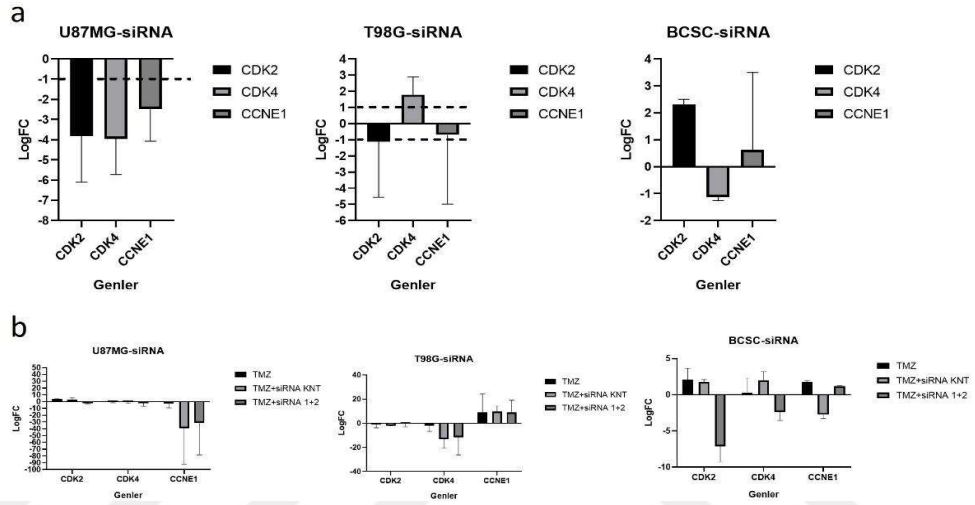
Şekil 4.10. Baskılama işlemi gerçekleştirilen hücre hatlarında genomik DNA fragmentlerinin farklı uygulama gruplarında gösterilmesi.

Hücre proliferasyonu üzerindeki azaltıcı etki sadece apoptozun indüklenmesi ile değil aynı zamanda hücre döngüsü tutuklanması nedeniyle de meydana gelebilir (Sandoval et al. 2004). Proliferasyonu azaltarak anti-kanser etkinlik oluşturan bir uygulamada, eğer hücreler apoptoz dışında hücre döngüsünün belirli bir fazında tutuklu kalıyor ise, etkinlik türü sitostatik olarak adlandırılır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının baskılanması GBM hücrelerinde sitostatik etki oluşturabilir. Bu nedenle, baskılama işlemi sonrası GBM ve BCSC hücrelerinde hücre döngüsü düzenleyici genlerin ifade değişimleri değerlendirildi.

4.8. Baskılama İşlemi GBM ve BCSC Hücrelerinde Hücre Döngüsü Düzenleyici Genlerin İfadesini Değiştirir

Çeşitli çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inaktive edildiği GBM hücrelerinin G0/G1 fazında tutuklu kaldığını göstermiştir (Chen et al. 2020). Mitojenik sinyale bağlı olarak siklin D ve CDK4 proteinlerinin oluşturduğu kompleks hücre döngüsünü başlatır (Caglar and Biray Avcı 2020). S fazına geçişte hücre döngüsünün ilerleyişi siklin E ve CDK2 tarafından düzenlenir (Caglar and Biray Avcı 2020). Bu genlerin ifade düzeylerinde meydana gelen düşüş hücrelerin G0/G1 evresinde

tutuklanmasına neden olur (Caglar and Biray Avcı 2020). Bu çalışmada, LRP5 üzerinden inaktive edilen Wnt/ β -katenin sinyal yolağının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin belirlenmesi için *CDK2*, *CDK4* ve *CCNE1* genlerinin mRNA ve protein düzeylerindeki ifadeleri tanımlandı. Baskılanmış *LRP5* ifadesinin belirtilen hücre hatlarında *CCND1* ifadesini düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.). Buna ilave olarak, baskılama işlemi sonrası U87MG hücre hattında hücre döngüsü ilişkili her üç genin mRNA düzeyindeki ifade seviyelerini düşürdü (Şekil 4.11.a).



Şekil 4.11. siRNA ile *LRP5* ifadesi baskılanan ve siRNA ile birlikte TMZ uygulanan U87MG, T98G ve BCSC hücre hatlarında hücre döngüsü düzenleyici genlerin mRNA ifade düzeylerindeki değişimler.

LRP5 ifadesinin baskılandığı U87MG hücre hattında *CDK2*, *CDK4* ve *CCNE1* genlerinin ortalama LogFC değerleri sırasıyla -3,807, -3,95 ve -2,48 idi (Şekil 4.11.a). *LRP5*'in baskılanması U87MG hücre hattında hücre döngüsü ilişkili genlerin ifadesini azalttı. T98G hücrelerinde *LRP5*'in baskılanmasının ardından, belirtilen genlerin ortalama LogFC değerleri sırasıyla -1,12, 1,79 ve -0,70 olarak bulundu. T98G hücre hattında baskılanmış *LRP5* ifadesi, *CDK2* ifadesini azaltırken *CDK4* ifadesini mRNA düzeyinde arttırdı. *CCNE1* ifadesinde ise değişim gözlenmedi. siRNA1+2 uygulanan BCSC hücrelerinde ise *CDK2*, *CDK4* ve *CCNE1* genlerinin ortalama LogFC değerleri sırasıyla 2,3, -1,125 ve 0,63 idi. *CDK2* ifadesi artarken *CDK4* gen ifadesinin siRNA uygulaması sonrası azaldığı saptandı. *CCNE1* gen ifadesinin ise değişmediği gözlemlendi. Sadece TMZ ve *LRP5* ifadesini baskılamaya yönelik siRNA ve TMZ'nin kombine uygulandığı gruplarda da *CDK2*, *CDK4* ve *CCNE1* genlerinin ifade düzeyleri incelendi.

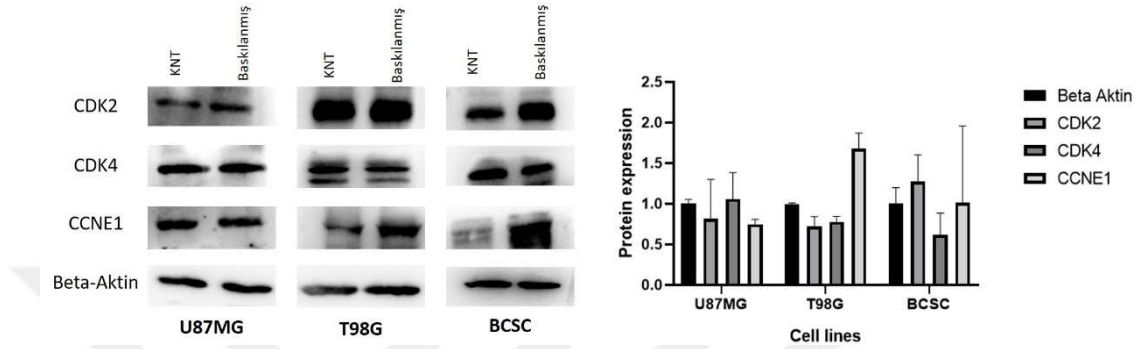
U87MG hücre hattı için TMZ, TMZ+siRNA kontrol ve TMZ+siRNA1+2 uygulama gruplarında *CDK2* gen ifadesine ait ortalama LogFC değerleri sırasıyla 3,814, 3,330 ve -2,177 idi (Şekil 4.11.b). TMZ ve TMZ+siRNA kontrol gruplarında mRNA düzeyindeki *CDK2* ifadesi artmış iken; TMZ+siRNA1+2 kombine grubunda bu ifade -2,177 kat azaldı. *CDK4* geni için ortalama LogFC değerleri tanımlanan gruplar için sırasıyla -0,03, -0,042 ve -2,099 idi. Sadece TMZ ve TMZ+siRNA kontrol uygulanan U87MG hücrelerinde *CDK4* ifadesi değişmez iken TMZ+siRNA1+2 kombine uygulama grubunda ifade azalışı saptandı. *CCNE1* için ortalama LogFC değerleri tanımlanan gruplar için sırasıyla -2,79, -39,05 ve -31,11 idi. Tüm gruplarda *CCNE1* ifadesinin azaldığı saptandı.

T98G hücre hattı TMZ, TMZ+siRNA kontrol ve TMZ+siRNA1+2 uygulama grupları için *CDK2* gen ifadesine ait ortalama LogFC değerleri sırasıyla -0,97, -2,00 ve -0,44 idi. Gruplara ait *CDK4* ifadeleri sırasıyla -1,88, -13,14 ve -11,53; *CCNE1* ifadeleri ise sırasıyla 9,01, 9,61 ve 8,95 idi. T98G hücrelerinde, TMZ *CDK4* ifadesinin azalmasına neden olurken *CCNE1* mRNA ifadesinin artmasına neden oldu.

TMZ, TMZ+siRNA Kontrol ve TMZ+siRNA1+2 grupları için BCSC hücrelerinde tanımlanan ortalama *CDK2* LogFC değerleri sırasıyla 2,10, 1,77 ve -7,16 idi. Susturma işlemi yapılmayan fakat TMZ uygulanan gruplarda *CDK2* ifadesi arttı. *LRP5*'i hedefleyen siRNA ve TMZ'nin kombine uygulandığı grupta *CDK2* ifadesi azaldı. Ortalama *CDK4* ifadeleri gruplar için sırasıyla 0,27, 1,97 ve -2,37 idi. Tek başına TMZ'nin uygulandığı grupta *CDK4* ifadesi değişmezken; kontrol siRNA ile birlikte uygulandığı grupta ifade artışı gözlemlendi. siRNA ile kombinasyonu *CDK4* ifade azalışına neden oldu. *CCNE1* ifadesi için TMZ, TMZ+siRNA Kontrol ve TMZ+siRNA1+2 grupları incelendiğinde, LogFC değerlerinin sırasıyla 1,76, -2,76 ve 1,13 olduğu belirlendi. TMZ'nin tek başına ve siRNA ile susturma işleminin birlikte uygulandığı grupta *CCNE1* ifadesi artış gösterdi. TMZ'nin kontrol siRNA ile birlikte uygulanması *CCNE1* ifadesini düşürdü.

Baskılama işlemi sonrası hücre döngüsü düzenleyici genlerin ifade profili değişimleri protein düzeyinde de tanımlandı (Şekil 4.12.). *LRP5* ifadesi baskılanmış U87MG hücrelerinde *CCNE1* protein ifadesi azalırken, *CDK4* ifadesi arttı. T98G

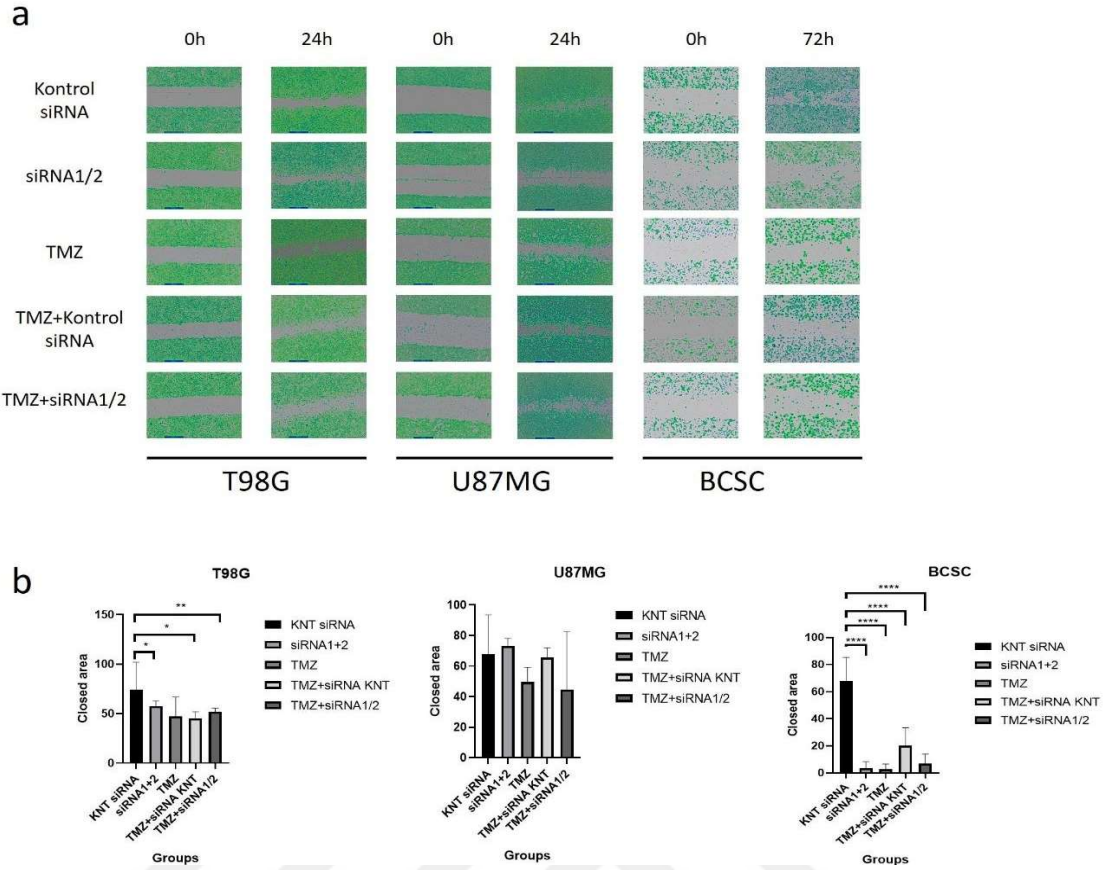
hücrelerine uygulanan gen susturma işlemi, CDK2 ve CDK4 protein ifadelerini azaltırken, CCNE1 ifadesinin artmasına neden oldu. BCSC hücrelerinde *LRP5*'in baskılanması ise CDK4 ifadesini düşürdü. Hücre döngüsünde G0/G1 faz geçişini düzenleyen genlerin ifadesindeki azalma, baskılanmış *LRP5* ifadesinin GBM ve BCSC hücre hatlarında G0/G1 faz tutuklanmasına neden olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.12. *LRP5* ifadesinin baskılandığı T98G, U87MG ve BCSC hücre hatlarında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ifade seviyelerindeki değişim.

4.9. Azalan *LRP5* İfadesi GBM ve BCSC Hücrelerinin İnvazyon Kapasitesini Azaltır

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının baskılandığı GBM hücrelerinin kök hücre özellikleri ve invazyon kapasiteleri azalmaktadır (Liu et al. 2018b; Gao et al. 2022). Bu nedenle, GBM ve BCSC hücrelerinde *LRP5* ifadesi baskılandıktan sonra invazyon kapasitelerindeki değişim yara iyileşme testi ile tanımlandı. T98G ve U87MG hücre hatlarında kontrol siRNA grubu için oluşturulan yara yüzeylerinin bir kısmı 24. saatte tamamen kapandığı için deney 24. saatte sonlandırıldı. Kontrol siRNA uygulanan T98G hücrelerinde oluşturulan yara yüzeylerinin ortalama %74'ü 24 saat içerisinde kapandı (Şekil 4.13.a ve 4.13.b). *LRP5* ifadesinin baskılandığı T98G hücrelerinde yara yüzeylerinin ortalama kapanma yüzdesi %57'idi. Sadece TMZ uygulanan grupta yara yüzeylerinin ortalama %47'si kapanmıştı. TMZ ve kontrol siRNA uygulanan grupta ortalama kapanmış alan yüzdesi sadece TMZ uygulanan grup yüzdesiyle benzerdi. Belirtilen grupta yüzey alanının ortalama %45'i kapanmıştı. *LRP5*'in susturulduğu ve ardından TMZ'nin uygulandığı T98G hücrelerine ait yüzeyin %51'i kapalıydı. TMZ, siRNA ve bunların kombine olarak uygulandığı gruplarda kapalı alan yüzdeleri kontrol grubuna göre daha düşüktü. Sonuç olarak, deney gruplarında T98G'nin invaziv özelliklerinin baskılandığı gösterildi.



Şekil 4.13. Baskılama işlemi gerçekleştirilen hücre hatlarında yara iyileşme testine ait nitel (a) ve nicel (b) sonuçlar.

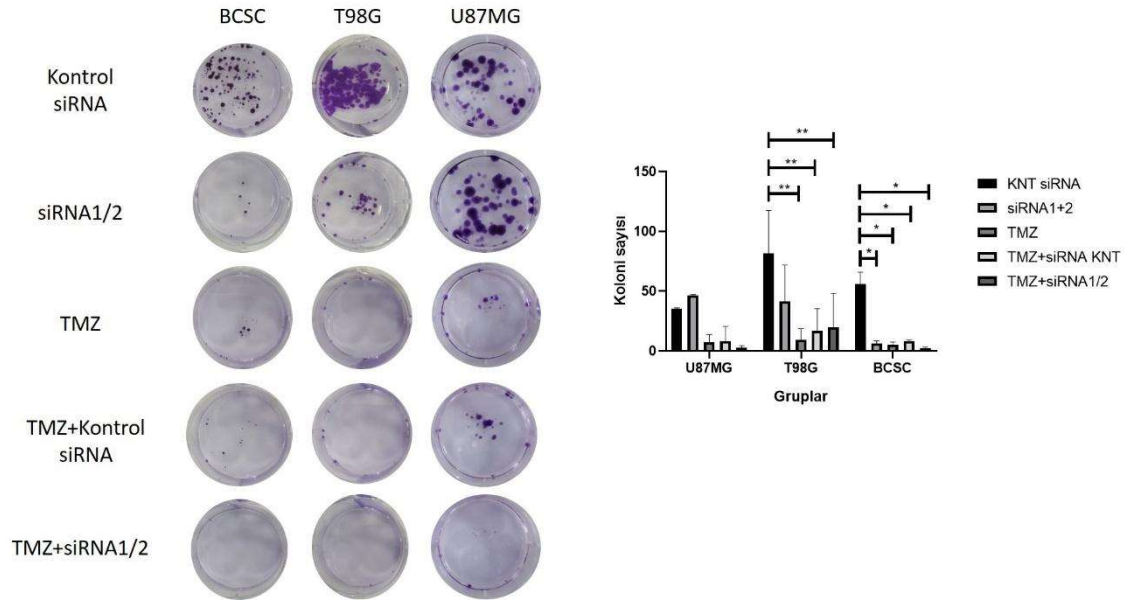
Kontrol siRNA uygulanan grupta U87MG hücreleri için oluşturulan yara yüzeylerinin ortalama %67,8'i kapandı (Şekil 4.13.a ve 4.13.b). *LRP5*'in susturulduğu grupta yara yüzeylerinin ortalama 73,2'si kapandı. Sadece TMZ'nin uygulandığı grupta yara yüzeylerinin %49'u kapandı. Kontrol siRNA ve TMZ'nin birlikte uygulandığı grupta yara yüzeylerinin ortalama %65,7'si kapalıydı. Her iki işlemin kombine uygulandığı grupta yer alan yara yüzeylerinin ise ortalama %44,6'sı kapanmıştı. Yara yüzeyi en az kapanan gruplar TMZ'nin tek başına uygulandığı ve TMZ'nin ifade baskılama işlemi ile kombine edildiği gruplardı. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız olmasına rağmen, TMZ'nin tek başına ve gen ifadesini baskılayan siRNA'lar ile birlikte uygulandığı gruplarda U87MG'nin invaziv özellikleri azaldı.

BCSC hücre hattında kontrol siRNA grubu için oluşturulan yara yüzeylerinin bir kısmı 72. saatte tamamen kapandığı için deney 72. saatte sonlandırıldı. Kontrol siRNA uygulanan BCSC hücrelerinde oluşturulan yara yüzeylerinin ortalama %68'i 72 saat içerisinde kapandı (Şekil 4.13.a ve 4.13.b). *LRP5* ifadesinin baskılandığı BCSC

hücrelerinde yara yüzeylerinin ortalama kapanma yüzdesi %3,6 idi. Sadece TMZ uygulanan grupta yara yüzeylerinin ortalama %2,79 u kapandı. TMZ ve kontrol siRNA uygulanan grupta ortalama kapanmış alan yüzdesi %20,11 idi. TMZ uygulanan ve *LRP5*'in susturulduğu gruba ait kapalı yüzey alan yüzdesi %6,8 idi. TMZ, siRNA ve bunların kombine olarak uygulandığı gruplarda yara yüzeyinin çok az bir kısmı tekrar hücre ile kaplandı. Sonuç olarak, deney gruplarında BCSC'nin invaziv özelliklerinin baskılandığı gösterildi.

4.10. Baskılanmış *LRP5* İfadesi GBM ve BCSC Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyelini Düşürür

GBM'de ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının baskılanması KKH'nin proliferatif kapasitesini ve hayatta kalma yeteneklerini azaltmaktadır (Kahlert et al. 2015). Çalışmalar Wnt/ β -katenin sinyal yolağının siRNA'lar aracılığıyla baskılanmasının, GBM ve BCSC hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Sun et al. 2018). Wnt/ β -katenin yolunun inhibisyonunun GBM hücrelerinde apoptozu indükleyerek klonal büyümeyi engellediğini rapor etmiştir (Yan et al. 2024). Benzer şekilde, BCSC hücrelerinde bu yolun baskılanmasının hücre hayatta kalma oranını düşürdüğünü ve koloni oluşumunu belirgin bir şekilde azalttığını göstermiştir (Smith et al. 2023; Wang et al. 2014). Bu çalışmada, GBM ve BCSC hücrelerinde *LRP5* ifadesinin siRNA aracılığıyla baskılanması sonucunda, hücrelerin klonal büyüme potansiyeli tanımlandı. T98G ve BCSC hücre hatlarında, kontrol grubuna kıyasla tüm deney gruplarında koloni sayısı önemli ölçüde düştü. Hem baskılanmış *LRP5* ifadesi hem de TMZ uygulaması, BCSC ve T98G hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini önemli ölçüde düşürdü. Buna karşın U87MG hücre hattında, kontrol siRNA uygulanan grupta oluşan koloni sayısı *LRP5*'in siRNA ile baskılandığı gruptaki koloni sayısından daha düşüktü (Şekil 4.14.). TMZ'nin uygulandığı her grupta koloni sayısı belirgin bir biçimde azaldı.



Şekil 4.14. *LRP5* ifadesi baskılanan hücre gruplarına ait kolojenik test sonuçları

Bu veriler, *LRP5* ifadesinin siRNA aracılığıyla baskılanmasının ve TMZ uygulamasının, T98G GBM ve BCSC hücre hatlarında klonal büyüme potansiyeli ve hayatta kalma becerilerini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Buna karşın, U87MG hücre hattında gözlemlenen farklılıklar, bu hücre hattının *LRP5* baskılanmasına karşı farklı bir biyolojik tepki geliştirdiğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

GBM erişkinlerde sık bir biçimde gözlenen agresif bir beyin tümörüdür. Bu hastalığın tedavisinde TMZ kullanılmaktadır ancak bu kemoterapi ajanına karşı GBM tümörlerinin direnç göstermesi tedavi başarısının önündeki en büyük engellerden biridir. Bu nedenle, GBM tedavisinde hedef olarak kullanılabilecek yeni terapötik belirteçlerin tanımlanması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, biyoinformatik analizlere ait sonuçlar *LRP5*'in terapötik bir hedef olabileceğini gösterdi. Devamında, *LRP5* hedefinin tedavide kullanılabilme potansiyeli U87MG ve T98G GBM hücre hatları ve BCSC hücre hattında test edildi. Elde edilen sonuçlar, baskılanmış *LRP5* ifadesinin GBM ve BCSC hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azalttığını ve TMZ'nin anti-kanser etkinliğini arttırdığını göstermektedir.

Anti-proliferatif etkinin nedeni incelendiğinde ise baskılanmış *LRP5* ifadesinin *CCND1*, *CCNE1*, *CDK2* ve *CDK4* gibi hücre döngüsünde G0/G1 evresini düzenleyen genlerin ifadesini azalttığı gözlenmiştir. Bu nedenle, GBM hücrelerinde *LRP5*'in hedeflenmesi sitostatik bir etkiye neden olabilir. Çalışmanın devamında, baskılanmış *LRP5* ifadesinin GBM ve BCSC hücrelerinin koloni oluşturma ve invazyon kapasitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. GBM ve BCSC hücrelerinde belirtilen ifade profili koloni oluşturma ve invazyon yeteneklerini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Sonuçlar, *LRP5*'in GBM hücrelerinde hedeflenmesi durumunda anti-kanser etkinlik meydana getireceğini sunmaktadır. GBM tedavisinde *LRP5* önemli bir terapötik hedef olarak kullanılabilir.

LRP5'in hedeflendiği “*in vivo*” GBM tümör modellerinden elde edilecek veriler, bu terapötik hedefin taşıdığı potansiyeli daha net bir biçimde ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

- Ajayi, S., Becker, H., Reinhardt, H., Engelhardt, M., Zeiser, R., von Bubnoff, N., Wäsch, R. 2018. Ruxolitinib. *Recent Results In Cancer Research*, 212, 119–132.
- Amarzguioui, M., Rossi, J. J., Kim, D. 2005. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Letters*, 579(26), 5974–5981.
- Amelio, D., Amichetti, M. 2012. Radiation therapy for the treatment of recurrent glioblastoma: an overview. *Cancers*, 4(1), 257–280.
- Angonin, D., Van Raay, T. J. 2013. Nkd1 functions as a passive antagonist of Wnt signaling. *Plos One*, 8(8), e74666.
- Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A. U., Lesniak, M. S. 2015. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Review Of Neurotherapeutics*, 15(7), 741–752.
- Bader, G. D., Hogue, C. W. 2003. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4, 2.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., Beier, C. P. 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67(9), 4010–4015.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B., Cidlowski, J. A. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends In Cell Biology*, 5(1), 21–26.
- Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Tan, S. T., Peng, L., Davis, P. F., Itinteang, T. 2016. Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Frontiers In Surgery*, 3, 21.
- Caglar, H. O., Aytatli, A., Barlak, N., Aydin Karatas, E., Tatar, A., Sahin, A., Karatas, O. F. 2024. Bioinformatics approach combined with experimental verification reveals OAS3 gene implicated in paclitaxel resistance in head and neck cancer. *Head & Neck*, 10.1002/hed.27803.
- Caglar, H. O., Biray Avci, C. 2020. Alterations of cell cycle genes in cancer: unmasking the role of cancer stem cells. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 3065–3076.
- Caglar, H. O. 2023. Hücre içi sinyal iletimi, In: *Temel moleküler biyoloji*. Kara, A. (eds), Akademisyen Yayınevi, 415-437, Ankara.
- Caglar, H. O., Duzgun, Z. 2023. Identification of upregulated genes in glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells using bioinformatics analysis. *Gene*, 848, 146895.
- Castelo-Branco, G., Andersson, E. R., Minina, E., Sousa, K. M., Ribeiro, D., Kokubu, C., Imai, K., Prakash, N., Wurst, W., Arenas, E. 2010. Delayed dopaminergic neuron

differentiation in *LRP6* mutant mice. *Developmental Dynamics: An Official Publication Of The American Association Of Anatomists*, 239(1), 211–221.

- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., Schultz, N. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401–404.
- Chang, L., Lei, X., Qin, Y. U., Zeng, G., Zhang, X., Jin, H., Wang, C., Wang, X., Su, J. 2016. Expression and prognostic value of *SFRP1* and β -catenin in patients with glioblastoma. *Oncology Letters*, 11(1), 69–74.
- Chen, X., Huang, L., Yang, Y., Chen, S., Sun, J., Ma, C., Xie, J., Song, Y., Yang, J. 2020. ASPM promotes glioblastoma growth by regulating G1 restriction point progression and Wnt- β -catenin signaling. *Aging*, 12(1), 224–241.
- Chen, M., Tang, B., Xie, S., Yan, J., Yang, L., Zhou, X., Zeng, E. 2019. Biological functions of TNKS1 and its relationship with Wnt/ β -catenin pathway in astrocytoma. *Oncotargets And Therapy*, 12, 10841–10850.
- Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T., Lin, C. Y. 2014. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8, 1-7.
- Ciani, L., Salinas, P. C. 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(5), 351–362.
- D'Alessio, A., Proietti, G., Sica, G., Scicchitano, B. M. 2019. Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue. *Cancers*, 11(4), 469.
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., Gharagouzlo, E. 2017. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. *International Journal Of Biomedical Science: IJBS*, 13(2), 48–57.
- Demšar, J., Curk, T., Erjavec, A., Gorup, Č., Hočevár, T., Milutinovič, M., Možina, M., Polajnar, M., Toplak, M., Starič, A. 2013. Orange: data mining toolbox in Python. *The Journal of Machine Learning Research*, 14, 2349-2353.
- de Sousa E Melo, F., Vermeulen, L. 2016. Wnt signaling in cancer stem cell biology. *Cancers*, 8(7), 60.
- Denysenko, T., Annovazzi, L., Cassoni, P., Melcarne, A., Mellai, M., Schiffer, D. 2016. Wnt/ β -catenin signaling pathway and downstream modulators in low- and high-grade glioma. *Cancer Genomics & Proteomics*, 13(1), 31–45.

- Ding, X., Deng, G., Liu, J., Liu, B., Yuan, F., Yang, X., Chen, Q. 2019. *GOLM1* silencing inhibits the proliferation and motility of human glioblastoma cells via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Brain Research*, 1717, 117–126.
- Duncan, J. S., Litchfield, D. W. 2008. Too much of a good thing: the role of protein kinase *CK2* in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of *CK2*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1784(1), 33–47.
- Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Garapati, P., Gillespie, M., Hausmann, K., Haw, R., Jassal, B., Jupe, S., Korninger, F., McKay, S., Matthews, L., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Shamovsky, V., Webber, M., Weiser, J., Williams, M., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P. 2016. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D481–D487.
- Fan, C. H., Liu, W. L., Cao, H., Wen, C., Chen, L., Jiang, G. 2013. O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death & Disease*, 4(10), e876.
- Feng, R., Patil, S., Zhao, X., Miao, Z., Qian, A. 2021. RNA therapeutics-research and clinical advancements. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 8, 710738.
- Fodde, R., Brabletz, T. 2007. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion In Cell Biology*, 19(2), 150–158.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Friedrich, M., Aigner, A. 2022. Therapeutic siRNA: state-of-the-art and future perspectives. *Biodrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals And Gene Therapy*, 36(5), 549–571.
- Gao, X., Mi, Y., Ma, Y., Jin, W. 2014. *LEF1* regulates glioblastoma cell proliferation, migration, invasion, and cancer stem-like cell self-renewal. *Tumour Biology: The Journal Of The International Society For Oncodevelopmental Biology And Medicine*, 35(11), 11505–11511.
- Gao, Z., Xu, J., Fan, Y., Qi, Y., Wang, S., Zhao, S., Guo, X., Xue, H., Deng, L., Zhao, R., Sun, C., Zhang, P., Li, G. 2022. PDIA3P1 promotes Temozolomide resistance in glioblastoma by inhibiting C/EBP β degradation to facilitate proneural-to-mesenchymal transition. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 41(1), 223.
- Ghosh, R., Tabrizi, S. J. 2017. Gene suppression approaches to neurodegeneration. *Alzheimer's Research & Therapy*, 9(1), 82.
- Goker Bagca, B., Ozates, N. P., Biray Avci, C. 2022. Ruxolitinib enhances cytotoxic and apoptotic effects of temozolomide on glioblastoma cells by regulating WNT signaling pathway-related genes. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 40(1), 37.

- Goker Bagca, B., Ozates, N. P., Asik, A., Caglar, H. O., Gunduz, C., Biray Avcı, C. 2020. Temozolomide treatment combined with AZD3463 shows synergistic effect in glioblastoma cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 533(4), 1497–1504.
- Gonçalves, C. S., Vieira de Castro, J., Pojo, M., Martins, E. P., Queirós, S., Chautard, E., Taipa, R., Pires, M. M., Pinto, A. A., Pardal, F., Custódia, C., Faria, C. C., Clara, C., Reis, R. M., Sousa, N., Costa, B. M. 2018. *WNT6* is a novel oncogenic prognostic biomarker in human glioblastoma. *Theranostics*, 8(17), 4805–4823.
- Gong, A., Huang, S. 2012. FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Research*, 72(22), 5658–5662.
- Gonias, S. L., Karimi-Mostowfi, N., Murray, S. S., Mantuano, E., Gilder, A. S. 2017. Expression of LDL receptor-related proteins (LRPs) in common solid malignancies correlates with patient survival. *Plos One*, 12(10), e0186649.
- Grochans, S., Cybulska, A. M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., Baranowska-Bosiacka, I. 2022. Epidemiology of glioblastoma multiforme-literature review. *Cancers*, 14(10), 2412.
- Grotewold, L., Rüther, U. 2002. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *The EMBO Journal*, 21(5), 966–975.
- Guichet, P. O., Guelfi, S., Teigell, M., Hoppe, L., Bakalara, N., Bauchet, L., Duffau, H., Lamszus, K., Rothhut, B., Hugnot, J. P. 2015. Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(1), 21–34.
- Günther, H. S., Schmidt, N. O., Phillips, H. S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., Lamszus, K. 2008. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27(20), 2897–2909.
- Guo, J., Cagatay, T., Zhou, G., Chan, C. C., Blythe, S., Suyama, K., Zheng, L., Pan, K., Qian, C., Hamelin, R., Thibodeau, S. N., Klein, P. S., Wharton, K. A., Liu, W. 2009. Mutations in the human naked cuticle homolog NKD1 found in colorectal cancer alter Wnt/Dvl/ β -catenin signaling. *Plos One*, 4(11), e7982.
- Guo, W., Chen, W., Yu, W., Huang, W., Deng, W. 2013. Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers. *Chinese Journal Of Cancer*, 32(9), 488–493.
- Haile, W. B., Gavegnano, C., Tao, S., Jiang, Y., Schinazi, R. F., Tyor, W. R. 2016. The Janus kinase inhibitor ruxolitinib reduces HIV replication in human macrophages and ameliorates HIV encephalitis in a murine model. *Neurobiology Of Disease*, 92(Pt B), 137–143.
- Han, C. H., Batchelor, T. T. 2017. Isocitrate dehydrogenase mutation as a therapeutic target in gliomas. *Chinese Clinical Oncology*, 6(3), 33.

- Han, M. H., Min, K. W., Noh, Y. K., Kim, J. M., Cheong, J. H., Ryu, J. I., Won, Y. D., Koh, S. H., Myung, J. K., Park, J. Y., Kwon, M. J. 2022. High *DKK3* expression related to immunosuppression was associated with poor prognosis in glioblastoma: machine learning approach. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 71(12), 3013–3027.
- Hao, Y. H., Lafita-Navarro, M. C., Zacharias, L., Borenstein-Auerbach, N., Kim, M., Barnes, S., Kim, J., Shay, J., DeBerardinis, R. J., Conacci-Sorrell, M. 2019. Induction of *LEFI* by *MYC* activates the WNT pathway and maintains cell proliferation. *Cell Communication And Signaling: CCS*, 17(1), 129.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., Stupp, R. 2005. *MGMT* gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal Of Medicine*, 352(10), 997–1003.
- Hennige, A. M., Ozcan, U., Okada, T., Jhala, U. S., Schubert, M., White, M. F., Kulkarni, R. N. 2005. Alterations in growth and apoptosis of insulin receptor substrate-1-deficient beta-cells. *American journal of physiology. Endocrinology And Metabolism*, 289(2), E337–E346.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., Gotoh, Y. 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development (Cambridge, England)*, 131(12), 2791–2801.
- Hu, H., Wang, H., Yang, X., Li, Z., Zhan, W., Zhu, H., Zhang, T. 2023. Network pharmacology analysis reveals potential targets and mechanisms of proton pump inhibitors in breast cancer with diabetes. *Scientific Reports*, 13(1), 7623.
- Jackson, M., Hassiotou, F., Nowak, A. 2015. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*, 36(2), 177–185.
- Kahlert, U. D., Suwala, A. K., Koch, K., Natsumeda, M., Orr, B. A., Hayashi, M., Maciarczyk, J., Eberhart, C. G. 2015. Pharmacologic Wnt inhibition reduces proliferation, survival, and clonogenicity of glioblastoma cells. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology*, 74(9), 889–900.
- Kang, H., Ga, Y. J., Kim, S. H., Cho, Y. H., Kim, J. W., Kim, C., Yeh, J. Y. 2023. Small interfering RNA (siRNA)-based therapeutic applications against viruses: principles, potential, and challenges. *Journal Of Biomedical Science*, 30(1), 88.
- Kaur, N., Chettiar, S., Rathod, S., Rath, P., Muzumdar, D., Shaikh, M. L., Shiras, A. 2013. Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Molecular And Cellular Neurosciences*, 54, 44–57.
- Kierulf-Vieira, K. S., Sandberg, C. J., Grieg, Z., Günther, C. C., Langmoen, I. A., Vik-Mo, E. O. 2016. Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation. *Experimental Cell Research*, 340(1), 53–61.

- Kim, W., Liao, L. M. 2012. IDH mutations in human glioma. *Neurosurgery Clinics Of North America*, 23(3), 471–480.
- Kim, Y., Kim, K. H., Lee, J., Lee, Y. A., Kim, M., Lee, S. J., Park, K., Yang, H., Jin, J., Joo, K. M., Lee, J., Nam, D. H. 2012. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology*, 92(3), 466–473.
- Kitange, G. J., Carlson, B. L., Schroeder, M. A., Grogan, P. T., Lamont, J. D., Decker, P. A., Wu, W., James, C. D., Sarkaria, J. N. 2009. Induction of *MGMT* expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncology*, 11(3), 281–291.
- Knotek, T., Janeckova, L., Kriska, J., Korinek, V., Anderova, M. 2020. Glia and neural stem and progenitor cells of the healthy and ischemic brain: the workplace for the wnt signaling pathway. *Genes*, 11(7), 804.
- Komiya, Y., Habas, R. 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75.
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T. W., Amaravadi, L., Brown, D. E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., Chang, B., Duong, T., Goodearl, A. D., Gearing, D. P., Sokol, S. Y., McCarthy, S. A. 1999. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, 238(2), 301–313.
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L., Rich, J. N. 2015. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, 29(12), 1203–1217.
- Lee S. Y. 2016. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198–210.
- Lee, Y., Lee, J. K., Ahn, S. H., Lee, J., Nam, D. H. 2016. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology*, 96(2), 137–150.
- Li, L., Gao, R., Huangfu, W., Zhang, F., Wang, R. 2023. Clinical significance of NKD inhibitor of Wnt signaling pathway 1 (NKD1) in glioblastoma. *Genetics Research*, 2023, 1184101.
- Liu, G., Yan, T., Li, X., Sun, J., Zhang, B., Wang, H., Zhu, Y. 2018a. *Daam1* activates RhoA to regulate Wnt5a-induced glioblastoma cell invasion. *Oncology Reports*, 39(2), 465–472.
- Liu, X., Gao, Q., Zhao, N., Zhang, X., Cui, W., Sun, J., Fu, J., Hao, J. 2018b. *Sohlh1* suppresses glioblastoma cell proliferation, migration, and invasion by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular Carcinogenesis*, 57(4), 494–502.
- Liu, X., Wang, L., Zhao, S., Ji, X., Luo, Y., Ling, F. 2011. β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 28(2), 608–614.

- Liu, Q., Guan, Y., Li, Z., Wang, Y., Liu, Y., Cui, R., Wang, Y. 2019. miR-504 suppresses mesenchymal phenotype of glioblastoma by directly targeting the *FZD7*-mediated Wnt- β -catenin pathway. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 358.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Junker, M., Oefner, P. J., Bogdahn, U., Wischhusen, J., Spang, R., Storch, A., Beier, C. P. 2010. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Research*, 70(5), 2030–2040.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., Ellison, D. W. 2021. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Lu, C., Cui, C., Liu, B., Zou, S., Song, H., Tian, H., Zhao, J., Li, Y. 2017. *FERMT3* contributes to glioblastoma cell proliferation and chemoresistance to temozolomide through integrin mediated Wnt signaling. *Neuroscience Letters*, 657, 77–83.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., He, X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9–26.
- Mazzoldi, E. L., Pastò, A., Pilotto, G., Minuzzo, S., Piga, I., Palumbo, P., Carella, M., Frezzini, S., Nicoletto, M. O., Amadori, A., Indraccolo, S. 2020. Comparison of the genomic profile of cancer stem cells and their non-stem counterpart: the case of ovarian cancer. *Journal Of Clinical Medicine*, 9(2), 368.
- Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D., Moon, R. T. 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*, 18(55), 7860–7872.
- Mizobuchi, Y., Matsuzaki, K., Kuwayama, K., Kitazato, K., Mure, H., Kageji, T., Nagahiro, S. 2008. *REIC/DKK-3* induces cell death in human malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 10(3), 244–253.
- Momota, H., Narita, Y., Miyakita, Y., Shibui, S. 2013. Secondary hematological malignancies associated with temozolomide in patients with glioma. *Neuro-Oncology*, 15(10), 1445–1450.
- Nàger, M., Sallán, M. C., Visa, A., Pushparaj, C., Santacana, M., Macià, A., Yeramian, A., Cantí, C., Herreros, J. 2018. Inhibition of WNT-CTNNB1 signaling upregulates SQSTM1 and sensitizes glioblastoma cells to autophagy blockers. *Autophagy*, 14(4), 619–636.

- Nayak, L., Bhattacharyya, N. P., De, R. K. 2016. Wnt signal transduction pathways: modules, development and evolution. *BMC Systems Biology*, 10 Suppl 2(Suppl 2), 44.
- Nelson, E. J., Gubbiotti, M. A., Carlin, A. M., Nasrallah, M. P., Van Deerlin, V. M., Herlihy, S. E. 2023. Clinical evaluation of IDH mutation status in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in gliomas. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 27(3), 371–381.
- Nogueira, L., Ruiz-Ontañón, P., Vazquez-Barquero, A., Lafarga, M., Berciano, M. T., Aldaz, B., Grande, L., Casafont, I., Segura, V., Robles, E. F., Suarez, D., Garcia, L. F., Martinez-Clement, J. A., Fernandez-Luna, J. L. 2011. Blockade of the NF κ B pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 30(32), 3537–3548.
- Pećina-Slaus, N., Martić, T. N., Kokotović, T., Kusec, V., Tomas, D., Hrasćan, R. 2011. AXIN-1 protein expression and localization in glioblastoma. *Collegium Antropologicum*, 35 Suppl 1, 101–106.
- Pegg A. E. 2000. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation Research*, 462(2-3), 83–100.
- Pei, Y., Brun, S. N., Markant, S. L., Lento, W., Gibson, P., Taketo, M. M., Giovannini, M., Gilbertson, R. J., Wechsler-Reya, R. J. 2012. WNT signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum. *Development (Cambridge, England)*, 139(10), 1724–1733.
- Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., González, B., Melguizo, C. 2015. Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: implication of MGMT, MMR, p-glycoprotein and CD133 expression. *PloS One*, 10(10), e0140131.
- Plesca, D., Mazumder, S., Almasan, A. 2008. DNA damage response and apoptosis. *Methods In Enzymology*, 446, 107–122.
- Pöschl, J., Grammel, D., Dorostkar, M. M., Kretschmar, H. A., Schüller, U. 2013. Constitutive activation of β -catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system. *Developmental Biology*, 374(2), 319–332.
- Pu, P., Zhang, Z., Kang, C., Jiang, R., Jia, Z., Wang, G., Jiang, H. 2009. Downregulation of Wnt2 and beta-catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Therapy*, 16(4), 351–361.
- Rončević, A., Koruga, N., Soldo Koruga, A., Rončević, R., Rotim, T., Šimundić, T., Kretić, D., Perić, M., Turk, T., Štimac, D. 2023. Personalized treatment of glioblastoma: current state and future perspective. *Biomedicines*, 11(6), 1579.
- Sandoval, R., Xue, J., Pilkinton, M., Salvi, D., Kiyokawa, H., Colamonici, O. R. 2004. Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons.

- Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(31), 32275–32280.
- Santos, A., Bakker, A. D., de Blieck-Hogervorst, J. M., Klein-Nulend, J. 2010. WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy*, 12(7), 924–932.
- Schiefer, L., Visweswaran, M., Perumal, V., Arfuso, F., Groth, D., Newsholme, P., Warriar, S., Dharmarajan, A. 2014. Epigenetic regulation of the secreted frizzled-related protein family in human glioblastoma multiforme. *Cancer Gene Therapy*, 21(7), 297–303.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504.
- Shevchenko, V., Arnotskaya, N., Korneyko, M., Zaytsev, S., Khotimchenko, Y., Sharma, H., Bryukhovetskiy, I. 2019. Proteins of the Wnt signaling pathway as targets for the regulation of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Oncology Reports*, 41(5), 3080–3088.
- Shevchenko, V., Arnotskaya, N., Zaitsev, S., Sharma, A., Sharma, H. S., Bryukhovetskiy, A., Pak, O., Khotimchenko, Y., Bryukhovetskiy, I. 2020. Proteins of Wnt signaling pathway in cancer stem cells of human glioblastoma. *International Review Of Neurobiology*, 151, 185–200.
- Shi, Y., He, B., You, L., Jablons, D. M. 2007. Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(9), 1499–1504.
- Shibahara, I., Sonoda, Y., Shoji, T., Kanamori, M., Saito, R., Inoue, T., Kawaguchi, T., Yamashita, Y., Watanabe, T., Kumabe, T., Watanabe, M., Suzuki, H., Tominaga, T. 2015. Malignant clinical features of anaplastic gliomas without IDH mutation. *Neuro-Oncology*, 17(1), 136–144.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben-Ze'ev, A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5522–5527.
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., Mittal, S. 2021. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma- a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*, 4(1), 17–43.
- Smith, J., Field, M., Sugaya, K. 2023. Suppression of NANOG expression reduces drug resistance of cancer stem cells in glioblastoma. *Genes*, 14(6), 1276.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G.,

- Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal Of Medicine*, 352(10), 987–996.
- Sun, J., Li, B., Jia, Z., Zhang, A., Wang, G., Chen, Z., Shang, Z., Zhang, C., Cui, J., Yang, W. 2018. RUNX3 inhibits glioma survival and invasion via suppression of the β -catenin/TCF-4 signaling pathway. *Journal Of Neuro-Oncology*, 140(1), 15–26.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., Mering, C. V. 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613.
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., Zhang, Z. 2017. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W98–W102.
- Taylor, J. S., Zeki, J., Ornell, K., Coburn, J., Shimada, H., Ikegaki, N., Chiu, B. 2019. Down-regulation of MYCN protein by CX-5461 leads to neuroblastoma tumor growth suppression. *Journal Of Pediatric Surgery*, 54(6), 1192–1197.
- Tomar, V. S., Patil, V., Somasundaram, K. 2020. Temozolomide induces activation of Wnt/ β -catenin signaling in glioma cells via PI3K/Akt pathway: implications in glioma therapy. *Cell Biology And Toxicology*, 36(3), 273–278.
- Tompa, M., Kajtar, B., Galik, B., Gyenesei, A., Kalman, B. 2021. DNA methylation and protein expression of Wnt pathway markers in progressive glioblastoma. *Pathology, Research And Practice*, 222, 153429.
- Tompa, M., Nagy, A., Komoly, S., Kalman, B. 2019. Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma. *Brain Research*, 1718, 114–125.
- Tseng, W. L., Hsu, H. H., Chen, Y., Tseng, S. H. 2017. Tumor recurrence in a glioblastoma patient after discontinuation of prolonged temozolomide treatment. *Asian Journal Of Neurosurgery*, 12(4), 727–730.
- Valente, V., Teixeira, S. A., Neder, L., Okamoto, O. K., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Scrideli, C. A., Paçó-Larson, M. L., Carlotti, C. G., Jr 2009. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative qPCR. *BMC Molecular Biology*, 10, 17.
- Villà, S., Balañà, C., Comas, S. 2014. Radiation and concomitant chemotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Chinese Journal Of Cancer*, 33(1), 25–31.
- Wang, D., Zhou, J., Fan, C., Jiao, F., Liu, B., Sun, P., Miao, J., Zhang, Q. 2014. Knockdown of LGR5 suppresses the proliferation of glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*, 31(1), 41–49.

- Wang, J. S., Wang, H. J., Qian, H. L. 2018. Biological effects of radiation on cancer cells. *Military Medical Research*, 5(1), 20.
- Wen, P. Y., Kesari, S. 2008. Malignant gliomas in adults. *The New England Journal Of Medicine*, 359(5), 492–507.
- Wesolowski, J. R., Rajdev, P., Mukherji, S. K. 2010. Temozolomide (Temodar). *American Journal Of Neuroradiology*, 31(8), 1383–1384.
- Wu, W., Klockow, J. L., Zhang, M., Lafortune, F., Chang, E., Jin, L., Wu, Y., Daldrup-Link, H. E. 2021. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological Research*, 171, 105780.
- Wu, X., Yan, T., Hao, L., Zhu, Y. 2019. Wnt5a induces ROR1 and ROR2 to activate RhoA in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Cancer Management And Research*, 11, 2803–2815.
- Xu, J., Su, Z., Ding, Q., Shen, L., Nie, X., Pan, X., Yan, A., Yan, R., Zhou, Y., Li, L., Lu, B. 2019. Inhibition of proliferation by knockdown of transmembrane (TMEM) 168 in glioblastoma cells via suppression of Wnt/ β -catenin pathway. *Oncology Research*, 27(7), 819–826.
- Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Li, X., Subhan, M. A., Parveen, F., Ataide, J. A., Rajmalani, B. A., Torchilin, V. P. 2023. Mechanisms of resistance and current treatment options for glioblastoma multiforme (GBM). *Cancers*, 15(7), 2116.
- Yan, Y., Cheng, Y. Y., Li, Y. R., Jiao, X. W., Liu, Y. M., Cai, H. Y., Ding, Y. X. 2024. Inhibitor of Wnt receptor 1 suppresses the effects of Wnt1, Wnt3a and β -catenin on the proliferation and migration of C6 GSCs induced by low-dose radiation. *Oncology Reports*, 51(2), 22.
- Yue, X., Lan, F., Yang, W., Yang, Y., Han, L., Zhang, A., Liu, J., Zeng, H., Jiang, T., Pu, P., Kang, C. 2010. Interruption of β -catenin suppresses the EGFR pathway by blocking multiple oncogenic targets in human glioma cells. *Brain Research*, 1366, 27–37.
- Yun, E. J., Kim, S., Hsieh, J. T., Baek, S. T. 2020. Wnt/ β -catenin signaling pathway induces autophagy-mediated temozolomide-resistance in human glioblastoma. *Cell Death & Disease*, 11(9), 771.
- Zhang, J., Stevens, M. F., Bradshaw, T. D. 2012a. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114.
- Zhang, J. H., Xu, M. 2000. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*, 10(3), 205–211.
- Zhang, L., Yang, X., Yang, S., Zhang, J. 2011. The Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *The European Journal Of Neuroscience*, 33(1), 1–8.

- Zhang, S., Li, Y., Wu, Y., Shi, K., Bing, L., Hao, J. 2012b. Wnt/ β -catenin signaling pathway upregulates *c-MYC* expression to promote cell proliferation of P19 teratocarcinoma cells. *Anatomical Record* (Hoboken, N.J.: 2007), 295(12), 2104–2113.
- Zheng, Y., McFarland, B. C., Drygin, D., Yu, H., Bellis, S. L., Kim, H., Bredel, M., Benveniste, E. N. 2013. Targeting protein kinase *CK2* suppresses prosurvival signaling pathways and growth of glioblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*, 19(23), 6484–6494.
- Zhou, F., Cao, W., Xu, R., Zhang, J., Yu, T., Xu, X., Zhi, T., Yin, J., Cao, S., Liu, N., Wang, Y., Zhao, C. 2019. MicroRNA-206 attenuates glioma cell proliferation, migration, and invasion by blocking the Wnt/ β -catenin pathway via direct targeting of *Frizzled 7* mRNA. *American Journal Of Translational Research*, 11(7), 4584–4601.

