

T.C  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİFFÜZ VE YÜKSEK DERECELİ GLİAL TÜMÖRLERDE miRNA  
EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi  
Ar. Gör. Sunde YILMAZ SÜSLÜER

DANIŞMAN: Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Bornova/İZMİR  
2012

T.C  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİFFÜZ VE YÜKSEK DERECELİ GLİAL TÜMÖRLERDE miRNA  
EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi  
Ar. Gör. Sunde YILMAZ SÜSLÜER

DANIŞMAN: Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Bornova/İZMİR  
2012

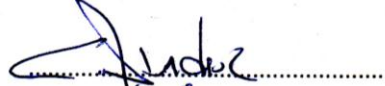


DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

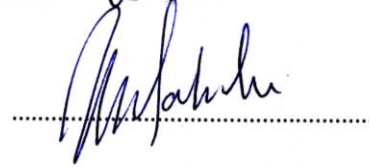
(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ



(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Meral SAKIZLI



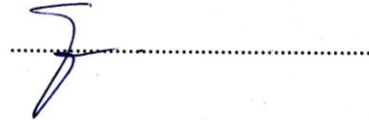
Üye : Prof. Dr. Nezih OKTAR



Üye : Prof. Dr. Tayfun DALBASTI



Üye : Doç. Dr. Zühal EROĞLU



Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: ..... 04.10.2012 .....

## ÖNSÖZ

*Dört sene önce “hocam, beyin tümörlü olgularda miRNA ekspresyonu çalışalım mı?” diye sorduğum gün dün gibi.. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’ na ilk girdiğim 2004 Eylül’ ü anılarımda hala capcanlı duruyor... Üzerinden tam sekiz sene geçmiş. Sekiz senede acısıyla tatlısıyla pek çok anı biriktirdim.*

*Bu kürsüye adım attığım andan itibaren bana kol kanat geren, fikirlerimi destekleyen, atacağım her yeni adımda beni cesaretlendiren, umusuzluğa düştüğüm anlarda “gerçekleşecek bak görürsün” diyerek sabrı ve içtenliği ile beni teşvik eden, Tübitak bursuna başvurduğumda başaracağımdan hiç şüphe duymadan bana kefil olan, yurtdışında çalışmak istediğimde bana yol gösteren, sadece okul ve iş yaşantısı ile ilgili değil gerçek hayata karşı olan dertlerimi de sabırla ve eleştirmeden dinleyen, değerli olduğumu hissettiren, öğrencisi olduğum için gerçekten çok şanslı ve özel hissettiğim, sonsuz saygı duyduğum değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanı’ mız Sayın Prof. Dr. **Cumhur GÜNDÜZ’ e,***

*Samimiyetini ve desteğini her zaman hissettiğim, güler yüzünü hiç esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. **Zuhal EROĞLU’ na,***

*Tümör olgu gruplarının opere edilmesinde büyük emeği olan, kapısını her çaldığımda beni güler yüzüyle karşılayan, sorularıma içtenlikle cevap veren, beni destekleyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. **Tayfun DALBASTI’ ya***

*Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. **Buket KOSOVA’ ya,***

*Tümör olgu gruplarının opere edilmesini sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. **Nezih OKTAR’ a,***

Hem teorik hem de pratik bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Sayın Prof. Dr. **Özgür ÇOĞULU'** ya,

Patoloji' ye gönderilen örneklerin tanı ve derece takibini yapan Sayın Prof. Dr. **Taner AKALIN'** a,

İlk geldiğim gün "hepiniz öleceksiniz" diyerek esprili tavrıyla kalbimi kazanan, sonradan bir ekip olmayı, güzel günlerin yanında kötü günlerde de birlikte kalabilmeyi, canla başla çalışmayı, birbirine destek olmayı öğrendiğim, bilgi ve birikimi ile ne zaman ihtiyaç duysam beni yanıtlayan, birlikte çok güzel projelerde çalıştığım ve gelecekte daha da iyilerini gerçekleştireceğimize inandığım, eleştirileri ve teşvikleriyle bugüne gelmemde büyük payı olan, azmini hep taktir ettiğim değerli arkadaşım, Sayın Dr. **Çığır BİRAY AVCI'** ya,

Dünyanın neresine gidersek gidelim birlikte gezmekten ve keşfetmekten büyük keyif aldığım, yaşadığımız zorluklarda birbirimize daima destek olduğumuz, yaşadığımız, çalıştığımız yer neresi olursa olsun mesafelerin bizi ayıramayacağı, yeri geldiğinde sırdaşım, yeri geldiğinde kardeşim olan değerli dostum Sayın Dr. **Zeynep Özlem DOĞAN ŞİĞVA'** ya,

Bilgilerini benimle paylaşan, yardıma ihtiyaç duyduğum anlarda çekinmeden yardımcı olan değerli arkadaşlarım Sayın Uzm. Dr. **Nur SELVİ'** ye, Sayın Dr. **Burçin TEZCANLI KAYMAZ'** a, Sayın Dr. **Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'** a,

Güler yüzleri ve yaşam enerjileri ile içimi ısıtan, bir ekip olmaktan her zaman mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Sayın Dr. Öğr. **Çağla KAYABAŞI'** na ve Sayın Dr. Öğr. **Tuğçe BALCI'** ya,

Son yıllarda aynı odayı paylaştığımız, kimi zaman sessizliğe gömülüp çalıştığımız, kimi zaman şen kahkahalarımızla odayı renklendirdiğimiz, değerli arkadaşlarım Sayın Dr. **Aslı TETİK VARDARLI'** ya, Sayın Ar. Gör. **Duygu AYGÜNEŞ'** e, Sayın Dr. Öğr.

**Ayşegül DALMIZRAK'** a, Sayın Dr. Öğr. **Çağdaş AKTAN'** a ve Sayın Dr. Öğr. **Ali Şahin KÜÇÜKASLAN'** a,

Tezimin mikroyarray aşamasında yardımlarını esirgemeyen, güler yüzü ile umutsuzluğa kapıldığım anlarda bana güven veren, samimiyeti ve içtenliği için değerli arkadaşım Sayın **Duygu ÜNÜVAR PURCU'** ya

Tezimle ilgili zorluk çektiğim anlarda imdadıma yetişen sevgili kuzenim Sayın **Zeynep YILMAZ'** a

Laboratuvarlarında çalışmamı kabul edip, orada en iyi şartlarda çalışmamı ve yaşamamı sağlayan, Sayın Dr. **Gyorgy HUTVAGNER'** e ve Dundee Üniversitesi' nde bulunduğum süre içerisinde bana yol gösteren, öğreten Sayın Dr. **Judit Remenyi'** ye, bu süre zarfında bana evini açan, karşılaştığım zorluklarda beni teselli eden, aynı evi paylaşmaktan çok büyük mutluluk duyduğum değerli arkadaşım, dostum Sayın Dr. **Nazan SANER'** e,

İçten ve sevecen tavırları ile her türlü yazışma işlerimi son derece titizlik ve hızla gerçekleştiren, yardım eden çok değerli sekreterlerimiz ve ablalarım Sayın **Gönül SAKLICA'** ya ve Sayın **Anıl KARAKAŞ'** a, laboratuvarlarda bize yardımcı olan Sayın **Hale GÜNDÜZ'** e, değerli personelimiz Sayın **Salih TOROĞLU'** ya

İyi ve kötü her anımda yanımda olan ve bana sonsuz destek veren, en kötü anımda beni mutlu edebilen, aşkını, sevgisini ve saygısını her zaman hissettiğim canım eşim Sayın **Bahadır SÜSLÜER'** e,

Ablası olmaktan her zaman gurur duyduğum, sıcacık yüreğiyle hep yanımda olan, beni güldüren, gülmekten öldüren biricik kardeşim Sayın **Aylin YILMAZ'** a

*Hayatım boyunca hep elimden tutan, sonsuz sevgilerini, güvenlerini, desteklerini hissettiğim, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan her an yanımda olan, beni ben yapan öğelerin mimarları biricik annem Sayın **Hülya YILMAZ** ve babam Sayın **Vedat YILMAZ**'a,*

*Doktora eğitimime devam edebilmemde büyük payı olan yurt içi doktora bursu programına dahil olduğum **TÜBİTAK**' a*

*Sonsuz teşekkür ederim...*

*Ben bu tezi bitirdim. Tezimde beyin tümörü olan hastaların tümör dokularından örneklerle çalıştım. Çalışabilmek için her gün acaba bugün yeni bir örnek gelecek mi diye bekledim. Sonunda elli hasta örneği ile çalışmış oldum.*

*Bunun aslında ne demek olduğunu tezim bitmeye yakinken daha derin bir şekilde öğrendim. Bu dönemde kayınpederim hastalandı ve içimizde her gün yeni bir umut yeşerterek dört gün boyunca hastaneye gittik. Ne yazık ki en son gün kötü haberi aldık ve onu kaybettik.*

*Ben laboratuvarında çalışırken, tezimi yazarken, kim bilir kaç hasta ameliyat oluyordu ve kim bilir kaç hasta ailesi dışarıda bir umuda sarılmış bekliyordular...*

*Bu tezi hastane koridorlarında umutla bekleyen hasta ve hasta yakınlarına adıyorum.*

*Sonsuz Saygılarımla*

19.09.2012

**Araş. Gör. Sunde Yılmaz SÜSLÜER**



## İÇİNDEKİLER

<b>BÖLÜM I</b>	
1.1. GİRİŞ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	3
1.2.1 Merkezi Sinir Sistemi	3
1.2.2. Sinir Sistemi Tümörleri	8
1.2.2.1. Epidemiyoloji	8
1.2.2.2. Etiyoloji	10
1.2.2.3. Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflandırılması	12
1.2.2.3.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Derecelendirmesi	12
1.2.2.3.2. Beyin Tümörü Sınıflandırılmasında İmmunohistokimya	18
1.2.2.3.3. Beyin Tümör Sınıflandırmasına Moleküler Genetiğin Katkısı	20
1.2.2.4. Astrositik Tümörler	22
1.2.2.4.1. Diffüz Astrositom (WHO Grade II)	24
1.2.2.4.2. Anaplastik Astrositom (WHO Grade III)	28
1.2.2.4.3. Glioblastom (WHO Grade IV)	30
1.2.2.4.3.1. Primer ve Sekonder Glioblastom	34
1.2.2.4.4. Piloitik Astrositom (WHO Grade I)	38
1.2.2.5. Oligodendrial Tümörler ve Miks Gliomlar	40
1.2.2.5.1. Oligodendrogliom (WHO Grade II)	40
1.2.2.5.2. Anaplastik Oligodendrogliom (WHO Grade III)	43
1.2.2.5.3. Oligoastroitom (WHO Grade II)	46
1.2.2.5.4. Anaplastik Oligoastroitom (WHO Grade III)	48
1.2.2.6. Ependimal Tümörler	50
1.2.2.6.1. Ependimom (WHO Grade II)	51
1.2.2.6.2. Anaplastik Ependimom (WHO Grade III)	53
1.2.2.6.3. Miksopapiller Ependimom (WHO Grade I)	54
1.2.2.6.4. Subependimom (WHO Grade I)	56
1.2.2.7. Koroid Pleksus Tümörler	57
1.2.2.7.1. Koroid Pleksus Papillomu (WHO Grade I)	57
1.2.2.7.2. Atipik Koroid Pleksus Papillomu (WHO Grade II)	59
1.2.2.7.3. Koroid Pleksus Karsinomu (WHO Grade III)	59
1.2.3. Kodlamayan RNA' lar	62
1.2.3.1. mikroRNA (miRNA)	63
1.2.3.1.1. miRNA' ların Genel Özellikleri	64
1.2.3.1.2. miRNA' ların Tarihçesi	64
1.2.3.1.3. miRNA Biyogenezi ve Çalışma Prensipleri	65
1.2.3.1.4. miRNA' ların İşlevleri	68
1.2.3.1.5. Kanser ve miRNA	69
1.2.3.1.6. Beyin Tümörü ve miRNA	72
1.2.3.1.6.1. Normal ve Neoplastik Beyin Büyümesi ve miRNA' lar	72
1.2.3.1.6.2. GBM ve miRNA	74
1.2.3.1.6.3. Hücre Döngüsü/ Proliferatif/ Sağkalım Defektleri ve miRNA	76
1.2.3.1.6.4. Hücre Göçü, İnvazyon ve miRNA	77

1.2.3.1.6.5. Anjiyogenez, Tümör Metabolizması ve miRNA	78
1.2.3.1.6.6. Farklılaşma, Kendini Yenileme ve miRNA	79
1.2.3.1.6.7. Beyin Tümörü Diağnozu ve Öngörüsünde miRNA' lar	80
1.2.3.1.6.8. Biyomarkır olarak miRNA' lar	82
1.2.3.1.6.9. Beyin Tümörü Tedavisinde Hedef Olarak miRNA'lar	84
1.2.3.1.6.10. Tedavide Hedeflemek için Aday miRNA' ların Seçimi	84
1.2.3.1.6.11. Antisens miRNA Tedavisi ve Anti-miRNA Oligonükleotidleri Kullanılarak Beyin Tümörü Tedavisindeki Zorluklar	85
1.2.4. Mikroarray	87
1.2.4.1. Mikroarray teknolojisinin avantajları	87
1.2.4.2. Mikroarray teknolojisinin dezavantajları	88
1.2.5. Beyin Tümörü Hücre Modelleri	88
<b>BÖLÜM II</b>	
2.1. GEREÇ VE YÖNTEM	92
2.1.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında ve Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	92
2.1.2. Olgu ve Hücre Hatları	93
2.1.3. Tümör Derece ve Evresinin Belirlenmesi	94
2.1.4. Tümör Hücre Kültürü	94
2.1.4.1. Tümör Hücrelerinin Kültür Kaplarına Ekimi	94
2.1.4.2. Tümör Hücrelerinin ve Hücre Hatlarının Hücrelerinin Pasajlanması	95
2.1.4.3. Tümör Hücrelerinin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)	96
2.1.4.4. Dondurulmuş Tümör Hücrelerinin Çözdürülmesi	96
2.1.4.5. Tümör Hücrelerinin ve Hücre hatlarının Canlılığının Belirlenmesi	97
2.1.5. miRNA Mikroarray Analizi	99
2.1.5.1. Total RNA İzolasyonu	99
2.1.5.1.1. RNA miktar ve saflıklarının ölçümü	102
2.1.5.1.2. RNA' ların kalite kontrolü	102
2.1.5.1.2.1. Kalite Kontrol Protokolü	103
2.1.5.2. miRNA Profillemesi	104
2.1.5.2.1. miRNA' ların İşaretlenmesi	105
2.1.5.2.1.1. İşaretleme Protokolü	105
2.1.5.2.2. Hibridizasyon	106
2.1.5.2.2.1. Hibridizasyon Protokolü	107
2.1.5.2.3. Mikroarray Analizi	108
2.1.5.2.3.1. Mikroarrayin Değerlendirilmesi	108
2.1.5.2.3.2. Mikroarrayin İstatistiksel Değerlendirilmesi	111
2.1.5.2.3.2.1 İstatistiksel analiz	112
<b>BÖLÜM III</b>	
3.1. BULGULAR	113
<b>BÖLÜM IV</b>	
4.1. TARTIŞMA	136

<b>BÖLÜM V</b>	
5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER	146
<b>BÖLÜM VI</b>	
6.1. ÖZET	149
6.2. ABSTRACT	152
<b>BÖLÜM VII</b>	
7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR	154
ÖZGEÇMİŞ	168

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Dünya Sağlık Örgütü' ne (WHO) göre sinir sistemi tümörleri sınıflandırması	14
<b>Tablo 2:</b> Beyin tümörü sınıflandırılmasında kullanılan immünohistokimyasal markırlar	20
<b>Tablo 3:</b> Nöroonkolojide kullanılan moleküler diagnostik testler	22
<b>Tablo 4:</b> Malin beyin tümörlerinde miRNA' lar	73
<b>Tablo 5:</b> Kullanılan Cihazlar	92
<b>Tablo 6:</b> Kullanılan Kimyasallar	93
<b>Tablo 7:</b> Olguların demografik ve total RNA değerleri	114
<b>Tablo 8:</b> Beyin tümörü hücre hatlarının total RNA değerleri	115
<b>Tablo 9:</b> GBM olgularındaki en yüksek miRNA ekspresyonlarının beyin tümörü hücre hatları (GBM HT) ile karşılaştırılması	116
<b>Tablo 10:</b> AO olgularındaki en yüksek miRNA ekspresyonlarının beyin tümörü hücre hatları (GBM HT) ile karşılaştırılması	117
<b>Tablo 11:</b> DA olgularındaki en yüksek miRNA ekspresyonlarının beyin tümörü hücre hatları (GBM HT) ile karşılaştırılması	117
<b>Tablo 12:</b> GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırılması	118
<b>Tablo 13:</b> GBM tanısı almış olguların, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA varsayılan hedef genleri	119
<b>Tablo 14:</b> AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını GBM tanısı almış olgular ile karşılaştırılması	119
<b>Tablo 15:</b> AO tanısı almış olguların, GBM tanısı almış olgular ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA varsayılan hedef genleri	120
<b>Tablo 16:</b> O tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırılması	120
<b>Tablo 17:</b> DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırılması	121
<b>Tablo 18:</b> DA tanısı almış olguların, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA varsayılan hedef genleri	122
<b>Tablo 19:</b> Olgu gruplarında ekspresyon saptanan miRNA' ların karşılaştırılması	123

## ŞEKİL DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b>	Beyini çevreleyen zarlar	7
<b>Şekil 2:</b>	Beyinin genel yapısı	7
<b>Şekil 3:</b>	Sol temporal lopta diffüz astrositom	28
<b>Şekil 4:</b>	WHO grade II diffüz astrositomlar	28
<b>Şekil 5:</b>	WHO grade III anaplastik astrositom	29
<b>Şekil 6:</b>	A; Sol temporal lopta nekroz ve intratümoral hemorajlar, B; büyütülmüş görüntüde tümör merkezinde nekroz	32
<b>Şekil 7:</b>	WHO Grade IV Glioblastom	32
<b>Şekil 8:</b>	A; WHO Grade IV dev hücre glioblastomları B; WHO Grade IV gliosarkoma	34
<b>Şekil 9:</b>	WHO Grade I pilositik astrositom	39
<b>Şekil 10:</b>	Corpus callosum ve singulat kıvrımı içeren oligodendrogliom	43
<b>Şekil 11:</b>	WHO Grade II Oligodendrogliom	43
<b>Şekil 12:</b>	WHO Grade III Anaplastik Oligodendrogliom	45
<b>Şekil 13:</b>	WHO Grade III Anaplastik Oligoastrositom	50
<b>Şekil 14:</b>	Ventriküler lümenin tam obstrüksiyonu ile 4. ventriküldeki ependimom	51
<b>Şekil 15:</b>	A; WHO Grade II Ependimom, B; WHO Grade II Papiller ependimom, C; WHO Grade II Tanisitik ependimom	53
<b>Şekil 16:</b>	WHO Grade I miksopapiller ependimom	55
<b>Şekil 17:</b>	WHO Grade I Subependimom	56
<b>Şekil 18:</b>	WHO Grade I Koroid Pleksus Papillomu	59
<b>Şekil 19:</b>	Difüz infiltre astrositik gliomun farklı tiplerinde tanımlanan moleküler değişimler	61
<b>Şekil 20:</b>	Oligodendrogliyal tümörlerin başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili moleküler değişimler	62
<b>Şekil 21:</b>	Oligoastrositomların başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili moleküler değişimler	62
<b>Şekil 22:</b>	miRNA yapısı	64
<b>Şekil 23:</b>	miRNA biyogenezi	68
<b>Şekil 24:</b>	Glioblastom patogenezinde rol oynayan sinyal yolları, disregüle miRNA' lar tarafından hedeflenir	77
<b>Şekil 25:</b>	U-87 MG Hücre Hattı	89
<b>Şekil 26:</b>	U-118 MG Hücre Hattı	90
<b>Şekil 27:</b>	Eksklüzyon boya prensibi	99
<b>Şekil 28:</b>	Neubauer hemositometresi	99
<b>Şekil 29:</b>	İnsan mikroarrayi çipinin yerleşimi	106
<b>Şekil 30:</b>	GBM tanısı almış olguların, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA ekspresyonlarının ısı haritası	118
<b>Şekil 31:</b>	AO tanısı almış olguların, GBM tanısı almış olgular ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA ekspresyonlarının ısı haritası	120
<b>Şekil 32:</b>	DA tanısı almış olguların, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA ekspresyonlarının ısı haritası	122
<b>Şekil 33:</b>	Beyin tümörü tanılı olguların miRNA ekspresyonlarının tanı gruplarına göre karşılaştırılması	135

## KISALTMALAR

°C	: Santigrat
µl	: Mikrolitre
ABCA8	: ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi A üyesi 8
ABDH2	: Abihidrolaz domain içeren protein 2
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ADAMTS5	: Trombospondin motif 5' li disintegrin ve metalloproteinaz
AFP	: Alfa-fetoprotein
ALDH1A3	: Aldehid dehidrogenaz 1 ailesi üyesi A3
AO	: Anaplastik oligodendrogliom
APAF1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
APC2	: Adenomatöz polipozis koli
ARNT	: Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator
BCL2	: B hücre lenfoması 2
CDKN2B	: Siklin-bağımlı kinaz 4 inhibitörü B
cDNA	: Komplementer deoksiribonukleik asit
CNS-PNET	: Primitiv nöroektodermal tümör
CO2	: Karbondioksit
COL11A1	: Kollagen alfa-1(XI) zinciri
COPA	: Koatomer alt-ünite alfa
CoREST	: Repressor Element-1 Susturucu Transkripsiyon
CREB1	: CAMP ' tan sorumlu element bağlama protein 1
CTDSP2	: Karboksi-terminal domain RNA polimeraz II polipeptid 2
CXCL14	: Kemokin (C-X-C motif) ligandı 14
CYP2U1	: Sitokrom P450, aile 2, alt-aile U, polipeptid 1
DA	: Diffüz astrositom
Dk	: Dakika
DLD	: Dihidrolipoamin dehidrogenaz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonukleik asit
DNase	: Deoksiribonukleaz
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGLN3	: EGL dokuz homolog 3
EMA	: Epitelyal membran antijen
EMP3	: Epitelyal membran protein 3
ENAM	: Enamelin
EPHA7	: Ephrin tip-A reseptörü 7
ESM1	: Endotelyal hücre-spesifik molekül 1
FBS	: Fötal sığır serum
FN1	: Fibronektin 1
FOXO1	: Forkhead box proteini O1
fRNA	: İşlevsel RNA
FRS2	: Fibroblast büyüme faktör reseptörü substrat 2
FRS2	: Fibroblast büyüme faktör reseptör substrat 2

<b>FSH</b>	: Folikül stimüle edici hormon
<b>FZD4</b>	: Kıvrık 4 protein
<b>GAB1</b>	: GRB2-ilişkili-bağlanma proteini 1
<b>GBM</b>	: Glioblastoma multiforme
<b>GCA</b>	: Grankalsin
<b>GFAP</b>	: Glial fibriller asidik protein
<b>GH</b>	: Büyüme hormonu
<b>GJA1</b>	: Gap junction alpfa-1 protein
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen & Eosin
<b>HCG</b>	: İnsan koryonik godatotropin
<b>HER2/Neu</b>	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
<b>HIF-1</b>	: Hipoksi indüklenebilir faktör
<b>HNRPK</b>	: Heterojen nukleer ribonükleoprotein K
<b>HPL</b>	: İnsan plental laktogen
<b>HT</b>	: Hattı
<b>IDH1</b>	: İzositrat dehidrogenaz 1 geni
<b>IKZF3</b>	: İkaros ailesi çinko parmak proteini 3
<b>ISL1</b>	: İnsülin gen çoğaltan protein 1
<b>KIF3A</b>	: Kinezin benzeri protein 3A
<b>KLL</b>	: Kronik Lenfositik Lösemi
<b>LH</b>	: Luteinize edici hormon
<b>LOH</b>	: Heterozigosite kaybı
<b>LRRC4</b>	: Lösince zengin tekrarlı proteini 4
<b>MAP2</b>	: Mikrotübül ilişkili protein 2
<b>MAP2</b>	: Mikrotübül ilişkili protein 2
<b>MAP3K2</b>	: Mitojen-aktive protein kinaz 2
<b>MARCKS</b>	: Myristolated alanince zengin C-kinaz substrat
<b>Mdm2</b>	: Murine double minute 2
<b>METAP2</b>	: Metiyonin aminopeptitaz 2
<b>MGMT</b>	: O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
<b>miRNA</b>	: MikroRNA
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteaz
<b>MPL</b>	: Myeloproliferatif lösemi
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>NAMPT</b>	: Nikotinamid fosforibosiltransferaz
<b>NAT2</b>	: N-asetiltransferaz2
<b>NCOA1</b>	: Nükleer reseptör ko-aktivatör 1
<b>NCOA3</b>	: Nükleer reseptör ko-aktivatör 3
<b>NCOA6</b>	: Nükleer reseptör ko-aktivatör 6
<b>ncRNA</b>	: Kodlamayan RNA
<b>NEO1</b>	: Neogenin 1
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>nmRNA</b>	: Mesajcı olmayan RNA
<b>NOTCH2</b>	: Nörogenik loküs notch homolog proteini 2
<b>npcRNA</b>	: Protein kodlamayan RNA

<b>NXPH1</b>	: Nöreksofilin 1
<b>OCT4</b>	: Oktamer bağlama transkripsiyon faktörü 4
<b>PARP1</b>	: Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
<b>PCNA</b>	: Prolifere edici hücre nükleer antijeni
<b>PDCD4</b>	: Programlı hücre ölüm proteini 4
<b>PDE4A</b>	: Fosfodiesteraz 4A
<b>PDGFRA</b>	: Platelet-türevli büyüme faktörü reseptör alfa
<b>PDPN</b>	: Podoplanin
<b>piRNA</b>	: Piwi etkileyen RNA
<b>PLAP</b>	: Plesental alkalın fosfataz
<b>PSA</b>	: Prostat-spesifik antijen
<b>PTEN</b>	: Fosfataz ve tensin homologu (MMAC-1)
<b>PTPRT</b>	: Reseptör-tip tirozin-protein fosfataz T
<b>RANBP9</b>	: Ran-bağlanma proteini 9
<b>REST</b>	: Repressor Element-1 Susturucu Transkripsiyon Faktörü
<b>RhoB</b>	: RAS homolog gen ailesi üyesi B
<b>RISC</b>	: RNA ile indüklenen susturma kompleksi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>Rpm</b>	: Dakikada devir sayısı
<b>RTN3</b>	: Retikulon 3
<b>SASH1</b>	: SAM ve SH3 domain içeren protein 1
<b>SEMA3C</b>	: Semaforin-3C
<b>SEPT7</b>	: Septin 7
<b>siRNA</b>	: Küçük müdahaleci RNA
<b>SLC38A2</b>	: Sodyum-çiftli nötral amino asit transportör 2
<b>SMA</b>	: Düz kas aktin
<b>Sn</b>	: Saniye
<b>snmRNA</b>	: Küçük mesajcı olmayan RNA
<b>snoRNA</b>	: Küçük nükleolar RNA
<b>snRNA</b>	: Küçük nükleer RNA
<b>STAT3</b>	: Transkripsiyon sinyal sensörü ve aktivatörü 3
<b>tmRNA</b>	: Transfer mRNA
<b>TPPP</b>	: Tubulin polimerizasyon-yükseltici protein
<b>TRAIL</b>	: TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand
<b>TSH</b>	: Tiroid stimüle edici hormon
<b>TTF1</b>	: Tiroid transkripsiyon faktör 1
<b>TUBB</b>	: Tubulin beta
<b>UTR</b>	: Çevrilmeyen (okunmayan) Bölge
<b>VAMP1</b>	: Vezikül-ilişkili membran proteini 1
<b>vb</b>	: Ve benzeri
<b>VCP</b>	: Valosin içeren protein
<b>VIPR2</b>	: Vasoaktif intestinal peptid reseptörü 2
<b>VM26</b>	: Teniposit, vumon
<b>WASF2</b>	: Wiskott-Aldrich sendromu protein ailesi üyesi 2
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü



## BÖLÜM I

### 1.1. GİRİŞ

Watson ve Crick tarafından DNA' nın yapısının belirlenmesinden günümüze kadar olan süreçte moleküler biyoloji alanında çok hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. İnsan genomunun sadece %1,5' i protein kodlamaktadır, geri kalanı RNA genleri, düzenleyici diziler, intronlar ve kodlamayan DNA' dan oluşur. Son zamanlarda mikroRNA' ların (miRNA) kanser araştırmalarında çok önemli etkileri olmuştur. Bu küçük kodlama yapmayan RNA' lar tümörogeneizde önemli düzenleyicilerdir. Birçok miRNA hedefinin ve ilişkili yollarının hızlı keşifleri kanser için miRNA tabanlı terapotiklerin gelişimine katkı sağlamıştır. Bu heyecan verici buluşlar miRNA çalışmalarının laboratuvarından gerçek hayata olan uygulamalara dönüşen miRNA çalışmalarının potansiyelini ortaya çıkarmıştır. miRNA' ların kanserlerin translasyonel araştırılmasında eksiksiz olarak anlaşılması bu alanla ilgili herkes için bir ön koşuldur ve miRNA tıp alanında son teknolojidir.

Beyin tümörleri hastalıkların heterojen bir spektrumunu kapsar. Malin gliomlar yetişkinlerde en agresif ve en sık görülen gruptur ve astrositik veya oligodendrogial farklılaşmanın değişen dereceli çeşitli alttiplerini kapsar. Tedavileri en zor alttipler olan malin gliomlar veya glioblastoma multiforme (GBM) hayli infiltratif ve invaziv tümörlerdir. Malin gliomlar genellikle operasyon ve takiben

kemoterapili veya kemoterapisiz radyoterapi ile tedavi edilirler. Nöroşirurjideki, radyoterapideki ve yeni terapötiklerin denenmesindeki ilerlemelere rağmen, GBM için ortalama sağkalım 12-15 aydır. Daha genç bireylerde (ortalama yaş 45) tanısı konan GBM, daha düşük gradeli gliomdan türevlenir ve 60 yaşlarında görülen ve “de novo” olarak meydana gelen primer GBM’ den daha olumlu sonuçları vardır. Primer ve sekonder GBM, spesifik genetik alterasyonların sıklıkla farklılaşması ile bilinir. Son araştırmalar GBM’ de daha büyük karmaşıklık ve genetik heterojenite belirtmektedir.

miRNA ekspresyon profilinin beyin tümörlerinin moleküler tanısında önemi ve bu tümörlerde terapötik hedef olarak miRNA’ ların rollerinin saptanmasına dair literatürde çalışmalar mevcutsa da, kesin sonuca ulaşılması için daha çok çalışma gerektirmektedir. Çalışmamızda diffüz ve anaplastik beyin tümörlü olgularda (diffüz astrositom, anaplastik oligodendrogliom ve glioblastoma multiforme) miRNA ekspresyonunun mikroarray sistemi ile rölatif kantitasyonunu tanımlayarak değişik tiplerdeki beyin tümörlü olgularda miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile ilgili miRNA ekspresyon profilleri ve tümör prognozu arasında korelasyon verileri belirlenmiştir.

## 1.2. GENEL BİLGİLER

### 1.2.1. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi kararların verildiği, etraftan gelen verilerin yorumlandığı, algılamanın ve diğer bütün zihin fonksiyonlarının yerine getirildiği bölgeleri içeren karmaşık bir işlevsel yapılar bütünüdür. Kabaca beyin ve omurilikten meydana gelir.

Gri (Substantia griseum) ve beyaz (Substantia album) hücrelerden oluşan beyin, kafatasının arkasında bulunan bir delikle (foramen occipitale magnum) omuriliğe (medulla spinalis) bağlanır.

Merkezi sinir sistemi, yani beyin ve omurilik, üç katlı koruyucu bir zar yapısı (meninks) ile çevrelenmiş durumdadır. Bu zarlar dıştan içe doğru dura mater, araknoid zar ve pia mater olarak sıralanırlar (Şekil 1). Bu üç kılıf, kesintisiz bir biçimde tüm merkezi sinir sistemini sarar ve çevresel sinir sisteminde de hafif yapı ve işlev değişiklikleri ile devamlılık gösterir.

- Dura mater (sert-dış zar): Kafatası kemiklerine yapışmış olan kalın, dayanıklı bir zardır.
- Araknoid zar (örümceksi-orta zar): Ortada olup ince bağ dokusu iplikleriyle, iki zarı birbirine bağlar.
- Pia mater (ince-iç zar): Beyni besleyen kan damarlarıyla donatılmış, hem beyne hem de omuriliğe sıkı sıkıya bağlı bir zardır.

Beyne en yakın olan pia mater ile ortada bulunan araknoid arasında beyin–omurilik sıvısı (serebrospinal sıvı) adı verilen bir sıvı bulunur. Sıvı, beyin

karıncıklarının duvarında yerleşik ağsı kılcal damar sistemince salgılanır. Bu sıvı, sinir sistemi dokusunun beslenmesi ve atıklarının atılmasında hayati öneme sahiptir. Ayrıca beynin şiddetli sarsıntı ve çarpmalara karşı korunmasında yardımcı olur.

Beyin, omurilikten yukarıya doğru arka beyin (rombensefalon), orta beyin (mezensefalon) ve ön beyin (prosensefalon) olmak üzere üç bölüme ayrılır.

**Ön beyin (Prosensefalon):** Beynin en büyük ve geniş kısmıdır. Uç beyin ve ara beyin olmak üzere iki kısımdan oluşur.

- a. Uç Beyin (serebral hemisferler, serebrum): Bu bölüm insanın öğrenilmiş davranışlarını yönetir. Kompleks psikolojik olaylardan olan bilinç, hafıza, zeka, sağduyu, irade ve duyuların değerlendirilmesi, beyin yarım kürelerinin fonksiyonlarına bağlı organizma faaliyetleridir. Beyin yarıküreleri de "lop" denilen dört kısma ayrılmıştır. Loplar, frontal (alın), parietal (yan) , temporal (şakak) ve occipital (ard kafa) olarak adlandırılır. Ayrıca loplar gyruslara (kıvrımlara) ayrılır. Loplarda duyu organları aracılığıyla alınan duyuların yorumlanması ve kaslara hareket sağlayıcı uyarıcıların yapılması gerçekleşir.
- b. Ara beyin (diensefalon): Talamus, hipotalamus ve hipofiz bezinin arka bölgesini içine alır. Bitkisel hayatın kontrol merkezi veya bütün otomatik hareketler ile metabolizmada dengelerin kurulması bu merkez sayesinde olur.
- Talamus: Beynin orta kısmında yer alan çift taraflı bir yapı olup, diensefalonun esas bileşenidir. Üçüncü ventrikülün sağ ve solunda yer almıştır. Ana görevi, vücuttan gelen koku hariç tüm duyuşsal impulsları daha yüksek beyin kabuğu bölgelerinin okuyabileceği bir biçime çevirerek ilgili bölgelere yollamak ve yine beyin kabuğundan gelen emirleri daha alt seviyedeki ilgili bölgelere iletmektir.

Talamus, vücuttan gelen duyular için hem bir aktarma istasyonudur, hem de işlem merkezi olarak görev yapar. Talamus ayrıca, beyin kabuğuyla olan bu karmaşık bağlantılarını kullanarak uyku-uyanıklık döngüsünün oluşmasına da katkı sağlar.

- **Hipotalamus:** Talamusun altında yerleşiktir. Vücudumuzda istem dışı çalışan tüm sistemleri kontrol eden otonom sinir sisteminin en üst kontrol merkezidir. Vücut sıcaklığı, su dengesi, iştah, heyecan bu merkezin önemli işlevleridir. Hipotalamus, salgı yapan sinir hücrelerinin de bulunduğu bir merkezdir. Bu salgılar hipofiz bezinin ön lobundan hormon salgılanmasını uyarır. Eşeyssel yönelme ve olgunlaşma merkezleri de hipotalamusta bulunur.
- **Hipofiz:** Hormonal salgıların kontrol merkezidir. Hipofizin endokrin bezleri etkilemesi sinir ve salgı sisteminin yakın ve fonksiyonel ilişkisini gösterir.

**Orta Beyin (Mezensefalon):** Beyincik ve ara beyin arasında kalan kısımdır. Beyin sapından serebral hemisferlere sinir yollarını taşır. Kısa ve dar yapılanmış olan orta beyin gözün ağ tabakasından gelen uyarıların ve görme reflekslerinin merkezidir. Kas tonusunu ve vücudun duruşunu düzenleyen merkezler bulunur.

**Arka Beyin (Rombensefalon):** Arka beyin beyincik ve omurilik soğanı olmak üzere iki kısımdan oluşur.

- a. **Beyincik (Serebellum):** Orta beyinin, köprüler ve omurilik soğancığının arka bölümlerinin altında yerleşiktir. İç kulakla bağıntılı olan beyincik, değişik eklemlerin koordinasyonunu, vücudun dengesini ve birçok kasın çalışmasının koordinasyonunu sağlamakla görevlidir. Motor aktivitelerin sırasını belirler. Motor öğrenme için gereklidir. Hızlı kas aktivitelerinde hayati rol oynar.

b. Omurilik Soğanı (Medulla oblongata): Omurilik soğanındaki sinir merkezleri, solunum, sindirim, dolaşım, boşaltım, salgılama ve üreme gibi önemli olayları düzenler. Omurilik soğanında soluma, yutma, çiğneme, öksürme, hapşırma, kusma, kan damarlarının büzülmesi ve gevşemesi, kalp atışı, tükürük salgılanması gibi reflekslerin kontrol edildiği merkezler bulunur.

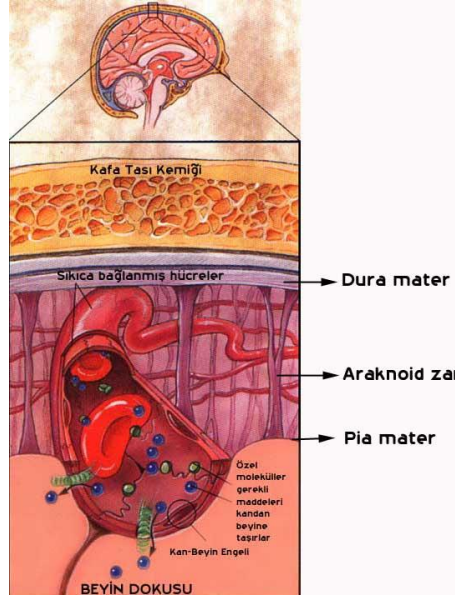
Beyin sapı; anatomik olarak, omurilikle beyini birbirine bağlayan bir köprü gibidir. Bu bölge, temel hayati fonksiyonların yürütülebilmesi için vazgeçilmez öneme sahiptir. Nefes alıp verme, kalp hızı ve kan basıncı, uyku ve uyanıklık, dikkat ve bunun gibi birçok önemli etkinlik, beyin sapı dediğimiz bu bölgeden kontrol edilir.

Pons; Orta beyinin altında, medulla oblongatanın anterior ucunda transvers sinir lifleridir. Köprüye benzer. Medulla oblongata ile beyin hemisferlerini birleştirir. Solunum kontrolüne katkıda bulunur. Apnöistik ve pnömotaksik merkez buradadır. Yüzeysel lifler serebelluma bağlanır. Motor ve sensorik (duysal) derin lifler medulla oblongatadan pons üzerinden orta beyine gider.

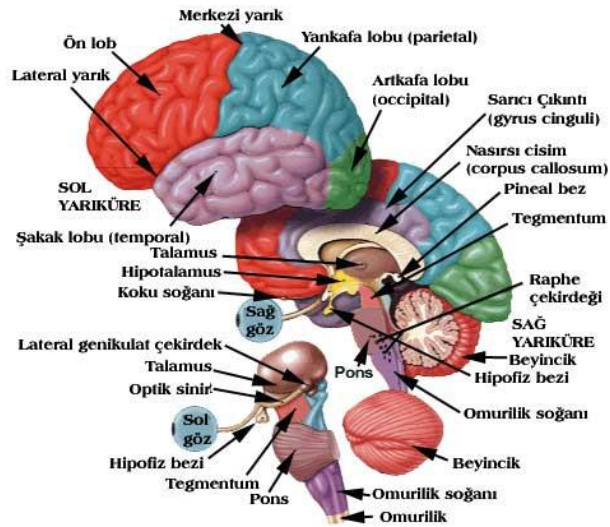
Beyin kabuğu (Korteks); Beyin yarı kürelerinin üzerinde, orta beyinin etrafını sarar. Sinir lifleri sinir hücreleriyle beyin hücreleri arasındaki bağlantıyı kurarlar. Yüksek beyin işlevleri denilen işlevleri ve algılamayla-değerlendirmeye ilişkin temel görevleri yürütür. Motor alanlar, özellikle istemli hareketlerin başlatılması ve icra edilmesinde önemli iken, duysal alanlar, tüm vücuttan gelen verilerin değerlendirildiği en üst merkezler olarak işlev görürler (Şekil 2).

Omurilik (Medulla spinalis); Sırtımızdaki omur kemikleri arasında aşağıya doğru uzanan, temel olarak, orta kısmında ince ve boylu boyunca bir kanal, kanalın

etrafında, enine kesildiğinde kelebek gibi görünen bir gri madde ve bunun etrafında ise beyaz madde kütesinden oluşan, tüp şeklinde bir yapıdır. Bu yapı, etraftan gelen bilgilerin merkezi sinir sistemine girdiği ve merkezden gelen emirlerin çevresel sisteme aktarıldığı yerdir. Gövde ve ekstremiteler kaslarını kontrol eden refleks merkezidir ve refleks merkezleri ile beyin arasında bağlantı sağlar.



Şekil 1. Beyini çevreleyen zarlar (78)



Şekil 2. Beyinin genel yapısı (76)

### **1.2.2. Sinir Sistemi Tümörleri**

Gliomlar glial hücrelerden gelişir ve patolojik olarak astrositom (düşük derece) ve glioblastom (yüksek derece) olarak sınıflandırılırlar. Beynin birincil tümörlerinin %40-60' ını oluştururlar, çoğunlukla malindirler ve erkeklerde daha sık görülürler. Meningiomlar, kafatası meninkslerinden gelişir ve beyin neoplazmalarının %25-30' unu oluştururken, schwannomlar sinir kılıfındaki Schwan hücrelerinden gelişen ve beyin neoplazmalarının %5-10' unu oluşturan tümörlerdir. Bu son iki tür çoğunlukla benidir. Sinir sistemi neoplazmalarının nadir görülen türleri arasında hipofiz adenomları, çocukluğun primer nöroektodermal tümörleri (medullablastom) ve omurilik ve periferik sinir tümörleri sayılabilir. Çok sık olmasa da beyin tümörleri morbiditeye önemli ölçüde katkıda bulunabilir, çoğunlukla çocukları etkiler ve toplamda kötü prognoz gösterir. Radyasyon ve kemoterapiye belirgin biçimde direnç göstermeleri nedeniyle glioblastomu olan hastaların prognozu çok kötüdür. Hastaların çoğunluğu 9-12 ay içinde ölür ve % 3' ten daha küçük bir kısmı 3 yıldan fazla yaşar (11).

#### **1.2.2.1.Epidemiyoloji**

Sinir sistemi tümörlerinin tanımlayıcı epidemiyolojisi hakkındaki verilerin yorumlanması zordur çünkü birçok çalışma hem benin hem de malin tümörleri kapsamaktadır. Merkezi sinir sistemi tümörleri yeni tanı konulan tüm malinitelerin %2' sini oluştururken çocukluk çağı malinitelerinin ise %20' sini oluştururlar. Merkezi sinir sistemi tümörleri içinde, ilk 15 yaş içindeki primer tümörlerin yaklaşık %40-45' i erişkin yaş grubunda ise %50-60' ı astrositer kökenli tümörlerdir. Beyin tümörlerinin



yaşa göre dağılımı, çocuklardaki insidansında bir tepe noktası ve 45-70 arası erişkinlerdeki insidansında bir diğer tepe noktası olmak üzere, çift modludur. Yetmiş yaşından sonra tekrar sıklığında azalma saptanır. Gelişmiş ülkelerde beyin tümörleri erkeklerde kanserle ilişkili mortalite nedenleri içinde 12. sıradadır. Beyin tümörleri insidansı hemen tüm yaş gruplarında erkeklerde kadınlardan bir miktar daha yüksektir; erkek kadın oranı gliomlar için 1,3 ve meningiomlar için 0,6'dır. Histolojik tiplerine göre insidans incelemelerinde ise çocukluk çağı ile erişkinlerde belirgin farklılık gözlenmiştir. Çocukluk çağında astrositom ve medulloblastomlar diğer tümörlerden daha sık saptanırken erişkin yaş grubunda ise glial tümörler ve meningiomlar belirgin olarak sık gözlenirler. Beyin neoplazmaları insidansında değişkenlik söz konusudur; Amerika kıtası ve Avrupa' da erkeklerde oran 6-8/100.000 arasında, Afrika ve Asya' da ise 2-3/100.000 arasındadır. ABD' de gliom oranları beyaz ırk arasında diğer etnik gruplara göre %30-50 daha yüksekken, meningiom oranları siyah ırkta biraz daha yüksektir. Son yıllarda beyin tümörü insidansı ve mortalitesi birçok gelişmiş ülkede, özellikle yaşlılar arasında artmıştır (53). İnsidanstaki artış 1970' lerin sonu ve 1980' lerin başıyla sınırlıdır. Bunun oluşumunda çevresel etkenlerin derecesinin ne olduğu tartışmalı olmakla beraber tıbbi teknolojilerin kullanımının tanıyı kolaylaştırması açısından bu durumu açıklayabileceği düşünülmüştür (123). 1983' ten sonra ve daha yakın geçmişte cep telefonu kullanımındaki artışla beraber insidans hem erkekler hem de kadınlar için göreceli olarak istikralı seyretmiştir. Yüksek çözünürlüğe sahip nörolojik görüntüleme (örneğin BT taraması, manyetik rezonans görüntüleme, PET tarama) tekniklerinin yaygın olarak kullanılmaya başlanması, teşhise ve raporlamaya dair prosedürlerdeki değişkenlikler ve hatta beyinin, başta meme ve akciğer kanseri

olmak üzere, sıkça metastaz gerçekleşen bir bölge olması ve daha ilkel görüntüleme tarzlarıyla beyin metastazlarının birincil beyin tümörü şeklinde yanlış sınıflandırılmış olması son yıllardaki insidanstaki artışı açıklamaktadır.

Bu üç nedenin yakın dönemde beyin tümörü insidansındaki artışın kaynağında yatması ihtimali, beyin tümörlerine bağlı mortalitenin sabit kalması, hatta hafif azalması olgusuyla da güçlendirilmekte, bu durum yeni görüntüleme teknolojileri sayesinde bulunan yeni beyin tümörlerinin büyük kısmının geçmişte bulunan beyin tümörlerine nazaran daha az ölümcül ve daha fazla iyileştirilebilir olduğunun da altını çizmektedir. İnsidanstaki coğrafi değişkenlik diğer birçok insan neoplazmlarında daha azdır, ancak insidans daha gelişkin ülkelerde daha yüksek olma eğilimi göstermektedir. Gliom insidansı yüksek sosyoekonomik gruplardan gelen kişilerde daha yüksek olma eğilimindedir. Yüksek sosyoekonomik statüyle beyin tümörleri ve daha varlıklı ekonomik kesimlerin görüntüleme teknolojilerine daha fazla erişebilmesi arasındaki ilişki, bu tümörlerin insidansının neden kaynak yönünden zengin ülkelerde orta halli veya yoksul olanlara göre daha yüksek olduğunu ve neden üst sosyoekonomik sınıflarda daha fazla olduğunu kısmen açıklamaktadır.

#### **1.2.2.2. Etiyoloji**

Son birkaç on yıldır en gelişmiş ülkelerde beyin tümörleri insidansı ve beyin tümörlerine bağlı mortalite artmıştır. Ancak beyin kanserinin tanımlayıcı epidemiyolojisindeki, zamansal eğilimleri de içeren farklılıklar, kısmen teshis ve raporlamayla ilgili prosedürlerdeki değişkenliklerden kaynaklanmış olabilir.

İyonlaştırıcı radyasyon beyin tümörlerinin tespit edilmiş tek genetik olmayan risk faktörüdür (53). Radyasyon merkezi sinir sistemi tümörlerinin her üç türüne de neden olur, ancak meningiom ve schwannom ile ilişkisi glioma göre daha güçlüdür. Bulgular genellikle atom bombası saldırısı sonrasında sağ kalanlardan ve kafa ve boyun bölgesinden X-ışını tedavisi görenlerden elde edilmektedir. Kafa travmasının meningiom için bir risk faktörü olduğu ve akustik travmanın da (yüksek gürültüye maruz kalınan işlerde olduğu gibi) akustik schwannom için bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür. N-nitroz içeren bileşikler, özellikle nitrozüreler güçlü deneysel beyin kanserojenleridir ve tütün dumanında bulunmaktadır. İnsanlarda aktif veya pasif tütün kullanımının etiyolojik bir rolü olduğuna ilişkin bulgular (yani çocuklukta tütün dumanına maruz kalınması) sonuçsuz kalmıştır (52). Yaşam tarzı, çevre (örneğin mesleki maruziyetler, pestisid kullanımı vb.) ile ilgili ve tıbbi başka birkaç faktörün de beyin kanserinde etiyolojik bir rol oynadıkları ileri sürülmüştür, ancak kanıtlar bir sonuca varmak için yeterli değildir. Bazı çalışmalar, metal işçiliği, itfaiyecilik, çiftçilik, lastik ve petrokimya endüstrilerini içeren belirli mesleklerle ve patolog, anatomist ve mumyalayıcı olarak çalışmakla merkezi sinir sistemi tümörleri insidansındaki artış arasında bir ilişki olduğunu öne sürmüştür, ancak bu bildirimlerin çoğunluğu doğrulanmamış ve hastalığa neden olan ajanlar belirlenememiştir. Cep telefonları tarafından yayılan radyofrekansındaki radyasyonun ve mikrodalga telekomünikasyonun malin gliomların etiyolojisinde bir rol oynuyor olabilecekleri görüşünün de henüz kanıtlanmaya ihtiyacı vardır. Merkezi sinir sistemi tümörlerinin etiyolojisi hakkında çok sınırlı bilginin olması nedeniyle etkin bir önleme stratejisi geliştirmek için gerekli kaynaklar yetersizdir.

### **1.2.2.3. Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflandırılması**

Hücrel patolojinin kurucusu olan Rudolp Virchow, 1864/65 yılında, gliomları, sinir sisteminin psammomalarından, melanomalarından ve diğer sarkomalarından ayırmıştır. Ancak, Bailey ve Cushing' in gliomlar için ilk sistematik sınıflandırmayı geliştirmeleri ve beyin tümör derecelendirme kavramını tanıtmaları 1926 yılındadır. Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) ilk olarak sinir sistemi tümörlerini sınıflandırması 1979 yılındadır. Revizyonlar 1993 ve 2000 yıllarında yapılmıştır. En son versiyonu da içeren (2007, Tablo 1) tüm WHO sınıflandırmaları, Bailey ve Cushing tarafından önerilen histogenetik prensipi izlemiştir. Morfolojik ve immunohistokimyasal özellikler baz alınarak her tümör varlığı türevlendiği hücre kökenine göre sınıflandırılır. Yaygın kullanımın aksine bu kavram, çoğu beyin tümörünün orijininin bilinmez olması durumuyla karşı karşıyadır. Üstelik fare modellerinden elde edilen deneysel verilere göre, örneğin gliomlar, ölümcül derecede farklılaşan astrositlerden veya oligodendrositlerden öte, glial prekürsör hücrelerden farklılaşmaya meyillidir. Bunun yanısıra, WHO kriterlerine göre yapılan histolojik sınıflandırma, biyolojik ve klinik olarak belirgin beyin tümörlerinin anlamlı ayrılmasına olanak sağlar ve bu ayrılama da, şimdiye kadar hiçbir diagnostik yaklaşımla değişmemiştir. Bu nedenle, beyin tümörlerinin morfolojik olarak sınıflandırılması, nöro-onkolojide "altın standart" tanı şekli olarak vardır ve var olacaktır (90).

#### **1.2.2.3.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Derecelendirmesi**

Tümör tanımlanmasına ek olarak, WHO sınıflandırması, WHO grade I (benin)' den WHO grade IV' e kadar değişen 4 aşamalı bir histolojik derecelendirmeyi içerir.

WHO' nun derecelendirmesi, cerrahi patolojinin diğer alanlarında yaygın olarak kullanılan derecelendirmeye eşit değildir, ancak tümör malinitesi ve hastanın prognozu açısından tahmin yürütülmesine olanak sağlar. Amaçlanan tümörün biyolojik davranışının önceden kestirilmesini sağlamaktır. Klinik uygulamalarda tümör derecesi seçilecek tedavi yönteminin belirlenmesinde, özellikle adjuvan radyoterapi ve özel kemoterapötiklerin seçilmesinde önem arz etmektedir. WHO' nun tümör sınıflandırmasında derecelendirme, çok çeşitli histolojik özelliğe sahip tümörlerin malinansi ölçütüdür.

WHO grade I tümörler; minimal çoğalma eğilimli ve yalnızca cerrahi müdahaleyle iyileēebilen tümörleri içerir. rnek olarak, pilositik astrositomlar, subependimomlar, cauda equina (kuyruk sokumu) 'nın miksopapiller ependimomları, çok çeşitli nöronal ve nöronal/glial tümörler, schwannomlar ve çoğu meningiomlar verilebilir.

WHO grade II tümörler; düşük mitotik aktiviteye sahiplerdir ancak yenilenmeye meyillidirler. Bazı grade II tümörlerde yüksek dereceli tümörlere dönüşme eğilimi mevcuttur. Diffüz astrositomlar, oligodendrogliomlar, oligoastrositomlar ve ependimomlar örnek olarak verilebilir.

WHO grade III tümörler; genellikle histolojik olarak malinansi bulguları gösteren lezyonlardır. Bunlar genellikle artmış mitotik aktivite, artmış selülarite, nükleer pleomorfizm ve hücresel anaplazi ile karakterizedir.

WHO grade IV tümörler; mitotik olarak aktif ve nekroz eğilimi yüksek maliniteye sahip neoplazmlar ile karakterizedir. Tipik olarak hızlı bir preoperatif ve

postoperatif hastalık gelişimi söz konusudur ve ölümcül bir seyir gösterirler. Bunlar glioblastomu ve embriyonal tümörlerin çeşitli formlarını içermektedir (90).

**Tablo 1.** Dünya Sağlık Örgütü' ne (WHO) göre sinir sistemi tümörleri sınıflandırması

<b>NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ</b>		
<b>ICD-0/Davranış</b>	<b>Astrositik Tümörler</b>	<b>WHO derece</b>
1	9421/1(*) Pilsitik Astrositom	derece I
	9425/3(**) Pilmiksoid Astrositom	derece II
2	9384/1 Subependimal Dev Hücreli Astrositom	derece I
3	9424/3 Pleomorfik Ksantoastrositom	derece II
4	9400/3 Diffüz Astrositom	derece II
	9420/3 Fibriller Astrositom	
	9411/3 Gemistositik Astrositom	
	9410/3 Protoplazmik Astrositom	
5	9401/3 Anaplastik Astrositom	derece III
6	9440/3 Glioblastom	derece IV
	9441/3 Dev Hücreli Glioblastom	derece IV
	9442/3 Gliosarkom	derece IV
7	9381/3 Gliomatozis Serebri	
<b>Oligodendroglial Tümörler</b>		
8	9450/3 Oligodendrogliom	derece II
9	9451/3 Anaplastik Oligodendrogliom	derece III
<b>Oligoastrositik Tümörler</b>		
10	9382/3 Oligoastrositom	derece II
11	9382/3 Anaplastik Oligoastrositom	derece III
<b>Ependimal Tümörler</b>		
12	9383/1 Subependimom	derece I
13	9394/1 Miksopapiller Ependimom	derece I
14	9391/3 Ependimom	derece II
	9391/3 Sellüler	
	9393/3 Papiller	
	9391/3 Berrak Hücreli	
	9391/3 Tanisitik	
15	9392/3 Anaplastik Ependimom	derece III
<b>Koroid Pleksus Tümörleri</b>		
16	9390/0 Koroid Pleksus Papillomu	derece I
17	9390/1 Atipik Koroid Pleksus Papillomu	derece II
18	9390/3 Koroid Pleksus Karsinomu	derece III

### **Diğer Nöroepitelyal Tümörler**

19	9430/3	Astroblastom	derece I
20	9444/1	Üçüncü Ventrikülün Kordoid Gliomu	derece II
21	9431/1	Angiosentrik Gliom	derece I

### **Nöronal ve Mikst Nöronal-Glial Tümörler**

22	9493/0	Serebellumun Displastik Gangliositomu (Lhermitte-Duclos)	
23	9412/1	Desmoplastik İnfantil Astrositom / Gangliogliom	derece I
24	9413/0	Disembryoplastik Neuroepitelyal Tümör	derece I
25	9492/0	Gangliositom	derece I
26	9505/1	Gangliogliom	derece I
27	9505/3	Anaplastik Gangliogliom	derece III
28	9506/1	Santral Nörositom	derece II
29	9506/1	Ekstraventriküler Nörositom	derece II
30	9506/1	Serebellar Liponörositom	derece II
31	9509/1	Papiller Glionöronal Tümör	derece I
32	9509/1	V. Ventrikülün Rozet Oluşturmuş Glionöronal Tümörü	derece I
33	8680/1	Parangliom	derece I

### **Pineal Bölge Tümörleri**

34	9361/1	Pineositom	derece I
35	9362/3	İntermediyer Diferansiyasyon Gösteren Pineal Parankimal Tümör	derece II, III
36	9362/3	Pineoblastom	derece IV
37	9395/3	Pineal Bölgenin Papiller Tümörü	derece II, III

### **Embriyonal Tümörler**

38	9470/3	Medulloblastom	derece IV
	9471/3	Desmoplastik/Nodüler Medulloblastom	
	9471/3	Şiddetli Nodülerite Yapan Medulloblastom	derece IV
	9474/3	Anaplastik Medulloblastom	derece IV
	9474/3	Büyük Hücreli Medulloblastom	
39	9473/3	SSS Primitif Nöroektodermal Tümör	derece IV
	9500/3	SSS Nöroblastom	
	9490/3	SSS Ganglionöroblastom	
	9501/3	Medulloepitelyom	
	9392/3	Ependimoblastom	
40	9508/3	Atipik Teratoid/Rabdoid Tümör	derece IV

### **Kranyal ve Paraspinal Sinirlerin Tümörleri**

41	9560/0	Schwannom (Nörilemmom, Nörinom)	derece I
	9560/0	Sellüler	
	9560/0	Pleksiform	
	9560/0	Melanotik	

42	9540/0	Nörofibrom	derece I
	9550/0	Pleksiform	
43		Perinörioma	derece I, II, III
	9571/0	Perinöriom, NOS	
	9571/3	Malin Perinöriom	
44		Malin Periferel Sinir Kılıfı Tümörleri (MPNST)	derece II, III, IV
	9540/3	Epitelioid MPNST	
	9540/3	Mezenkimal Diferansiyasyon Gösteren MPNST	
	9540/3	Melanotik MPNST	
	9540/3	Glandüler Diferansiyasyon Gösteren MPNST	

### Meninkslerin Tümörleri

#### Meningotelyal Hücrelerin Tümörleri

45	9530/0	Meningioma	derece I
	9531/0	Meningotelyal	
	9532/0	Fibröz (Fibroblastik)	
	9537/0	Transisyonel (Mikst)	
	9533/0	Psammomatöz	
	9534/0	Angiomatöz	
	9530/0	Mikrokistik	
	9530/0	Sekretuar	
	9530/0	Lemfoplasmositten zengin	
	9530/0	Metaplastik	
	9538/1	Kordoid	
	9538/1	Berrak Hücreli	
	9539/1	Atipik	derece II
	9538/3	Papiller	
	9538/3	Rabdoid	
	9530/3	Anaplastik (Malin)	derece III

#### Mezenkimal Tümörler

46	8850/0	Lipom
47	8861/0	Angiolipom
48	8880/0	Hibernom
49	8850/3	Liposarcom
50	8815/0	Soliter Fibröz Tümör
51	8810/3	Fibrosarkom
52	8830/3	Malin Fibröz Histiositom
53	8890/0	Leiomyom
54	8890/3	Leiomyosarkom
55	8900/0	Rabdomyom
56	8900/3	Rhabdomyosarkom
57	9220/0	Kondrom
58	9220/3	Kondrosarkom
59	9180/0	Osteom
60	9180/3	Osteosarkom
61	9210/0	Osteokondrom



62	9120/0	Hemangiom	
63	9133/1	Epitelioid Hemangioendotelyom	
64	9150/1	Hemangioperisityom	derece II
65	9150/3	Anaplastik Hemangioperisitom	derece III
66	9120/3	Angiosarkom	
67	9140/3	Kaposi Sarkomu	
68	9364/3	Ewing Sarkom - PNET	

#### **Primer Melanositik Lezyonlar**

69	8728/0	Diffüz Melanositozis	
70	8728/1	Melanositom	
71	8720/3	Malin Melanom	
72	8728/3	Meningeal Melanomatosis	

#### **Meninkslerle İlişkili Diğer Tümörler**

73	9161/1	Haemangioblastom	derece I
----	--------	------------------	----------

#### **Lenfomalar ve Hemapoietik Tümörler**

74	9590/3	Malin Lenfomalar	
75	9731/3	Plazmositom	
76	9930/3	Granülositik Sarkom	

#### **Germ Hücre Tümörleri**

77	9064/3	Germinom	
78	9070/3	Embriyonal Karsinom	
79	9071/3	Yolk Sak Tümörü	
80	9100/3	Koriokarsinom	
81	9080/1	Teratom	
	9080/0	Matür	
	9080/3	İmmatür	
	9084/3	Malin Transformasyon Gösteren Teratom	
82	085/3	Mikst Germ Hücre Tümörleri	

#### **Sellar Bölge Tümörleri**

83	9350/1	Kraniofaringiom	derece I
	9351/1	Adamantinomatöz	
	9352/1	Papiller	
84	9582/0	Granüler Hücreli Tümör	derece I
85	9432/1	Pituisitom	derece I
86	8991/0	Adenohipofizin İğsi Hücreli Onkositomu	derece I

#### **Metastatik Tümörler**

(\*) *International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) {614A} ve*  
(\*\*) *the Systematized Nomenclature of Medicine (http://snomed.org). Morfoloji kodları. 1. Davranış: /0 benign tümörleri, /3 malin tümörleri ve /1 borderline veya davranışı bilinmeyen tümörleri göstermektedir (174)*

### 1.2.2.3.2. Beyin Tümörü Sınıflandırılmasında İmmunohistokimya

Spesifik farklılaşma markırlarının ekspresyonunun yanısıra çoğalmaya bağlı antijenlerin immunohistokimyasal boyanması, beyin tümörlerinin morfolojik sınıflandırmasında önemli bir yer tutmaktadır. Tablo 2' de farklı tümör varlıklarının ayırıcı tanısı ve çoğalma aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılan tanısal antijenler görülebilir.

Rutin tanı işlemi sırasında, bu antijenlerin immunohistokimyası genellikle formalinle fikse edilmiş parafin kesitleri üzerinde yapılır. Peroksidaz veya alkalin fosfataza dayanan teşhis yöntemleri kullanılır. Böylece geleneksel boyamalar ile çözülmesi zor hatta imkansız olan önemli ayırıcı tanı sorunları da ortamdan kalmış olur. Örneğin, teşhisi zor olan malin, küçük, yuvarlak ve mavi hücre tümörleri genellikle immunohistokimya ile kolaylıkla teşhis edilebilmektedir. Primeri belirsiz metastaz durumunda, bir çok organa-spesifik markırlar ile organ yeri ve primer tümörün cinsi belirlenebilir. İmmünohistokimya "monstroselüler sarkoma" denen belli oluşumların, dev hücre glioblastomu olarak yeniden sınıflandırılmasında ve üçüncü ventrikülün kordoid gliomu gibi yeni tümör oluşumlarının tanımlanmasında önemli bir araç olmuştur. Ancak, hala immunohistokimya ile çözümlenemeyen durumlar da söz konusudur. Karışık gliomlar (oligoastroitomlar) hatırı sayılır bir nesnellikten ve gözlemci çeşitliliğinden müzdariptir. Çünkü neoplastik astrositler ve oligodendrositlere özgü immunohistokimyasal markırlar yoktur. Bununla beraber, hem neoplastik hem de neoplastik olmayan hücrelerce eksprese edilen birçok farklılaşma antijeni, neoplastik ve reaktif lezyonlar arasında güvenilir bir farklılık sergilemezler. Örneğin, glial fibriller asidik protein (GFAP) immünreaktivitesi hem

normal hem de reaktif astrositlerde görüldüğü gibi, astrositik tümör hücrelerinde de görülür. Bir tümörün malinite seviyesini belirlemek için, MIB-1 antikorunu kullanarak, proliferasyon-ilişkili antijenlerden Ki-67 için immunohistokimya bakmak rutin bir işlemdir. MIB1 indeksinin çeşitli durumlarda teşhis anlamında faydalı bilgiler sunduğu su götürmez bir gerçek olsa da, boyama sonuçları ve değerlendirme metodları laboratuvarlardan laboratuvara değişir. Farklı WHO derecelerindeki tümörlerdeki MIB1 pozitifliğinin çakışıklığı, diagnostik “cut-off” değerlerinin tanımını engellemiştir. Bu nedenle, WHO sınıflandırması MIB-1 boyamayı, bir çok tümör varlığının sınıflandırması ve derecelendirmesi için bir kriter olmaktan çıkarmıştır. Meningiomlar bu durumun dışında tutulmuştur.

Gelecekte, hücre ve/veya tümör-tipine spesifik markırlar geliştirildikçe, immunohistokimyasal analizler beyin tümörü teşhislerinde çok daha önemli hale gelecektir. Bununla beraber, tümör hücreleri tarafından anormal olarak aktif ya da aşırı eksprese edilen belirli proteinlere karşı geliştirilen hedefe yönelik tedavilerdeki gelişmeler, spesifik immunohistokimyasal analizlere ihtiyaç duymaktadır. Çünkü hedeflenmiş proteinlerin ekspresyonunun ispatının, tedavi öncesi yapılması gereklidir. Genel onkolojide öne çıkan örnekler, göğüs karsinomundaki Her2/ErbB2 aşırı ekspresyonunu ve gastrointestinal stromal tümörlerdeki cKit aşırı ekspresyonunu içermektedir. Nöro-onkolojide, bunun gibi hedef proteinlerin immunohistokimyasal değerlendirmesi önemli bir tanı analizi olacaktır. Örnek olarak, malin gliomların moleküler tedavisi için hedef olarak kullanılan epidermal büyüme faktörünün immunohistokimyasal ispatı verilebilir (90).

**Tablo 2.** Beyin tümörü sınıflandırılmasında kullanılan immünohistokimyasal markırlar (90)

<b>Nöronal ve nöroendokrin markırlar</b>	Sinaptofizin, nörofilament proteinleri, NeuN, kromogranin A
<b>Glial markırlar</b>	Glial fibriller asidik protein (GFAP), S-100 protein, MAP2
<b>Epitelyal markırlar</b>	Sitokeratinler, epitelyal membran antijen (EMA)
<b>Melanositik markırlar</b>	Melan A, Human Melanoma Black (HMB-45)
<b>Mezenşimal markırlar</b>	Vimentin, dezmin, düz kas aktin (SMA), miyogloblin
<b>Kan hücresi markırları</b>	CD45 (pan-lökositler), CD20 (B hücreleri), CD3 (T hücreleri), CD68, HLA-DR (monositler, makrofajlar, mikroglia), CD138 (plazma hücreleri)
<b>Germ hücresi markırları</b>	B-HCG, alfa-fetoprotein (AFP), plental alkalın fosfataz (PLAP), insan plental laktogen (HPL), OCT4 (germinomlar), c-Kit (germinomlar), CD30 (embriyonel karsinomlar)
<b>Hipofiz bezi hormonları</b>	Prolaktin, ACTH, TSH, FSH, LH, GH
<b>Proliferasyon markırları</b>	Ki-67 (MIB-1)
<b>Diğer markırlar</b>	P53, CD34, tiroid transkripsiyon faktör 1 (TTF1), Cdx2, prostat-spesifik antijen (PSA), tireoglobulin, östrojen ve progesteron reseptörleri, HER2/Neu, EGFR, INI1

#### 1.2.2.3.3. Beyin Tümör Sınıflandırılmasına Moleküler Genetiğin Katkısı

Primer beyin tümörlerinin moleküler patojenitesi hakkındaki bilgiler hızla gelişmekte ve farklı tümör tiplerinde birçok genetik ve epigenetik değişiklik tanımlanmaktadır. Günümüzde, genetik analizler birçok tümör oluşumun sınıflandırması, tanı değerlendirmesi ve terapötik idaresinde anlamlı bir etki oluşturamamıştır. Ancak, göze çarpan birkaç istisna vardır. Örneğin oligodendrogial tümörlerde 1p ve 19q kollarının allelik boyanması, teşhis ve tedaviye yanıtla yakından ilişkilidir.

Bunun sonucu, 1p ve 10q delesyonları için oligodendrogial tümörlerin moleküler testleri dünya çapında birçok laboratuvarında adjuvan tedaviye yanıt veren bu tümörlerin karakterizasyonu amacıyla rutin olarak yapılmaktadır.

1p/19q kaybı ve Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) amplifikasyonu, anaplastik oligodendrogliom ve küçük hücre glioblastomu arasındaki zor ayırıcı tanıyı çözmek için de kullanılabilir. Tanısal nöro-onkolojide kullanılan moleküler testlerin potansiyel indikasyonları Tablo 3' te verilmiştir. Bunların arasında, son zamanlarda, WHO grade III ve IV malin gliomların MGMT promotor metilasyonu için test edilmesi dikkat çekici olmuştur.

MGMT, DNA hasarını tamir eden O6-metilguanin DNA metil-transferaz enzimini kodlar. Bu enzim aynı zamanda O6-alkilguanin DNA alkil-transferaz olarak da bilinir. Bu enzim, mutajenik alkil-eklenmeleri O6-pozisyonundan ayırır ve böylece gliom tedavisi için kullanılan nitrozüre bileşikleri ve temozolomid gibi alkilleyici ilaçlara karşı direncin oluşmasına neden olur. Nitrozüre türevleri veya temozolomid ile tedavi edilen malin gliom hastaları üzerine yapılan birçok araştırma göstermiştir ki, MGMT promotor hipermetilasyonu, kemoterapiye gösterilen yanıtın ve hastanın sağ kalma olasılığının bağımsız bir markıdır.

Birlikte ele alındığında, moleküler markırların, sadece ayırıcı tanı problemlerinde yardımcı olmakla kalmayıp, bireysel hastanın tedaviye cevabının ve hastaya uygulanan tedavi sonucunun tahmin edilmesine de yardımcı olduğu konusunda artan bir ortak görüş vardır. Yakın gelecekte, yeni bulunan moleküler markırların, kontrollü olası klinik denemelere katılımları açısından sistematik olarak değerlendirilmesi önem kazanacaktır.

Dahası, mikroarray-tabanlı genomik hibridizasyon ve mRNA ekspresyonu profillenmesi gibi yeni teknikler, tek bir deneyde birden fazla genin analizinin

eşzamanlı olarak yapılmasına olanak sağlaması açısından, moleküler diagnostik alanında umut verici bakış açıları kazandıracaktır.

Aslında, ilk verilere bakıldığında malin tümörlerin mikroarray-tabanlı ekspresyon profillenmesi, histolojik sınıflandırmalara göre, klinik sonuçlarla daha uyumludur. Bu iyimser bulguların aksine, güncel moleküler analizler, beyin tümörlerinin oturmuş morfolojik sınıflandırmalarının ve sinir sistemi tümörlerinin WHO derecelendirmelerinin yerini tutamayacaktır (90).

**Tablo 3.** Nöroonkolojide kullanılan moleküler diagnostik testler (90)

Genetik Değişiklik	Tümör tipi/Endikasyonu
<b>1p/19q kaybı</b>	Anaplastik oligodendrogliom, anaplastik oligoastroitom; adjuvan terapiye verilen yanıtın ve prognoz tahmini
<b>1p/19q kaybı</b>	Oligodendrogliom, oligoastroitom; tümör progresyonu için terapötik strateji planlanması
<b>1p/19q kaybı ve EGFR amplifikasyonu</b>	Anaplastik oligodendrogliom, küçük hücreli glioblastom; ayırıcı tanı
<b>MGMT promotör metilasyonu</b>	Glioblastom; DNA-alkile edici ilaçlarla kemoterapiye olan yanıtın tahmini
<b>INI1 mutasyonu</b>	Atipik teratoid/rabdoid tümör; diağnoz konfirmasyonu
<b>MYCN/MYCC amplifikasyonu</b>	Medullablastom; zayıf prognoz indikatörü

#### 1.2.2.4. Astrositik Tümörler

Astroitik tümörler, primer beyin tümörlerinin en yaygınıdır ve tüm glial neoplazmların %60' ını oluşturur. WHO derecelendirmesi bunları iki büyük kategoriye ayırır: 1) en yaygın grup olan diffüz infiltratif astroitomlar (diffüz astroitom, anaplastik astroitom, glioblastom) ve 2) Daha az görülen sınırlı büyümeye sahip astroitik neoplazmlar (pilositik astroitom ve pleomorfik ksantoastroitom). İkinci başlıktaki tümörler daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülür, yavaş gelişir, malin gelişim için potansiyeli limitlidir ve tümörün

alınmasıyla tedavi edilebilir. Tersine, diffüzyonla sızan astrositomlar öncelikli olarak yetişkin bireyleri etkiler, lokal yenilenmeye ve malin gelişime doğal olarak meyillidirler. Kemoterapi, radyoterapi ve nöral cerrahiyle tedavileri olası değildir (90).

WHO, astrositomların klinikopatolojik alt tiplerini aşağıdaki gibi ayırt etmektedir.

- a. WHO grade I; çocuklarda rastlanan en yaygın beyin tümörüdür ve esasen pediatrik bir tümördür ve nadiren neoplastik transformasyon geçirmektedir. Lokalizasyona bağlı olarak en benin astrositomlar, vital duyuşal fonksiyonları engelleyebilmekte ve sıklıkla tam bir rezeksiyon ardından rekürrens sergilemektedirler.
- b. WHO grade II; tüm gliomların %25' ini oluşturmaktadır ve doğal olarak nüfuz ederler (infiltratiftirler). Agresif histolojik özellikleri olmamasına rağmen, erişkinlerdeki düşük-dereceli astrositomlar, hastaların büyük çoğunluğunda öldürücüdürler.
- c. WHO grade III; yüksek oranda malin gliomlardır ve artmış glioblastom gelişimi eğilimine sahiptirler.
- d. WHO grade IV; son derece malin beyin tümörleridir ve tipik olarak erişkinleri etkilerler. Bu gliom tipleri kötü prognoza sahiptirler, kısmen, kötü olarak tanımlanan tümör, hızla beynin diğer bölgelerine yayılır. Bunlar en yaygın intrakranial neoplazmlardır ve primer beyin tümörlerinin %60' ını açıklarlar.

#### 1.2.2.4.1. Diffüz Astrositom (WHO Grade II)

**Tanım:** İyi farklılaşmış komşu beyin dokularına diffüzyonla sızan yavaş gelişen astrositik gliomdur. Genel olarak genç yetişkinlerde supratentoryal olarak gelişir ve anaplastik astrositom ve sonunda sekonder glioblastoma malin progresyon için içsel bir eğilimi vardır.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Diffüz astrositomlar tüm primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaklaşık %5' ini ve astrositik gliomların %10-15' ini oluşturur. Genellikle genç erişkinlerde (yaş ortalaması 30-40) gelişir ancak herhangi bir yaşta da ortaya çıkabilir.

**Makroskopisi ve yerleşimi:** Diffüz astrositomlar öncelikli olarak serebral hemisferlerde gelişir. Çocuklarda beyin sapında yerleşimi dışında diğer yerleşimleri seyrekdir. Makroskopik olarak, diffüz astrositomlar sınırları belli olmayan, renkleri griden sarıya değişen ve genellikle ak ve/veya boz bölgede yumuşak lezyonlar olarak karakterizedir. Var olan yapıların genişlemesi ve normal anatomik sınırların bulanıklaşması ile kendilerini belli ederler (Şekil 3). Sistik değişimler yaygındır. Tümörler corpus callosum aracılığıyla kontrolateral yapılara sızabilir.

**Histopatoloji:** Mikroskopi, düşükten orta dereceli selülariteye sahip diferansiye olmuş astrositik tümörü görüntüleyebilir. Hatta komşu beyin parankimasına sızma olup olmadığı da görülebilir. Mikrositik dejenerasyon, yaygın bir özelliktir. Mitotik aktivite düşüktür. Nekroz ve mikrovasküler çoğalma yoktur. Üç histolojik alt sınıf tanımlanmıştır. Fibriller astrositom (Şekil 4a), en yaygın türdür ve kısıtlı sitoplazmaya sahip multipolar neoplastik astrositlerden oluşur ve fiberden



zengin glial matriks oluşturan hücrelere sahiptir. Daha az yaygın görülen gemistositik astrositom (Şekil 4b), gemistositik astrositler, örneğin genişlemiş eozinofilik sitoplazmaya sahip tümör hücreleri, alışılmadık nükleus ile karakterizedir. Tanıyı koymak için en az tümör hücrelerinin %20' si gemistositik fenotipe sahip olmalıdır. Üçüncü tip ise, protoplazmik astrositomdur. Bu tip seyrek görülür ve eozinofilik sitoplazmaya sahip tümör hücrelerinden oluşmuştur. Mikrositik ya da mukoid matrise yerleşmiş, az ve gevşek yapıya sahiptir (Şekil 4c). Protoplazmik astrositomlar içindeki tümör hücreleri yapıları sadece küçük miktarda glial filamentler içerir. Diffüz veya anaplastik astrositomun bazı olguları nörofil-benzeri bölgeler içerebilirler, bunlar sinaptosin pozitifler ve bazen oldukça pleomorfik nörositik ve/veya nöronal hücreler tarafından bir rozet benzeri modelde çerçevelenirler. Bu tür tümörler başlangıçta rozet glionöronal tümör olarak rapor edilmişlerdir. WHO sınıflandırması, nöropil benzeri adaların varlığını nadir büyüme paterni olarak dikkate alır, kendisi tümör varlığı teşkil etmez. Diffüz infiltratif astrositomun nadir olguları granüler hücrelerin önemli bir bileşenini içerebilir, bunlar büyük, eozinofilik dolu yuvarlak hücreler ve PAS-pozitif granüllerdir. Nadiren tümörler atipik granül hücrelerden oluşabilir (granüler hücre astrositomu). Lenfositik infiltratlar çoğunlukla mevcuttur. Hastaların çoğu oldukça kötü sağkalım göstermesine rağmen granüler hücre farklılaşması, grade II, III veya IV astrositomlarda meydana gelebilir. Moleküler genetik incelemeler genellikle yüksek gradeli astrositik tümörlerde bulunan, 9p ve 10q kromozom kollarındaki kayıplar gibi genetik değişimlerde yüksek bir insidansı göstermiştir, fakat granüler hücre astrositomlarını diğer diffüz astrositomlardan ayıracak spesifik bir genetik alterasyon yoktur. Böylece, bu

neoplazmlar diffüz astrositomun belirgin bir büyüme modelini temsil ederler, ancak kendileri varlık teşkil etmemektedir.

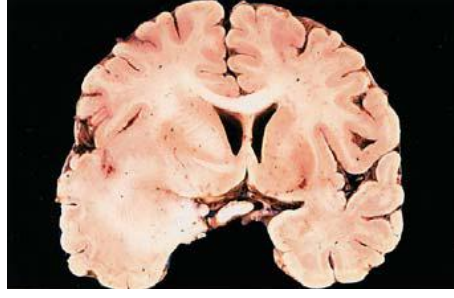
**Derecelendirme:** Bu tip astrositolar, WHO grade II' dirler. Ancak, bu tümörlerin yenilenme ve kendiliğinden anaplastik astrositom ya da sekonder glioblastoma dönüşüme kalıtsal bir eğilimleri vardır. İlerlemenin histolojik belirtileri yani artmış selülarite ve mitotik aktivite, odak şeklinde gelişebilir. Bu nedenle, biyopsi yerinin seçimi ve dokudan örnek alma önemli konulardır. Gemistositik astrositolar hızlı ilerlemeye meyillidir ve hastalığın sonucunun tahmin edilmesi de bir o kadar zordur. Fakat uzun süren epilepsiye sahip hastalarda, II. Derece WHO astrositoların bir alt türü, tekrarlamaya daha az meyilli olmaktadır ve hayatta kalma şansı da daha yüksektir.

**İmmunohistokimya:** Diffüz astrositolar, GFAP ve protein S-100 için pozitif boyanır. GFAP immünreaktivite, gemistositik ve fibriller türlerde güçlüyken, protoplazmik astrositolar da görülen pozitiflik zayıftır. p53 tümör supresör protein için yapılan immün boyama, tüm vakaların yaklaşık %60' ında yaygın nükleer immünreaktivite gösterir. Ki-67(MIB-1) işaretlenme indeksi düşüktür (<%5).

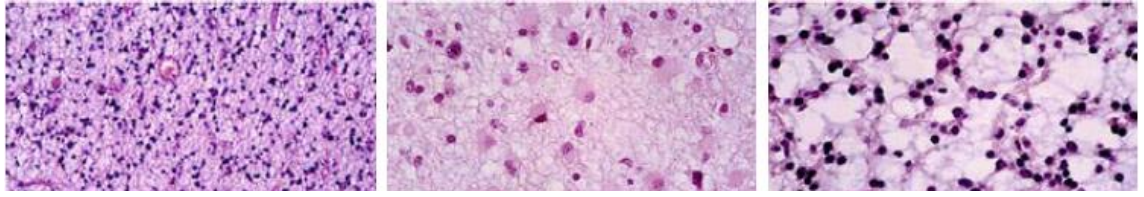
**Ayırıcı tanı:** Diffüz astrositom ve reaktif astrogliazis arasındaki histolojik ayırlama oldukça önemlidir. p53 için yapılan immunohistokimya, astrositik tümör hücrelerindeki nükleer p53 birikimini göstermesi açısından bazen yardımcı olabilir. Ancak, negatif p53 boyama diffüz astrositomu elememiz için yeterli değildir. p53- pozitif hücrelerin varlığının tek tek dikkatle yorumlanması gerekir. Pilsitik astrositom için diferansiyel tanı, küçük biyopsi örneği varlığında güç olabilir.

Anaplastik astrositolar, özellikle mitotik aktivitedeki artış gibi, anaplazinin histolojik özelliklerinin varlığı ile diffüz astrositolarından ayrılır.

**Moleküler patoloji:** (Şekil 19) En yaygın görülen karyotipik anomali, trizomi/polizomi 7' dir. Moleküler sitogenetik analizler kromozom 7 veya 7p' deki artışın, vakaların %50' sinden fazlasında görüldüğünü göstermiştir. Kromozom 22q, 13q, 10q ve cinsiyet kromozomlarındaki kayıplar daha seyrek görülür. TP53 tümör supresör genin 17p13 bölgesindeki mutasyon ve 17p' deki heterozigositenin kaybı yaklaşık tüm diffüz astrositoların %50-60' ı ile gemistositik tümörlerin %80' inde görülür. Diffüz astrositoların TP53 mutasyonunun olmadığı bir alt grubunda, p14<sup>ARF</sup> geninde promotör metilasyonu görülmektedir. Platelet-türevli büyüme faktörü reseptör alfa (PDGFRA) ve bağlandığı PDGFα' nın artmış ekspresyonları yaygındır. Özellikle, 17p bölgesinde LOH görülen tümörlerde görülür. İzositrat dehidrogenaz 1 geninde (IDH1) kodon 132' yi etkileyen mutasyonlar diffüz astrositoların %60' ından fazlasında bulunmuştur. Diffüz astrositoların %50' sinden fazlasında epigenetik olarak sustuğu rapor edilen diğer genler; 10q26' da MGMT geni, 5q31' deki protokaderin-gama alt-aile A11 geni ve 19q13' teki EMP3 genidir[160]. İlginç olarak, MGMT hipermetilasyonu TP53 mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Malin ilerlemeyi gösteren potansiyel moleküler markırlar, kromozom 6 ve 19q' daki allelik kayıpları içerir. Oligodendroglioların aksine, 1p ve 19q kayıpları diffüz astrositolarında nadirdir (90).



**Şekil 3.** Sol temporal lopta diffüz astrositom (90)



**A**

**B**

**C**

**Şekil 4.** WHO grade II diffüz astrositomlar (H&E). A; Fibriller, B; Gemistositik, C; Protoplazmik astrositom varyantları (90)

#### **1.2.2.4.2. Anaplastik Astrositom (WHO Grade III)**

**Tanım:** Diffüz olarak yan dokulara sızma yapan astrositik gliomdur. Artmış selülarite, atipik sitoloji ve arsız mitotik aktivite ile karakterizedir. Bu tümörler daha önceden var olan diffüz astrositomlardan türerler veya daha az malin prekürsör lezyonların yokluğunda kendiliğinden gelişirler. Anaplastik astrositomlarda sekonder glioblastoma progresyon için içsel bir eğilim vardır.

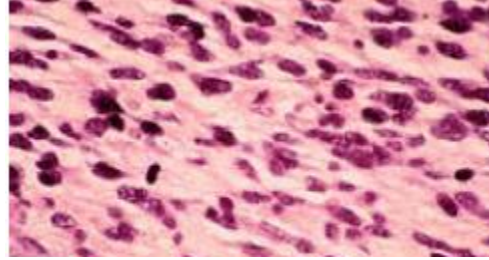
**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Tüm astrositik gliomların yaklaşık %10-25' ini kapsar. İnsidansı 40-45 yaşlarda pik yapmaktadır.

**Makroskopisi ve yerleşimi:** Çoğunlukla serebral hemisferlerde yerleşim gösterir. Çocuklarda ve genç erişkinlerde, beyin sapı ve talamus da tipik yerleşim

yeridir. Makroskopik olarak, anaplastik astrositolar perifokal ödemle birlikte yayılan lezyonlardır. Normal beyin dokusundan ayırt etmek, diffüz astrositolarla göre daha kolaydır. Ancak sınırları astrositolarla benzer şekilde belirsizdir.

**Histopatoloji:** Mikroskopik olarak, fokal yada diffüz anaplaziye benzer işaretler gösterir. Bunlar artmış selülarite, atipik nükleus ve arsız mitotik aktivite olarak sıralanabilir (Şekil 5). Glioblastomun histolojik belirtileri (vasküler proliferasyon ve nekroz) görülmez, ancak anaplastik astrositolar, sekonder glioblastom gelişmeye meyillidir.

**İmmunohistokimya:** Anaplastik astrositolar, GFAP ve protein S-100 için pozitif boyanır. Nükleer p53 tümör supresör protein için yapılan immunoboyama, tüm vakaların yaklaşık %60' ında görülür. Ki-67(MIB1) için boyamada, tümör hücrelerinin %5' inden fazlasında nükleer pozitiflik görülür.



**Şekil 5.** WHO grade III anaplastik astrositom (H&E). Artmış selülarite, nükleer pleomorfizm ve mitotik aktivite (90)

**Moleküler patoloji:** (Şekil 19) Diffüz astrositolar gibi anaplastik astrositolarla da sıklıkla, kromozom 7' de kazanımlar, TP53 mutasyonu ve PDGFRA/PDGF $\alpha$  aşırı ekspresyonu görülür. TP53 mutasyonuna alternatif olarak, anaplastik astrositoların altbirimlerinde p14<sup>ARF</sup> ekspresyonunda yok olma görülür,

bu, ya homozigot silinmeye veya promotor hipermetilasyonuna ya da MDM2 amplifikasyonuna bağlı olabilir. Bu sebeple, anaplastik astrositomların çoğunluğu p53 fonksiyonunu deregüle eden genetik değişiklikler taşıır. Tüm vakaların yaklaşık %20-25' inde 9p21 üzerindeki CDKN2A ve CDKN2B genleri ya silinmiştir ya da hipermetile olmuştur. Bu genler, G1/S-faz ilerleyişinin negatif regülatörlerini kodlar. Bu negatif regülatörler de siklin-bağlı kinazlardan Cdk4 veya Cdk 6' nın aktivitesini inhibe eder. CDKN2A ve CDKN2B değişiklikleri içermeyen tümörlerin alt gruplarında CDK4 geninin amplifiye olduğu veya retinoblastom genlerinde (RB1) mutasyon taşıdığı bulunmuştur. Hepsi göz önüne alındığında, tümörlerin en az üçte biri pRb-1-bağlı hücre döngüsü kontrolünü etkileyen gen değişiklikleri taşıır. Glioblastomlara nazaran, anaplastik astrositomlarda 10q2' deki PTEN geninin mutasyonu nadirdir. Olduğu zaman da, prognozu glioblastomlardaki gibi zayıftır. Anaplastik astrositomlardaki ek delesyonlar tümör supresör genleri bilinmemekle beraber, 6, 11p, 14q, 19q ve 22q kromozomları üzerinde haritalanmıştır (90).

#### **1.2.2.4.3. Glioblastom (WHO Grade IV)**

**Tanım:** Yetişkin olguların serebral hemisferlerinde lokalize olan en malin ve en yaygın astrositik gliomdur. Histolojik olarak yüksek selülarite, hücresel pleomorfizm, atipik nükleus, canlı mitotik aktivite ve vasküler tromboz, mikrovasküler proliferasyon ve nekrozla karakterizedir. Primer glioblastomlar prekürsör lezyonlar olmadan de novo olarak meydana gelirler. Sekonder glioblastomlar daha önceden var olan diffüz veya anaplastik astrositomlardan gelişirler.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** En sık görülen primer beyin tümörleridir ve intrakranial tümörlerin %10-15' ini ve astrositik tümörlerin %50-60' ını oluşturur. Yıllık insidansı yaklaşık 100.000 kişilik populyasyondan 2 yeni vakadır. Her yaşta gelişebilir, ancak erişkin hastalar en sık etkilenen gruptur (tepe insidansı: 50-70 yaş).

**Makroskopisi ve yerleşimi:** Glioblastomların büyük çoğunluğu serebral hemisferlerde gelişir. Bazal ganglia ve kontralateral hemisfere yayılım yaygındır. Beyin kökünde yerleşim nadiren görülür ve bu yerleşim özellikle çocuklarda görülür. Serebellumun ve omurganın glioblastomları çok nadirdir. Makroskopik olarak, etli gri periferik bir alana sahip nekrotik kitlelerdir (Şekil 6a, b). Tümör içi kanamalar sıklıkla görülür. Çevresindeki beyin dokusu genellikle belirgin bir ödeme karakterizedir.

**Histopatoloji:** Glioblastomlar hücreli, yüksek anaplastisiteye sahip tümörlerdir. Çok çeşitli morfolojiye sahip hücrelerden oluşurlar. Bu hücreler, fibriler ve gemistositik hücreler, fusiform hücreler, küçük anaplastik hücreler ve çok çekirdekli dev hücrelerdir. Nükleer atipi belirgindir ve atipik formları da içeren mitotik aktivite dikkat çekicidir (Şekil 7a). Mikrovasküler çoğalma ve/veya nekroz varlığı, tanı için temel koşullardır. Mikrovasküler çoğalma, sıklıkla glomerulus veya garland benzeri kapiller yapılar şeklinde sonlanır (Şekil 7b). Vasküler tromboz yaygındır. Makroskopik olarak görülebilen ve nöro-görüntüleme tümörün güçlenmeyen merkez bölgesi olarak görüntülenen geniş iskemik nekrozların yanı sıra, glioblastomlar tipik olarak küçük, genellikle birden fazla, düzensiz şekilli, psödo-palizat hücrelerle çevrili band benzeri veya serpijinöz odaklı nekrozlar gösterirler [90,(Şekil 7c)].

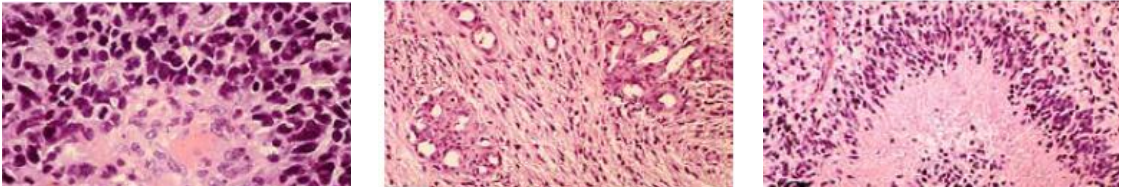


A

B

Şekil 6. A; Sol temporal lopta nekroz ve intratümoral hemorajlar, B;

Büyütülmüş görüntüde tümör merkezinde nekroz (90)



A

B

C

Şekil 7. WHO Grade IV Glioblastom (H&E). A; Mitotik aktiviteli ve patolojik

tümör damarlı yüksek derecede selüler, pleomorfik gliom. B; Glioblastomda

glomeruloid kapiller küme oluşumu ile mikrovasküler proliferasyon. C;

Glioblastomda perinekrotik psödopalizataşma ile tipik nekroz (90)

**Glioblastom varyantları:** WHO sınıflandırması, klasik glioblastomlardan farklı olarak 2 histolojik glioblastom varyantı belirtmektedir. Bunlar dev hücreli glioblastom ve gliosarkomadır.

- Dev hücreli glioblastom, çok sayıda pleomorfik, tuhaf görünümlü ve boyutları 500  $\mu\text{M}$ ' a varan çok hücreli dev hücrelerdir (Şekil 8a). Bazı dev hücreli glioblastomlar kollagen ve retikulin fiberden zengin matrikse sahiptir. Lenfotik sızıntı dikkat çekici olabilir. Dev hücreli glioblastomlar sıklıkla sınırları daha belirgin bir büyümeye sahiptir. Bu da, bu tip varyantta daha iyi bir prognozun yapılmasına katkıda bulunur. Morfolojik özellikleri dev hücreli glioblastoma benzer özellikler,



normal bir glioblastomun radyasyona maruz bırakılmasıyla da elde edilebilir. Bu nedenle, bu gibi durumlar, dev hücreli glioblastom olarak nitelendirilmemelidir.

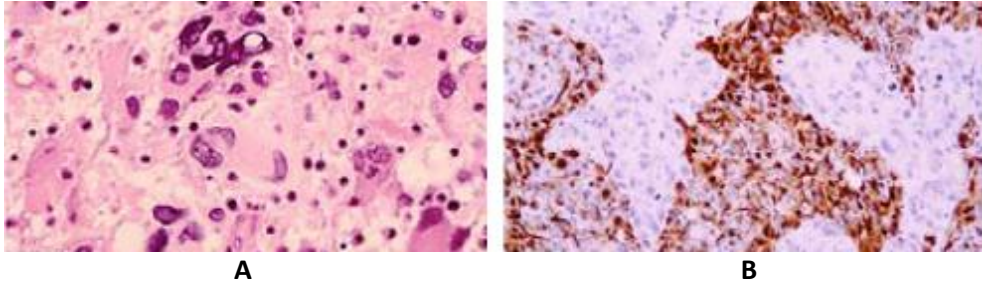
- Gliosarkomalar, gliom ve sarkomanın fenotipik özelliklerini gösteren bifazik doku şekilli alanlarla karakterizedir (Şekil 8b). Glial bileşen, glioblastomun histolojik özelliklerini gösterirken, immunohistokimyasal olarak da GFAP açısından pozitiftir. Sarkomatoz tümör bölümleri ise retikülin fiberlerince zengindir ve GFAP-negatif işsi hücrelerden oluşur. Bu da, fibroblastomun görüntüsünü çağrıştırır. Bazı vakalar kondroid, kemikli ve miyojenik farklılaşma ipuçları gösterebilir. Epitelyal metaplazi de rapor edilmiştir.

WHO tarafından tanınmış iki glioblastom çeşidine ek olarak, diğer daha az yaygın çeşitlerden de bahsedilebilir. Bunlar oligodendroglial farklılaşmayla bağlantılı morfolojik özellikler gösteren küçük bir grup tipik glioblastomlardır. Bu gibi vakalar, oligodendroglial bileşenli glioblastom olarak sınıflandırılabilir ve nekrotik bölgelerin varlığı ile anaplastik oligoastroitomdan ayrılırlar. Ancak, bu tümörler için tanı kriterleri çok kısıtlı tanımlanmıştır, bu nedenle, anaplastik oligoastroitom veya sıradan glioblastom mu olduklarına dair yapılacak ayırıcı tanıda, öznelliğe yüksek oranda izin verilmektedir. Yine de, oligodendroglial bileşenli glioblastomlar, sıradan glioblastomlara göre, daha iyi prognoz ve adjuvan terapiye yüksek olasılıkla olumlu yanıt vermeleriyle ilişkilendirilebilirler.

Diğer bir histolojik çeşit olan küçük hücreli glioblastom ise, dağınık sitoplazmalı ve yuvarlak veya havuç şekilli hiperkromatik hücreye sahip monomorfik küçük anaplastik hücrelerden oluşur. Histolojik olarak bu tür, yüksek anaplastik oligodendroglom veya primitif nöroektodermal tümörlerle karıştırılabilir. Genetik

olarak, kromozom 10 üzerinde EGFR amplifikasyonu ve kayıpları yaygındır, bunun yanısıra 1p ve 19q üzerindeki birleşik kayıplar yoktur. Küçük hücreli astrositomlar glioblastom gibi davranır, ancak endotelial hiperplazi ve nekrozdan yoksundur.

Glioblastomun diğer yaygın olmayan türleri, köpük benzeri granüler sitoplazmaya sahip granüler hücre glioblastomu ve epitelial farklılaşma alanlarına sahip ve sitokeratinler için immünohistokimyasal pozitifliğe sahip glioblastomları (yoğun lipitlenmiş glioblastom, adiposit-benzeri farklılaşma ve epitelial metaplazili glioblastom) içerir (90).



**Şekil 8.** A; WHO Grade IV dev hücre glioblastomları (H&E), sayısız çok nukleuslu dev hücreler. B; WHO Grade IV gliosarkoma, GFAP-pozitif glial tümör bölgeleri sonucu oluşan bifazik yapı ve GFAP-negatif sarkomatoz doku (GFAP, 90)

#### 1.2.2.4.3.1. Primer ve Sekonder Glioblastom

Çoğu glioblastom kısa klinik geçmişiyle *de novo* davranışta hızla gelişir ve düşük malignitenin lezyonlarını göstermez. Bu tümörlere primer glioblastomlar denir. Daha az bilinen haliyle, glioblastomlar daha önce var olan düşük dereceli gliomların ilerlemesiyle ortaya çıkarlar. Bu tip vakalara da sekonder glioblastomlar denir. Morfolojik olarak, primer ve sekonder glioblastomlar ayırt edilemezler. Klinik olarak,

sekonder glioblastomlar genellikle 45 yaş altı genç hastalarda ortaya çıkarken, primer glioblastomlar çok büyük bir çoğunlukla daha yaşlı hastalarda görülür. Primer ve sekonder glioblastomların prognozu, yaşa endekslendiğinde her ikisinde de eşit ölçüde zayıftır.

**İmmunohistokimya:** Diğer astrositik tümörlere benzer olarak, glioblastomlar GFAP ve S-100 protein bakımından pozitiflerdir. Ancak immünreaktivitede belirgin intratümoral heterojenite görülebilir. Bu heterojenite, fibriler ve gemistositik tümör hücrelerde pozitif iken, küçük anaplastik hücrelerde sıklıkla negatiftir. Çok çekirdekli dev hücreler değişken GFAP ve S-100 pozitifliğe sahiptir. Güçlü nükleer p53 immünreaktivitesi tüm glioblastomların %30-40' ında görülürken, dev hücre glioblastomları ve sekonder glioblastomlardaki p53 pozitifliği, tüm vakaların %80' inde görülür. EGFR' nin güçlü ekspresyonu primer glioblastomların yaklaşık %60' ında görülürken, sekonder glioblastomlarda görülmesi seyrekdir. M1B1 işaretleme indeksi genellikle yüksektir (>%10) ancak sıklıkla belirgin bölgesel heterojenite gösterir.

**Ayırıcı tanı:** Mikrovasküler çoğalmanın ve/veya nekrozun varlığı, glioblastomları anaplastik astrositomlardan ayırır. Anaplastik oligoastroitom ve anaplastik oligodendrogliomlar arasındaki ayırıcı tanı çok daha zordur ve hatırı sayılır ölçüde gözlemciler arası değişkenliğe bağlıdır. Moleküler testler, küçük hücreli astrositom/glioblastom ve anaplastik oligodendrogliom arasındaki ayırıcı tanıları gibi bazı vakalarda yararlıdır.

**Moleküler patoloji:** (Şekil 19) Moleküler genetik analizler primer ve sekonder glioblastomlar arasında genetik farklılıklar olduğunu göstermektedir. Primer glioblastomlarda sıklıkla EGFR amplifikasyonu, CDKN2 A ve p14<sup>ARF</sup> nin homozigot delesyonu, CDK4 amplifikasyonu, MDM2 veya MDM4 amplifikasyonu, RB1 mutasyonu/homozigot delesyonu, monozomi 10 ve PTEN mutasyonu görülür. TP53 mutasyonları primer glioblastomların yaklaşık %30' unda görülürken sekonder glioblastomların %60' ından fazlasında görülür. Sekonder glioblastomlardaki TP53 mutasyonları kodon 248 ve 273' te bir araya gelmiştir. EGFR, MDM2 veya MDM4 amplifikasyonları ve PTEN mutasyonları da nadirdir. Kromozom 10 üzerindeki allelik kayıplar 10q üzerindeki markırlarla sınırlıdır. 19p ve 13q üzerindeki allelik kayıplar, RB1 geninin promotöründeki hipermetilasyon ve PDGFRA' nın aşırı ekspresyonu sekonder glioblastomda daha yaygındır. Ayrıca, IDH1 nokta mutasyonları primer glioblastomda nadirdirler fakat sekonder glioblastomlarda yaygındır. Beraber ele alındığında, primer ve sekonder glioblastomlar farklı genetik değişiklikler taşır. Ancak, her iki glioblastomdaki genetik değişiklikler aynı onkogenik yolları hedefler. Bunlar p53, pRB1, Pten/Pi3K/Akt ve mitojenle aktiflenmiş protein kinaz yollarıdır. 1p ve 19q' nun oligodendrogliom-ilişkili delesyonları glioblastomlarda nadirdir.

TP53 mutasyonları dev hücreli glioblastomların %80' inde tespit edilebilirken, PTEN mutasyonları primer glioblastomlarda görülen benzer sıklıkta (yaklaşık %30) görülür. EGFR amplifikasyonu ve CDKN2A ve p14<sup>ARF</sup> homozigot delesyonları nadirdir. Gliosarkomalar, primer glioblastomlar gibi genetik değişiklikler gösterir ancak EGFR amplifikasyonu daha az yaygındır. Gliomlu ve sarkomlu alanlar değişmeyen bir

şekilde benzer genetik sapmalara sahiptir. Bunlar da her iki bileşenin monoklonal orijinden geldikleri hakkında ciddi tartışmalara yol açar (90).

#### **1.2.2.4.4. Piloitik Astrositom (WHO Grade I)**

**Tanım:** Yavaş büyüyen, sınırları belirgin, genellikle çocuklar ve genç erişkinlerde görülen sistik astrositomdur. Histolojik karakteristikleri, gevşek ve sıkı dokunun bifazik büyüme biçiminden, rozental fiberlerden ve eozinofilik granüler yapılardan oluşur.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Piloitik astrositolar tüm kafa içi tümörlerin yaklaşık %6' sını oluşturur. Çocuklar ve genç erişkinler daha çok etkilenen gruptur. Pediatrik hastalarda en yaygın görülen primer beyin tümörlerindedir. Nörofibromatozis tip 1(NF1)' e sahip hastalar özellikle optik sinir gliomları olmak üzere, piloitik astrositolar için artmış riske sahiptir. Ancak, piloitik astrositoların büyük çoğunluğu, irsi tümör sendromuna sahip olmayan hastalarda görülen sporadik tümörlerdir.

**Makroskopisi ve yerleşimi:** Piloitik astrositoların %80' inden fazlası serebellar tümörlerdir. Diğer tipik bölgeler ise optik sinir ve optik kiazm (optik gliom), hipotalamus, talamus, bazal ganglia, beyin kökü ve omuriliklidir. Nadir vakalar serebral yarı kürelerde konumlanabilir. Makroskopik olarak piloitik astrositolar yumuşak, gri ve sıklıkla sınırları belirgin kistik lezyonlardır. Ancak pia mater' in lokal tutulumu yaygın değildir.

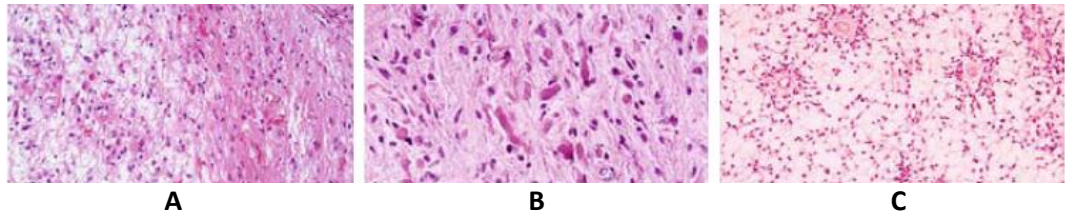
**Histopatoloji:** Piloitik astrositolar düşükten orta dereceye selülarite ve bifazik yapılanma ile karakterizedir. Bipolar (piloid) tümör hücreli kompakt alanlar

ve multipolar tümör hücreli mikrokistik alanlar içerir (Şekil 9a). Bu tümörlerin önemli bir tanı özelliği rozental fiberlerin ve eozinofilik granüler yapıların varlığıdır (Şekil 9b). Kapiler çoğalma, denejeneratif hücrel pleomorfizm, palizad olmayan nekrozun odağı ve ara ara gerçekleşen mitozlar bu tanıyla uyumludur. Ancak, yüksek mitotik aktivite ve palizad nekroz tümörün daha saldırgan davranışta olduğunun göstergesidir. Bunun gibi nadir olgular anaplastik pilositik astrositom olarak sınıflandırılır. Yeni bir histolojik çeşit olan pilomiksoid astrositom, miksoid matriks içinde, bipolar neoplastik astrositlerden oluşan monomorfik bir popülasyonla karakterizedir. Tümör hücreleri psödorozet benzeri anjiosentrik yapılar oluşturur (Şekil 9c). Normal pilositik astrositlerle karşılaştırıldıklarında, rozental fiberler genellikle görülmez. Pilomiksoid astrositler baskın olarak çocukların optik kiazm/hipotalamus bölgesinde görülür. Yakın zamanda, histolojik olarak benzer tümörlerin omurilikte de görüldüğü rapor edilmiştir.

**İmmunohistokimya:** Pilositik astrositler GFAR ve protein S-100 için pozitifdir. p53 için immunoboyama negatiftir veya bireysel hücrelerle sınırlıdır. M1B1 işaretlemesi düşüktür (<%5).

**Ayırıcı tanı:** En önemli ayırıcı tanı, piloid gliozistir. Piloid gliozis, kraniofaringioma ve kapiler hemangioblastom gibi yavaş büyüyen tümörlere, vasküler şekil bozuklarına ve diğer merkezi sinir sistemi lezyonlarına karşı geliştirilen bir reaksiyon olarak görülebilir. Omurilikte, tanisitik ependimom nadir ayırıcı tanıdır. Gangliogliomlar uzun süredir var olan temporal lobun iyi sınırlanmış lezyonlarında yaygın klinik ayırıcı tanısıdır. Ancak, neoplastik ganglion hücrelerinin histolojik ipuçları açıkça gangliogliomları pilositik astrositlerden ayırmaktadır.

**Moleküler patoloji:** Piloitikastroitomer sıklıkla 7q34' te bulunan BRAF onkogeninin duplikasyonlarına sahiptirler, bu da artmış mitojen-aktif kinaz sinyalleşmesi ile sonuçlanır. BRAF duplikasyonu, BRAF onkogeninin kinaz domainini birleştiren çerçeve içi füzyon geni ile sonuçlanır, bu da BRAF kinaz aktivitesine sebep olur. Tümörlerin küçük bir grubu aktif edici BRAF mutasyonları taşır. Piloitik astroitomlu NF1 hastalarında sıklıkla 17q11.2, NF1 gene lokusunda, allelik kayıplar bulunmaktadır. Sporadik tümörlerde sapma nadirdir. NF1-ilişkili ve sporadik piloitik astroitomlarda ve pilomiksoit astroitomlarda gen ekspresyon profilinde, aldehid dehidrogenaz 1 ailesi üyesi L1 (ALDH1L1)' i agresif tümör varyantlarında aşağı-regüle olarak tanılanmıştır. Diffüz astroitomlara nazaran, çoğu piloitik astroitomlar 17q üzerinde allelik kayıplara ve TP53 geninde mutasyona sahip değildir (90).



**Şekil 9.** WHO Grade I piloitik astroitom (H&E). A; Bipolar tümör hücrelerinin kompakt bölgelerinin ve multipolar tümör hücrelerinin mikrosistik bölgelerinin meydana getirdiği tipik bir bifazik yapı. B; Rozental fiberler homojen, eozinofilik, sarmal şekilde gözlenir. C; Perivasküler tümör hücresi düzenli ve tümör matrisinin miksoit dejenerasyonuna sahip monomorfik pilomiksoit astroitom (90)

### 1.2.2.5. Oligodendrial Tümörler ve Miks Gliomlar

#### 1.2.2.5.1. Oligodendrogliom (WHO Grade II)

**Tanım:** Morfolojik olarak oligodendrogliaya benzeyen neoplastik hücrelerden oluşan, diffüz infiltrate, iyi farklılaşmış gliomdur. Özellikle yetişkin olguların serebral hemisferlerinde lokalizedir. Genellikle kromozom 1p ve 19q delesyonlarını taşır.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Oligodendrogliom tümörlerin (anaplastik formları da dahil) yıllık insidansı yaklaşık 100.000 bireyde 0,3' tür. Gliomların yaklaşık %10-15' i oligodendrogliom tümörlerdir. Çocuklarda da etkili olabilmesine rağmen insidansı 50' li yaşlarda artış göstermektedir.

**Makroskopisi ve lokalizasyon:** Çoğu oligodendrogliomlar serebral hemisferlerde ortaya çıkmaktadır. En yaygın lokasyon frontal lobtur. Tümör kitlesi tipik olarak beyin dokusunda lokalizedir fakat serebral kortekse doğru uzama da yaygındır. Oligodendrogliomlar nadiren, serebellum, beyin kökü veya omurilik içerisinde gelişirler. Makroskopik olarak, tümörler grimsi-pembe renkte yumuşak kitleler halinde görülürler (Şekil 10). Sıklıkla kalsifikasyonlar bulunur. Mukoid dejenerasyon bölgeleri, kistik değişiklikler ve intratümöral hemorajlar alışılmamış değildir.

**Histopatoloji:** Oligodendrogliomlar yuvarlak, hiperkromatik nukleuslu izomorfik hücrelerden oluşan, kısmen selüler diffüz infiltrate gliomlardır. Artmış selüleritenin nodüler alanları, mitotik aktivitesi düşük olduğu sürece anaplazi göstergesi olmayabilir. Parafin kesitlerde, oligodendrogliom tümör hücreleri merkezi yuvarlak nukleuslu ve iyi tanımlanan hücre sınırları ile balpeteği görünümüne sahip



olurlar (Şekil 11b). Diagnostik olarak yararlı olan bu durum smear preparatlarda ve frozen kesitlerde gözlenmez (Şekil 11a), Bu da intraoperatif diaagnoz zorluğu yaratmaktadır. Oligodendroglionlar, GFAP pozitif olan küçük gemistositik hücreler içerebilirler, bu yüzden mini/mikrogemistositler olarak adlandırılabilirler. Büyük taşlı-yüzük hücreler veya eozinofilik granüler hücreler içeren tümörler çok nadirdir. Tümör dokusunda ve/veya çevre beyindeki mikrokalsifikasyonlar yaygındır. Diğer dejeneratif özellikler ekstraselüler münin birikimi ve mikrosist oluşumudur. Oligodendroglionlar, kümes teli benzeri, yoğun olarak dallanan kapillerlerin oluşturduğu tipik bir damarlaşma gösterirler. Korteksin infiltrasyonu ile tümör hücrelerinin oluşturduğu sekonder yapılar olarak adlandırılan perinöronal satellitoz, perivasküler agregasyonlar ve subpial akümülyasyonlar oligodendroglionlarda sıktır.

**İmmunohistokimya:** Oligodendroglionlar S-100, CD57, MAP2, Olig1 ve Olig2 için devamlı pozitiflerdir. Fakat bu markırlardan hiçbiri oligodendroglionlar için tamamen spesifik değildir. GFAP-pozitif minigemistositler ve gliofibriler oligodendrositler sıklıkla bulunur. Sinaptofisin genellikle rezidüel kortikal nörofilin işaret eder, bu da oligodendroglion hücreleri tarafından infiltre edilmiştir, neoplastik hücreler genellikle negatiftir. Fakat son veriler oligodendroglionların 1p ve 19q kayıpları görülen küçük bir grubunun sinaptosin ekspresyonu ile nörositik diferansiyasyon ve perivasküler rozet ve Homer Wright-benzeri oluşumlar gösterebildiğine değinmişlerdir. Çoğu oligodendroglionlar nükleer p53 boyaması göstermezler. MIB-1 indeksi genellikle düşüktür (<5%).

**Ayırıcı tanı:** Oligodendroglionların, makrofajca zengin reaktif lezyonlardan, hem de berrak hücreli ependimom, nörositom, disembriyoplastik nöroepitelial

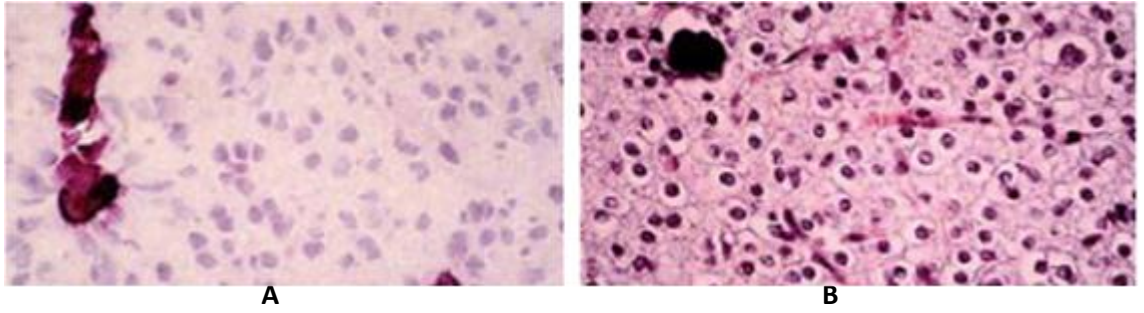
tümör (DNT), berrak hücreli meningiom ve metastatik berrak hücreli karsinomlardan ayırt edilmesi gerekir. İmmünohistokimyasal analiz genellikle bu farklılıkları ayırmaya yardımcıdır.

**Moleküler Patoloji:** (Şekil 20) 1p ve 19q' nun allelik kayıpları oligodendrogliomların yaklaşık %80' inde bulunur. Olguların çoğunda her kromozom kolunun bir kopyasının kaybıyla sonuçlanan büyük delesyonlar görülür. Şu ana kadar 1p ve 19q' deki oligodendrogliom supresör genleri bilinmemektedir, fakat 1p' deki CDKN2C, CITED4, CAMTA1, DFFB, SHREW1, TP73 ve RAD54 genler ve 19q' daki p190RhoGAP, EMP3, ZNF342 ve PEG3 genleri gibi birçok olası gen betimlenmiştir. Kromozom 4, 6, 11p, 14 ve 22q' yu etkileyen delesyonlar da oligodendrogliomlarda bulunur fakat 1p/19q kayıplarından daha nadir görülür. Diffüz astrositomların aksine, 17p ve TP53 genindeki mutasyonlar nadirdir. İlginç olarak, TP53 mutasyonu ile 1p ve 19q üzerindeki heterozigosite kaybı birbirini dışlar. Fakat 1p/19q kayıplı oligodendrogliomlar sıklıkla p14<sup>ARF</sup> geninin promotör hipermetilasyonunu (p53-bağımlı büyüme regülasyonunu değiştirebilir) gösterirler. MGMT promotör hipermetilasyonu ve azalan ekspresyonu özellikle 1p/19q delesyona uğramış tümörlerde yaygındır. Oligodendrogliomların hemen hemen yarısı, EGFR gen amplifikasyonunun yokluğunda epidermal büyüme faktör reseptörlerini aşırı-eksprese ederler. Buna ek olarak, çoğu tümör platelet-türevli büyüme faktörleri ve reseptörlerinin ko-ekspresyonunu sergiler, bu da oto veya parakrin büyüme stimülasyonunun patogeneizde rol oynadığını önermektedir (90).



**Şekil 10.** Corpus callosum ve singulat kıvrımı içeren oligodendrogliom.

Tümörün kolay anlaşılır sınırları yoktur ve grımaddeye doğru büyür (90)



**Şekil 11.** WHO Grade II Oligodendrogliom (H&E). A; Frozen kesitte,

kalsifikasyonlara sahip monomorfik, selüler gliom. Frozen kesitte oligodendrogliom-petek dokusu görülmemekte. B; Parafin kesitlerinde oligodendrogliomlar tümör hücrelerinin karakteristik petek görüntüsü sergilemekte (90)

#### 1.2.2.5.2. Anaplastik Oligodendrogliom (WHO Grade III)

**Tanım:** Anaplazinin fokal veya diffüz histolojik özelliklerine sahip bir oligodendrogliomdur.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Oligodendroglial tümörlerin yaklaşık yarısını oluşturur. İnsidansı 45-50 yaşlarında artış göstermektedir.

**Makroskopisi ve lokalizasyon:** Anaplastik oligodendrogliomlar, frontal lob ve takibinde temporal lob için genellikle hemisferik tümörlerdir. WHO grade II oligodendrogliomların aksine nekrotik bölgeler görülebilir.

**Histopatoloji:** Mitotik aktivite (Şekil 12), mikrovasküler proliferasyon ve nekrozu kapsayan anaplazi belirtileri gösteren diffüz infiltrate oligodendrogliomlardır. Oligodendrogliomların tipik petek hücreleri ve vasküler yapısı hala tanınabilir. Mikrokalsifikasyonlar da görülebilir. Gliofibriler oligodendrositler ve minigemistositler yaygındır. Bazı olgular, çok çekirdekli dev hücreler içeren selüler pleomorfizm gösterebilirler.

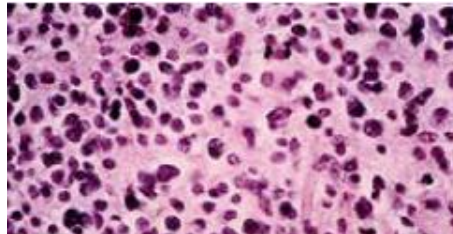
**İmmünohistokimya:** İmmünohistokimya profili WHO grade II oligodendrogliomlarla benzerdir. Fakat GFAP-pozitif hücreler daha yaygındır ve proliferatif aktivite artmıştır. MIB1 indeksi %5' ten fazladır.

**Ayırıcı tanı:** Çoğu olguda diagnoz dolaysız-doğrudandır. Olguların bir kısmında, anaplastik oligoastrocitoma karşı ayırıcı tanı problemlidir ve gözlemci değişikliği ile ilişkilidir. Yüksek derecede selüler ve zayıf faklılaşmış anaplastik oligodendrogliomları malin küçük-hücreli astrositik neoplazmlardan ayırmak moleküler genetik analizler ile gerçekleştirilebilir.

**Moleküler patoloji:** (Şekil 20) 1p ve 19q' nun birlikte kayıpları anaplastik oligodendrogliomların %60-70' inde bulunur. CDKN2A geninin (9p21) homozigot delesyonu olguların yaklaşık üçte birinde belirlenebilir. CDKN2A delesyonu, bozulmamış 1p ve 19q' lu anaplastik oligodendrogliomlarda daha yaygındır fakat 1p/19q kaybı olan tümörlerde de görülebilir. Komşu p14<sup>ARF</sup> ve CDKN2B genleri

yaygın olarak delesyona uğramıştır. Bununla beraber, nadir vakalarda 1p32' deki CDKN2C geninde homozigot delesyon ya da mutasyon görülür. PTEN veya PIK3CA mutasyonları, anaplastik oligodendrogliomların %10' undan daha azında görülür. Diğer birçok kromozomun (4, 6, 7, 11, 13q, 15, 18 ve 22q), anaplastik oligodendrogliomlarda rastgele kazanım veya kayıpları sıklıkla gözlenmektedir. Primer oligodendrogliomlarla karşılaştırıldığında, protoonkogenlerin amplifikasyonu azdır (tüm olguların %10' undan az). Düşük dereceli oligodendrogliomlara benzer olarak, MGMT ve diğer birçok gen, anaplastik oligodendrogliomlardaki promotör hipermetilasyonu ile sıklıkla susturulmuştur.

**Genetik Alterasyonların Klinik Önemi:** Cairncross ve arkadaşlarının çalışmasını takiben birçok bağımsız çalışmada 1p ve 19q' nun kombine delesyonlarının radyasyon ve kemoterapiye karşı olumlu yanıtta ve de daha uzun sağkalımda bağımsız bir markır olduğu doğrulanmıştır. Bunun tersine CDKN2A' nın homozigot delesyonu ve PTEN mutasyonu, zayıf sağkalımlı oligodendrogliom hastaları ile ilişkili olan moleküler alterasyonları sergiler. Ayrıca, kromozom 7, 8q, 19q ve 20' deki kazanımlar ve 9p, 10, 18q ve Xp' deki kayıplar kısa sağkalımla ilişkilendirilmiştir (90).



**Şekil 12.** WHO Grade III Anaplastik Oligodendrogliom. Nükleer polimorfizm ve mitotik aktivite gibi anaplastik özellikleri olan hücreli oligodendrogliyal tümör (90)

### 1.2.2.5.3. Oligoastrozitom (WHO Grade II)

**Tanım:** Morfolojik olarak oligodendrogliom veya diffüz astrozitomdaki tümör hücrelerine benzeyen 2 farklı neoplastik hücre tipinin belirgin bir karışımından oluşan diffüz infiltrate gliomdur. Oligodendroglial ve astroglial komponentler diffüz olarak birbirine karışmış veya farklı bölgelere ayrılmış olabilirler.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Miks gliomlar (oligoastrozitomlar ve anaplastik oligoastrozitomlar) tüm gliomları yaklaşık %5' ini oluşturur. Fakat bu tümörler için histolojik kriter çok değişken olduğu için, bu hesaplamanın dikkatlice yapılmış olması gerekmektedir. Oligoastrozitomlar genellikle 35-45 yaşları arası gelişim gösterirler.

**Makroskopisi ve lokalizasyon:** Oligoastrozitomların büyük bir kısmı serebral hemisferlerde ortaya çıkar, frontal lob en yaygın görülen bölgedir. Makroskopisi oligodendrogliomlara benzer.

**Histopatoloji:** Oligoastrozitomlar düşük mitotik aktiviteli diffüz infiltrate gliomlardır. Mikrokalsifikasyonlar ve mikrosistik dejenerasyon yaygın olarak görülür. Nekroz ve vasküler endotelial proliferasyon yoktur. Tümör ya astroitik ya da oligodendroglial fenotip gösteren en az iki farklı hücre popülasyonundan oluşur. Bazı tümörler bölgeye göre oligodendroglial ve astroitik farklılaşmanın farklı bölgelerini gösterirler (kompakt varyant). Diğerlerinde, tüm popülasyonlar karışmıştır (diffüz varyant). Astroitik veya oligodendroglial kökenli olup olmadıklarını belirlemesi zor olan tranzisyonal fenotipli neoplastik hücreler bu tümörlerde bulunabilir. Oligodendrogliom-predominant, astrozitom-predominant ve yaklaşık olarak eşit derecede oligodendroglial ve astroglial şeklinde bir

altsınıflandıma önerilebilir, fakat bu altsınıflandırmanın klinik önemi henüz belirsizdir.

**İmmünohistokimya:** Astrositik ve oligodendroglial komponentleri güvenli bir şekilde ayırabilen spesifik bir markır henüz bulunamamıştır. Fakat GFAP immünoreaktivitesi astrogliallerde genellikle güçlüdür ve oligodendroglial komponentte daha değişkendir. Oligoastrositomların yaklaşık üçte biri nükleer p53 birikimi gösterir. MIB-1 indeksi düşüktür (<%5).

**Ayırıcı tanı:** Oligoastrositomlar saf oligodendrogliallardan ve astrositomlardan, sırasıyla oligodendroglial veya astrositik fenotipli iki farklı hücre popülasyonunun varlığı ile ayrılır. GFAP-pozitif minigemitositler ve gliofibriller oligodendrositler ile tipik oligodendroglial hücreler, oligodendroglialdan oligoastrositom diağnozunun yönünü değıştirmekte yeterli değıldir. Oligodendroglial hücrelere ek olarak sadece fibriller, protoplazmik veya klasik gemistositik astroglial komponent, oligoastrositom olarak tanısı konmalıdır.

**Moleküler patoloji:** (Şekil 21) Oligoastrositomlarda IDH1 mutasyonu (olguların %60-70' inde) görülür. Oligoastrositomların yaklaşık %30-50' si 1p ve 19q' da allelik kayıp göstermektedir. 17p heterozigosite kaybı ve/veya TP53 mutasyonu olguların üçte birinde saptanır, TP53 mutasyonu, 1p/19q delesyonundan ayrıdır. Histolojik olarak 1p/19q kaybı olan oligoastrositomlar sıklıkla oligodendroglialom predominantken, TP53 mutasyonu olan oligoastrositomlar çoğunlukla astrositom predominanttirlar. Bunlara ek olarak, oligoastrositomlarda temporal lobta 1p/19q delesyonlarının TP53 mutasyonundan daha az yaygın olduğı saptanmıştır.

Oligoastroitomların diğer b6lgelerinde durum bunun tam tersidir. Mikrodisekte oligodendroglial ve astositik t6m6r b6lgelerinin ayrı molek6ler analizleri çoğu 6rneklerde yaygın genetik alterasyonlar g6stermektedir, bu da her komponentin monoklonal bir orijinini g6sterir (90).

#### **1.2.2.5.4. Anaplastik Oligoastroitom (WHO Grade III)**

**Tanım:** Artmış sel6larite, atipik nukleus, pleomorfizm ve artmış mitotik aktivite gibi anaplazinin fokal ve diff6z histolojik 6zelliklerine sahip bir oligoastroitomdur.

**İnsidans ve yaş dağılımı:** Anaplastik oligoastroitomlar en çok 50' li yaşlar civarında g6r6l6r.

**Makroskobi ve lokalizasyon:** Anaplastik oligoastroitomların çoğu hemisferik t6m6rlerdir, genellikle frontal lobta ve temporal lobta meydana gelir. Makroskobik g6r6nt6 diğer malin astositik veya oligodendroglial t6m6rlere benzerdir.

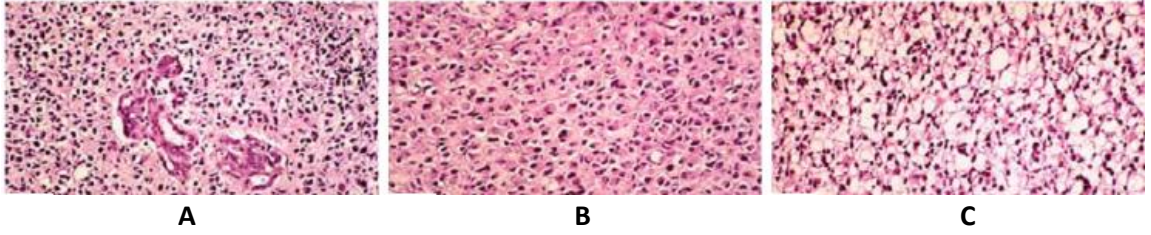
**Histopatoloji:** Mikroskobik olarak anaplazinin fokal ve diff6z histolojik belirtilerine sahip (y6ksek sel6larite, nukleer atipi, sel6ler pleomorfizm, mitotik aktivite ve mikrovask6ler proliferasyon) diff6z infiltrate oligoastroitomdur (Şekil 13 a, b, c). Nekroz g6r6lmez. Çoğunlukla astositik ve oligodendroglial komponentlerden her biri anaplastik 6zellikler g6sterir. Anaplazi bazı olgularda fokal ve bir komponentle sınırlı olabilir.

**İmm6nohistokimya:** İmm6nohistokimyasal profil WHO grade II oligoastroitomlarla benzerdir, yalnız MIB-1 indeksi daha y6ksektir (<%5).



**Ayırıcı tanı:** En önemli ayırıcı tanılar anaplastik oligodendrogliom, anaplastik astrositom ve glioblastomlardır. Bunların arasında, kesin-belirgin bir oligodendrogliom komponenti tanımlandığında, anaplastik astrositomdan ayırt etmede problem yaşanmamaktadır. Anaplastik oligodendrogliomdan ayırmak daha zordur çünkü bazı anaplastik oligodendrogliomlar, minigemistositlerden gemistositlere uzanan tranzisyonel fenotipli tümör hücreleri gibi önemli derecede selüler pleomorfizm gösterirler. Anaplastik oligoastrositom ile glioblastom arasındaki diferansiye tanıyla ilgili olarak, WHO' nun 2007' deki sınıflandırması, ayırıcı kriter olarak nekrozun varlığını ya da yokluğunu önerir. Örneğin, oligoastrositomdaki nekrozun varlığı, artık anaplastik oligoastrositom tanısına uygun değildir, ancak, oligodendriogliale bileşenli glioblastom olarak sınıflandırılmasına yardımcıdır (WHO grade IV).

**Moleküler patoloji:** (Şekil 21) 1p ve 19q' nun kombine delesyonları anaplastik oligoastrositomların yaklaşık %50' sini oluşturur. TP53 mutasyonu olguların üçte birinde ve çoğunlukla 1p/19q delesyonu olmayanlarda görülür. Anaplastik oligoastrositomların yaklaşık üçte ikisi IDH1 mutasyonu görülür. Progresyon-ilişkili değişiklikler 9p' deki kayıpları ve CDKN2A' nın homozigot delesyonunu ve kromozom 10, 11p ve 13q' daki kayıpları kapsar. EGFR veya PDGFRA gibi proto-onkogenlerin amplifikasyonu görülebilir fakat primer glioblastomlardakinden daha az yaygındır. MGMT özellikle 1p/19q delesyonu olan tümörlerde sıklıkla hipermetiledir. (90).



**Şekil 13.** WHO Grade III Anaplastik Oligoastrocitom. Aynı tümörün farklı bölgelerinde, A; Vasküler proliferasyon ile oligodendroglial diferansiasyon, B; Sayısız minigemistositler, C; Fibriler astrositik diferansiasyon (90)

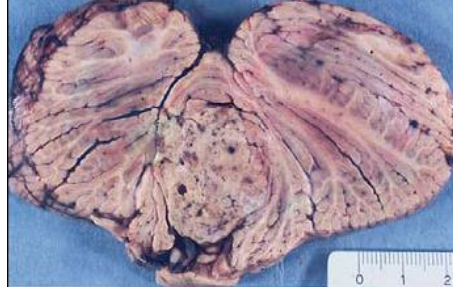
#### 1.2.2.6. Ependimal Tümörler

**Tanım:** Perivasküler psödorozetler (damar duvarına doğru dairesel, fibriller olarak uzanan perivasküler tümör hücreleri) ve gerçek rozetler (kübik tümör hücrelerinin tek bir katmanından oluşan kanallar ve tubuli) gibi ependimal diferansiasyonların histolojik özelliklerini gösteren glial tümörlerdir.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Ependimal tümörler merkezi sinir sistemi tümörlerinin yetişkinlerde %5' i, 15 yaş altı çocuklarda %10' u ve 3 yaşından küçük çocuklarda %30' unda görülür. Omurilikte görülen en yaygın (%50) glial tümördür. Suependimom ve miksopapiller ependimom yetişkin tümörleridir.

**Makroskopisi ve yerleşimi:** Ependimomlar tipik olarak omuriliğin merkezi kanalını da içerecek şekilde ventriküler sistem boyunca meydana gelirler (Şekil 14). Beyinde infratentorial ependimomlar çocuklarda daha yaygındır. Yetişkinlerde, infratentorial ve supratentorial ependimom sıklığı eşit derecededir. Suependimomlar genellikle 4. veya lateral ventrikülün duvarına yapışıktır. Miksopapiller ependimomların büyük çoğunluğu konüs/kuyruk bölgesinde

lokalizedir. Ependimal tümörler bazen ventriküllerle ilişkili olmadan veya beyin dışında bile gelişebilirler (90).



**Şekil 14.** Ventriküler lümenin tam obstrüksiyonu ile 4. ventriküldeki ependimom. Tümör, çevresindekiserbellar dokudan iyi ayrılmış durumda (90)

#### **1.2.2.6.1. Ependimom (WHO Grade II)**

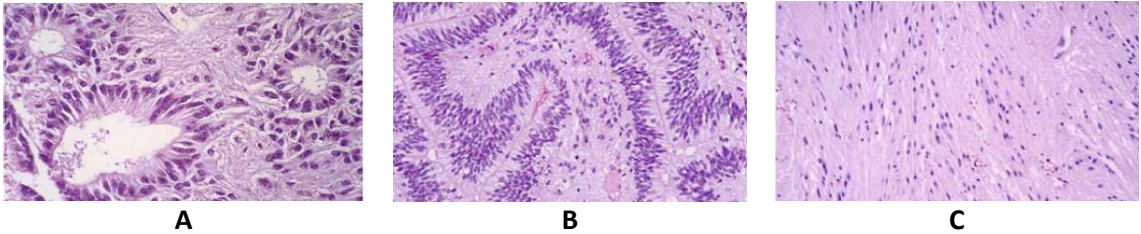
**Histopatoloji:** Diagnostik özellikleri psödorozetler ve gerçek ependimal rozetlerdir (Şekil 15a). Selüler yoğunluk orta derecededir ve mitoz bölünme nadirdir, nekroz meydana gelebilir. Diffüz astrositomlarla karşılaştırıldığında, ependimomlar beyinden iyi betimlenmektedir. WHO sınıflandırmasına göre ependimomlar histolojik olarak 4' e ayrılırlar. Selüler ependimom artmış mitotik aktivitenin yokluğunda yüksek derecede hücresel yoğunluk ile karakterizedir. Papiller ependimom damara uzak bölgelerde, psödo-papiller modele yol açan disintegrasyon-parçalanma gösterir (Şekil 15b). Berrak-hücreli ependimom boyanmayan (H&E ile boyandığında beyaz veya açık renk), yuvarlak sitoplazmalı tümör hücrelerinden oluşur. Tanisitik ependimom, uzamış sinir iplikleri demeti özelliklidir (Şekil 15c).

**İmmünohistokimya:** Kan damarlarının etrafındaki tümör hücreleri GFAP için pozitifler. Epitelyal membran antijeni (EMA) için boyamaya göre çoğu ependimom karakteristik bir nokta-benzeri perinükleer pozitiflik gösterirler. Ki-67/MIB-1 işaretleme indeksi genelde > %4' tür.

**Ayırıcı tanı:** Varyantları bazen problemlili olsa da olguların büyük çoğunluğunda histolojik diağnoz kolay ve anlaşılırdır. Papiller ependimom, koroid pleksus papillom, astroblastom, papiller meningiom, pineositom gibi diğeri tip papiller tümörlerden ayırt edilmelidir. Berrak-hücreli ependimom nörositom ve oligodendroglioma benzer, diağnozu zordur ve çeşitli nöronal ve glial antijenler için immünohistokimya uygulamaları gerekir. Berrak-hücreli ependimomlarda kromozom 9 ve 1p/19q kodelasyonunun yokluğu bu ayırıcı tanıyı yapmakta yardımcı olabilir. Tanisitik ependimom, cerrahi nöropatolojide en zor ve bellirsiz diağnozlardan biridir çünkü anlaşılır kriterler yoktur ve astrositoma benzerliği çarpıcıdır.

**Moleküler patoloji:** Olguların %30-60' ında 22. kromozom kaybı vardır. Ayrıca 6q, 10q, 11q, 1p, 14q ve 13 kaybı ve 1q ve 7 kazanımı görülebilir. Kromozom 22 üzerindeki sorumlu tümör supresör gen tanımlanmayı beklemektedir, NF2, tümörlerin sadece bir altgrubunda mutasyona uğramıştır, çoğu spinal lokasyondadır ve hSNF5/INI1 mutasyonları bulunmamaktadır. 22q' daki kayıplar ve kromozom 4 kazançları yetişkin hastalardaki tümörlerde daha yaygınken, 1q' daki kazanımlar agresif klinik davranışlar ile koreledir. TP53 mutasyonları ve CDK4 ve EGFR amplifikasyonları ependimomlarda genellikle yoktur. Ancak, ERBB2, ERBB4 ve EGFR ekspresyonları sıklıkla yukarı-regüledir. Ependimomlarda RASSF1, CDKN2A, CDKN2B, p14<sup>ARF</sup> ve TP53 gibi tümör supresör genlerin epigenetik susturulmaları görülebilir.

Bu genlerin yanısıra CASP1, MGMT, TIMP3 ve THBS1 gibi diğer genlerinde susturulmaları görülmektedir. CDKN2A delesyonu supratentorial endimomlarda sıklıkla görülür (33), ancak diğer bölgelerdeki endimomlarda görülmesi nadirdir. Posterior fossa endimomlar arasında, üç genetik altgrup, çoklu eş zamanlı DNA amplifikasyonu, 1q kazanımı veya dengeli karyotiple karakterize olarak önerilmiştir. Spinal intramedular endimomlar, özellikle, 22q ve 14q kromozomlarının kayıpları ve 7q, 9p ve 16 kromozomlarının kazanımını gösterir. Bunun yanısıra, intrakranial endimomlar, sıklıkla, 1q üzerinde kazanım ve 6q üzerinde kayıplar taşır. Tümör yerleşimi ile bağlantılı belirgin genomik profiller, bölgesel olarak farklı mRNA ekspresyon imzalarında da yansıtılır. Supratentorial endimomlarda EPHB-EPHRIN ve NOTCH yolak üyelerinin artmış ekspresyon seviyeleri ile spinal endimomlar, HOX genlerinin yukarı-regüle edilmiş ekspresyonlarını göstermiştir (90).



**Şekil 15.** A; WHO Grade II Ependimom. Tipik endimomal kanal oluşumu (H&E), B; WHO Grade II Papiller endimom (H&E), C; WHO Grade II Tanisitik endimom, Uzamış tümör hücrelerinden oluşur (90)

#### 1.2.2.6.2. Anaplastik Ependimom (WHO Grade III)

**Histopatoloji:** WHO grade II endimomdan farklılaşma ve anaplazi için en önemli kriter yüksek mitotik aktivitedir [genellikle her 10 HPF (“high-power fields” yüksek büyütme mikroskop alanı) başına 4 mitozdan fazla]. Tipik olarak yüksek

selüler yoğunluk, mikrovasküler proliferasyon ve psödo-palizatlanan nekrozla karşılaşılır. Psödo-rozetler daha az önemlidir ve endimal rozetler yaygın olarak kayıptır.

**İmmünohistokimya:** GFAP ve EMA ekspresyonları grade II endimom ile örtüşür fakat genelde az vurgulanır. MIB1 indeksi >%4' tür ve %20' den de yüksek olabilir.

**Ayırıcı tanı:** Anaplastik endimom ile karşılaştırıldığında, malin astrositik gliomlar daha invaziv, GFAP için daha pozitif ve EMA için immünohistokimyada nokta ve halkalar eksiktir. Ependimoblastom, çok nadir görülen embriyonel bir tümördür ve medullablastoma çok benzer, fakat küçük, yuvarlak lumina etrafındaki mitotik olarak aktif tümör hücrelerinin çok tabakalı rozetlerini (ependimoblastik rozetler) içerir. Ependimoblastom daha önceleri anaplastik endimom ile karıştırılmıştır fakat açıkça farklı bir oluşum sergilemektedir.

**Moleküler patoloji:** Birkaç çalışmada grade II ve grade III endimomlar karşılaştırılmış ve malin progresyonun altında kromozom 9, 10q ve 13' te kayıp ve 1q' da kazanımın yattığı bulunmuştur. Bir çalışmada supratentorial endimomlarda gradeler arasında ekspresyon paterni farklılığı bulunmuştur (90).

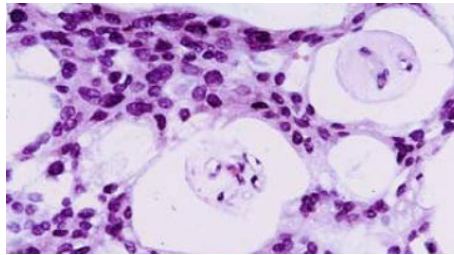
#### **1.2.2.6.3. Miksopapiller Ependimom (WHO Grade I)**

**Histopatoloji:** Tümör hücreleri tarafından depolanan musinöz ekstraselüler maddeden ötürü meydana gelen belirgin miksoid ve psödo-papiller dejenerasyon göstermesi önemli bir özelliğidir (Şekil 16). Diğer tipik özellikleri perivasküler psödo-rozetler ve vasküler hyalinozdur.

**İmmunohistokimya:** Çoğu olgu ependimom için tipik olan EMA ile boyanmazken tümör hücreleri GFAP pozitifdir. Ki-67/MIB1 indeksi genellikle >%3'tür fakat yüksek değerler de reküransa veya ekstraspinal metastaza gerek olmaksızın meydana gelebilir.

**Ayırıcı tanı:** Konüs/kuyruk lokasyonunun bilinmesi diağnoz için iyi bir ipucu sağlar. Ayırıcı tanı değerlendirmeleri bazen kordoma, kondroid tümörler, adenoid sistik karsinom ve musinöz adenokarsinomu içermektedir fakat daha az anlaşılır durumlarda GFAP immünoboyama yardımcı olur. Daha yaygın olarak, bir ependimal tümörün miksoid veya psödo-papiller özellikleri, mikso-papiller ependimomun teşhisini doğrulamak için yeterlidir.

**Moleküler patoloji:** Mikso-papiller ependimomlar ependimal tümörler içinde en çok sayısal kromozomal anormalliğe sahiptirler (kromozom 9 ve 18 kazanımları en yaygınlarıdır) ve yaygın olarak aneuploidi ve tetraploidi gösterirler. Diğer ependimal tümörler gibi istikrarlı mutasyonlar henüz tanımlanmamıştır. NF2 geni bozulmamıştır (90).



**Şekil 16.** WHO Grade I mikso-papiller ependimom. Ependimal tümör hücreleri perivasküler musin birikimi ile hyalinize damarların etrafında (90)

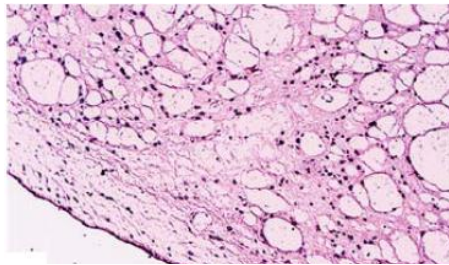
#### 1.2.2.6.4. Subependimom (WHO Grade I)

**Histopatoloji:** Düşük hücresel yoğunluklu, tümör hücresi nukleuslarının kümелendiği bir tümördür (Şekil 17). Perivasküler psödo-rozetler ayırt edilemezler. Mitoz ve nekroz yoktur. Nükleer polimorfizm, kalsifikasyon ve hemoraj dejeneratif özellikleridir. Damarlar hiyalinoza uğrayabilir fakat endotelial hiperplazi genellikle yoktur.

**İmmunohistokimya:** Tümör hücreleri GFAP eksprese ederler. Ki-67/MIB-1 ineksi < %1,5' tir.

**Ayırıcı tanı:** İntraventriküler lokalizasyon göz önünde bulundurulduğunda neredeyse ayırıcı tanı yoktur. Bazı tümörler fokal olarak ependimoma benzer bölgeler içermektedir fakat bu klinik bir çıkarım değildir.

**Moleküler patoloji:** Birkaç genetik çalışmada hSNF5/INI1, NF2 ve PTEN genlerini çalışılmıştır fakat herhangi bir anormallik bulunmamıştır. Bir mikroarray karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çalışmasında 12 hastadan 5' inde (%42), kopya sayısı anomalisi görülmüştür (90).



**Şekil 17.** WHO Grade I Subependimom. Sayısız mikrosistli düşük selülarite özelliği gösteren subependimal tümör (90)



### 1.2.2.7.Koroid Pleksus Tümörler

**Tanım:** Papiller şekilli intraventriküler nöroektodermal tümörlerdir.

**İnsidansı ve yaş dağılımı:** Koroid pleksus tümörler tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin %0,5' ini, 15 yaş altı çocuklarda %2,5 ve 1 yaşından küçük çocuklarda %13' ünü oluşturur. Koroid pleksus tümörlerin %85' inden fazlası papillomlardır (WHO grade I), atipik tümörler (WHO grade II) ve koroid pleksus karsinomları (WHO grade III) daha az yaygındır.

**Makroskopisi ve yerleşimi:** Tümörler lateral ventriküllerin koroid pleksusundan (%50), 3. ventrikülden (%5), 4. ventrikülden (%40), veya birden fazla ventrikülden (%5) kaynaklanabilir. Serebellopontin açısında primer belirti nadirdir. Lateral ventriküllerin tümörleri ağırlıklı olarak çocuklarda meydana gelir ve %60' ı hayatlarının ilk 10 yılında belirtileri görünür. Makroskopik olarak papiller yapı tarafından meydana gelen karnabahar benzeri görünüm karakteristiktir (90).

#### 1.2.2.7.1.Koroid Pleksus Papillomu (WHO Grade I)

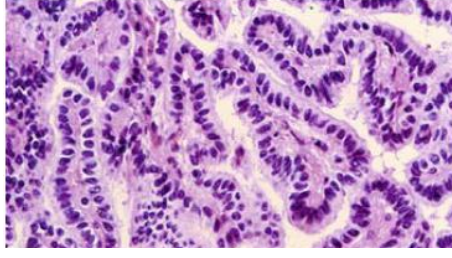
**Histopatoloji:** Histolojik görüntü non-neoplastik koroid pleksusa çok benzer. Fibrovasküler nükleuslar silindirik, kübik veya düz epitel hücrelerin tek bir katmanında sıralanır (Şekil 18). Nükleuslar genelde monomorfiktir ve mitoz nadir görülür (her 20 HPF başına 1 mitozdan az). Nükleer polimorfizm, kalsifikasyon, stromal ödem ve makrofajların birikimi gibi farklı dejeneratif özellikler yaygındır.

**İmmunohistokimya:** Normal ve neoplastik koroid pleksus epitelyal hücreler potasyum kanalı Kir7.1 ve stanniokalsin-1 eksprese ederler, bu da sensitiv ve spesifik

diagnostik markırlar olarak kullanılıdır. Bundan başka, çoğu tümör sitokeratinleri, vimentini, S-100 proteini ve transeritrini eksprese eder. GFAP fokal olarak pozitif olabilir. MIB-1 inseksi < %5' tir (ortalama: %2).

**Ayırıcı tanı:** Küçük cerrahi örneklerin olduğu durumlarda, dokunun patolojik lezyona bağlı tümör yerine non-neoplastik koroid pleksusu içermesi bir problem olarak karşımıza çıkabilir. Koroid pleksus papillomu genellikle daha yüksek selüler yoğunluk, daha sık düzleşmiş epitelyal hücreler ve nükleer morfolojiye göre daha çok düzensizlik gösterir. Koroid pleksus tümörlerin aksine, papiller ependimom perivasküler psödo-rozetler, GFAP için pozitiflik ve EMA (epitelyal membran antijen) için nokta-benzeri boyanma özellikleri sergiler. Yüksek derecede faklılaşmış papiller karsinom metastazlarını dışlamak için, akciğer, tiroid, kolon ve diğer karsinomlar (tiroglobulin, tiroid transkripsiyon faktör-1, CEA) tarafından eksprese edilen antijenler ve koroid pleksus antijenleri (Kir7.1) için olan immünohistokimya kullanımı yararlı olabilir.

**Moleküler patoloji:** Komparatif genomik hibridizasyon sayısal kromozomal anormallik gösteren %90' dan fazla koroid pleksus papillomu ortaya çıkarmıştır [+7q (%65), +5q (%62), +7p (%59), +5p (%56), +9p (%50), +9q (%41), +12p, +12q (%38), +8q (%35) ve -10q (%56), -10p, -22q (%47)] (D- Rickert ve Paulus 2004). TP53 ve hSNF5/INI1 mutasyonları yoktur (90).



**Şekil 18.** WHO Grade I Koroid Pleksus Papillomu (90)

#### **1.2.2.7.2. Atipik Koroid Pleksus Papillomu (WHO Grade II)**

Bu tümörler histolojik ve prognostik özellikleri grade I ve grade III arasında olan koroid pleksus tümörlerdir. WHO grade II (atipik) koroid pleksus papillom, HPF başına 2 veya daha fazla mitozla artmış mitotik indeksi ile tanımlanmıştır. Atipik koroid pleksus papillomların grade I tümörlerden daha çok nüks eğilimi vardır (90).

#### **1.2.2.7.3. Koroid Pleksus Karsinomu (WHO Grade III)**

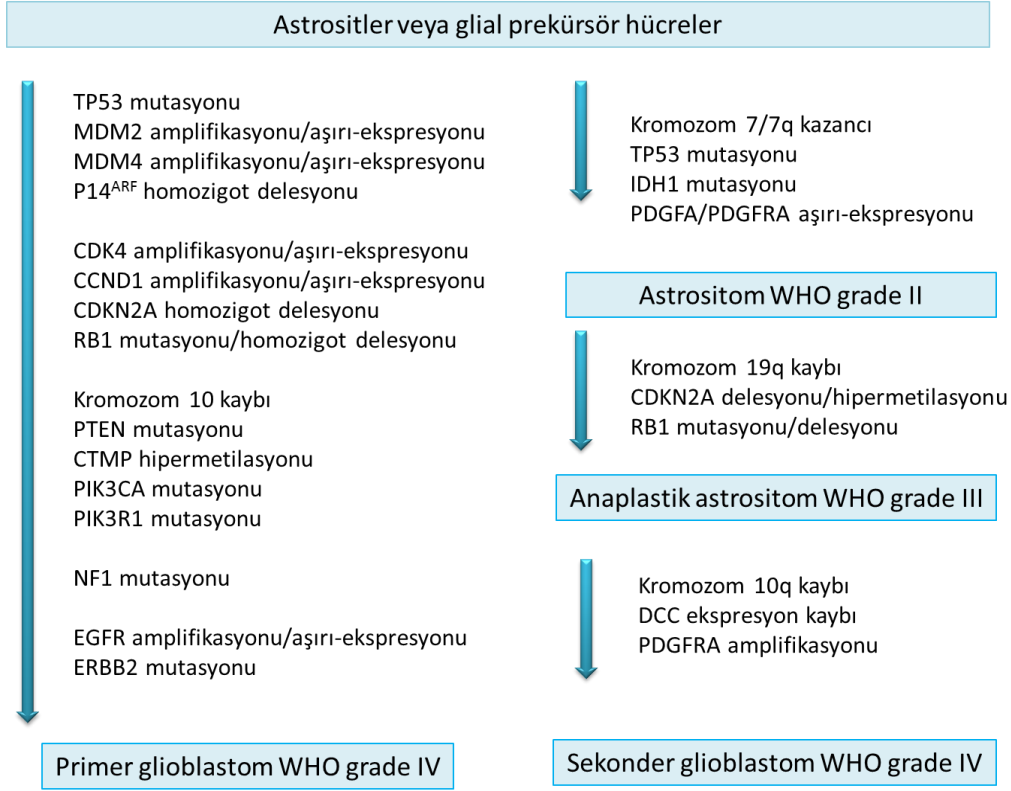
**Histopatoloji:** Bu koroid pleksus tümörü hareketli mitotik aktivite, yüksek selüler yoğunluk, nükleer pleomorfizm, nekrotik bölgeler ve belli belirsiz papiller yapı gibi özellikler gösterir.

**İmmunohistokimya:** Diğer benzerleri gibi, koroid pleksus karsinomları da Kir7.1' i eksprese ederler ve tipik olarak sitokeratinler, vimentin ve S-100 proteini ve bazen de GFAP için pozitiflerdir. Akciğer ve tiroid karsinom markırları için negatiflerdir ve çoğu tümör, birçok metastazı boyamayan anti-epitelyal antibadiler HEA125 ve BerEP4 ile boyanırlar. MIB1 indeksi > %5' tir (mean: %15).

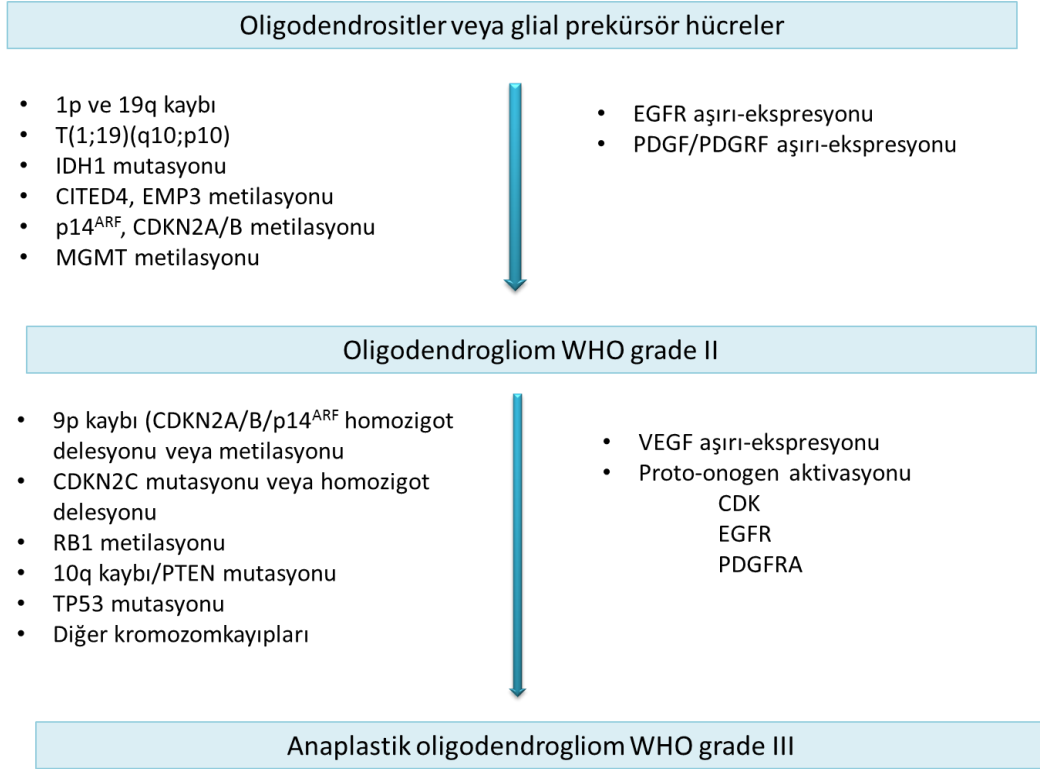
**Ayırıcı tanı:** Koroid pleksus karsinomlu çocuklarda, özellikle dediferanse olgularda papiller yapı kaybolduğunda en zor diagnozlardan birisidir. İki tümör

arasında genetik, morfolojik ve olası nozolojik bir ilişki olduğu ileri sürülse de, atipik teratoid tümör/rabdoid tümör prensipte immünohistokimyasal ekspresyon profiline dayanarak hariç tutulabilir. Germ hücreleri antijenleri (PLAP, alfa-fetoprotein  $\beta$ -HCG) için immünohistokimya papiller germ-hücre tümörlerini dışlamak için kullanışlıdır. Metastatik karsinom koroid pleksus karsinomuna çok benzer fakat bebeklikte neredeyse hiç meydana gelmez. Bunun aksine erişkin hastalarda malin papiller epitelyal tümörler ventriküllerin çevresinde bile lokalize olsalar neredeyse hiç koroid pleksus karsinomu değildirler, ve genellikle metastatik karsinomu sergilerler.

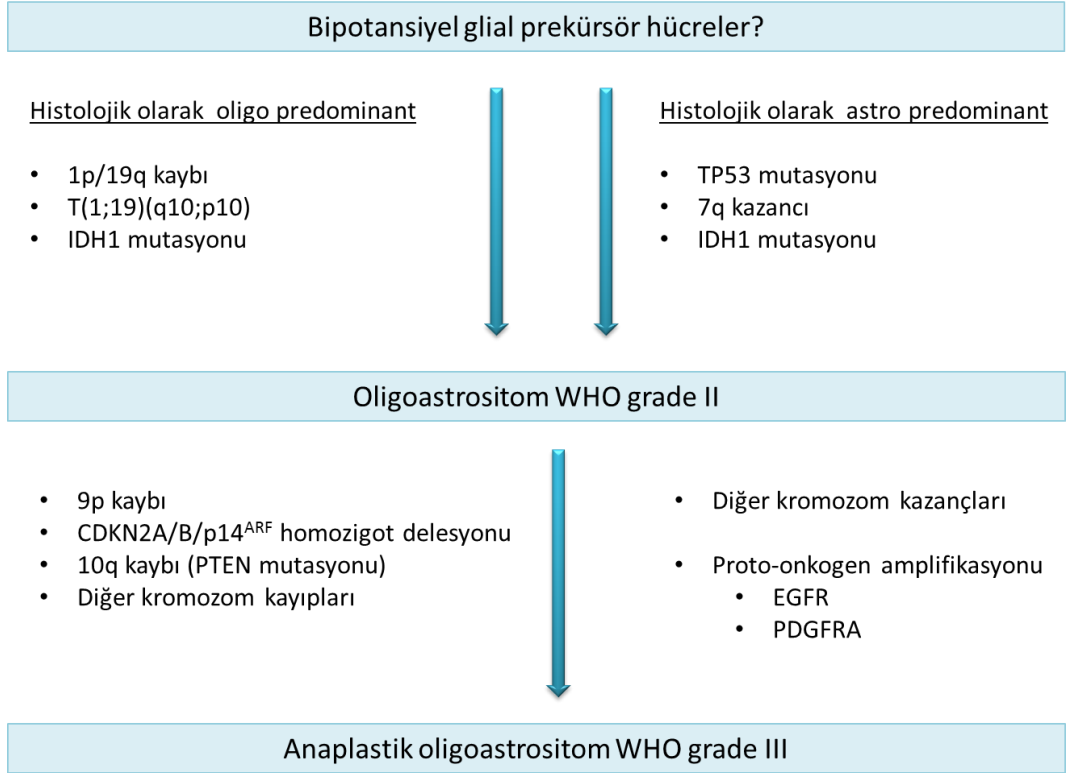
**Moleküler patoloji:** Hemen hemen tüm koroid pleksus karsinomlar sayısal kromozomal değişikliğe sahiptirler (+12p, +12q, +20p (%60), +1, +4q, +20q (%53), +4p (%47), +8q, +14q (%40), +7q, +9p, +21 (%33) ve -22q (%73), -5q (%40), -5p, -18q (%33) (D- Rickert ve Paulus 2004). Koroid pleksus karsinom, TP53 (Li-Fraumeni sendromu) ve hSNF5/INI1' in (Rabdoid predispozisyon sendromu) germline inaktivasyonlarının düzenlenmesinde meydana geliyor olabilir. Sporadik tümörlerde mutasyonlar hSNF5/INI1' de tanımlanmıştır. PDGF reseptörleri, özellikle PDGF reseptör beta koroid pleksus karsinomunda sıklıkla görülür (90).



**Şekil 19.** Difüz infiltrate astrositik gliomun farklı tiplerinde tanımlanan moleküler değişimler (90)



**Şekil 20.** Oligodendroglial tümörlerin başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili moleküler değişimler (90)



**Şekil 21.** Oligoastrocitomların başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili moleküler değişimler (90)

### 1.2.3. Kodlamayan RNA' lar

İnsan genomunun %65' inin transkribe olduğu tahmin edilmesine rağmen bugün için %2' den azının proteine çevrildiği bilinmektedir. Komplementer DNA (cDNA) kütüphanelerinin sistematik sekanslanması ve transkriptom çalışmaları, tüm transkribe olan RNA' ların en azından yarısının protein kodlamayan RNA molekülleri olduğunu göstermiştir. (2, 186)

Kodlamayan RNA, proteine çevirisi yapılmayan işlevsel bir RNA molekülüdür. İngilizce literatürde non-coding RNA' nın kısaltması olan ncRNA olarak anılırlar, daha az sıklıkla kullanılan diğer adları non-protein-coding RNA (npcRNA; protein kodlamayan RNA), non-messenger RNA (nmRNA; mesajcı olmayan RNA), small non-messenger RNA (snmRNA; küçük mesajcı olmayan RNA), functional RNA (fRNA;

işlevsel RNA)' dır. Kodlamayan RNA' nın yazıldığı DNA dizileri RNA geni veya kodlamayan RNA geni olarak adlandırılır.

Kodlamayan RNA' lar arasında, taşıyıcı RNA, ribozomal RNA gibi yaygın ve işlevsel olarak önemli RNA' ların yanı sıra, çok sayıda farklı işlevleri olan kodlamayan RNA bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; snRNA (small nuclear RNA); RNA transkriptlerin işlenmesinde ve intronların uzaklaştırılmasında, snoRNA (small nucleolar RNA); rRNA' nın olgunlaşmasında, piRNA (piwi interacting RNA); gametogenezde ve tmRNA (transfer mRNA); ribozomların kırık mRNA' lardan arındırılmasında, siRNA (small interfering RNA) ve miRNA (microRNA) ise gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (39).

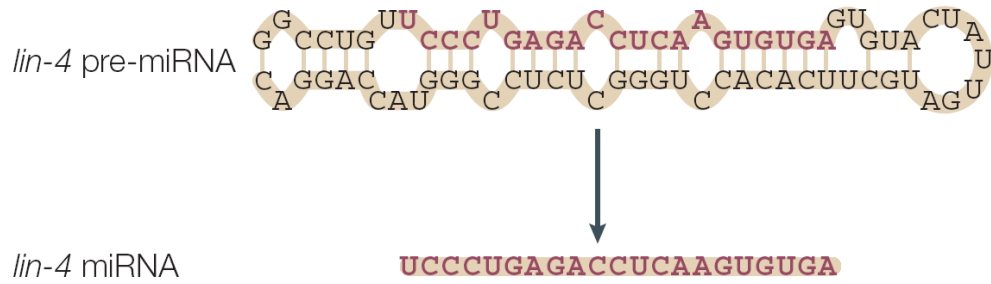
İnsan genomunda kodlamayan RNA' ların sayısı bilinmemektedir, ancak yakın zamanda transkriptomik ve biyoinformatik çalışmalar ile elde edilen bulgular binlerce kodlamayan RNA' nın var olduğunu göstermektedir (8, 182).

### **1.2.3.1. mikroRNA (miRNA)**

#### **1.2.3.1.1.miRNA' ların Genel Özellikleri**

MikroRNA' lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir (165). MikroRNA, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşitidir (Şekil 22).

miRNA' lar gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonal) bir mekanizma ile regüle ederler. Her bir miRNA kendi moleküler işlevini hedef mesajcı RNA' lara (mRNA) ya tam yada kısmi şekilde bağlanarak mRNA' nın translasyonunun inhibisyonuna ve/veya bu mRNA' nın kesilmesine neden olur, bu da protein üretiminin baskılanmasına yol açar. Çoğu miRNA' lar organizmanın her yerinde eksprese edilirken, bazıları embriyonik gelişim sürecinde dokuya spesifik ekspresyon özelliği gösterirler. miRNA' ların yaklaşık % 60' ı bağımsız eksprese edilirken, %15' i kümeler halinde ve % 25' i de intronlarda eksprese edilirler (39, 196, 83).



**Şekil 22.** miRNA yapısı (77)

### 1.2.3.1.2. miRNA' ların Tarihçesi

İlk mikroRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmiş (108) olup, mikroRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. (158) Lee ve arkadaşları 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans'* ı gen içeriği bakımından taramışlar, *lin-4* olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir (108). *Lin-4'* ün hedefe spesifik



translasyonel inhibisyona neden olması gelişme süresinde gen düzenlenmesinde yeni bir mekanizma olabileceğini düşündürmüştür. 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları *C.elegans*' ta 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA keşfetmişlerdir (155). Let-7' nin insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup (145), bu durum let-7' nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir.

Daha sonraki yıllarda lin-4 ve let-7' ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve mikroRNA' lar olarak isimlendirilmiştir (105). Bitki, hayvan ve insan genomunda miRNA' ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir.

En son yayınlanan miRBase' e (miRNA' ların dizileri ve farzedilen hedefleri ile ilgili bilgi veren bir database) göre (Sürüm 19; Ağustos 2012), hayvanlar, bitkiler ve virüsler gibi değişik türlerde 25.141 miRNA ve sadece *Homo sapiens*' te 1.600 prekürsör, 2.042 matür miRNA tanımlanmıştır (66).

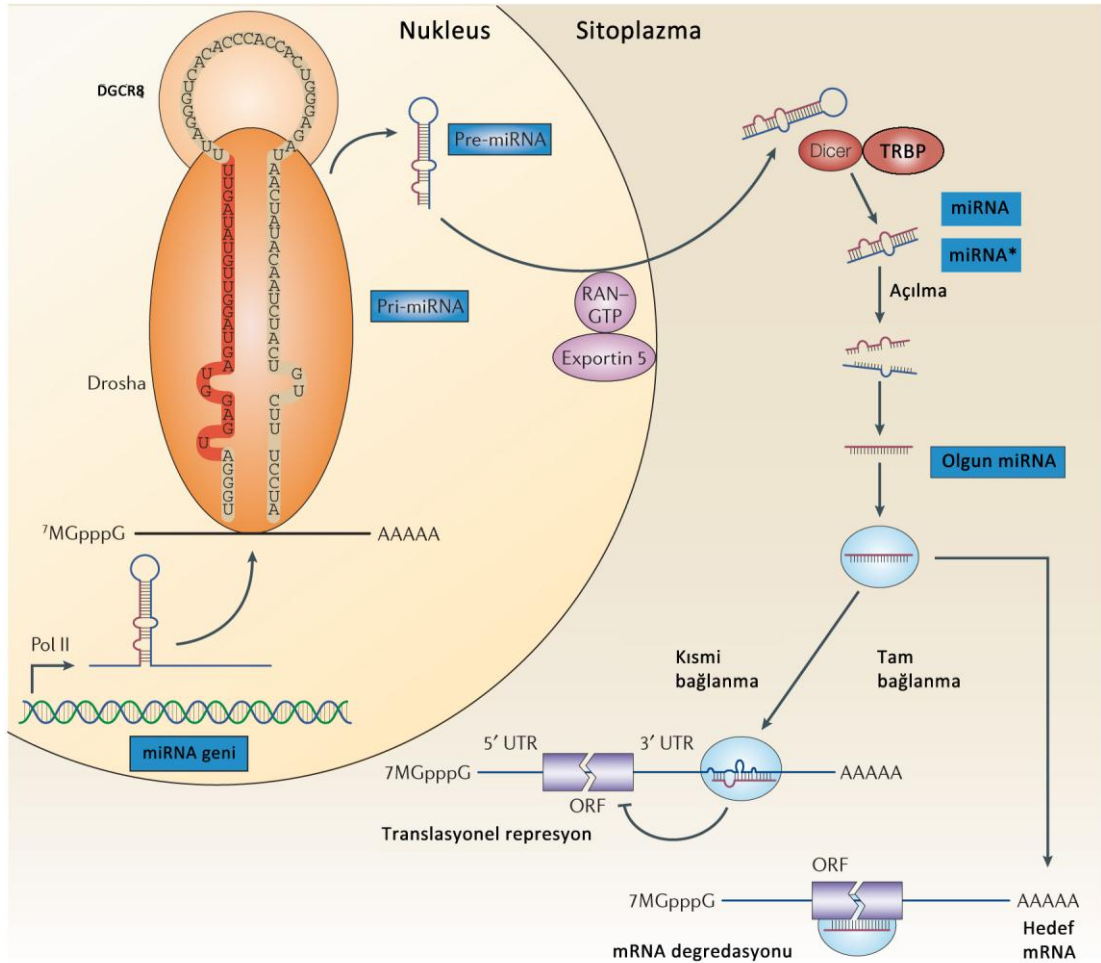
Her miRNA, birçok mRNA' yı hedefleyebilir ve direkt veya dolaylı olarak binlerce proteinin ekspresyonunu kontrol edebilir, bu da tek bir miRNA' nın değişiminin bile önemli biyolojik sonuçlar doğurabileceğini gösterir.

#### **1.2.3.1.3. miRNA Biyogenezi ve Çalışma Prensipleri**

İnsanlarda miRNA' lar pri-miRNA adı verilen 1 kb' dan daha büyük diziler halinde transkribe olurlar ve 5' cap ve 3' poliA kuyrukları vardır (16, 110). pri-miRNA transkriptleri iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA haline gelirler

[6, (Şekil 23)]. İlk adım nukleusta meydana gelir ve bir RNAz III olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlama proteini olan DGCR8 (DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8) tarafından gerçekleştirilir (71, 109). Drosha pri-miRNA' nın her iki ipliğini de keserek pre-miRNA adı verilen yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda sap ilmik formunda öncül molekül oluşturur (100, 109). Bu pre-miRNA' lar nükleer transport reseptörü eksportin (Exp-5-Ran transport reseptor ailesinin bir üyesi) ve nükleer protein Ran-GTP aracılığıyla nukleustan sitoplazmaya taşınır (9, 128). Son adımda bir RNAz III enzimi olan Dicer ve bir çift zincir RNA bağlama proteini olan TRBP (HIV-1 transaktive edici cevap oluşturan RNA bağlanma proteini) tarafından pre-miRNA' nın sap-ilmik formunun bittiği bölgelerden kesilir (24, 98). Sonuçta yaklaşık 22 nükleotid boyunda çift iplikli yapıda bir molekül oluşur. Dicer enzimi; helikaz domaini, DUF 283 domain, PAZ (Piwi, Argonaute- Zwiller) domaini ve RNAaz III domaini olmak üzere üç domain içerir. miRNA dubleksleri, helikaz enzimi tarafından olgun miRNA' ya dönüştürülür. Bu molekülün bir ipliği miRNA, diğer ipliği ise pre-miRNA' nın diğer eşlenik kolundan türeyen dizidir. Çift iplikli RNA molekülü daha sonra RISC (RNA-indüklü susturma kompleksi) adı verilen protein kompleksine yüklenir (15). RISC, çift ipliğin açılmasıyla aktive olur. miRNA molekülü ve RISC hedef mRNA' lara yönelirken, açılmış çift iplikli yapının diğer ipliği degrade olur (70, 163). miRNA' lar hedef mRNA' ları ile farklı canlı türlerine ait aynı miRNA ailesinde yüksek oranda korunmuş ve tohum adı verilen 6-8 nükleotidlik bir bölge aracılığı ile etkileşirler (93). Hedef ile miRNA' nın tohum dizisi (miRNA' nın 5' ucunun 2 ve 8. nükleotitleri) arasında eşleniklik olması hedefin belirlenmesi açısından çok önemlidir (115). miRNA' lar hedef mRNA' ya kısmi veya tam eşleniklik göstererek bağlanabilirler. Hedef mRNA' nın translasyona uğramayan 3' UTR bölgesi (-3' untranslated region) ile

miRNA tohum dizisi arasındaki eşlenikliğin seviyesi, miRNA' nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirler (82). miRNA' ların hedef mRNA üzerinde bağlanma bölgeleri genellikle 3' UTR' dedir, ama 5' UTR' yi veya ORF' u (açık okuma çerçevesi) hedef aldıkları durumlarda da gen ifadesi baskılanır (114). Eğer eşleniklik çok yüksek seviyede ise RISC hedef mRNA' ları degrade eder. Ayrıca bu durumda hedef mRNA' nın bozulumu da gerçekleşebilir. RISC' e yüklenmiş miRNA' lar aracılığı ile mRNA' ların poliA kuyruklarının ve 5'-cap yapılarının yok edilip mRNA bozulununun tetiklendiği belirlenmiştir (188). PoliA kuyruklarının ve 5' cap yapılarının yok olması sonucunda kararlılıkları azalan mRNA' lar hücrel enzimler tarafından parçalanır. Genellikle memelilerde görüldüğü gibi eğer eşleniklik daha az ise, hedef mRNA' dan protein oluşumu baskılanır (147, 179). Bu olayın mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da hedef genin mRNA seviyesi artarken, protein seviyesinin değişmediği, dolayısıyla da baskılamanın translasyonel seviyede gerçekleştiği gösterilmiştir (142, 187). Birçok çalışmada translasyonel seviyede düzenlemenin, translasyonun başlangıcında gerçekleştiği belirlenmiştir (80, 179). miRNA-RISC kompleksinin çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek protein translasyonunun başlangıç ve uzama aşamalarını engelliyor olması muhtemel gözükmektedir.



**Şekil 23.** miRNA biyogenezi (47)

#### 1.2.3.1.4. miRNA' ların işlevleri

In vivo çalışmalarda sitokinleri, büyüme faktörlerini, transkripsiyon faktörlerini, pro-apoptotik, anti-apoptotik proteinleri içeren kritik sinyal moleküllerinin regülasyonu aracılığı ile miRNA' ların gelişim (94), bağışıklık, nöronal fonksiyon, proliferasyon (25), diferansiasyon (23) apoptoz (191) ve metabolizma (152) ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çeşitli kanserlerde birçok onkogen ve tümör supresörlerin ekspresyonunu regüle ederek önemli rol oynayan miRNA' ların anormal ekspresyon gösterdiği bilinmektedir. İlk olarak bazı miRNA' ların bu

süreçleri tek bir hedef geni baskılayarak düzenledikleri belirlenmiş olsa da zamanla birçok miRNA' nın tek başına birden fazla hedef geni baskılayabildiği anlaşılmıştır (4, 164).

miRNA' lar bir mRNA molekülüne bir antisens bütünleme ile bağlanarak mRNA' nın negatif regülasyonu aracılığıyla post-transkripsiyonal seviyede gen ekspresyonunu regüle ederler. miRNA' ların çok küçük RNA molekülleri olduğu gerçeği göz önüne alındığında bir miRNA' nın 100 farklı mRNA' yı hedefleyebildiği ve regüle edebildiği kabul edilmiştir. On binden fazla mRNA' nın bu mekanizma ile direkt olarak regüle edildiğine inanılmaktadır (13, 40, 114, 120). Bu yüzden, organ morfolojisinde, bilateral asimetride, stres yanıtında, metabolizmada, hücre proliferasyonunda ve apoptozda yer alan çeşitli hücresel fonksiyonların ve yolların regülasyonunda miRNA' ların yer aldığı gerçeği sürpriz değildir (1).

miRNA' ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi ve tanı veya tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleştirilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadelerini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

#### **1.2.3.1.5. Kanser ve miRNA**

miRNA' lar, gen ifadesinde kritik işlevlere sahiptirler ve düzensizlikleri hastalıkların patogenezinde önemli sonuçlara yol açmaktadırlar. miRNA ekspresyonu insan kanserlerinde deregüledir, bazı miRNA' lar birden çok tipteki neoplazmlarda yukarı veya aşağı regüle durumdadırlar. Atipik eksprese olan miRNA' ların gösterilmesi, malin transformasyonlarla ilgili yollardaki bilinen onkogenlerin

ve tümör supresör genlerin fonksiyonlarını etkileyebilir. Hücre döngüsü progresyonu, farklılaşmanın kaybı, artan sağkalım, invazyon ve metastazın miRNA'nın etkisi altında olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla miRNA'lar, onkogen veya tümör supresör genler olarak rol oynarlar. Kanserin moleküler temeli üzerine bilgi arttıkça, ortaya çıkan bulgular, miRNA ekspresyon profillerinin, klinik uygulamalara aktarılması potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Kanseri dokularının analizi, miRNA'ların kanser sınıflandırmasında, prognostik stratifikasyonda ve ilaç yanıtında yararlı olabileceğini ortaya çıkarmıştır. miRNA'ların erken tanı ve devam eden araştırmalarda yararlı olabilecek olan, dolaşımdaki belirteçler oldukları belirlenmiştir. miRNA çalışmaları ile kanser tedavisi üzerinde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Önemli klinik uygulamalara uyarlanması önem taşımaktadır (30)

Tümörögenezdeki hem erken olaylar (anormal hücre büyümesi, hücre ölümü ve hücre farklılaşması) hem de geç olaylar [anjyogenez, invazyon ve metastaz, (Şekil 21)] anormal miRNA ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu moleküler ve biyolojik bağlantılarıyla ilgili çeşitli yayınlar mevcuttur (29, 65).

Tümörögenizde miRNA'ların işlevsel olduğunun ilk kanıtı, Calin ve arkadaşlarının kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları çalışmayla ortaya konulmuştur (17). B-hücreli KLL hastalarının hemen hemen yarısı 13q14 delesyonu taşımaktadır. Delesyon analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca miR-15a ve miR-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiş ve KLL hastalarının %68'inde bu miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı veya olmadığı rapor edilmiştir. Kanseri ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir.

Bu iki miRNA' nın ekspresyon seviyelerinin KLL hücrelerinde, anti-apoptotik B-hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2' nin üretimi ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle Cimmino ve arkadaşları miR-15a ve miR16-1'in tümör supresör aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bu iki miRNA' nın düşük seviyelerinin yüksek seviyede Bcl-2 proteini ile ilişkili olduğu dolayısıyla anormal hücre büyümesini gerçekleştirdiği, yüksek seviyelerinin ise apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (32). Normal seviyelerinin kontrolsüz hücre büyümesini engellediği rapor edilen miR-15a ve miR16-1'in böylelikle tümör supresör aktiviteleri belirlenmiş oldu.

Kolorektal kanserde miR-143 ve miR-145' in aşağı-regüle olduğunu gösteren çalışma, solid tümörlerde miRNA deregülasyonunun tanımlanması ile ilgili ilk çalışmadır (138).

miRNA' ların kanserdeki rolü ile ilgili olarak, miRNA' ların kanserin başlangıcında ve progresyonunda anahtar bir rol oynadığı ile ilgili bir şüphe yoktur. Calin ve ark (18) %50' den fazla miRNA geninin kanser ilişkili genomik bölgelerde veya fragil bölgelerde lokalize olduğunu bulmuşlardır. Bundan başka, miRNA ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin displazi ve kanserle ilişkili olduğu ve belirli miRNA' ların ekspresyonları ile kanser gelişimi arasında belirgin bir bağ olduğu gösterilmiştir (27, 59, 196). Spesifik miRNA' ların bilinen onkogenleri veya tümör supresör genleri modüle ettikleri veya kendilerinin bu şekilde davrandıkları gösterilmiştir, bu yüzden onko-miR' ler veya tümör süpresör-miR' ler olarak adlandırılırlar ve çeşitli kanser tiplerindeki hücre farklılaşmasında, proliferasyonda, anjiyogenezde, apoptozda veya invazyonda yer alan genleri direkt olarak hedefledikleri gösterilmiştir (27, 40, 59, 196). miRNA ekspresyon profillerinin insan

kanserlerinde klinikopatolojik özellikler, hastalık progresyonu, prognoz ile korele olduğu bulunmuştur (59, 165).

#### **1.2.3.1.6. Beyin Tümörü ve miRNA**

##### **1.2.3.1.6.1. Normal ve Neoplastik Beyin Büyümesi ve miRNA' lar**

Beyin tümörü patogenezi anlamadaki majör ilerlemeler, normal ve neoplastik beyin gelişiminin altında yatan hücresel ve moleküler süreçler arasında yer alan önemli benzerlikler, gelişimsel nörobiyolojiden gelmektedir. Aslında, nöral sistem/progenitör hücre yenilenmesi, farklılaşma, hücre döngüsü ve ölümü regüle eden genler ve sinyal yolları sıklıkla beyin tümör oluşumu ve progresyonunda öncüdürler (184). Bunlar, normal ve neoplastik beyin gelişiminde önemli oldukları tanımlanmış miRNA bölgeleri içerirler. miRNA sentezindeki veya spesifik miRNA' lardaki bozulmaların, beyin morfolojisini ciddi şekilde değiştirdiği gösterilmiştir. Hücresel modeller üzerine yapılan çalışmalarda miR-9, miR-124, miR-125' in (107, 171) ve model organizmalarda yapılan çalışmalarla miR-430 miR-9' un (61, 95) beyin morfogenezinde, nöronal gelişimde önemli oldukları gösterilmiştir.

Çeşitli diğer insan neoplazmlarında gösterildiği gibi, değişmiş miRNA ekspresyonu, GBM, oligodendrogliom ve çocukluk çağı embriyonal beyin tümörleri - MB, CNS-PNET, rabdoid tümörlerini içeren beyin tümörlerinde tanımlanmıştır (Tablo 4).



**Tablo 4. Malin beyin tümörlerinde miRNA' lar**

MikroRNA	Tümör tipi	Kromozom lokasyonu	Ekspresyon	Hedefler	Referanslar
<b>miR-21</b>	Glioblastom	17q23.1	Yüksek	EGFR, PTEN, HNRPK, TaP63, Tropomyosin 1, PDCD4, Maspin, RhoB, MARCKS, RECK, TIMP3	(35, 143, 156)
<b>miR-221/222</b>	Glioblastom, CNS Rabdoid Tümör	Xp11.3	Yüksek	STAT3, Akt, p27Kip1, c-kit	(60, 197)
<b>miR-128-1</b>	Glioblastom	2q22.1	Düşük	Bmi-1	(63)
<b>miR-7</b>	Glioblastom	7q26.1	Düşük	IRS1/2, Raf1	(97, 183)
<b>miR-181a/181b</b>	Glioblastom	1q32.1	Düşük		(51, 167, 194)
<b>miR-9</b>	Oligodendrogliom	miR-9-1: 1q22 miR-9-1: 5q14.3 miR-9-1: 15q26.1	Yüksek	REST, BAF34a	(51, 167, 194)
<b>miR-30b/d</b>	Medulloblastom	8q24.22-q24.23	Yüksek		(90)
<b>miR-124</b>	Medulloblastom	miR-124-1: 8p23.1 miR-124-2: 8q13.1 miR-124-3: 20q13.33	Düşük	REST, BAF34a, CDK6, RB1, TrkC reseptör, CDK6, SLC16A1	(33, 51, 149, 167, 194)
<b>miR-17-92</b>	Medulloblastom	13q31.3	Yüksek	TSP-1, Bmi-1, PTEN, PP2A, SHH sinyalleşmesi	(43, 132)
<b>miR-326</b>	Medulloblastom	11q13.4	Düşük	PKM2, SMO, NOTCH 1/2	(96)
<b>miR-125b, miR-324-5</b>	Medulloblastom	miR-125b-1: 11q24.1 miR-125b-2: 21q21.1 miR324-5p: 17p13.1	Düşük	SMO, SHH sinyalleşmesi	(51)
<b>C19MC</b>	CNS-PNET	19q13.42: miR-520g, miR-517c, miR-520h	Yüksek	WNT/JNK sinyalleşmesi, ABCG2	(117, 180),
<b>miR-137</b>	Glioblastom	1p22	Düşük	CDK6, MITF	(C55)
<b>miR-34a</b>	Glioblastom	1p36.22	Düşük	NOTCH1/2, CDK6	(119)

Primer tümörlerde spesifik miRNA' ları hedefleyen genomik ve epigenetik değişiklikler (C19MC, miR-17-92 kümeleri ve miR-26a), beyin tümörü patogenezinde bu miRNA' lar için direkt etiyolojik rolleri desteklemektedir. miR-21 ve miR-124 gibi tümörlerde ekspresyonları değişen miRNA' ların fonksiyonel rolleri onaylanmıştır fakat farklı primer beyin tümörlerindeki ekspresyonları değişen diğer miRNA bölgelerinin önemlerinin aydınlatılması gerekmektedir. Beyin tümörü miRNA' larının önemli bir bölümü için gösterdiği gelişimsel belirli roller göz önüne alındığında, bazı miRNA' ların değişmiş ekspresyonu, büyük olasılıkla belirli nöral soyları ve tümörlerin hücrel türemelerini yansıtır ve sadece tümör sınıflandırması için değil aynı zamanda tümör alt-gruplarının biyolojisinin gelişmiş tarifi için güçlü bir araç sunabilir. Diğer tümör tiplerinin aksine nispeten az sayıda çalışma ile (bugüne kadar-

2011 toplam 82) beyin tümörlerinde miRNA' ların rolleri çoğunlukla gliomlar ve embriyonal beyin tümörleri üzerinde odaklanarak araştırılmıştır.

#### **1.2.3.1.6.2. GBM ve miRNA**

Çeşitli miRNA' ların glioblastomda deregüle olduğu in vitro ve in vivo' da kanıtlanmıştır. Ciafrè ve ark insan glioblastom örneklerinde, 245 miRNA içinde 9 miRNA' yı (miR-10b, miR-130a, miR-221, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-9-2, miR-21, miR-25, miR-123) yukarı-regüle ve 4 miRNA' yı aşağı regüle (miR-128a, miR-181c, miR-181a, miR-181b) ve insan glioblastom hücre hatlarında 9 miRNA' yı yukarı-regüle (miR-221, miR-23a, miR-24-2, miR-24-1, miR-23b, miR-21, miR-222-pre, miR-191, miR-220) ve 7 miRNA' yı aşağı regüle bulmuşlardır (31). Chan ve ark glioblastom örneklerinde 5 miRNA' yı (miR-21, miR-138, miR-347, miR-291-5', miR-135) yukarı-regüle ve 3 miRNA' yı (miR-198, miR-188, miR-202) aşağı-regüle bulmuşlardır (20). Sasayama ve ark, glioblastom örneklerinde miR-10b, miR-21, miR-183, miR-92b ve miR-106b' nin yukarı-regüle ve miR-302c\*, miR-379, miR-329, miR-134 ve miR-369-3p' nin aşağı-regüle olduğunu bulmuşlardır. miR-10b' nin glioblastomlarda yüksek derecede aşırı-eksprese olduğu ve ekspresyonunun astrositik tümörlerde tümör grade' i ve malinansi ile korele olduğu gösterilmiştir. İlginç olarak, bu çalışma miR-10b' nin ekspresyonunun malin gliomun multifokal lezyonları ile korele olduğunu ilk kanıtıdır (161). Diğer çalışmalar, Çinli hastaların gliom örneklerinde bazı miRNA' ların (miR-34a, miR-15b, miR-200a, miR-146b) önemli derecede deregüle (190) veya miR-29b, miR-125a ve miR-149' un glioblastomlarda aşağı-regüle olduğunu (38) rapor etmişlerdir. GBM' de, 192 miRNA ile yapılan bir array çalışmasında, 13 miRNA (miR-101, miR-128a, miR-132, miR-

133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154\*, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330) aşağı-regüle ve 3 miRNA (miR-21, miR-155, miR-210) yukarı-regüle bulunmuştur (167). Malin astrositomlarla (primer ve sekonder glioblastom ve anaplastik astrositom) yapılan diğer bir mikroarray çalışmasında kontrollerle karşılaştırıldığında, 756 miRNA' dan 55' i yukarı-regüle ve 29' u aşağı-regüle bulunmuştur (154).

Astrositom gradeleri ile ilgili olarak, bazı araştırmacılar miRNA ekspresyonu ve tümör grade' i arasında bir ilişki tanımlamışlardır. miR-21 ve miR-221, gliomda aşırı-eksprese olarak bulunmuştur. miR-21, düşük ve yüksek gradeli tümörlerde homojen bir şekilde aşırı-ekspresedir, fakat miR-221' in aşırı-ekspresyonu yüksek gradeli tümörlerde daha bellidir (36). Astrositom grade II, anaplastik astrositom grade 3, sekonder glioblastom, primer glioblastom ve normal beyinde miR-17-92 kümesinin elemanları üzerine yapılan bir çalışmada, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-92a-1 ve miR-106b' nin, non-neoplastik beyine oranla primer ve sekonder glioblastomlarda önemli derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. miR-19a ve miR-19b hem primer hem de sekonder glioblastomlarda aşağı-regüledir. İlginç olarak, miR-17-5p, miR-19a ve miR-106b, sekonder glioblastomlarda astrositom grade II' ye oranla önemli derecede daha yüksek eksprese olmuşlardır (46). miR-181a' nın da insan gliom örneklerinde tümör grade' i ile korele olduğu gösterilmiştir (166). Rao ve ark, glioblastomlar (primer ve sekonder) ve anaplastik astrositomlar arasında farklı şekilde eksprese olan 67 miRNA tanımlamışlardır ve sadece 23 miRNA (miR-126, miR-21, miR-146b-5p, miR-155, miR-16, miR-193a-3p, miR-199a-3p/miR-199b-3p, miR-22, miR-335, miR-143, miR-381, miR-24, miR-552, miR-886-5p, miR-142-5p,

miR-34a, miR-128, miR-513a-5p, miR-509-3-5p, miR-376c, miR-886-3p, miR-219-2-3p, miR-451) %94.8' lik bir diagnostik doğrulukla glioblastomları anaplastik astrositomlardan ayırmak için yeterli bulunmuştur (154). Diğer ilginç bir çalışmada önce primer WHO grade II gliomu (3 diffüz astrositom ve bir astrositom predominant) olan ve hastalıkları tekrarlayıp sonrasında glioblastoma ilerleyen (WHO grade IV) hastalarda miRNA ekspresyonu incelenmiştir. Çalışma sonunda, önceki WHO grade II tümörlerine oranla sekonder glioblastomda 14 miRNA' da deregülasyon (miR-184 ve miR-328 aşağı-regüle, miR-9, miR-15a, miR-16, miR-17, miR-19a, miR-20a, miR-21, miR-25, miR-28, miR-130b, miR-140 ve miR-210 yukarı-regüle) saptanmıştır. Aynı hastalarda miR-16, miR-17, miR-19a, miR-20a, miR-140 ve miR-184' ün PCR validasyonu ile bu bulgular konfirme edilmiştir. Fakat 14 diffüz astrositoma karşı 13 sekonder glioblastomdan oluşan bir kohortta yapılan bağımsız bir validasyon sonucunda miR-19 önem kazanmamıştır (130).

#### **1.2.3.1.6.3. Hücre Döngüsü/ Proliferatif/ Sağkalım Defektleri ve miRNA**

Hücre döngüsü/ proliferasyon/ sağkalım defektleri ile devamlı ve anlamlı bir şekilde ilişkili olan ve onkogenik veya tümör supresör olarak gliomlarda tanımlanan miRNA' lar miR-21 (20, 37, 118, 143, 156, 200) miR-26a (81, 99) miR-221/222 (60, 197) miR-7 (97, 183) ve miR-34a' yı (68, 119) içermektedirler ve bütün bunlar EGFR/PTEN/Akt, p53/pRB, STAT3/Akt, RAS/Raf/MEK/ERK sinyalleşme yolları ve Rb G1-S hücre döngüsü kontrol noktalarının bir veya daha çok komponentini hedeflemektedir. Şekil 24 deregüle miRNA' lar tarafından hedeflenen glioblastom patogenezindeki sinyalleşme yollarını özetlemektedir.



### 1.2.3.1.6.5. Anjiyogenez, Tümör Metabolizması ve miRNA

Mikrovasküler proliferasyon ve neo-anjiyogenez GBM' in en yoğun olarak çalışılan önemli histopatolojik özellikleridir ve özgün tedaviler için odaklanılan önemli bir alandır. Hücre göçü ve invazyonunda dahil olan miRNA' lar gibi onkogenler ve tümör supresör genlerin çoğunun GBM' de anjiyogenez ve tümör metabolizmasında payı vardır.

GBM anjiyogenezinde tümör-niş ilişkisinin önemi yakın zamanlarda miR-296' nın, insan mikrovasküler endotel hücreleri tarafından U-87 gliom hücreleri ile birlikte kültürlendikten sonra üretilen VEGF' nin pro-anjiyogenik alt efektörlerinden biri olduğunu keşfeden Wurdinger ve arkadaşlarının bir çalışmasında gösterilmiştir (189). Bunlar, işlev kaybı ve kazancı deneylerini kullanarak miR-296' nın in vitro anjiyogenez modellerinde tubülogenezi tetiklediğini göstermişlerdir.

Gliom anjiyogenezinde gereken miRNA yelpazesi henüz belirlenmemiş olsa da, normal damar gelişimi ve anjiyogenezde işlevi olan pekçok miRNA' nın tümörden kaynaklı anjiyogenezde örtüşen rolleri olması beklenir. Gerçekten de, gliom hücrelerinde tümör baskılayıcı rolü olan miR-34a' nın endotel progenitor hücrelerinde yaşlanmayı tetikleyerek fizyolojik anjiyogenezi durdurduğu (199) gösterilmiştir.

Hipoksinin, tümör grade'i, yayılım ve vaskülarite dahil GBM biyolojisinin muhtemel bir sürükleyicisi ve belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (5, 49). GBM' de sıklıkla işlevselliği kalmayan ve sırasıyla onkogenik ve tümör baskılayıcı roller alan MYC onkoproteini ve HIF ailesindeki transkripsiyon faktörleri (HIF-1/2) arasındaki

fonksiyonel birliktelik (81, 135) tümör hücrelerinin anaerobik metabolizma ve anjiyogenezi kolaylaştırmak yoluyla hipoksi koşullarına karşı adaptif tepkilerinde merkezi roller oynadığı gösterilmiştir. Hem c-Myc hem de HIF-1' in, hedef genleri metabolizma ve anjiyogenezde görev yapan miR-17-92 (43, 172), miR-23a/b (21, 58), miR-210 (50) miR-451 (62) ve miR-326' yı (96) doğrudan aktif hale getirdiği gösterilmiştir.

Özellikle, miR-17-92 grubunun miRNA' ları, miR-210 ve diğer hipoksi ile bağlantılı miRNA' lar (103) primer GBM' de en yüksek miktarda artış gösterdiği belirlenmiş olan miRNA' lardır. Bu miRNA' ların pek çoğunun ekspresyonu astrositik tümör gelişimi sırasında GBM' in belirgin özelliklerinin kazanılması ile paraleldir ve tedavide önemli olabileceğini gösteren hayatta kalma işlevlerine sahiptir.

#### **1.2.3.1.6.6. Farklılaşma, Kendini Yenileme ve miRNA**

Malin beyin tümörlerinin tahmini hücresel kökeni olan, sinir kök/progenitör hücreleri de dahil çeşitli dokulardan ve hücre türlerinden türetilen kök hücrelerin yenilenmesi ve farklılaşmasını düzenlemede miRNA' ların önemli fizyolojik rollere sahip olduğu sağlam kanıtlarla desteklenmektedir (57). "Kanser kök hücreleri" diye adlandırılan, kendini yenileme ve multipotent farklılaşma potansiyeli ve güçlü tümör başlangıcı ve muhafazası özellikleri gibi belirleyici kök hücre özelliklerini gösteren tümör hücrelerinin küçük bir kısmı GBM' i de içeren çeşitlilikteki solid tümörlerden izole edilmiştir (56, 168). Primer GBM' lerin RNA ve miRNA ekspresyon profilleri multipotent sinir kök hücrelerinin transkriptomları ile önemli seviyede bir örtüşme gösterir. Özellikle miR-17 ailesi, miR-183-182, miR-302-367 ve miR-371-373

kümeleri gibi, pluripotent embriyonik kök hücrelerde yüksek miktarda bulunan miRNA' lar da GBM ve sinir kök hücrelerinde yukarı-regüledirler. Buna ek olarak, sinir farklılaşmasında önemli olan miRNA' lar (miR-7, miR-9, miR-124, miR-137) GBM' ler ve farklılaşmamış sinir kök hücrelerinde az ifade edilmektedir (106). Kök hücre yenilenmesinde/farklılaşmasında normal işlevi olan özel miRNA' ların in vitro ve in vivo manipülasyonunun GBM hücrelerinde ve GBM-kanser kök hücrelerinde tümörjenik özellikleri değiştirebilir olması önemlidir. Özellikle, miR-124 ve miR-137' nin ektojik anlatımı CDK6' yı hedef alarak ve RB1 yolağını aktive ederek GBM' de farklılaşmaya ve hücre döngüsü duraksamasına yol açabilirken (167), miR-128 ekspresyonu da onkogenik bir sinir kök hücresi yenilenmesi faktörü olan Bmi-1' i hedef alarak GBM hücrelerinde büyüme ve kendini yenilemeyi durdurabilir (63).

GBM veya GBM-kanser kök hücreleri üzerinde miRNA' ların rolü konusunda yapılan bugüne kadarki çalışmalar örnek sayıları ve mikroarray platformları ile sınırlıdır. GBM' deki moleküler heterojenliğin ortaya çıkmasıyla da uyumlu olarak, mRNA ekspresyon profili çalışmaları GBM-kanser kök hücrelerinin de özel sinyalleşme yolağı işaretleri temelinde birbirinden ayrılabilirliğini göstermektedir (7, 124). Bu nedenle, büyük miktardaki GBM' den izole edilmiş olan kanser kök hücrelerinde eksprese olan bütün miRNA' ların yelpazesinin daha geniş kapsamda incelenmesi, GBM-kanser kök hücrelerinin muhtemel tümörjenik özelliklerini korumak için gerekli olan esas sinyalleşme yolaklarını destekleyen miRNA' ların belirlenmesine yardım edecektir.



### 1.2.3.1.6.7. Beyin Tümörü Diağnozu ve Öđđörüsünde miRNA' lar

Çoğu beyin tümörü için güncel tedavi kararları öncelikle, tümör morfolojisi ve yarı-kantitatif immunohistokimyasal yöntem bazlı olası hücre soyunun sınıflandırılmasına dayanmaktadır. Çocuk ve yetişkinlerde gliomlar en sıklıkla tanı konan tümörleri temsil etmelerine rağmen, tedavi stratifikasyonu ve tahmini için kritik olan tümör derecelendirmesi, terapötik denemelerindeki merkez patoloji derlemelerinde %30' a kadar kanıtlandığından, yetersiz kalmaktadır (151). Benzer şekilde, karakteristik olarak değişken nöro/glial veya epitelyal diferansiyasyon sergileyen embriyonal beyin tümörlerinin teşhisi, histolojik alt sınıfların yeni tanımlamaları ve yeniden sınıflandırmalarında yansıtıldığı üzere (91, 125) uzmanlar arasında dahi çekişmelere neden olmaktadır (14).

Çeşitli çalışmalar normal doku, tümör ve tümör alttipleri arasında miRNA ekspresyonunun dikkate değer bir şekilde değişkenlik sergilediğini göstermiştir. Bu değişkenlik, geliştirilmiş kanser tedavisi için yararlanılması gereken bir potansiyele sahiptir (29, 157, 178).

miR-92b ve miR-9/9\* ekspresyonlarının, beyinde intrinsik olanları, metastatik tümörlerden spesifik olarak belirlemekte ve ayırmakta olduğu bulunmuştur (140). Normal ve neoplastik dokularda geniş kohortlarda gerçekleştirilen miRNA profillemesinde yaklaşık 200 miRNA' nın ekspresyon imzalarının 16,000' den fazla mRNA' nın ekspresyon profilinden daha sağlam bir sınıflandırma sağladığı görülmüş ve tümör tipleri, soyları ve diferansiyasyon durumları belirlenmiştir (126).

Morfolojik GBM tümörlerinin çeşitli alt gruplarını ispatlayan son mRNA ekspresyon çalışmaları, gliomların moleküler çeşitliliğini vurgulamakta ve daha özelleşmiş tedavilerin gelişimine meydan okumaktadırlar. Önemli olarak, gliom, ependimom ve medulloblastom çalışmaları, primer tümörlerin gen ekspresyon imzalarından tümör hücre orjinini tahmin etmekte ve tümör fenotipi ve terapötik yanıtı belirleyebilmektedir. miRNA ekspresyonu, beyin tümörlerinin klinik idaresi için daha güçlü diyagnostik ve prediktif araçları temsil edebilir.

Bugüne kadar, beyin tümörlerinde miRNA ekspresyon çalışmalarının yayınlanan büyük bir kısmı çok az sayıda tümör ve sınırlı miRNA array platformlarında gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber bu çalışmalar, normal ve neoplastik beyin dokularının ayırt edilebilir olduğunu ve beyin tümör progresyonu ve hasta prognozunu belirleyebileceğini konfirme etmiştir (51, 167). Özellikle miR-21' in artan seviyeleri, yüksek miR-221 ve düşük miR-125, miR-137 (167) ve miR-181b ekspresyonları grade II' den grade III/IV gliomlara progresyonunda paralellik gösterdiği rapor edilmiştir (36, 130). Bu çalışmalar, miRNA' ların gliom sınıflandırması ve belirtileri için potansiyel olduğunun altını çizmektedir.

#### **1.2.3.1.6.8. Biyomarkır olarak miRNA' lar**

Hastalık ile ilişkili olan morbidite ve mortaliteyi önemli derecede düşürmek için ve tanısı konmuş olguların prognozunu geliştirmek için, günümüzdeki çalışmaların önemli bir amacı kanser hastalarının erken diağnozudur. Onkolojik araştırma yıllarca tümör örneklerinde tanımlanabilen veya hasta kanında dolaşan proteinler arasında yararlı biyomarkırlar için çalışmalar yapmıştır. Şimdi, miRNA' lar

stabil olmaları ve seviyelerinin ölçülebilmeleri özellikleri sayesinde potansiyel biomarkırlar paneline eklenmiştir (30).

Tedaviyi uyarılmanın yanında, terapötik etkiyi ölçmek için uygun biyomarkırlara ihtiyaç duyulduğu, yolak spesifik kanser terapötiklerinin gelişimi ile artan bir farkındalık oluşmaktadır. Örneğin, EGFR inhibitörlerine karşı EGFR amplifikasyonu/aşırı-ekspresyonu olan GBM' lerin tedaviye cevap verme hızının PTEN kaybı ile tahmin ve modüle edildiği gösterilmiştir (181).

Benzer olarak miRNA' ların ekspresyonu, radyasyon ve spesifik kemoterapiye olan gliom yanıtının tahmin edilmesi veya modifiye edilmesini sağlamaktadır. Özellikle miR-21 ekspresyonunun, radyasyon rezistansı (22), taksol (156) ve VM26 (118) duyarlılığı ile korele olduğu bildirilmiştir. Günümüze değin, merkezi sinir sistemi tümörleri için kandan veya serumdan saptanan biyomarkırlar olan konvansiyonel sinyal molekülleri ile sınırlı başarı elde edilmiştir. Vücut sıvısındaki şaşırtıcı miRNA stabilitesi ile ilgili raporlar, merkezi sinir sistemi tümörleri için miRNA' ların kolayca elde edilebilir, cazip kan-bazlı biyomarkırlar olduklarını gün ışığına çıkarmıştır. Ayrıca, miRNA' ların aselüler serum veziküllerinde tespiti, miRNA' ların hücre-bağımsız serebrospinal sıvılarda da başarı ile tespit edilebileceğini göstermiştir. Serebrospinal sıvılarda tümör spesifik miRNA' ların tespit yeterliliği, özellikle MB ve CNS-PNET gibi embriyonal beyin tümörlerinin tedavilerinde, dikkate değer terapötik etki sağlamakta iken, nispeten basit serebrospinal sıvı sitolojisi derecelendirme ve tedavi risk stratifikasyonu için altın standart olmayı sürdürmektedir.

Bu bulgular miRNA' ların biyomarkır olarak kullanabileceğine ve kanserlerin saptanmasında güçlü bir tanısal araç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Günümüzde miRNA' ların tanısal amaçlı kullanım alanları hızla çoğalmaktadır.

#### **1.2.3.1.6.9. Beyin Tümörü Tedavisinde Hedef Olarak miRNA' lar**

Yüzlerce kansere miRNA' ların dahil olması, kanser tedavisinde miRNA' ların hedef alınmasını açık bir şekilde tetiklemiştir. Tek bir miRNA sıklıkla, diferansiyasyon, proliferasyon, apoptoz veya hücre büyümesi gibi multipl hücre fonksiyonu nitelendiren, bir veya çeşitli yolları içeren çok sayıda mRNA' yı hedeflemektedir. Bu nedenle, kritik regülatör merkezde, kritik tümör onkogenik veya tümör süpresör miRNA' nın inhibisyonu veya düzeltilmesi potansiyel olarak güçlü ve etkili kanser terapötikleri olduğunu temsil etmektedir.

#### **1.2.3.1.6.10. Tedavide Hedeflemek için Aday miRNA' ların Seçimi**

miRNA ekspresyonu yüksek oranda hücre tipi ve doku spesifiktir, bu nedenle tümör ve normal doku arasında en çok diferansiyel olarak eksprese olan ve tümör büyümesinin önemli bir mekanizması olan terapötik bir hedefdir ve kanser tedavisi için idealdir (28). miR-21, miR-17-92 ve C19MC gibi, beyin tümörlerine özgü çeşitli miRNA' lar, MYC gibi geleneksel onkogenlerin yüksek düzeyde genomik amplifikasyonunu veya ekspresyonunu ortaya koyarlar. Çocukluk çağı medullablastom ve nöroblastomdaki MYC onkogenlerine benzer olarak, C19MC amplikonu, rekürren CNS-PNET' in neredeyse tüm tümör hücrelerinde var olduğu rapor edilmiş (148), bu da C19MC onkogenik miRNA' ların CNS-PNET' teki önemini vurgulamaktadır. Benzer olarak, c-MYC bazlı lenfomajenezi potansiyel olarak

arttırdığı gösterilmiş olan miR-17-92 lokusunun, medulloblastom için cazip bir hedef olduğu bildirilmiştir (72). Yakın zamanda yapılmış olan bir çalışma, lenfomagenezi tetiklemek için indüklenebilir miR-21 kullanmış ve böylece miR-21 in in vivoda güçlü bir onkogen (134) ve gliom tedavisi için cazip bir aday olduğu ispatlanmıştır. Dikkate değer olarak, bu çalışma, miR-21 ekspresyonunun tek başına lenfomagenezin indüklenmesi için gerekli olduğunu ve miR-21 ekspresyonunun geri çekilmesinin eşlik ettiği bu tümör regresyonunun, tümör hücrelerinin MYC gibi konvansiyonel onkogenlerle aynı şekilde “miRNA onkogenlerine bağımlılık” sergilediğini işaret etmektedir (86). Bu çalışma, C19MC, miR-17-92 and miR-21 gibi onkomirlerin anti-kanser hedefler olarak yüksek oranda çekiciliğinin altını çizmektedir.

Klinik onkolojide monoterapi istisna olduğu gibi, spesifik anti-miRNA' ların da diğer yeni tedavilerle veya konvansiyonel kemo veya radyoterapötiklerle kombinasyonu en yararlı olmaktadır. Örneğin, anti-miR-21' in in vitro ve in vivoda gliom hücre hatlarında apoptozu indüklemek için, TRAIL (37) ve VM26 ve konvansiyonel kemoterapötiklerden Taksol (156) ile sinerjisi gösterilmiştir.

#### **1.2.3.1.6.11. Antisens miRNA Tedavisi ve Anti-miRNA Oligonükleotidleri Kullanılarak Beyin Tümörü Tedavisindeki Zorluklar**

miRNA bazlı tedaviler önemli derecede aşağı-regüle olan miRNA' ların yerine konması veya anti-miRNA oligonükleotidlerin kanserde yukarı-regüle olan miRNA' ların degradasyonu artırılarak veya rekabetçi olarak bağlanmaları prensibine dayanmaktadır. İdeal bir anti-miRNA, in vitro ve in vivo stabiliteyi ve miRNA hedefleri için yüksek spesifite ve bağlanma afinitesini içermektedir.

Son miRNA terapötik modellerinde, bir veya multipl miRNA' lar veya antagomirler eksprese eden lentivirüsler veya adenovirüsler, tek veya çoklu miRNA' ları susturmak veya tamir etmek için sırasıyla başarı ile kullanılmaktadır (101, 162). Benzer olarak, adenovirus ko-eksprese eden p53 ve p21-hedefleyen miRNA' lar, tümör hücre kemo-sensitivitesini in vitro ve in vivo da zenginleştirmek üzere başarı ile kullanılmaktadır (85). Bu çalışmalar, kanser terapötüğü olarak anti-miRNA uygulamalarının kapsamının farkındalığının altını çizmektedir.

Konvansiyonel beyin tümörü tedavisindeki gibi, kan-beyin bariyerinin rölatif geçirmezliği, beyin tümörlerine anti-miRNA' ların tedavisinin uygulanmasında en dikkate değer engeldir. Anti-miRNA' ların sistemli uygulaması, çeşitli tümörlerde miRNA düzeylerini hedeflemesine (45, 102) ve fare korteksine doğrudan enjekte edilen anti-miRNA' ların hedef miRNA' ları etkili bir şekilde susturmasına rağmen, sistemik olarak iletilen anti-miR' ler, hedef miRNA ekspresyonunu değiştirmek için etkin bir şekilde kan-beyin bariyerini geçememektedirler (102). Fakat son çalışmalar miRNA bazlı farmakolojiklerin nanopartiküller ve immunolipozomlar (121, 198) aracılığıyla etkin bir şekilde aktarılmasına dair heyecan verici olasılıklar sunmaktadır.

Beyin tümörlerindeki miRNA-bazlı tedavilerin gerçekleştirilmesindeki zorluklar, nörogenezde miRNA' lar için kritik düzenleyici rolleri işaret etmektedir (92). Ayrıca, tek bir nükleotid tarafından farklılaşan yüksek oranda ilişkili miRNA' ları kodlayan, C19MC gibi büyük miRNA kümelerinin bir çoğunun, özellikle spesifik anti-miRNA' lar ile hedeflenmesi güçtür. Beyin gelişiminde miRNA' ların normal

fonksiyonlarını irdeleyen böyle çalışmalar, miRNA-bazlı terapötiklerin en iyisinin tasarımı için kritiktirler.

#### **1.2.4. Mikroarray**

mikroRNA mikroarrayi kültüre edilmiş hücrelerde veya dokularda mikroRNA ekspresyonu çalışmak için yüksek ürün hacimli bir yöntemdir. mikroRNA mikroarraylerde biyotin etiketleri 5'-cap yapı içermeyen RNA moleküllerinin 5' uçlarına bağlanır. Bu RNA molekülleri rRNA, tRNA, mikroRNA, siRNA, snRNA' ları ve fonksiyonları henüz belli olmayan diğer RNA transkriptlerini içermektedir. Etiketleme seçiciliğinden dolayı, bu yöntemde, genom transkriptlerinin karmaşık dizileri olan mRNA' nın sebep olduğu, düşük yanlış pozitif hibridizasyon sinyalleri meydana gelir. Bu yöntem, RNA hedef amplifikasyonu olmadan direkt izole edilen RNA' yı kullanır ve sonuçta hücrel mikroRNA molar oranını yansıtır, böylece hibridizasyon sinyallerin güvenilirliği sağlanmış olur. Bir mikroRNA mikroarrayi genel olarak; 1) total RNA izolasyonu 2) mikroRNA işaretlenmesi ve temizlenmesi 3) mikroRNA' nın mikroRNA problemleri ile tespit edilen arraye hibridizasyonu 4) yıkamalar ve görüntüleme basamaklarından oluşur.

##### **1.2.4.1. Mikroarray teknolojisinin avantajları**

Gen ifadesi modellerinin genel bir görüntüsünü elde etmeyi mümkün kılması, belli bir hücre türünün belirli bir ortam için gen ifade profili belirlenip, bu profil farklı hücre tipleri ve farklı çevre koşullarındaki gen ifadesi profilleriyle bu yöntemle karşılaştırılabilmesi, kısa sürede ve oldukça pratik olarak birkaç bin genin analizinin

mümkün olması, az sayıda deney yapılması ve güvenilir olması avantajlarının arasında sayılabilir.

#### **1.2.4.2.Mikroarray teknolojisinin dezavantajları**

Tüm deney düzeneği nükleik asit hibridizasyon yöntemine bağlıdır ve yüksek oranda benzerlik gösteren diziler problem yaratabilir. Bu nedenle mikroarrayden elde edilen veriler klasik gen ekspresyon analiz yöntemleriyle doğrulanmalıdır. Ayrıca tüm mikroarray deneylerinin aynı hassasiyette olmayışı, ekspresyondaki küçük değişikliklerin analizde fark edilemeyecek boyutta olması, birbirinden farklı çipler kullanılarak yapılan deneylerin birbiriyle karşılaştırılmasında yaşanan zorluklar, optimizasyon ve standardizasyon sorunları karşılaşılan problemlerden birkaçıdır.

#### **1.2.5. Beyin Tümörü Hücre Modelleri**

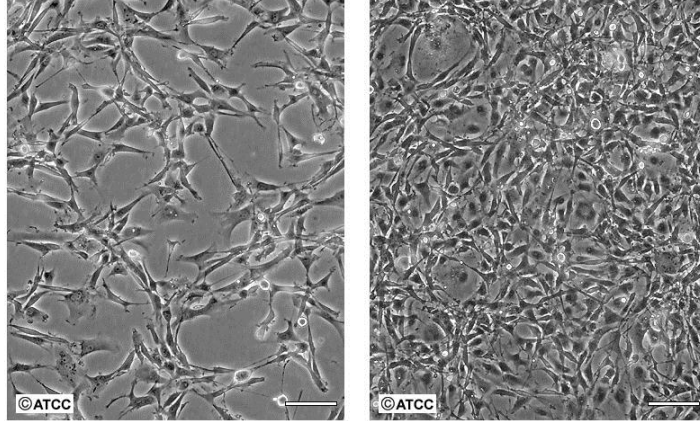
Hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve in vitro kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre hattı kullanımının bir takım avantajları bulunmaktadır. Muamele edilmeleri kolaydır ve sınırlı koşullarda bile limitsiz üreyebilme yeteneğindedirler. Ayrıca, yüksek derecede homojenite gösterirler ve donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılabilir hale getirilebilirler. Ancak, bir takım dezavantajları da bulunmaktadır. Hücre hatları sürekli kültürde genotipik ve fenotipik sapmalara eğilimlidirler. Ayrıca, alt kültürler oluşabilir ve zaman içerisinde popülasyonda bulunan daha hızlı büyüyen ve spesifik klonların seçimiyle fenotipik değişikliklere neden olabilirler.



Bu çalışmada U-87MG, U-118MG ve LN-18 hücre hatları çalışılmıştır (75).

**U-87 MG Hücre Hattı** (Şekil 25)

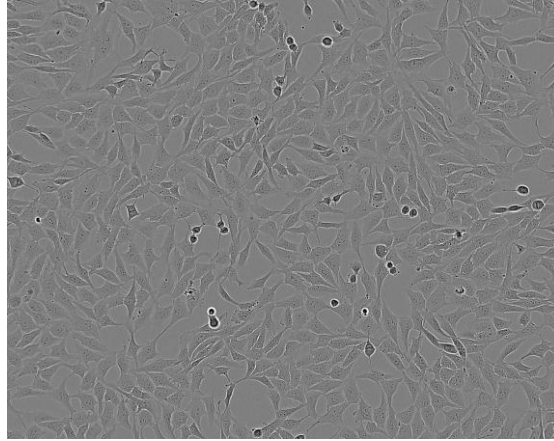
<b>Organizma:</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Yaş:</b>	44
<b>Cinsiyet:</b>	Bayan
<b>Etnik köken:</b>	Beyaz Irk
<b>Organ:</b>	Beyin
<b>Büyüme Özelliği:</b>	Adheren
<b>Morfoloji:</b>	Epitelyal
<b>Hastalık:</b>	Glioblastom, astrositom
<b>Tümör derecesi:</b>	2007'de derece IV olarak sınıflandırıldı
<b>Morfoloji:</b>	Epitelyal
<b>Tumorigenik:</b>	Evet
<b>Antijen ekspresyonu</b>	Kan tipi A, Rh+
<b>Sitogenetik Analiz:</b>	Hücrelerin % 48' inde rastlanan 44 kromozoma sahip hipodiploid insan hücre hattıdır. Yüksek kromozom düzenlenme derecesi % 5,9'dur. 12 markır der(1)t(1;3) (p22;q21), der(16)t(1;16) (p22;p12), del(9) (p13) ve başka 9 tane dahil olmak üzere tüm hücreler için ortaktır. Birçok hücrede der(1) markırı 2 kopyaya sahiptir. Normal X'ten sadece 1 kopya vardır. N1,N6 ve N9 bulunamadı.
<b>İzoenzimleri:</b>	AK-1,1 , ES-D, 1, G6PD, B, GLO-I,1, Me-2,1, PGM1,2, PGM3,1



**Şekil 25.** U-87 MG Hücre Hattı (ölçek çubuğu: 100µm)

## U-118 MG Hücre Hattı (Şekil 26)

<b>Organizma:</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Yaş:</b>	50
<b>Cinsiyet:</b>	Erkek
<b>Etnik köken:</b>	Beyaz Irk
<b>Organ:</b>	Beyin
<b>Büyüme Özelliği:</b>	Adheren
<b>Morfoloji:</b>	Karışık
<b>Hastalık:</b>	Glioblastom, astrositom
<b>Tümör derecesi:</b>	2007’de derece IV olarak sınıflandırıldı
<b>Tumorigenik:</b>	Evet
<b>Antijen ekspresyonu</b>	Kan tipi A, Rh+; HLA Aw24, A28, B12, Bw47
<b>DNA Profili</b>	Amelogenin: X,Y
<b>(STR):</b>	CSF1PO: 11,12, D13S317: 9, D16S539: 12,13, D5S818: 11, D7S820: 9, THO1: 6, TPOX: 8, vWA: 18
<b>İzoenzimleri:</b>	AK-1, 1-2, ES-D,1, G6PD,B, GLO-I, 1-2, Me-2, 1, PGM1, 2, PGM3, 2



Şekil 26. U-118 MG Hücre Hattı

## LN-18 Hücre Hattı:

<b>Organizma:</b>	Homo sapiens
<b>Doku:</b>	serebrum; sağ temporal lob
<b>İzolasyon Tarihi:</b>	1976
<b>Tümör derecesi:</b>	Derece IV
<b>Hastalık:</b>	Glioblastom; gliom
<b>Hücresel Ürünler:</b>	Fibronektin
<b>Yaş:</b>	65
<b>Cinsiyet:</b>	Erkek
<b>Etnik köken:</b>	Beyaz
<b>Organ:</b>	Beyin

<b>Büyüme Özelliği:</b>	Adheren
<b>Morfoloji:</b>	Epitelyal
<b>Tumorigenik:</b>	Evet
<b>Antijen ekspresyonu</b>	HLA A2, A9, B5, BW35, DRW3,
<b>DNA Profili</b>	Amelogenin: X,Y
<b>(STR):</b>	CSF1PO: 12, D13S317: 12,13, D16S539: 11,13, D5S818:11,13, D7S820: 8,10, THO1: 9, TPOX: 8, vWA: 17,18
<b>Onkogen:</b>	p53 + (mutasyona uğramış, TGT (Cys) --> TCT (Ser) kodon 238'de mutasyon), PTEN + (yabanıl tip), p16 - (delete), p14ARF - (delete)

## BÖLÜM II

### 2.1. GEREÇ VE YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda 2007-2011 yılları arasında beyin tümörü tanısı almış 50 olgu (32 GBM, 10 DA ve 8 AO) çalışıldı. Tümör fenotipine neden olan miRNA ekspresyon değişimleri mikroarray yöntemi ile belirlendi.

#### 2.1.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında ve Moleküler Çalışmalarda Kullanılan

##### Cihazlar ve Kimyasallar

**Tablo 5:** Kullanılan Cihazlar

Adı/Modeli	Marka
Steril kültür kapları	Corning
Laminar Air Flow	Hera Safe Heraeus
CO <sub>2</sub> ' li inkübatör	Thermo Electron Corporation Hepa Class 100
Inverted mikroskop	Olympus
Işık mikroskobu	Olympus
Santrifüj	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Soğutmalı Santrifüj	IEC MultiRF thermo
Otomatik mikropipetler (10-1000µl)	Eppendorf
NanoDrop ND-1000	Thermo
-86°C Derin Dondurucu	Revco
-20°C Derin Dondurucu	Vestel
Falkon tüp (15 ml, 50ml)	Corning
Neubauer Lam	Marienfeld
Disposable pipetler (5, 10, 25 ml)	Costar
+4 °C Buzdolabı	Vestel

Tablo 5' in devamı

Adı/Modeli	Marka
TC-300 Thermocycler	Techne
Bio TDB-120 Kuru ısı bloğu	Biosan
2100 Bioanalyzer	Agilent
RT Analyzer	Geniom
Nimblegen MS 200 Array Tarayıcı	Roche
miRNA Biochip	GenoExplorer
HX1 mikser	Nimblegen
Nimblegen HS12 Hibridizasyon fırını	Roche
NimbleGen Mikroarray kurutucu	Roche

Tablo 6: Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Marka
BIOAMF Medyum	Biological Industries, Israel
DMEM Medyum	Biological Industries, Israel
İnaktif Fötal Sığır Serumu	Biological Industries, Israel
Penisilin/ Streptomisin	Biological Industries, Israel
L-glutamin	Biological Industries, Israel
Trypsin	Biological Industries, Israel
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
Tripan Mavisı Boyası	Sigma Chemical Co., St Louis Missouri
DNase/ RNase free su	Fermentas
Kloroform	Merck
Etanol	Merck
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
<i>miRNeasy Kiti</i>	Qiagen
Bioanalyzer ve RNA 6000 Nano Assay Reagent Kit	Agilent
GenoExplorer™ miRNA Full Kit	GenoSensor Corporation
RNaseZAP	Ambion

### 2.1.2. Olgu ve Hücre Hatları

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı' nda 2007-2011 yılları arasında beyin tümörü tanısı almış 50 (19K, 31E) olgu çalışıldı. Tez çalışmasına katılmayı kabul etmiş, gönüllü onam formu imzalamış olgulardan tanı amaçlı rutin biyopsi uygulamaları sırasında veya operasyon ile rezeke edilen tümörden tümör örneği alındı. Tümör örneklerinin Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji

Anabilim Dalı' na transferi 15 ml' lik falkon tüplerde bulunan serum içermeyen DMEM medyum içerisinde operasyonun hemen akabinde gerçekleştirildi.

Pozitif kontrol olarak U-87 MG (insan glioblastom grade 4), LN-18 (insan glioblastom grade 4), U-118 MG (insan glioblastom grade 4) hücre hatları kullanıldı.

### **2.1.3. Tümör Derece ve Evresinin Belirlenmesi**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı' nda alınan 50 tümör dokusu, çalışılacak tümör örnekleri arasındaki heterojenitenin bertaraf edilmesi amacıyla 2 eşit parçaya ayrıldı. Parçalardan biri, Patoloji Anabilim Dalı' nda eş zamanlı olarak tümörün tipi ve derecesini belirlemek üzere histopatolojik olarak değerlendirildi.

### **2.1.4. Tümör Hücre Kültürü**

#### **2.1.4.1. Tümör Hücrelerinin Kültür Kaplarına Ekimi**

Mekanik yöntemle küçük parçalara ayrılan doku parçası, 25 cm<sup>2</sup>' lik hücre kültür kabına (flask) ekildi. Hücrelerin in vitro koşullar altında yaşayabilmeleri, büyüyebilmeleri ve proliferasyonu için BIOAMF-1 (Biological Industries), BIOAMF-1 supplement, 2mM L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin bileşiminden oluşan uygun kültür ortamı kullanıldı. Hücrelerden yeterli üreme elde edilene kadar 37°C' de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>' li etüvde inkübe edildi. Hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlendi.

#### 2.1.4.2. Tümör Hücrelerinin ve Hücre Hatlarının Hücrelerinin Pasajlanması

Yeterli üreme gözlenen flasklardaki hücreler, hücre sayısını artırmak amacıyla 75 cm<sup>2</sup> lik flasklara pasajlandı. Beyin tümör hücreleri ve hücre hatları hücreleri monolayer hücrelerdir ve hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Bu nedenle,

- Flasklarda bulunan ortam döküldü ve flasklar bir kez serumsuz ortam kullanılarak yıkandı.
- Daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml tripsin-EDTA (%0,25-%0,05 v/v) solüsyonu ilave edildi. 3-4 sn bekletildikten sonra tripsin uzaklaştırılarak flasklar 5 dk boyunca inkübatörde bekletildi.
- Inkübatörden çıkan flasklar inverted mikroskopta incelendi ve tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.

Yukarıdaki 3 işlem tripsinizasyon olarak adlandırılmaktadır

- Flasklarda bulunan tüm hücreler yapıştıkları flask yüzeyinden kalktıktan sonra, üzerine 10 ml serumlu ortam ilave edildi.
- Bu hücre-ortam karışımı 15 ml' lik falkon tüplere aktarıldı ve 2500 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası falkon tüp içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücrelerin üzerine 10 ml BIOAMF-1 medyum eklenip 2 adet 75 cm<sup>2</sup> lik flaska eşit olarak bölündü.
- Flasklar üzerine 10 ml daha medyum eklenerek pasajlama işlemi tamamlanmış oldu.

- Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve proliferasyonları sağlandı.

#### **2.1.4.3. Tümör Hücrelerinin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)**

- Flasklarda bulunan hücreler öncelikle tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırıldı.
- Flasklarda bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra, üzerine 10 ml serumlu ortam ilave edildi.
- Hücreler 15 ml' lik falkon tüplere alınarak 2500 rpm' de 5 dk süre ile santrifüj edildi.
- Bu sırada 9:1 oranında serum: DMSO karışımından oluşan ortam buz üzerinde hazırlandı.
- Santrifüj sonrası falkon tüp içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüpler buz üzerine alındı. Falkon tüplerde bulunan hücreler üzerine 800 µl serum-DMSO karışımı eklenerek resüspanse edildi.
- Buz içerisinde bulunan kriyotüpler içerisine bu karışım aktarılarak -86°C'ye kaldırıldı.

#### **2.1.4.4. Dondurulmuş Tümör Hücrelerinin Çözdürülmesi**

- -86°C' de kriyotüpler içerisinde bulunan dondurulmuş hücreler oda ısısına alındı.
- DMSO' nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunmaktadır. DMSO' dan zarar görme sürecisini azaltmak amacıyla kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edildi. Pastör pipeti yardımıyla karıştırılarak hücreler 15 ml' lik falkon tüp içerisine alındı.



- Falkon tüp içerisine toplam hacim 15 ml olacak Şekilde besi ortamı ilave edilerek 2500 rpm'de 10 dk santrifuj edildi.
- Santrifuj sonrası falkon tüp içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler üzerine 15 ml besi ortamı eklendi, pastör pipeti yardımıyla karıştırıldı ve 2500 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası falkon tüp içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve ken hücrelerin üzerine 15 ml besi ortamı eklenerek 75 cm<sup>2</sup> lik flasklara alındı.
- Flasklar, 37 °C' de % 95 nem ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.
- 48 saat sonra remeye baŐlayan hücrelerin ortamları yenilendi. Yaklaşık 1 hafta sonra hücreler bütün flask yüzeyini kapladı. Hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapıldı.

#### **2.1.4.5. Tümör Hücrelerinin ve Hücre hatlarının Canlılığının Belirlenmesi**

Hücre canlılığının belirlenmesinde, tripan mavisi canlılık boyası testi uygulandı. Tripan mavisi boyası sadece l hücrelerin membranlarından geçebilir. Her bir muamele edilen grubun yaŐama yüzdesi l hücrelerin (mavi) ve canlı hücrelerin (boya almamıŐ) sayılmasıyla belirlenir (Şekil 27). Analiz edilen parametre; hasarlı, sızıntı yapan plazma membranıdır. Bu testin avantajları arasında ışık mikroskobu ile canlı hücrelerin ölülerden ayırt edilmesinde kullanılan standart bir metot olması, hızlı ve ucuz olması, total hücre popülasyonundan çok küçük bir hacmin test analizi için gerekli olması sayılabilir.

Sayım için en sık kullanılan yöntem Neubauer hemositometresidir ve iki

eşdeğer bölmeye sahiptir (Şekil 28). Sayma odacığının derinliği 0,1 mm' dir. Hücre süspansiyonu, odacığa mikropipetler yardımıyla aktarılır. Mevcut hücre sayısına göre hücreler, karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde sayılır. Sol ve üst üçlü çizgilerdeki hücreler sayıma dahil edilir. Bu bölmelerin alanı 1 mm<sup>2</sup> dir. Böylece hacmi 0,1 mm<sup>3</sup> olur. Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N):

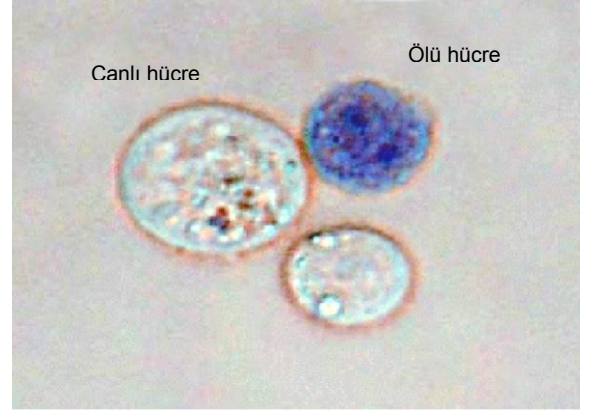
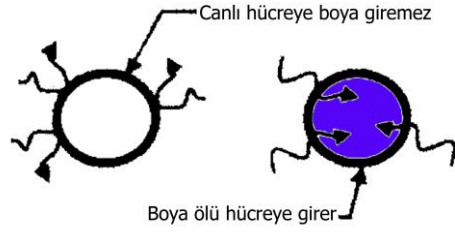
$N=0,1\text{mm}^3$  te mevcut hücre sayısı

1 ml yani 1cm<sup>3</sup> teki hücre sayısı =  $N \times DF \times 10^4$  olur.

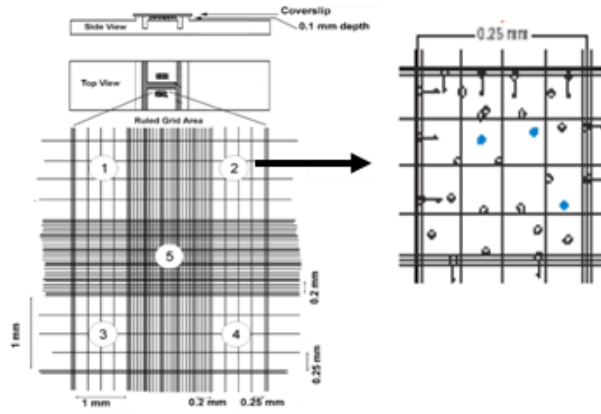
DF=Dilusyon Faktörü

- Tümör hücreleri ve hücre hatları monolayer hücreler oldukları için ilk olarak tripsinizasyon işlemi yapıldı.
- Tripsinizasyon işleminden sonra hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak 96 gözlü plate' lere aktarıldı ve 50 µl tripan mavisi boyası ile karıştırıldı.
- Canlı ve ölü hücreler Neubauer lamda sayıldı.

Tripan mavisi boyası canlı hücreler tarafından metabolize edildi ve hücre dışına atıldı. Bu nedenle, canlı hücreler beyaz renkte görüldü. Ölü hücreler ise, tripan mavisini metabolize edemedikleri için maviye boyandılar.



Şekil 27. Eksklüzyon boya prensibi



Şekil 28. Neubauer hemositometresi

## 2.1.5. miRNA Mikroarray Analizi

### 2.1.5.1. Total RNA İzolasyonu

miRNA profillemesi için kültüre edilen tümör hücrelerinden ve hücre hatları hücrelerinden küçük RNA' ları (örneğin miRNA) da içeren total RNA izolasyonu için, 18 nükleotidin üzerindeki bütün RNA' ları saflaştırabilen miRNeasy Kiti kullanıldı.

Kit; fenol/ guanidinin tiyosiyanat' tan oluşan monofazik bir solüsyon (QIAzol Lysis Reagent) ile hücrelerin parçalanmasına ve total RNA' nın silikamembran

kolonla saflaştırılması temeline dayanmaktadır. RNA içeriği bilinmeyen hücrelerde kit ile izolasyon için en fazla  $1 \times 10^7$ , en az  $1 \times 10^5$  hücre kullanıldı. Bu yüzden hücreler sayılarak başlangıç materyalinin miktar kantitasyonu gerçekleştirildi.

- Flaskta tek bir katman halinde büyüyen hücreler ( $1 \times 10^7$ ) tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldıktan sonra üzerlerine 10 ml ortam eklendi ve içerik 15ml' lik falkon tüpe aktarılıp 2500 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Çökmüş olan hücreler üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi ve pipetaj ile görünür hiçbir hücre pellet yığını kalmayınca kadar karıştırıldı.
- Hücrelerin patlatılıp RNA eldesinin iyi olması için homojenleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlem için "Qiasredder" tüp kullanıldı. Qiazol ve hücre karışımının hepsi "Qiasredder" tüp içine aktarıldı ve 13000 rpm' de 2 dk santrifüj edildi.
- "Qiasredder" tüp içersindeki homojenatlar 5 dk. oda sıcaklığında (15–25°C) inkübe edildi.
- Kolon atıldı ve karışımın üzerine 140 µl kloroform eklenerek tüpün kendi kapağı kapatıldı ve bir sonraki aşamadaki faz ayrımı için 15 sn. çalkalandı.
- Homojenatların bulunduğu tüpler tekrar oda sıcaklığında (15–25°C) 2-3 dk inkübe edildi.
- Daha sonra 4°C' de 13000 rpm' de 15 dk santrifüj edilerek örneklerin 3 faza ayrışması sağlandı: En üstte RNA içeren renksiz sulu faz (hacmi yaklaşık 350 µl), ortada beyaz ara katman (interfaz) ve en altta kırmızı organik fazdır.

- Renksiz sulu faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldıktan sonra hacminin 1,5 katı kadar %100' l k etanol (~525  l) eklendi ve pipetaj ile tamamen karıştırıldı.
-  rnek karışımının 700  l' si 2ml' lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında (15–25 C) 13000 rpm' de 15 sn. santrifüjlendi. Elüsyon döküldükten sonra filtre aynı toplama tüpüne yerleştirildi ve kalan karışım tekrar filtrelerin üzerine eklenip tekrar oda sıcaklığında 13000 rpm' de 15 sn. santrifüjlendi.
- Elüsyon atılarak aynı toplama tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 350  l Buffer RWT eklendikten sonra 13000 rpm' de 15 sn. santrifüj edildi.
- 10  l DNase 1 stok solüsyonu ve 70  l Buffer RDD küçük bir ependorf tüp  çerisinde karıştırıldı.
- Santrifüj sonrası elüsyon atılarak aynı toplama tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 10  l DNase 1 stok solüsyonu+70  l Buffer RDD karışımı eklendi ve oda sıcaklığında (15–25 C) 15 dk. inkübe edildi.
-  nk basyon sonrası kolon üzerine 350  l Buffer RWT eklendi ve 13000 rpm' de 15 sn. santrifüj edildi.
- Elüsyon atılarak aynı toplama tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 500  l Buffer RPE tamponu eklendi ve 13000 rpm' de 15 sn. santrifüj edilerek yıkandı. Elüsyon atılarak kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildikten sonra yıkama işlemi aynı Şekilde 500  l Buffer RPE ile 13000 rpm' de 2 dk. santrifüj edilerek tekrarlandı.
- Elüsyon atılırken kolon el syonla temas etmeyecek Şekilde yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Herhangi bir yıkama tampon veya elüsyon artığını elimine etmek için yeni toplama tüpü içine yerleşik kolon, en yüksek hızda 1 dk. santrifüj edildi.

- Total RNA' nın (küçük RNA' ları da içeren) elüsyonu için kolon 1,5 ml' lik bir eppendorf tüpe yerleştirildikten sonra 40 µl RNase-free su direkt olarak membran üzerine eklenerek 13000 rpm' de 2 dk. santrifüj edildi.
- Elde edilen elüsyon miRNA gibi küçük RNA' ların da yer aldığı total RNA' yı içermektedir.
- \*İzolasyonu yapılan RNA' lar -70<sup>0</sup>C' de degradasyon olmadan 1 yıl saklanabilir.

#### **2.1.5.1.1. RNA miktar ve saflıklarının ölçümü**

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260/280 nm ve 230/260 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçümler her bir örnekten 1-1,5µl kullanılarak Nanodrop (Thermo Scientific) cihazında gerçekleştirildi. İzole edilen RNA' ların saflığı 230, 260 nm ve 280 nm' deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilerek, ideal saflıkta kaliteli RNA' nın 10 mM Tris·Cl (pH 7.5) içindeki  $A_{260}/A_{280}$  ve  $A_{230}/A_{260}$  absorbans oranının 1,9-2,1 olması beklenmektedir.


#### **2.1.5.1.2. RNA' ların kalite kontrolü**



Nanodrop'la spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA' nın yeterli moleküler ağırlığa sahip olduğunun doğrulanması ve degradasyonunun kontrolü için Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi kullanıldı.

Analizler 250 ng total RNA örneği ile Agilent Bioanalyzer ve RNA 6000 Nano Assay Reagent Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Prensip, Agilent RNA kitleri RNA fragmentlerinin analizleri için dizayn edilen çip ve reaktifleri içermektedir. Her RNA

çipi, nükleik asit fragmanlarını onların boyutlarına göre elektroforetik olarak ayıran birbirine bağlı mikrokanallar içermektedir. Jel görüntüsünde 28S ve 18S ribozomal bantları keskin bir şekilde görülmesi gerekmektedir. RNA bütünlük katsayısı (RIN)>7 olmayan ve degradasyon görülen örnekler çalışma dışı bırakılarak işaretleme ve hibridizasyon aşamalarına dahil edilmedi.

#### **2.1.5.1.2.1. Kalite Kontrol Protokolü**

- Çip çalışma istasyonu kuruldu.
- Jel hazırlandı.
  - 550 µl RNA 6000 Nano jel matriks filtreli tüpe aktarıldı.
  - Oda sıcaklığında 1500 rcf' de 10 dk santrifüj edildi.
  - 0,5ml RNase-free mikrosantrifüj tüplerine 65 µl filtre edilmiş jel alikuotlandı (alikuotlanan jel 4 hafta içinde kullanılmalıdır).
- Jel-boya karışımı hazırlandı.
  - RNA 6000 Nano boya konsantresi oda sıcaklığında 30 dk ekilibre edildi.
  - RNA 6000 Nano boya konsantresi 10 sn vortekslendi, kısa santrifüj edildi ve 65µl filtre edilmiş jel üzerine 1 µl eklendi.
  - Karışım vortekslendi. Oda sıcaklığında 13000 rcf' de 10 dk santrifüj edildi (Karışım aynı gün içinde kullanılmalıdır).
- Jel-boya karışımı yüklendi.
  - Çip çalışma istasyonuna yeni bir RNA 6000 Nano çip yerleştirildi.
  - 9 µl jel-boya karışımı  işaretli kuyucuğa pipetlendi.
  - Enjektör pistonununun 1 ml hizasında olduğundan emin olundu ve sonra çip çalışma istasyonu kapatıldı.

- Piston klips tarafından tutulana kadar bastırıldı.
- 30 sn beklendi ve klips serbest bırakıldı.
- 5 sn beklendi ve piston 1ml hizasına geri çekildi.
- Çip çalışma istasyonu açıldı ve 9 µl jel-boya karışımı G işaretli kuyucuklara pipetlendi.
- Agilent RNA 6000 Nano markırı yüklendi.
  - 5 µl RNA 6000 Nano markır 12 örnek kuyucuğuna ve  kuyucuğuna pipetlendi.
- Ladder ve örnekler yüklendi.
  - 1 µl ladder  kuyucuğuna pipetlendi.
  - 1 µl örnek 12 örnek kuyucuğuna pipetlendi.
  - Çip IKA vorteks cihazındaki adaptöre yatay olarak koyuldu ve 2400 rpm’de 1 dk vortekslendi.
  - Çip Agilent 2100 biyoanalizör cihazına yerleştirildi ve cihaz çalışmaya bırakıldı.

#### **2.1.5.2. miRNA Profillemesi**

Beyin tümörü tanısı almış olguların miRNA mikroarray ile ekspresyon profili belirlenmesi amacı ile miRBase 16.0’ yı tamamen kapsayan, ek olarak prekürsör ve olgun miRNA’ ları da içeren problara sahip olan “GenoExplorer miRNA Full Kit” plakaları kullanıldı.

Her bir prob plaka üzerine triplike spotlanmıştır. Arrayin normalizasyonu ve kalite kontrolü, pozitif ve negatif kontrol problemleri ile yapılmaktadır. İşaretleme



sistemi küçük RNA' nın 5' ucunun biotin ile işaretlenmesine dayanır. Biotinle işaretlenmiş miRNA örnekleri GenoExplorer miRNA Biochip üzerine hibridize edildi ve Nimblegen Array Scanner ile biyoçip tarandı. Daha sonra biyoinformatik analiz yapıldı.

#### **2.1.5.2.1. miRNA' ların İşaretlenmesi**

Total RNA' nın işaretlemesi için "GenoExplorer miRNA labeling kit" kullanıldı. miRNA' lar 5' uçlarından biyotin ile işaretlendi. Kitin seçici özelliği standart 3' ucundan işaretleme yerine, başlık yapısı içermeyen RNA' ların 5' ucundan işaretleme yapmasıdır. Bu sayede sağlam mRNA' lar işaretlenmezken, 5' başlık yapısı bulunmayan rRNA, tRNA, smallRNA, miRNA, siRNA ve snRNA' lar işaretlenmektedir. Streptavidin bağlı boya, kit içinde bulunmaktadır ve hibridizasyon sonrası kullanıldı. İşlem için 2,5-10 µg total RNA kullanıldı.

##### **2.1.5.2.1.1. İşaretleme Protokolü**

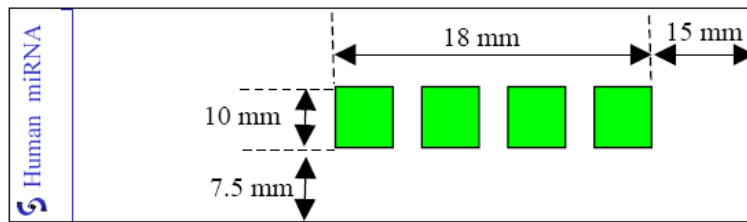
- Buffer L buz üzerinde çözüldü. Herhangi bir kalıntı olması durumunda solüsyon 37 °C' de altüst ederek homojenizasyon sağlandı.
- Buffer L çözüldükten sonra vortekslendi ve santrifüjlendi ve tek seferde kullanılacak miktarlarda alikuotlandı (bir örnek için 7 µl ).
- miRNA işaretleme reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı. Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı ve viskoz Buffer L yavaşça pipetlendi.

Reaktif	Hacim ( $\mu$ l)
Buffer L	7,0
RNA (2,5-10 $\mu$ g)	Ayarlanır
RNAase-free su	Ayarlanır
Enzyme L	0,5
Toplam	20,0

- Reaksiyon karışımı pipetle alt-üst edilerek karıştırıldı.
- 20 °C' de 3 saat, inkübe edildi.
- 75 °C' de 20 dk inkübe edilerek, enzim inaktive edildi.
- Hibridizasyon aşamasına kadar buzda muhafaza edildi.
- \*İşaretli örnekler daha sonra kullanılmak üzere -70 °C' de saklanabilir.

#### 2.1.5.2.2. Hibridizasyon

GenoExplorer miRNA Biochip, 25 mm x 75 mm ölçülerinde cam slaytlardan oluşmaktadır. Çipler DNA prob bağlanması için kullanılan patentli polimerler ile kaplıdır. Mikroarray analizi için biyoçipe, amin-modifiye DNA oligonükleotid proplar kovalent olarak bağlanmıştır. İnsan mikroarrayi çipinin yerleşimi Şekil 29' da gösterilmiştir.



**Şekil 29.** İnsan mikroarrayi çipinin yerleşimi

Biyotinle işaretlenmiş miRNA örnekleri biyoçipe yüklendi ve hibridizasyon gerçekleşti. Ardından streptavidin ile muamele edildi ve ışımalar array tarayıcı ile toplandı.

### 2.1.5.2.2.1. Hibridizasyon Protokolü

- İşaretlenmiş RNA örnekleri kullanılacak Nimblegen HX1 mikserin hacmine uygun orandaki 2X hibridizasyon solüsyonu ve su ile karıştırıldı.
- Örnekler 95 °C' de 5 dk. inkübe edilerek denatüre edildi.
- Santrifüjlenerek soğutuldu.
- HX1 mikser, biyoçip üzerine yerleştirildi.
- Örnekler HX1 mikser içine yavaşça pipetlendi. Hava kabarcığı olması durumunda, kabarcıklar yavaşça itirilerek uzaklaştırılmaya çalışıldı. Mikserin yükleme bölümü kapatıldı.
- Biyoçip 42 °C' deki Nimblegen hibridizasyon fırını içerisine yerleştirildi ve karıştırma modu açıldı.
- 42 °C' de 16-20 saat inkübe edildi.
- Hibridizasyonun ardından biyoçip, hibridizasyon fırınından uzaklaştırıldı ve 42 °C' deki Wash Buffer 1 içinde yavaşça sallandı ve HX1 mikser çıkarıldı.
- Biyoçip, içerisinde oda sıcaklığındaki Wash Buffer 1 olan yeni bir kap içine alındı. 5 dk. periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.
- Biyoçip, içerisinde oda sıcaklığındaki Wash Buffer 2 olan yeni bir kap içine alındı. 30 sn. periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.
- Yıkanan biyoçip NimbleGen mikroarray kurutucuda 3 dk. kurutuldu.
- 1:250 oranında dilüe edilmiş SA-S boya solüsyonu, biyoçip üzerine yavaşça pipetlendi.
- Biyoçip üzerine boyutuna uygun olarak hazırlanan parafilm örtüldü. Hava kabarcığı olması durumunda, kabarcıklar yavaşça itirilerek uzaklaştırılmaya

çalışıldı.

- Biyoçip 25 °C' deki ısı bloğu yerleştirildi.
- 25 °C' de 30 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından biyoçip ısı bloğundan uzaklaştırıldı ve Wash Buffer 1 içinde yavaşça sallandı. Parafilm uzaklaştırıldı.
- Biyoçip, içerisinde oda sıcaklığındaki Wash Buffer 1 olan yeni bir kap içine alındı. 5 dk. periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.
- Biyoçip, içerisinde oda sıcaklığındaki Wash Buffer 2 olan yeni bir kap içine alındı. 30 sn. periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkadı.
- Yıkanan biyoçip NimbleGen mikroarray kurutucuda 3 dk. kurutuldu.

#### **2.1.5.2.3. Mikroarray Analizi**

Biyoçipin analizi nimblegen array tarayıcı kullanılarak yapıldı. Biyoçipe uygun PMT ayarları yapıldı. Tarayıcı SA-S boyasının sinyaline uygun olan 635 nm dalga boyuna ayarlandı. Data analizi için biyoçip ile birlikte gelen yada genosensorcorp sitesinde mevcut olan array listesi .txt ve .gal dosya formatında bulunmaktadır. Bu dosyalarda tüm problemlerin yeri işaretlenmiştir. Pozitif kontrol problemleri arrayin sol köşesindedir. Gal file veya TXT dosyaları scanner içerisine eklenebilir.

#### **2.1.5.2.3.1. Mikroarrayin Değerlendirilmesi**

NimbleGen Array tarayıcıda okutulan mikroarrayin analizi GenePix Pro v7.0 (moleculardevices) yazılım programında gerçekleştirildi. Tümör örneklerine ait ham veriler (mikroarraye ait görüntüler) öncelikle görsel olarak kontrol edildi ve hesaplamaların doğruluğu için görüntünün düzgün olmadığı bölümlerin

işaretlenerek hesaplama dışı bırakılması gibi bazı manuel düzeltmeler gerçekleştirildi. Yapılan ilk kontrollerden biri mekansal/uzaysal analizdir. Bu analizle problemlerin sinyal yoğunluklarının çip üzerindeki yerleşimleriyle bağlantılı olup olmadığı kontrol edilerek gerekli düzeltmeler yapıldı.

Ardından mikrodizin çalışmasının doğruluğu için, alınan görüntü verilerinde artefaktların atılarak her bir çipin işlenebilir hale geldiği bir arka plan düzeltmesi yapılmalıdır. Bunun için küresel arka plan normalizasyon (*global background normalization*) metodu kullanılarak mikroarray için hesaplanan genel (küresel) arka plan sinyal yoğunluğu ölçülen her nokta sinyal yoğunluğundan çıkarılarak sinyal yoğunluğu etkin bir biçimde düzeltildi.

Daha sonra her bir dizin için elde edilen görüntü üzerinde normalizasyon yapıldı. Normalizasyon, elde edilen görüntülerde deneysel hatalardan kaynaklanan anormal yoğunluk değerlerinin saptanarak çıkarılması ve her bir örneğin düzenlenmesi için gereklidir. Böylece her bir örnek karşılaştırılabilir hale getirilir. Bunun için “Varyans Stabilize Edici Normalizasyon” yöntemi kullanıldı. Bu yöntem “quantile normalizasyon” metodunu da içermektedir ve bu metod mikrodizin çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan normalizasyon yöntemidir. Normalizasyon sonrasında elde edilen veriler *Box-plot* ve *scatter-plot* grafikleri ile ifade edilerek diffüz astrositom, anaplastik oligodendrogliom ve glioblastoma multiforme grupları birbirleriyle karşılaştırıldı.

Normalizasyondan sonraki aşamada biyolojik replikalar arasındaki tekrarlanabilirlik düzeyinin saptanabilmesi için yapılan, örnekler arası korelasyon ve

oluşan sinyal değerlerinin ölçülmesini de içeren temel istatistiki analizler gerçekleştirildi. Burada temel amaç her bir biyoçip içerisinde mevcut olan miRNA sinyallerinin saptanmasıdır. Genellikle her bir biyoçip içerisinde mevcut olan problemlerin yüzdesi hesaplanır ve her bir prob için bir “*Boolean p*” değeri oluşturulur. Bu değer her bir miRNA'nın var olup olmadığını güvenilir bir şekilde belirten bir değerdir ve biyoçiplerin yüksek hassasiyet seviyesinden dolayı üzerinde bulunan hemen hemen her miRNA saptanabilir.

Bundan sonraki aşamada örnekler benzer sinyal değeri ve biçimlerine göre gruplandırılırlar. Bunun için en yaygın olarak kullanılan hiyerarşik gruplandırma yöntemidir. Tümör örnekleri kendi grupları içerisinde sinyal değerlerine göre tekrardan gruplandırılarak ekspresyon seviyelerindeki bağlantı görsel olarak da ortaya konulurken burada ayrıca beyin tümörüne özgü hiyerarşik gruplandırmaya ait bir ısı haritası-*heatmap* grafiği çıkartıldı.

Ayrıca kalite kontrollerin etkin bir biçimde ortaya konulabilmesi için “*MA plot*” ve “*PCA*” grafikleri de çıkartıldı. Mikrodizin analizlerinde en yaygın olarak kullanılan grafik türlerinden biri olan “*MA plot*” grafiği orijinal olarak iki renkli mikrodizin deneyleri için oluşturulmuş bir grafikdir ve grafikte iki kanalın (mikrodizin üzerinde örnek konulan 8 bölmeden biri) yoğunluklarının oranı (logaritmik düzeyde ifade edilen) her iki kanalın yoğunluklarının ortalamasının fonksiyonu olarak ifade edilmektedir. Bahsi geçen grafikler farklı şekilde eksprese olmuş problemlerin tüm yoğunluk yüzeyinde eşit olarak yayılım gösterip göstermediğini ortaya koyar. Daha detaylandırılacak olursak, bir nokta y ekseninde sıfırdan ne kadar uzaklaşırsa bu noktaları temsil eden problemler o kadar deregüle olmuş demektir. Kullanılan biyoçipler

her ne kadar tek renk dizin-*array*' ler olsa da prensipte bu dizinlere ait "*MA plot*" grafikleri oluşturulması iki renk *array*' lerden farklı değildir. Bunların yanı sıra Ana Bileşen Analiz (*Principal component analysis-PCA*) grafikleri de yüksek biyoinformatik bilgi veren miRNA'ların kombinasyonlarının tanımlanması için kullanıldı.

#### **2.1.5.2.3.2. Mikroarrayin İstatistiksel Değerlendirilmesi**

Diffüz astrositom, anaplastik oligodendrogliom ve glioblastoma multiforme gruplarında farklı şekilde eksprese olan miRNA' lara ait sayısal değerlerin istatistiksel analizi CLC Main Workbench v5.0 (CLC bio) yazılımında gerçekleştirildi.

Tümör gruplarına ait normalize edilmiş miRNA ekspresyon değerlerine Log<sub>2</sub> transformasyonu uygulandı. Grupların ikili karşılaştırılmasında t testi uygulandı. Gruplar arası miRNA ekspresyon değişimlerinde  $\pm 2$  kat ve üzeri olan miRNA' lar değerlendirildi ve ısı haritaları gerçekleştirildi. Üçlü grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyas analizi uygulandı. Mikroarray analiz sonucu elde edilen p değeri için FDR ("False Discovery Rate") düzeltmesi gerçekleştirildi. FDR-p değeri  $> 5 [-\text{Log}(\text{FDR}-\text{p})]$  anlamlı olarak kabul edildi.

Anlamlı miRNA' ların hedefledikleri genler yedi database (DIANA-microT, Targetscan, miRDB, RNA22-HSA, TARGETMINER, PICTAR-VERT ve miRanda) kullanılarak gerçekleştirildi ve yanlış pozitifliği önlemek için en az 3 database' de hedef olarak belirlenen genler alındı.

#### **2.1.5.2.3.2.1 İstatistiksel analiz**

Çalışmamızda tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma v.b.) SPSS v15.0 paket programında yapılmış olup  $p < 0,05$  anlamlı olarak alınmıştır.



## BÖLÜM III

### 3.1. BULGULAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda 2007-2011 yılları arasında beyin tümörü tanısı almış 50 (19K, 31E) olgu çalışıldı. Olguların 19' u kadın olup yaş ortalaması  $50,74 \pm 13,71$  (range 29-73) ve 31 erkek olgunun yaş ortalamaları  $51,77 \pm 12,42$  (range 28-76) olarak saptandı. Tez çalışmasına katılmayı kabul etmiş, gönüllü onam formu imzalamış olgulardan tanı amaçlı rutin biyopsi uygulamaları sırasında veya operasyon ile rezeke edilen tümörden tümör örneği alındı. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda alınan 50 tümör dokusu, çalışılacak tümör örnekleri arasındaki heterojenitenin bertaraf edilmesi amacıyla 2 eşit parçaya ayrıldı. Parçalardan biri, Patoloji Anabilim Dalı'nda eş zamanlı olarak tümörün tipi ve derecesini belirlemek üzere histopatolojik olarak değerlendirildi. Patoloji değerlendirme sonucuna göre 32 olgu glioblastoma multiforme (GBM), 10 olgu diffüz astrositom (DA) ve 8 olgu anaplastik oligodendrogliom (AO) olarak belirlendi. GBM olgularının 15' i kadın olgu olup yaş ortalaması  $55,07 \pm 11,54$  (range 29-73) ve 17 olgu erkek olup yaş ortalaması  $55,82 \pm 12,56$  (range 28-76) idi, DA grubunda 3 kadın [yaş ortalaması  $30,67 \pm 1,53$  (range 29-32)] ve 7 erkek [yaş ortalaması  $41,30 \pm 11,27$  (range 29-59)] ve AO grubunda da 1 kadın [yaşı 46 ve 7 erkek [yaş ortalaması  $47,86 \pm 11,68$  (range 30-60)] olarak belirlendi (Tablo 7).

**Tablo 7.** Olguların demografik ve total RNA değerleri

Olgu No	Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tür	Total RNA	260/280	260/230
1	GF	K	29	GBM	2453,20	2,08	2,18
2	AM	K	42	GBM	282,30	2,08	2,36
3	EY	K	43	GBM	539,50	2,06	2,00
4	FU	K	51	GBM	450,30	2,01	1,77
5	MIK	K	51	GBM	671,50	2,09	2,25
6	NU	K	52	GBM	1004,70	2,08	2,07
7	AK	K	54	GBM	388,50	2,07	3,52
8	FC	K	55	GBM	416,70	2,07	1,30
9	SB	K	56	GBM	371,50	2,05	2,21
10	ZK	K	58	GBM	801,00	2,08	2,15
11	NA	K	61	GBM	893,30	2,09	2,23
12	UA	K	63	GBM	295,70	2,03	1,34
13	MG	K	67	GBM	687,20	2,08	2,25
14	KE	K	71	GBM	973,60	2,11	1,27
15	GIF	K	73	GBM	331,70	2,04	2,16
16	HC	E	28	GBM	879,10	2,03	2,21
17	SMG	E	40	GBM	947,00	2,06	2,18
18	MT	E	43	GBM	1707,00	2,10	2,18
19	YG	E	49	GBM	374,80	2,08	1,60
20	CG	E	50	GBM	980,70	2,08	2,08
21	MS	E	50	GBM	1058,90	2,21	1,45
22	MK	E	53	GBM	900,00	2,10	2,09
23	KA	E	54	GBM	482,80	2,01	1,72
24	RK	E	54	GBM	655,80	2,12	2,08
25	IB	E	55	GBM	491,70	2,07	2,04
26	MhS	E	57	GBM	939,60	2,09	1,44
27	DA	E	63	GBM	1074,00	2,10	2,23
28	MF	E	66	GBM	1197,10	2,09	2,24
29	SE	E	68	GBM	768,70	2,06	2,29
30	MmK	E	71	GBM	876,20	2,22	2,38
31	HE	E	72	GBM	418,20	2,01	1,86
32	SK	E	76	GBM	771,60	2,07	2,10
33	AA	K	46	AO	1010,10	2,10	1,81
34	YK	E	30	AO	1520,50	2,06	2,23
35	NP	E	39	AO	872,00	2,10	2,22
36	RG	E	40	AO	1076,00	2,10	2,20
37	FO	E	50	AO	767,50	2,50	2,37
38	SF	E	57	AO	539,30	2,08	2,07
39	YA	E	59	AO	1249,60	2,10	1,96
40	KE	E	60	AO	774,80	2,09	2,23
41	GI	K	29	DA	2142,6	2,06	2,21
42	FS	K	31	DA	1117,1	2,04	2,23
43	SB	K	32	DA	1998,8	2,09	2,17
44	NY	E	35	DA	839,9	2,08	2,12

Tablo 7' nin devamı

Olgu No	Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tür	Total RNA	260/280	260/230
45	MG	E	36	DA	1584,4	2,08	2,18
46	FG	E	37	DA	749,6	2,11	1,51
47	IK	E	44	DA	853,9	2,09	2,19
48	AD	E	52	DA	557,5	1,99	2,06
49	MsS	E	58	DA	1078,5	2,09	1,96
50	OS	E	59	DA	1295,8	2,08	2,13

Pozitif kontrol olarak U-87 MG (insan glioblastom grade 4), LN-18 (insan glioblastom grade 4) ve U-118 MG (insan glioblastom grade 4) hücre hatları kullanıldı (Tablo 8).

**Tablo 8.** Beyin tümörü hücre hatlarının total RNA değerleri

Hücre HT no	Olgu	Total RNA	260/280	260/230
1	U87-MG	1670,8	2,25	2,37
2	U118MG	1596,1	2,08	1,97
3	LN-18	4514,1	1,58	1,60

Beyin tümürlü olguların eksplant kültürlerinin 4. pasajlarından ve beyin tümörü hücre hatlarından miRNA ekspresyonunu çalışmak için total RNA izole edildi ve gerek miktarları gerekse saflıkları (Tablo 7, 8) mikroarray çalışmak için uygun olarak değerlendirildi.

GBM olgularının miRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde en yüksek ekspresyon gösteren miRNA' lar sırasıyla (Tablo 19) miR-21, miR-23a, let-7a, let-7f, let-7d, miR-23b, miR-100, let-7b, miR-29b, let-7c, let-7e ve miR-99a olarak belirlenmiştir. En yüksek ekspresyon gösteren bu 12 miRNA beyin tümörü hücre hatları (U-87 MG, U-118 MG LN-18) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermeyip benzer ekspresyon profilleri sergilemişlerdir (Tablo 9).

**Tablo 9.** GBM olgularındaki en yüksek miRNA ekspresyonlarının beyin tümörü hücre hatları (GBM HT) ile karşılaştırılması

miRNA	GBM ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-mir-21	22,16	21,56	0,97	0,0700	0,96
hsa-miR-23a	22,09	21,47	0,97	0,0200	1,52
hsa-let-7a	22,01	21,46	0,98	0,0400	1,10
hsa-let-7f	21,91	21,36	0,98	0,0200	1,30
hsa-let-7d	21,88	21,58	0,99	0,1700	0,64
hsa-miR-23b	21,75	21,11	0,97	0,0051	1,70
hsa-miR-100	21,74	21,17	0,97	0,0300	1,22
hsa-let-7b	21,72	21,40	0,99	0,1300	0,74
hsa-miR-29b	21,69	21,46	0,99	0,4300	0,29
hsa-let-7c	21,68	21,29	0,98	0,0800	0,89
hsa-let-7e	21,62	21,33	0,99	0,1100	0,80
hsa-miR-99a	21,60	21,11	0,98	0,0700	0,96

GBM grubunda yüksek eksprese olan miRNA' ların regüle ettiği hedef genlerin geçerliliği kanıtlandığı için hedef genleri belirlenmedi

Çalışmamızda regüle ettiği hedef genlerin geçerliliği kanıtlanmayan miRNA lar 7 veri tabanında (DIANA-microT, Targetscan, miRDB, RNA22-HSA, TARGETMINER, PICTAR-VERT ve miRanda) analiz edildi ve en az 5 veri tabanında ortak olan genlerin beyin tümörü ile ilgili olanların değerlendirilmesi yapıldı.

AO olgularının miRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde en yüksek ekspresyon gösteren miRNA' lar sırasıyla (Tablo 19) miR-21, let-7a, miR-23a, let-7d, let-7f, miR-100, let-7b, miR-99a, let-7c, miR-23b, miR-29b ve miR-29a olarak belirlendi ve GBM grubu miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık göstermedi (Tablo 10). miR-29a' nın regüle ettiği genlerin de geçerliliğinin kanıtlandığı belirlendi.

**Tablo 10.** AO olgularındaki en yüksek miRNA ekspresyonlarının beyin tümörü hücre hatları (GBM HT) ile karşılaştırılması

miRNA	AO ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-21	21,51	20,24	0,94	1,02E-05	4,00
hsa-let-7a	21,35	20,14	0,94	7,14E-05	3,30
hsa-miR-23a	21,21	20,15	0,95	4,94E-06	4,14
hsa-let-7d	20,95	20,25	0,97	0,0009	2,41
hsa-let-7f	20,95	20,04	0,96	4,80E-05	3,40
hsa-miR-100	20,95	19,85	0,95	3,06E-05	3,52
hsa-let-7b	20,87	20,08	0,96	0,0005	2,59
hsa-miR-99a	20,87	19,78	0,95	1,58E-05	3,70
hsa-let-7c	20,77	19,97	0,96	0,0002	2,82
hsa-miR-23b	20,74	19,78	0,95	1,86E-06	4,44
hsa-miR-29b	20,55	20,14	0,98	0,1600	0,60
hsa-miR-29a	20,53	20,18	0,98	0,2300	0,48

DA olgularının miRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde en yüksek ekspresyon gösteren miRNA' lar sırasıyla (Tablo 19) miR-21, let-7d, miR-23a, let-7a, let-7f, let-7b, miR-100, let-7c, miR-29b, let-7e ve miR-99a olarak belirlenmiştir. En yüksek ekspresyon gösteren bu 12 miRNA beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermeyip benzer ekspresyon profilleri sergilemişlerdir (Tablo 11).

**Tablo 11.** DA olgularındaki en yüksek miRNA ekspresyonlarının beyin tümörü hücre hatları (GBM HT) ile karşılaştırılması

miRNA	DA ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-21	22,18	21,69	0,98	0,07	0,85
hsa-let-7d	22,04	21,70	0,98	0,12	0,68
hsa-miR-23a	22,02	21,60	0,98	0,13	0,66
hsa-let-7a	21,96	21,59	0,98	0,14	0,62
hsa-let-7f	21,96	21,49	0,98	0,06	0,89
hsa-let-7b	21,81	21,53	0,99	0,17	0,57
hsa-miR-100	21,74	21,30	0,98	0,06	0,85
hsa-let-7c	21,74	21,42	0,99	0,15	0,60
hsa-miR-29b	21,73	21,59	0,99	0,45	0,25

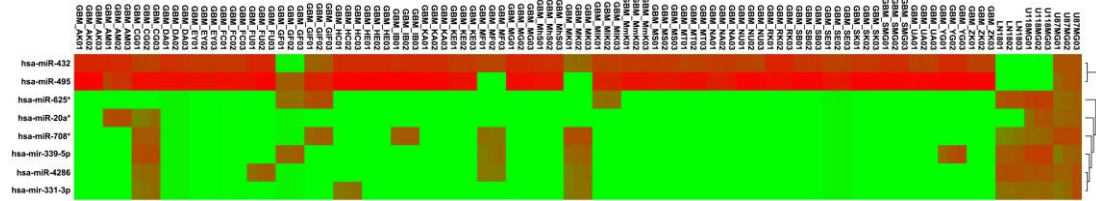
Tablo 11' in devamı

miRNA	DA ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-let-7e	21,65	21,46	0,99	0,25	0,46
hsa-miR-99a	21,64	21,24	0,98	0,09	0,74

GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında miR-495 ve miR-432 ekspresyonları 2 kat anlamlı artma ve miR-708-3p, mir-339-5p ve miR-4286 ekspresyonları 4 kat, mir-331-3p, miR-625-3p ve miR-20a-3p 5 kat azalma gösterdi (Tablo 12 ve Şekil 30).

**Tablo 12.** GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırılması

miRNA	GBM ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-20a-3p	2,41	14,40	-5,97	5,62E-14	10,67
hsa-miR-625-3p	2,74	15,19	-5,54	7,88E-12	8,93
hsa-mir-331-3p	2,70	13,96	-5,18	9,32E-12	8,47
hsa-miR-4286	3,07	14,90	-4,86	2,40E-10	7,74
hsa-mir-339-5p	3,50	15,24	-4,36	5,97E-08	7,39
hsa-miR-708-3p	3,64	14,94	-4,11	1,34E-07	5,49
hsa-miR-432	16,72	8,01	2,08	6,40E-10	5,21
hsa-miR-495	18,84	7,81	2,44	1,44E-07	5,21



**Şekil 30.** GBM tanısı almış olguların, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA ekspresyonlarının ısı haritası

mir-331-3p' nin hedef genleri validedir. Anlamlı olan diğer miRNA' ların regüle ettikleri varsayılan genler Tablo 13' te verildi.

**Tablo 13.** GBM tanısı almış olguların, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA varsayılan hedef genleri

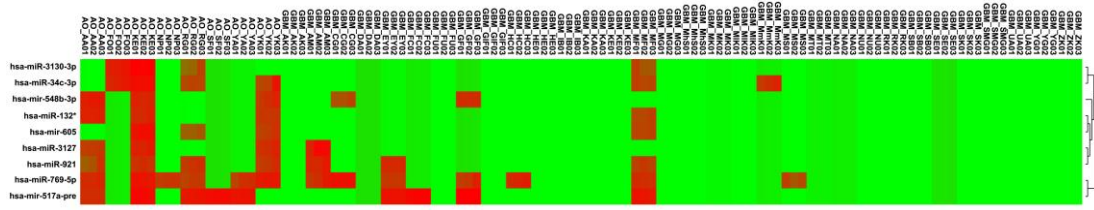
<b>miR-495</b>	NOTCH2, STAT3, ARNT, CDKN2B, GJA1,
<b>miR-432</b>	CDKN2B, CRX, DLD, E2F3, TUBB, IKZF3, FN1
<b>miR-708-3p</b>	CDKN2B, ARPP-19, FRS2, METAP2, ABHD2, PTPRT
<b>mir-339-5p</b>	VCP, VIPR2, SEPT7, NXPH1, APAF1, MPL
<b>miR-4286</b>	C2ORF21, LRRC4, VAMP1, ERO1L, PDE4A
<b>miR-625-3p</b>	ENAM, WASF2, ADAMTS5, SHE, COPA
<b>miR-20a-3p</b>	TOPORS, ADAMTS5, EPHA7, SASH1, GAB1

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında miR-34c-3p, miR-132-5p, mir-605, miR-3130-3p, miR-3127, mir-517a-pre, mir-548b-3p, miR-921 ve miR-769-5p' de anlamlı artma saptandı (Tablo 14 ve Şekil 31).

mir-605, mir-548b-3p ve miR-769-5p' nin regüle ettiği hedef genlerin geçerliliği kanıtlandığı için miR-34c-3p, miR-132-5p, miR-3130-3p, miR-3127, mir-517a-pre ve miR-921' in regüle ettiği varsayılan genler Tablo 15' te verilmiştir.

**Tablo 14.** AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını GBM tanısı almış olgular ile karşılaştırılması

miRNA	AO ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
<b>hsa-miR-769-5p</b>	11,08	3,94	<b>2,78</b>	1,30E-08	5,94
<b>hsa-miR-921</b>	7,63	2,40	<b>3,23</b>	2,24E-07	5,01
<b>hsa-mir-517a-pre</b>	9,67	2,89	<b>3,33</b>	1,58E-07	5,07
<b>hsa-mir-548b-3p</b>	6,73	2,01	<b>3,33</b>	1,89E-07	5,03
<b>hsa-miR-3127</b>	6,56	1,75	<b>3,70</b>	1,76E-08	5,86
<b>hsa-mir-605</b>	6,30	1,63	<b>3,85</b>	2,03E-09	6,52
<b>hsa-miR-3130-3p</b>	6,24	1,61	<b>3,85</b>	2,39E-08	5,82
<b>hsa-miR-34c-3p</b>	7,95	1,96	<b>4,00</b>	4,14E-10	6,84
<b>hsa-miR-132-5p</b>	6,62	1,63	<b>4,00</b>	6,64E-10	6,81



**Şekil 31.** AO tanısı almış olguların, GBM tanısı almış olgular ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA ekspresyonlarının ısı haritası

**Tablo 15.** AO tanısı almış olguların, GBM tanısı almış olgular ile karşılaştırıldığında anlamlı olan miRNA varsayılan hedef genleri

<b>miR-34c-3p</b>	RANBP9, RTN3, PLK4, MAP3K2, KIF3A
<b>miR-132-5p</b>	ADAR, CDKN2B, RAB31, ABHD2, TPPP, CHP
<b>miR-3130-3p</b>	PCNA, NCOA6, DST
<b>miR-3127</b>	FZD4, BCL2
<b>mir-517a-pre</b>	ISL1, ADAM9
<b>miR-921</b>	NAT2, ADD3, DDX6, FOXO1

DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında anlamlı değişim saptanmadı.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında mir-204 ekspresyonunun 6 kat anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Tablo 16 ve Şekil 31). mir-204 regüle ettiği hedef genler validedir.

**Tablo 16.** AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırılması

miRNA	AO ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
<b>hsa-mir-204</b>	2,25	14,59	-6,48	3,48E-08	5,20

DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında 18 miRNA ekspresyonu anlamlı artma ve 7 miRNA ekspresyonu anlamlı azalma gösterdi (Tablo 17 ve Şekil 32). Anlamlı değişim gösteren miRNA'



lardan miR-409-3p, miR-654-3p, mir-214, mir-382, miR-126, mir-155, mir-582-5p, miR-9-3p, miR-96 ve miR-9' ün regüle ettiği hedef genlerin geçerliliği kanıtlanmış olduğundan ve miR-495, miR-432, mir-339-5p ve miR-625-3p regüle ettiği varsayılan hedef genler yukarıda verildiğinden veri tabanlarında incelemesi yapılmadı. Diğer miRNA' lar, miR-154-3p, miR-487b, miR-145-3p, miR-493-5p, miR-136, mir-337-3p, mir-154, mir-369-3p, miR-411 ve mir-381' in regüle ettiği varsayılan genler Tablo 18' de verilmiştir.

**Tablo 17.** DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonlarını beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırılması

miRNA	DA ortalama	GBM HT ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-9	2,90	18,80	-6,48	2,66E-12	10,06
hsa-miR-96	2,77	17,73	-6,41	1,62E-12	10,21
hsa-miR-9-3p	2,76	17,30	-6,26	2,69E-12	10,06
hsa-miR-625-3p	2,50	15,36	-6,14	2,88E-13	10,71
hsa-mir-339-5p	2,67	15,26	-5,71	1,83E-11	9,37
hsa-mir-582-5p	2,72	15,20	-5,60	3,52E-11	9,17
hsa-mir-155	18,15	6,62	2,78	2,34E-08	6,59
hsa-miR-126	16,68	5,72	2,94	3,55E-10	8,29
hsa-mir-381	17,78	5,89	3,03	5,66E-10	8,10
hsa-mir-382	17,19	5,46	3,13	9,55E-12	9,60
hsa-miR-432	17,43	5,49	3,13	7,53E-11	8,90
hsa-miR-411	18,86	5,96	3,13	1,09E-10	8,77
hsa-mir-214	18,66	5,83	3,23	6,28E-12	9,72
hsa-miR-136	18,34	5,68	3,23	5,59E-11	8,99
hsa-mir-337-3p	17,37	5,36	3,23	7,21E-11	8,90
hsa-mir-154	18,83	5,92	3,23	9,62E-11	8,81
hsa-mir-369-3p	18,52	5,71	3,23	2,77E-10	8,38
hsa-miR-493-5p	18,08	5,49	3,33	2,63E-11	9,28
hsa-miR-145-3p	16,87	4,95	3,45	1,91E-11	9,37
hsa-miR-154-3p	18,27	5,03	3,57	3,21E-13	10,71
hsa-miR-487b	19,06	5,29	3,57	5,09E-13	10,57
hsa-miR-495	20,17	5,36	3,70	7,87E-14	11,08
hsa-miR-654-3p	18,08	4,87	3,70	2,75E-13	10,71
hsa-miR-409-3p	19,40	5,01	3,85	2,38E-14	11,47



**Tablo 19.** Olgu gruplarında ekspresyon saptanan miRNA' ların karşılaştırılması

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-let-7a	22,31	21,64	21,8	1,03	0,0043	2,37
hsa-let-7a-2-3p	3,81	3,72	3,33	1,14	0,87	0,06
hsa-let-7a-2-pre	6,81	2,42	3,21	2,81	0,0007	3,16
hsa-let-7a-3p	8,42	6,39	5,67	1,49	0,14	0,85
hsa-let-7b	21,89	21,48	21,52	1,02	0,02	1,7
hsa-let-7b-3p	14,21	15,9	15,58	1,12	0,002	2,71
hsa-let-7c	21,79	21,41	21,47	1,02	0,05	1,3
hsa-let-7d	21,98	21,71	21,67	1,01	0,09	1,05
hsa-let-7d-3p	3,96	6,28	2,16	2,91	1,44E-05	4,84
hsa-let-7d-pre	4,95	3,66	2,11	2,35	0,0049	2,31
hsa-let-7e	21,43	21,33	21,41	1	0,69	0,16
hsa-let-7f	21,96	21,63	21,7	1,02	0,15	0,82
hsa-let-7g	20,37	20,59	20,86	1,02	1,11E-05	4,95
hsa-let-7g-3p	5,04	3,23	2,51	2,01	0,03	1,52
hsa-let-7i	20,38	20,5	20,73	1,02	3,77E-05	4,42
hsa-let-7i-3p	10,16	10,41	9,51	1,09	0,77	0,11
hsa-miR-1	11	10,67	8,24	1,34	0,14	0,85
hsa-miR-7	14,64	16,7	13,86	1,2	0,02	1,7
hsa-miR-7-1-3p	12,18	13,69	9,62	1,42	0,004	2,4
hsa-miR-7-2-3p	6,71	5,02	2,34	2,86	7,82E-05	4,11
hsa-miR-9	6,91	2,58	6,67	2,68	0,03	1,52
hsa-miR-9-1-pre	14,57	10,69	12,9	1,36	0,09	1,05
hsa-miR-9-3p	7,55	2,44	5,8	3,1	0,02	1,7
hsa-miR-10a	9,67	3,59	3,55	2,72	2,40E-05	4,62
hsa-miR-10b	7,87	2,52	3,01	3,12	0,0001	3,95
hsa-miR-15a	18,87	18,9	17,78	1,06	4,47E-05	4,35
hsa-miR-15a-3p	3,72	2,29	2,48	1,63	0,29	0,54
hsa-miR-15b	10,06	11,51	6,03	1,91	4,49E-05	4,35
hsa-miR-15b-3p	14,37	13,06	12,51	1,15	0,39	0,41
hsa-miR-16-2-3p	10,5	11,94	7,82	1,53	0,0062	2,21
hsa-miR-17	18,33	18,54	17,47	1,06	0,0007	3,18
hsa-miR-18a	11,51	11,32	6,49	1,77	3,09E-05	4,51
hsa-miR-18b	16,13	16,4	15,39	1,07	0,19	0,72
hsa-miR-19a	12,13	8,77	7,96	1,52	0,02	1,7
hsa-miR-19b	18,15	17,9	16,22	1,12	0,0029	2,54
hsa-miR-20a	16,78	16,24	11,36	1,48	1,81E-06	5,74
hsa-miR-20b	18,19	18,22	16,06	1,13	0,002	2,7
hsa-miR-21	22,46	21,85	21,95	1,03	0,02	1,7
hsa-miR-21-3p	12,22	12,52	10,39	1,2	0,2	0,7
hsa-miR-22	20,15	20,39	20,36	1,01	0,2	0,7
hsa-miR-22-5p	18,43	18,91	18,45	1,03	0,7	0,15
hsa-miR-23a	22,18	21,69	21,89	1,02	0,04	1,4
hsa-miR-23a-3p	5,5	2,1	2,53	2,62	0,0022	2,65
hsa-miR-23b	21,73	21,29	21,54	1,02	0,04	1,4
hsa-miR-23b-5p	4,86	2,3	2,54	2,11	0,02	1,7
hsa-miR-24	20,86	20,94	20,92	1	0,67	0,17
hsa-miR-24-1-5p	21,17	21,15	21,27	1,01	0,38	0,42
hsa-miR-24-2-3p	21,11	21,12	21,21	1	0,49	0,31
hsa-miR-25	18,37	18,52	18,3	1,01	0,73	0,14

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-25-5p	3,83	2,44	1,76	2,18	0,02	1,7
hsa-miR-26b	21,06	20,86	20,92	1,01	0,05	1,3
hsa-miR-27a	21,03	20,96	20,9	1,01	0,44	0,36
hsa-miR-27a-5p	5,58	5,26	3,92	1,42	0,26	0,59
hsa-miR-27b	20,7	20,83	19,92	1,05	0,2	0,7
hsa-miR-27b-5p	6,99	7,22	6,95	1,04	0,98	0,01
hsa-miR-28-3p	14,79	17,08	15,92	1,15	0,06	1,22
hsa-miR-28-5p	17,54	17,99	17,47	1,03	0,02	1,7
hsa-miR-296-3p	3,92	3,24	2,97	1,32	0,63	0,2
hsa-miR-29a	21,6	21,25	21,31	1,02	0,05	1,3
hsa-miR-29a-3p	13,74	12,49	12,99	1,1	0,67	0,17
hsa-miR-29b	21,62	21,41	21,49	1,01	0,62	0,21
hsa-miR-29b-1-5p	8,71	8,78	5,79	1,52	0,02	1,7
hsa-miR-29b-2-5p	10,85	7,03	4,81	2,26	5,25E-05	4,28
hsa-miR-29c	20,64	20,59	20,62	1	0,94	0,03
hsa-miR-29c-5p	10,05	9,23	11,69	1,27	0,13	0,89
hsa-miR-30a	19,88	20,27	20,17	1,02	0,19	0,72
hsa-miR-30a-3p	14,28	17,08	16,84	1,2	0,0007	3,15
hsa-miR-30b	19,79	20,03	19,23	1,04	0,31	0,51
hsa-miR-30b-3p	5,64	4,96	6,05	1,22	0,69	0,16
hsa-miR-30b-pre	4,88	2,48	1,63	3	0,0002	3,74
hsa-miR-30c	20,31	20,55	19,85	1,04	0,44	0,36
hsa-miR-30c-1-pre	5	5,12	1,77	2,89	2,78E-05	4,56
hsa-miR-30c-2-3p	8,24	7,41	3,69	2,23	9,66E-05	4,02
hsa-miR-30d	19,54	19,87	19,67	1,02	0,31	0,51
hsa-miR-30d-3p	4,73	4,65	3,31	1,43	0,26	0,59
hsa-miR-30e	19,21	19,71	19,43	1,03	0,14	0,85
hsa-miR-30e-3p	16,76	17,35	16,8	1,04	0,54	0,27
hsa-miR-31	18,07	20,35	18,81	1,13	0,16	0,8
hsa-miR-31-3p	13,19	14,85	8,35	1,78	9,25E-06	5,03
hsa-miR-320a	18,34	18,56	18,47	1,01	0,58	0,24
hsa-miR-32-3p	4,02	2,45	5,01	2,05	0,1	1
hsa-miR-33a	5,57	9,14	7,29	1,64	0,12	0,92
hsa-miR-33a-3p	9,61	8,57	4,79	2	8,00E-05	4,1
hsa-miR-34a	16,97	19,43	18,78	1,15	0,0056	2,25
hsa-miR-34a-3p	13,39	17,11	15,88	1,28	0,0053	2,28
hsa-miR-34b	3,54	2,4	1,67	2,11	0,04	1,4
hsa-miR-34b-5p	15,36	17,59	16,34	1,14	0,16	0,8
hsa-miR-34b-pre	3,34	2,53	1,68	1,98	0,05	1,3
hsa-miR-34c-3p	7,98	2,16	1,98	4,02	3,63E-10	9,44
hsa-miR-34c-5p	6,25	7,29	4,77	1,53	0,08	1,1
hsa-miR-34c-pre	9,27	6,22	3,37	2,75	4,79E-05	4,32
hsa-miR-91	18,47	18,97	17,98	1,06	0,0008	3,11
hsa-miR-92a	15,9	17,18	13,42	1,28	0,0043	2,37
hsa-miR-92a-1-5p	3,8	2,21	1,99	1,91	0,05	1,3
hsa-miR-92a-1-pre	4,48	3,88	1,96	2,28	0,0042	2,37
hsa-miR-92b	15,18	16,68	16,11	1,1	0,16	0,8
hsa-miR-92b-5p	9,58	6,53	5,76	1,66	0,02	1,7
hsa-miR-93	18,78	19,35	18,85	1,03	0,03	1,52
hsa-miR-93-3p	4,74	2,37	2,14	2,21	0,0044	2,35
hsa-miR-96	6,41	2,44	5,78	2,63	0,04	1,4

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-98	19,84	20,09	19,43	1,03	0,48	0,32
hsa-miR-99a	21,85	21,31	21,4	1,03	0,02	1,7
hsa-miR-99a-3p	7,97	8,19	5,59	1,47	0,06	1,22
hsa-miR-99b	18,59	18,89	18,31	1,03	0,56	0,25
hsa-miR-99b-3p	6,8	4,76	3,26	2,09	0,0065	2,19
hsa-miR-100	21,93	21,41	21,53	1,02	0,02	1,7
hsa-miR-100-3p	12,42	12,81	7,97	1,61	0,0001	3,95
hsa-miR-101	15,55	17,18	15,49	1,11	0,17	0,77
hsa-miR-103	19,59	20,07	20,25	1,03	1,20E-05	4,92
hsa-miR-103-2-5p	8,74	9,64	9,08	1,1	0,86	0,07
hsa-miR-105	5,54	5,05	2,85	1,94	0,01	2
hsa-miR-105-3p	5,1	2,32	1,68	3,04	6,51E-05	4,19
hsa-miR-106a	15,69	16,88	11,94	1,41	0,0003	3,55
hsa-miR-106a-3p	6,33	2,46	2,4	2,64	0,0002	3,64
hsa-miR-106b	17,72	17,6	14,04	1,26	0,0005	3,34
hsa-miR-106b-3p	6,65	3,85	5,45	1,73	0,21	0,68
hsa-miR-107	19,11	19,52	19,6	1,03	0,0069	2,16
hsa-miR-108	6,34	6,53	2,37	2,76	6,25E-06	5,2
hsa-miR-122	8,72	8,98	6,18	1,45	0,05	1,3
hsa-miR-123	8,42	10,28	7,35	1,4	0,09	1,05
hsa-miR-124-2-pre	3,4	3,7	1,66	2,23	0,0047	2,33
hsa-miR-124-3-pre	4,76	3,75	1,97	2,41	0,0034	2,46
hsa-miR-125a-3p	3,37	3,19	3,61	1,13	0,9	0,05
hsa-miR-125a-5p	17,18	17,57	17,46	1,02	0,31	0,51
hsa-miR-125a-pre	4,9	5,14	1,97	2,61	0,0002	3,77
hsa-miR-125b	21,01	20,94	20,93	1	0,79	0,1
hsa-miR-125b-1-3p	11,8	12,27	12,17	1,04	0,95	0,02
hsa-miR-125b-1-pre	4,96	7,45	1,97	3,78	8,96E-09	8,05
hsa-miR-125b-2-3p	6,5	7,33	3,75	1,96	0,0025	2,61
hsa-miR-126	12,47	16,35	15,34	1,31	0,0002	3,8
hsa-miR-126-5p	8,1	11,85	6,12	1,93	9,79E-05	4,01
hsa-miR-127-3p	15,32	17,72	17,11	1,16	0,02	1,7
hsa-miR-127-5p	8,67	12,04	10,98	1,39	0,13	0,89
hsa-miR-127-pre	3,48	3,45	2,56	1,36	0,41	0,39
hsa-miR-128a	16,56	16,52	15,89	1,04	0,03	1,52
hsa-miR-128b	16,25	16,18	14,78	1,1	0,02	1,7
hsa-miR-129-3p	6,4	6,28	5,73	1,12	0,87	0,06
hsa-miR-129-5p	4,99	3,61	2,9	1,72	0,11	0,96
hsa-miR-130a	20,31	21,04	21,01	1,04	2,85E-07	6,55
hsa-miR-130a-pre	11,51	6,29	3,3	3,49	5,08E-08	7,29
hsa-miR-130b	20,23	20,52	20,29	1,01	0,08	1,1
hsa-miR-130b-5p	3,68	3,53	1,82	2,03	0,0096	2,02
hsa-miR-130b-pre	7,43	2,49	1,66	4,49	6,06E-11	10,22
hsa-miR-132	3,2	2,28	2,07	1,54	0,33	0,48
hsa-miR-132-5p	6,65	2,28	1,65	4,02	5,31E-09	8,27
hsa-miR-133a	3,92	6,75	5,5	1,72	0,28	0,55
hsa-miR-133b	3,83	6,59	6,96	1,82	0,11	0,96
hsa-miR-134	12,7	16,65	13,52	1,31	0,0075	2,13
hsa-miR-135b	5,3	2,3	2,99	2,3	0,04	1,4
hsa-miR-135b-3p	4,88	2,4	1,67	2,93	0,0004	3,44
hsa-miR-136	13,33	18,01	16,5	1,35	0,0013	2,88

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-136-3p	10,89	16,08	12,74	1,48	0,0017	2,77
hsa-miR-137	10,68	13,69	13,46	1,28	0,11	0,96
hsa-miR-139-5p	13,63	12,99	10,88	1,25	0,06	1,22
hsa-miR-140-3p	16,91	17,76	16,7	1,06	0,22	0,66
hsa-miR-140-5p	16,36	17,59	17,09	1,08	0,03	1,52
hsa-miR-141	16,32	17,75	16,88	1,09	6,18E-05	4,21
hsa-miR-142 3p	5,03	9,03	5,28	1,8	0,0065	2,19
hsa-miR-142 5p	14,1	16,95	16,65	1,2	1,20E-05	4,92
hsa-miR-143	18,05	21,31	20,67	1,18	0,002	2,7
hsa-miR-143-5p	5,35	8,6	3,03	2,84	2,82E-06	5,55
hsa-miR-143-pre	3,64	2,03	1,74	2,09	0,03	1,52
hsa-miR-145	17,2	20,28	18,59	1,18	0,02	1,7
hsa-miR-145-3p	9,65	16,54	11,88	1,71	0,0002	3,72
hsa-miR-146a	18,72	19,47	18,22	1,07	0,21	0,68
hsa-miR-146b-5p	16,42	18,41	17,77	1,12	0,03	1,52
hsa-miR-147	3,6	2,26	1,95	1,85	0,08	1,1
hsa-miR-148b	11,69	13,44	12,36	1,15	0,44	0,36
hsa-miR-149	7,07	6,51	5,9	1,2	0,68	0,17
hsa-miR-149-3p	13,46	6,49	8,76	2,07	0,001	2,98
hsa-miR-151-3p	18,09	18,54	17,94	1,03	0,53	0,28
hsa-miR-151-5p	19,47	19,59	19,65	1,01	0,67	0,17
hsa-miR-152	16,77	19,29	18,73	1,15	0,03	1,52
hsa-miR-153	6,76	6,37	4,8	1,41	0,25	0,6
hsa-miR-154	13,98	18,5	16,52	1,32	0,0093	2,03
hsa-miR-154-3p	13,43	17,94	14,62	1,34	0,0051	2,29
hsa-miR-155	13,45	17,82	14,93	1,32	0,0058	2,24
hsa-miR-17-3p	11,91	10,7	11,02	1,11	0,73	0,14
hsa-miR-181a	14,94	17,03	16	1,14	0,09	1,05
hsa-miR-181a-2-3p	3,44	3,47	6,28	1,82	0,02	1,7
hsa-miR-181b	16,42	17,16	16,13	1,06	0,27	0,57
hsa-miR-181c	8,85	10,86	14,18	1,6	4,13E-06	5,38
hsa-miR-181c-3p	7,54	3,83	3,42	2,2	0,0019	2,73
hsa-miR-181d	12,25	12,55	11,55	1,09	0,71	0,15
hsa-miR-1826	18,73	18,8	18,99	1,01	0,46	0,34
hsa-miR-185	17,36	17,57	16,85	1,04	0,49	0,31
hsa-miR-185-3p	6,55	8,32	4,21	1,98	0,0025	2,6
hsa-miR-186	18,28	18,85	17,72	1,06	0,09	1,05
hsa-miR-187-3p	3,25	4,9	2,38	2,06	0,02	1,7
hsa-miR-188-5p	11,41	11,71	6,73	1,74	3,43E-05	4,46
hsa-miR-189	5,07	2,01	4,14	2,52	0,05	1,3
hsa-miR-190	9,32	5,32	6,34	1,75	0,06	1,22
hsa-miR-191	19,92	20,02	20,12	1,01	0,52	0,28
hsa-miR-192	11,22	10,31	10,42	1,09	0,82	0,09
hsa-miR-193a-3p	18,29	19,29	18,8	1,06	0,0076	2,12
hsa-miR-193a-5p	16,28	16,57	15,33	1,08	0,14	0,85
hsa-miR-193a-pre	3,78	2,28	1,77	2,14	0,02	1,7
hsa-miR-193b	16,68	16,99	16,2	1,05	0,37	0,43
hsa-miR-193b-5p	8,07	6,56	4,88	1,65	0,04	1,4
hsa-miR-194	11,93	9,05	9,01	1,32	0,14	0,85
hsa-miR-194-3p	3,85	3,7	2,14	1,8	0,05	1,3
hsa-miR-195	19,97	19,84	18,48	1,08	0,01	2

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-196a	3,88	2,2	4,56	2,07	0,13	0,89
hsa-miR-196b	4,47	2,27	3,63	1,97	0,29	0,54
hsa-miR-196b-pre	5,03	6,38	1,66	3,84	2,27E-08	7,64
hsa-miR-197	9,74	9,48	4,54	2,14	3,72E-06	5,43
hsa-miR-197-pre	4,76	3,82	1,63	2,92	0,0002	3,74
hsa-miR-198	4,72	3,49	2	2,36	0,004	2,4
hsa-miR-198-pre	3,58	3,78	1,67	2,27	0,0048	2,32
hsa-miR-199a-1-pre	5,03	7,97	4,41	1,81	0,01	2
hsa-miR-199a-2-pre	4,34	4,88	1,67	2,92	2,23E-05	4,65
hsa-miR-199a-3p	15,91	20,87	19,12	1,31	0,0024	2,63
hsa-miR-199a-5p	16,51	19,89	17,88	1,2	0,03	1,52
hsa-miR-199b-3p	15,94	20,82	18,98	1,31	0,0029	2,53
hsa-miR-199b-5p	6,67	10,85	6,08	1,78	0,0018	2,74
hsa-miR-19b-1-5p	5,02	3,74	1,67	3	8,44E-05	4,07
hsa-miR-200a	6,58	8,32	3,86	2,16	0,0003	3,47
hsa-miR-200a-pre	3,52	2,28	2,18	1,62	0,26	0,59
hsa-miR-200b	7,14	2,27	2,74	3,14	3,94E-05	4,4
hsa-miR-200c-pre	3,69	2,49	1,76	2,1	0,02	1,7
hsa-miR-202	5,3	2,38	2,3	2,3	0,01	2
hsa-miR-204	3,41	2,38	4,51	1,89	0,19	0,72
hsa-miR-205	4,15	2,54	1,8	2,31	0,01	2
hsa-miR-205-3p	12,42	10,15	8,91	1,39	0,11	0,96
hsa-miR-205-pre	11,6	8,92	3,3	3,52	1,05E-09	8,98
hsa-miR-206	5,52	7,85	3,83	2,05	0,0034	2,47
hsa-miR-206-pre	5,66	3,78	2,29	2,46	0,0027	2,57
hsa-miR-208a	8,01	4,61	2,83	2,83	0,0001	3,87
hsa-miR-210	18,05	17,67	17,48	1,03	0,6	0,22
hsa-miR-211	2,93	4,99	2,4	2,08	0,0084	2,08
hsa-miR-212	5,11	3,77	2,46	2,08	0,02	1,7
hsa-miR-213	16,27	16,85	17,05	1,05	0,0038	2,42
hsa-miR-214	15,48	18,33	16,13	1,18	0,05	1,3
hsa-miR-214-3p	6,49	8	6,29	1,27	0,42	0,38
hsa-miR-215	10,91	6,15	6,3	1,77	0,0038	2,42
hsa-miR-218	17,56	17,38	16,63	1,06	0,32	0,49
hsa-miR-219-2-3p	3,79	3,79	4,03	1,06	0,97	0,01
hsa-miR-219-5p	5,13	3,57	2,56	2	0,03	1,52
hsa-miR-221	20,85	20,81	21,13	1,02	0,0092	2,04
hsa-miR-221-5p	11,82	13,05	7,61	1,71	3,35E-05	4,47
hsa-miR-222-5p	6,96	3,74	5,39	1,86	0,13	0,89
hsa-miR-224	11,92	18,48	16,64	1,55	1,20E-08	7,92
hsa-miR-224-3p	8,29	9,16	6,93	1,32	0,24	0,62
hsa-miR-297	3,99	2,53	2,85	1,58	0,45	0,35
hsa-miR-299	6,9	13,49	9,31	1,96	0,0002	3,81
hsa-miR-299-5p	8,62	11,59	9,04	1,34	0,16	0,8
hsa-miR-300	3,3	5,12	2,17	2,36	0,0017	2,76
hsa-miR-301a	12,46	15,35	14,92	1,23	0,005	2,3
hsa-miR-301b	5,71	6,3	5,05	1,25	0,59	0,23
hsa-miR-302a	6,73	6,19	4,59	1,47	0,18	0,74
hsa-miR-302b	6,91	4,47	3,79	1,82	0,05	1,3
hsa-miR-302d	7,09	5,97	6,65	1,19	0,81	0,09
hsa-miR-302d-pre	3,41	2,24	1,78	1,91	0,07	1,15

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-320a-pre	4,9	3,52	3,79	1,39	0,61	0,21
hsa-miR-320b	17,99	18,05	18,19	1,01	0,47	0,33
hsa-miR-320c	18,05	18,2	18,2	1,01	0,76	0,12
hsa-miR-320d	18,06	18,12	18,16	1,01	0,86	0,07
hsa-miR-320e	14,16	13,04	14,73	1,13	0,2	0,7
hsa-miR-323b-3p	3,07	3,77	2,27	1,66	0,16	0,8
hsa-miR-324 3p	6,54	7,72	8,42	1,29	0,4	0,4
hsa-miR-324 5p	14,1	14,85	15,41	1,09	0,24	0,62
hsa-miR-326-pre	3,81	2,27	1,78	2,14	0,02	1,7
hsa-miR-328	3,82	3,55	3,83	1,08	0,96	0,02
hsa-miR-329	13,78	18,31	16,72	1,33	0,0024	2,61
hsa-miR-330-3p	3,85	5,78	2,2	2,63	8,74E-05	4,06
hsa-miR-331-3p	5,48	4,92	2,48	2,2	0,0011	2,97
hsa-miR-331-5p	6,45	3,37	2,33	2,77	0,0002	3,71
hsa-miR-335	16,65	18,62	15,5	1,2	0,04	1,4
hsa-miR-335-3p	9,07	9,69	5,33	1,82	0,002	2,7
hsa-miR-337-3p	12,86	17,05	15,1	1,33	0,0079	2,1
hsa-miR-337-5p	10,87	15,89	12,26	1,46	0,0023	2,63
hsa-miR-338-3p	5,17	4,84	9,45	1,95	0,0002	3,69
hsa-miR-339-5p	3,83	2,34	3,29	1,64	0,46	0,34
hsa-miR-340-5p	9,98	6,42	6,64	1,56	0,07	1,15
hsa-miR-342-3p	16,58	16,77	15,87	1,06	0,32	0,49
hsa-miR-345	7,25	7,5	4,99	1,5	0,06	1,22
hsa-miR-345-pre	4,02	3,69	3,13	1,28	0,66	0,18
hsa-miR-346	3,88	4,69	3,06	1,53	0,21	0,68
hsa-miR-346-pre	5,22	2,09	2,13	2,49	0,0012	2,94
hsa-miR-361-3p	12,15	10,76	11,17	1,13	0,7	0,15
hsa-miR-361-5p	17,13	17,44	16,57	1,05	0,19	0,72
hsa-miR-362-3p	11,54	10,37	5,96	1,94	4,11E-05	4,39
hsa-miR-362-5p	11,69	11,77	9,11	1,29	0,04	1,4
hsa-miR-363-3p	11,04	14,29	15,18	1,38	2,20E-05	4,66
hsa-miR-365	19,37	19,79	19,63	1,02	0,14	0,85
hsa-miR-368	17,88	20,8	19,54	1,16	0,06	1,22
hsa-miR-369-3p	15,66	18,19	15,02	1,21	0,03	1,52
hsa-miR-369-5p	8,98	15,48	12,43	1,73	3,84E-05	4,42
hsa-miR-370	5,42	4,62	3,53	1,54	0,2	0,7
hsa-miR-373-5p	15,47	17,3	16,18	1,12	0,08	1,1
hsa-miR-374a	18,5	18,81	16,59	1,13	0,0026	2,59
hsa-miR-374b	18,12	17,76	14,42	1,26	0,0008	3,09
hsa-miR-374b-3p	6,88	5,19	2,37	2,9	3,78E-05	4,42
hsa-miR-375	8,37	9,46	5,05	1,87	0,0007	3,16
hsa-miR-376a	17,44	20,36	19,26	1,17	0,02	1,7
hsa-miR-376a-1-pre	3,45	3,69	1,67	2,21	0,0052	2,28
hsa-miR-376a-5p	8,16	10,17	5,51	1,84	0,0007	3,16
hsa-miR-376b	16,77	19,95	18,52	1,19	0,02	1,7
hsa-miR-376c	17,76	20,8	19,48	1,17	0,04	1,4
hsa-miR-377	14,53	16,64	12,76	1,3	0,0012	2,92
hsa-miR-377-pre	4,82	2,53	1,63	2,96	0,0003	3,59
hsa-miR-378	16,52	14,91	14,07	1,17	0,05	1,3
hsa-miR-378-5p	11,79	12,21	9,72	1,26	0,1	1
hsa-miR-378c	4,14	6,24	3,33	1,87	0,02	1,7



miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-378-pre	3,58	2,32	1,74	2,05	0,05	1,3
hsa-miR-379	14,74	17,22	15,68	1,17	0,03	1,52
hsa-miR-379-3p	8,74	9,86	5,3	1,86	0,0015	2,82
hsa-miR-379-pre	4,97	3,77	2,41	2,07	0,03	1,52
hsa-miR-380	13,73	15,99	11	1,45	5,52E-05	4,26
hsa-miR-380-3p	6,28	4,93	2,55	2,46	0,0003	3,46
hsa-miR-381	12,95	17,45	15,24	1,35	0,004	2,39
hsa-miR-382	14,15	16,86	15,98	1,19	0,01	2
hsa-miR-382-pre	4,77	2,37	2,07	2,3	0,0076	2,12
hsa-miR-409-3p	16,16	19,07	17,72	1,18	0,07	1,15
hsa-miR-409-5p	10,04	12,58	11,76	1,25	0,26	0,59
hsa-miR-410	10,76	16,12	11,88	1,5	0,0009	3,06
hsa-miR-410-pre	3,34	2,27	1,8	1,86	0,11	0,96
hsa-miR-411	14,29	18,53	15,35	1,3	0,01	2
hsa-miR-421	10,58	11,36	6,71	1,69	0,0004	3,42
hsa-miR-422a	14,25	14,12	10,07	1,42	0,0003	3,49
hsa-miR-422b	14,49	14,54	11,94	1,22	0,03	1,52
hsa-miR-423-3p	12,85	15,84	14,2	1,23	0,02	1,7
hsa-miR-423-5p	16,86	16,66	16,55	1,02	0,46	0,34
hsa-miR-423-pre	3,42	5,17	2,01	2,57	0,0011	2,95
hsa-miR-424	18,64	18,77	18,57	1,01	0,68	0,17
hsa-miR-424-3p	5,39	5,09	4,53	1,19	0,76	0,12
hsa-miR-424-pre	11,42	7,71	3,27	3,49	1,25E-08	7,9
hsa-miR-425-3p	8,87	9,41	7,84	1,2	0,47	0,33
hsa-miR-4270	4,11	2,19	2,05	2,01	0,03	1,52
hsa-miR-431	8,66	13,84	9,62	1,6	0,0024	2,62
hsa-miR-431-3p	5,1	2,25	1,99	2,56	0,0019	2,73
hsa-miR-432	11,45	17,1	16,51	1,49	8,57E-09	8,07
hsa-miR-449a	3,58	2,31	1,69	2,12	0,03	1,52
hsa-miR-449b	8	3,57	3,29	2,43	0,0003	3,56
hsa-miR-449b-3p	4,01	2,22	3,69	1,81	0,24	0,62
hsa-miR-450a	13,79	10,53	11,14	1,31	0,12	0,92
hsa-miR-450b-5p	6,92	3,74	2,76	2,5	0,0009	3,06
hsa-miR-452	12,78	15,31	13,38	1,2	0,16	0,8
hsa-miR-452-3p	5,26	10,02	4,09	2,45	4,91E-06	5,31
hsa-miR-454	16,81	17,05	13,75	1,24	0,0013	2,88
hsa-miR-455-3p	9,78	11,57	11,33	1,18	0,53	0,28
hsa-miR-455-5p	9,62	10,77	7,44	1,45	0,04	1,4
hsa-miR-483-3p	3,71	3,62	3,12	1,19	0,77	0,11
hsa-miR-483-5p	9,2	10,15	8,36	1,21	0,43	0,37
hsa-miR-484	12,09	14,28	12,23	1,18	0,21	0,68
hsa-miR-485-3p	10,01	10,88	9,5	1,15	0,59	0,23
hsa-miR-485-5p	3,64	3,73	2,89	1,29	0,54	0,27
hsa-miR-486-3p	3,81	2,26	2,24	1,7	0,14	0,85
hsa-miR-486-5p	3,38	2,33	2,62	1,45	0,57	0,24
hsa-miR-487a	10,85	16,39	14,97	1,51	1,38E-05	4,86
hsa-miR-487b	14,16	18,73	17,36	1,32	0,0027	2,57
hsa-miR-491-5p	8,17	6,97	3,97	2,06	0,0005	3,34
hsa-miR-493	9,83	12,21	10,14	1,24	0,25	0,6
hsa-miR-493-5p	13,19	17,76	16,35	1,35	0,0055	2,26
hsa-miR-494	18,16	19,83	18,61	1,09	0,1	1

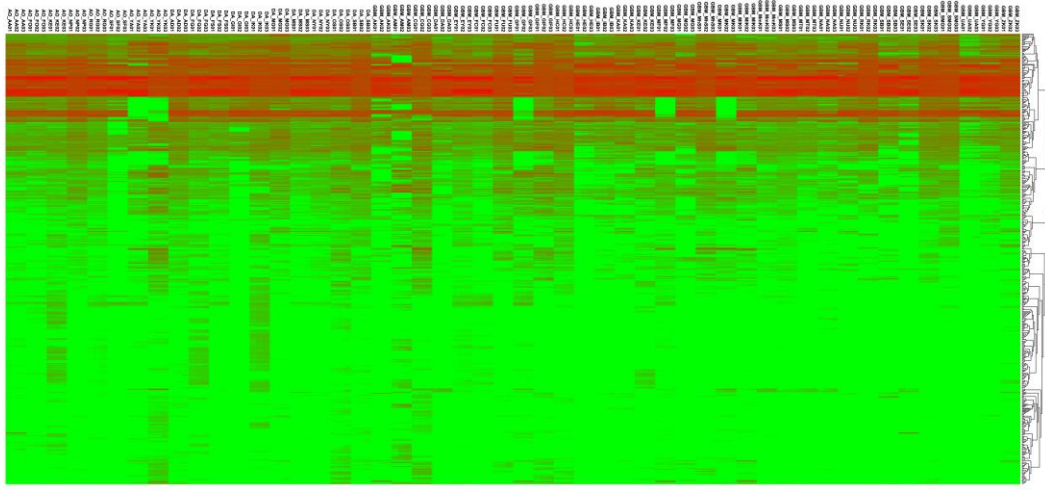
miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-495	16,67	19,84	18,63	1,19	0,03	1,52
hsa-miR-496	10,6	14,2	13,59	1,34	0,04	1,4
hsa-miR-497	12,17	13,06	14,15	1,16	0,16	0,8
hsa-miR-500-3p	9,21	5,77	4,07	2,26	0,0003	3,47
hsa-miR-500b	10,89	4,81	4,78	2,28	8,13E-05	4,09
hsa-miR-501-5p	6,19	6,56	4,36	1,5	0,11	0,96
hsa-miR-502-3p	6,25	4,84	2,5	2,5	0,0003	3,58
hsa-miR-503	12,82	11,25	7,49	1,71	0,0001	3,89
hsa-miR-504	6,59	6,33	2,81	2,35	0,0001	3,92
hsa-miR-505	8,59	10,59	5,55	1,91	0,0002	3,68
hsa-miR-506	4,9	3,52	2,11	2,33	0,0086	2,06
hsa-miR-507	3,56	2,3	2,04	1,74	0,19	0,72
hsa-miR-508-3p	3,56	2,15	1,74	2,04	0,04	1,4
hsa-miR-509-1-pre	4,67	3,81	1,67	2,79	0,0003	3,48
hsa-miR-509-3-5p	14,6	16,64	15,45	1,14	0,1	1
hsa-miR-510	3,34	4,88	1,74	2,8	0,0001	3,86
hsa-miR-510-pre	6,15	3,75	1,65	3,73	1,60E-06	5,8
hsa-miR-511-1-pre	8,22	6,37	2,44	3,36	1,29E-07	6,89
hsa-miR-512-1-pre	4,95	2,3	2,09	2,37	0,0055	2,26
hsa-miR-512-5p	5,03	3,93	3,11	1,62	0,24	0,62
hsa-miR-513a-1-pre	3,57	2,32	1,63	2,19	0,03	1,52
hsa-miR-513a-2-pre	14,99	15,14	16,89	1,13	0,0021	2,68
hsa-miR-513a-5p	6,31	4,92	3,71	1,7	0,11	0,96
hsa-miR-514-2-pre	4,95	2,42	2,03	2,44	0,004	2,4
hsa-miR-516b-1-pre	3,39	3,93	2,02	1,94	0,05	1,3
hsa-miR-516b-2-pre	3,22	3,92	1,71	2,29	0,0055	2,26
hsa-miR-517a-pre	9,71	7,43	2,92	3,33	2,02E-07	6,69
hsa-miR-517b-pre	4,41	2,48	1,62	2,73	0,0006	3,22
hsa-miR-518d-pre	3,68	2,46	1,63	2,26	0,02	1,7
hsa-miR-520h-pre	5,05	3,74	1,64	3,09	0,0001	3,94
hsa-miR-524-5p	18,44	18,96	17,69	1,07	0,05	1,3
hsa-miR-525-3p	14,04	14,29	11,51	1,24	0,04	1,4
hsa-miR-532-3p	4,8	2,48	2,91	1,94	0,11	0,96
hsa-miR-532-5p	11,91	11,06	9,17	1,3	0,12	0,92
hsa-miR-532-Pre	3,48	2,43	1,64	2,12	0,03	1,52
hsa-miR-539	8,4	9,18	5,49	1,67	0,0069	2,16
hsa-miR-542-3p	3,84	2,42	3,31	1,59	0,45	0,35
hsa-miR-542-5p	6,43	7,71	2,83	2,73	3,40E-06	5,47
hsa-miR-542-Pre	4,73	2,5	1,62	2,91	0,0003	3,5
hsa-miR-543	8,37	12,13	8,07	1,5	0,01	2
hsa-miR-544-Pre	4,96	3,82	1,78	2,79	0,0007	3,19
hsa-miR-545	5,08	5,18	2,87	1,8	0,03	1,52
hsa-miR-545-Pre	4,93	2,28	1,67	2,95	0,0003	3,6
hsa-miR-548a-1-Pre	11,06	7,93	7,84	1,41	0,08	1,1
hsa-miR-548a-3p	6,44	4,92	3,71	1,74	0,06	1,22
hsa-miR-548a-3-Pre	3,54	2,21	1,78	1,99	0,06	1,22
hsa-miR-548b-3p	6,76	3,66	2,04	3,31	5,74E-06	5,24
hsa-miR-548c-3p	5,09	2,3	2,16	2,35	0,002	2,7
hsa-miR-548d-2-Pre	3,38	2,53	2,1	1,61	0,29	0,54
hsa-miR-548t	11,05	11,54	7,08	1,63	0,0006	3,23
hsa-miR-549-Pre	6,49	7,32	3,21	2,28	0,0005	3,27

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-550-1-Pre	3,27	2,37	2,03	1,61	0,26	0,59
hsa-miR-550-3p	5,27	6,65	5,37	1,26	0,57	0,24
hsa-miR-551a	3,2	5,05	2,52	2,01	0,02	1,7
hsa-miR-551b	12,12	14,23	9,31	1,53	0,0009	3,05
hsa-miR-552	4,94	2,53	3,14	1,96	0,16	0,8
hsa-miR-560-Pre	5,18	3,24	4,02	1,6	0,39	0,41
hsa-miR-562	2,96	2,23	1,79	1,65	0,22	0,66
hsa-miR-565-Pre	19,75	20,08	20,18	1,02	0,24	0,62
hsa-miR-566	4,15	4,72	5,68	1,37	0,48	0,32
hsa-miR-566-Pre	11,08	11,57	14,09	1,27	0,03	1,52
hsa-miR-570	4,74	2,36	2,24	2,12	0,01	2
hsa-miR-574-3p	14,28	16,24	15,32	1,14	0,1	1
hsa-miR-574-5p	16,88	15,8	17,31	1,1	0,02	1,7
hsa-miR-574-Pre	11,03	14,18	13,79	1,29	0,08	1,1
hsa-miR-576-3p	3,81	2,02	1,77	2,16	0,0095	2,02
hsa-miR-576-5p	4,86	3,33	1,74	2,79	0,0002	3,7
hsa-miR-582-5p	3,82	2,39	3,63	1,6	0,43	0,37
hsa-miR-584	11,9	11,93	7,95	1,5	0,0011	2,94
hsa-miR-589	5,13	2,22	1,74	2,94	9,56E-06	5,02
hsa-miR-590-3p	3,4	3,8	2,41	1,58	0,22	0,66
hsa-miR-590-5p	8,83	7,6	8,72	1,16	0,69	0,16
hsa-miR-594	6,93	8,56	4,21	2,03	0,0006	3,24
hsa-miR-594-Pre	19,47	20,09	20,21	1,04	0,0011	2,97
hsa-miR-595	5,21	7,64	6,55	1,46	0,41	0,39
hsa-miR-598	3,91	2,23	3,36	1,75	0,35	0,46
hsa-miR-598-Pre	3,94	3,54	2,02	1,95	0,02	1,7
hsa-miR-600-Pre	6,67	6,45	2,42	2,76	4,82E-06	5,32
hsa-miR-601-Pre	4,67	4,94	1,64	3,02	1,26E-05	4,9
hsa-miR-602-Pre	5,03	3,84	1,62	3,1	0,0001	3,99
hsa-miR-603-Pre	6,63	6,08	2,3	2,88	4,20E-06	5,38
hsa-miR-605	6,33	2,34	1,66	3,82	9,43E-08	7,03
hsa-miR-607	5,03	4,98	1,62	3,1	5,10E-06	5,29
hsa-miR-608	6,79	2,6	4,84	2,61	0,03	1,52
hsa-miR-610-Pre	3,38	3,91	1,98	1,98	0,03	1,52
hsa-miR-611-Pre	8,06	3,79	2,75	2,93	3,15E-05	4,5
hsa-miR-614	3,12	2,52	1,66	1,87	0,07	1,15
hsa-miR-615-3p	3,51	5,1	2,81	1,82	0,06	1,22
hsa-miR-615-5p	4,97	5,1	2,51	2,03	0,0062	2,21
hsa-miR-616-5p	6,4	6,02	4,35	1,47	0,16	0,8
hsa-miR-619-Pre	7,3	5,94	7,36	1,24	0,58	0,24
hsa-miR-621-Pre	3,72	2,32	1,82	2,04	0,03	1,52
hsa-miR-625	10,68	9,53	5,93	1,8	0,0005	3,28
hsa-miR-625-3p	5,58	2,17	2,53	2,57	0,0037	2,43
hsa-miR-628-3p	6,5	3,37	4,69	1,93	0,1	1
hsa-miR-629	11,55	10,04	7,08	1,63	0,003	2,52
hsa-miR-632	3,84	2,37	2,7	1,62	0,38	0,42
hsa-miR-634	4,85	3,6	3,83	1,35	0,61	0,21
hsa-miR-638	8,91	6,32	9,43	1,49	0,08	1,1
hsa-miR-638-Pre	9,89	8,76	7,25	1,36	0,17	0,77
hsa-miR-645-Pre	5,16	2,24	2,23	2,31	0,0025	2,6
hsa-miR-650-Pre	3,78	2,31	1,8	2,1	0,02	1,7

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-652	4,11	2,27	3,27	1,81	0,3	0,52
hsa-miR-654-3p	15,01	17,75	15,55	1,18	0,05	1,3
hsa-miR-654-5p	6,41	8,05	7,53	1,26	0,62	0,21
hsa-miR-654-Pre	11,02	16,68	13,92	1,51	0,0003	3,56
hsa-miR-655	11,03	15,35	13,91	1,39	0,02	1,7
hsa-miR-656	8,86	13,14	10,16	1,48	0,04	1,4
hsa-miR-658	15,01	15,35	17,11	1,14	0,0007	3,15
hsa-miR-660	11,81	11,47	9,33	1,27	0,11	0,96
hsa-miR-662-Pre	7,42	6,18	6,55	1,2	0,78	0,11
hsa-miR-663-Pre	5,53	5,36	3,72	1,49	0,18	0,74
hsa-miR-664	10,62	10,51	9,57	1,11	0,67	0,17
hsa-miR-665	10,69	14,69	13,29	1,37	0,02	1,7
hsa-miR-668	6,79	4,51	4,04	1,68	0,08	1,1
hsa-miR-671-3p	3,67	2,23	2,42	1,64	0,25	0,6
hsa-miR-671-5p	11,77	11,83	10,85	1,09	0,64	0,19
hsa-miR-708	13,09	13,79	11,16	1,24	0,17	0,77
hsa-miR-708-3p	3,75	5,04	3,43	1,47	0,29	0,54
hsa-miR-720	16,88	15,35	16,35	1,1	0,16	0,8
hsa-miR-744	13,29	13,48	9,6	1,4	0,0011	2,94
hsa-miR-744-3p	7,59	3,87	3,26	2,33	0,0008	3,1
hsa-miR-758	6,76	6,91	4,72	1,46	0,12	0,92
hsa-miR-760	6,61	6,45	4,11	1,61	0,05	1,3
hsa-miR-765	8,13	4,69	4,64	1,75	0,03	1,52
hsa-miR-766	5,43	5,06	3,94	1,38	0,36	0,44
hsa-miR-767-5p	3,71	2,46	1,67	2,23	0,02	1,7
hsa-miR-768-3p	16,97	17,34	16,5	1,05	0,23	0,64
hsa-miR-768-5p	19,23	19,47	19,76	1,03	0,0067	2,18
hsa-miR-769-3p	6,47	3,49	2,76	2,35	0,0025	2,61
hsa-miR-769-5p	11,11	3,67	3,96	3,03	2,46E-08	7,61
hsa-miR-876-3p	3,96	3,97	3,47	1,14	0,85	0,07
hsa-miR-876-5p	5,29	2,4	2,17	2,44	0,0021	2,67
hsa-miR-877	5	2,5	2,16	2,31	0,0053	2,28
hsa-miR-877-3p	3,27	3,79	5,1	1,56	0,3	0,52
hsa-miR-885-3p	12,31	12,49	8,4	1,49	0,0027	2,58
hsa-miR-885-5p	5,16	3,87	2,19	2,36	0,0066	2,18
hsa-miR-886-3p	11,9	15,87	12,62	1,33	0,02	1,7
hsa-miR-886-5p	14,94	17,63	16,68	1,18	0,06	1,22
hsa-miR-887	3,52	2,3	2,21	1,59	0,25	0,6
hsa-miR-889	10,93	16,53	10,06	1,64	3,09E-05	4,51
hsa-miR-891a	9,97	10,12	5,41	1,87	4,62E-05	4,34
hsa-miR-891b	3,32	3,84	1,67	2,29	0,005	2,31
hsa-miR-892a	3,02	3,66	1,6	2,29	0,0026	2,59
hsa-miR-921	7,66	5,05	2,43	3,16	2,91E-06	5,54
hsa-miR-922	4,52	2,44	2,39	1,89	0,06	1,22
hsa-miR-923	10,04	11,67	6,82	1,71	0,0007	3,13
hsa-miR-936	3,8	2,44	2,17	1,75	0,13	0,89
hsa-miR-939	5,03	2,36	3,03	2,13	0,07	1,15
hsa-miR-940	4,66	2,27	2,68	2,06	0,07	1,15
hsa-miR-1180	8,48	6,7	5,35	1,59	0,07	1,15
hsa-miR-1182	3,84	3,74	2,4	1,6	0,13	0,89
hsa-miR-1183	5,34	5,37	3,83	1,4	0,27	0,57

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-1184	4,8	3,77	2,64	1,82	0,1	1
hsa-miR-1185	4,7	9,04	4,28	2,11	0,0002	3,65
hsa-miR-1207-5p	12,67	12,93	13,13	1,04	0,95	0,02
hsa-miR-1224-5p	13,56	12,15	10,3	1,32	0,06	1,22
hsa-miR-1225-3p	3,79	2,44	2,04	1,86	0,07	1,15
hsa-miR-1228-5p	14,12	12,2	14,43	1,18	0,11	0,96
hsa-miR-1246	14,63	15,39	15,9	1,09	0,3	0,52
hsa-miR-1248	19,86	20,14	20,08	1,01	0,45	0,35
hsa-miR-1250	6,32	3,94	4,76	1,61	0,29	0,54
hsa-miR-1254	4,12	3,48	3,74	1,19	0,9	0,05
hsa-miR-1257	3,94	3,86	3,13	1,26	0,63	0,2
hsa-miR-1258	5,55	3,78	3,44	1,61	0,17	0,77
hsa-miR-1260	17,46	17,66	17,5	1,01	0,82	0,09
hsa-miR-1260b	16,58	17,36	17,06	1,05	0,53	0,28
hsa-miR-1268	14,67	12,95	15,17	1,17	0,11	0,96
hsa-miR-1269	3,83	3,59	2,06	1,85	0,03	1,52
hsa-miR-1271	3,71	6,4	4,77	1,73	0,15	0,82
hsa-miR-1272	3,7	2,23	2,11	1,76	0,1	1
hsa-miR-1273	7,32	4,95	6,5	1,48	0,35	0,46
hsa-miR-1275	5,48	2,43	3,94	2,26	0,09	1,05
hsa-miR-1280	15,11	16,92	16,52	1,12	0,0019	2,73
hsa-miR-1285	7,42	6,42	8,36	1,3	0,36	0,44
hsa-miR-1287	3,86	2,22	1,79	2,15	0,01	2
hsa-miR-1290	6,75	7,26	4,83	1,5	0,1	1
hsa-miR-1291	11,59	9,23	8,41	1,38	0,11	0,96
hsa-miR-1293	3,87	2,26	1,8	2,15	0,02	1,7
hsa-miR-1294	3,83	1,98	3,78	1,94	0,15	0,82
hsa-miR-1296	3,97	3,31	2,11	1,88	0,06	1,22
hsa-miR-1297	4,87	2	3,94	2,44	0,08	1,1
hsa-miR-1300	3,83	2,03	1,76	2,18	0,0085	2,07
hsa-miR-1303	5,87	2,47	5,19	2,38	0,05	1,3
hsa-miR-1304	5,65	4,54	2,24	2,52	0,0004	3,41
hsa-miR-1306	7,29	7,87	6,85	1,15	0,77	0,11
hsa-miR-1307	4,65	2,36	1,77	2,63	0,0007	3,14
hsa-miR-1308	20,31	20,7	20,75	1,02	0,0061	2,21
hsa-miR-1322	4	3,63	3,01	1,33	0,58	0,24
hsa-miR-1469	5,13	2,39	4,81	2,15	0,08	1,1
hsa-miR-1827	11,98	12,71	7,78	1,63	0,0002	3,75
hsa-miR-1908	5,21	7,37	5,32	1,41	0,25	0,6
hsa-miR-1914	6,79	6,34	3,85	1,76	0,02	1,7
hsa-miR-1914-3p	3,61	2,34	1,63	2,22	0,02	1,7
hsa-miR-1915	11,6	10,23	7,35	1,58	0,0043	2,37
hsa-miR-1972	6,08	8,64	7,48	1,42	0,37	0,43
hsa-miR-1973	12,02	11,97	11,35	1,06	0,82	0,09
hsa-miR-1975	12,24	12,97	14,43	1,18	0,09	1,05
hsa-miR-1979	14,39	15,85	12,79	1,24	0,02	1,7
hsa-miR-2276	5,79	7,56	4,89	1,54	0,11	0,96
hsa-miR-2278	3,97	2,41	1,86	2,13	0,03	1,52
hsa-miR-3123	5,02	5,11	1,67	3,05	1,56E-05	4,81
hsa-miR-3125	5,19	3,88	2,87	1,81	0,1	1
hsa-miR-3126-3p	6,36	3,61	2,15	2,96	0,0003	3,59

miRNA	AO ortalama	DA ortalama	GBM ortalama	Oran	p	FDR p
hsa-miR-3127	6,59	3,48	1,78	3,7	4,76E-07	6,32
hsa-miR-3128	4,55	6,48	1,69	3,83	1,14E-07	6,94
hsa-miR-3129	4,79	5,06	2	2,53	0,0004	3,44
hsa-miR-3130-3p	6,28	2,49	1,64	3,83	5,26E-07	6,28
hsa-miR-3130-5p	5,18	3,92	1,97	2,63	0,0016	2,79
hsa-miR-3131	5,15	4,81	2,43	2,12	0,0058	2,23
hsa-miR-3132	4,91	2,34	2,36	2,1	0,02	1,7
hsa-miR-3134	6,27	3,56	1,78	3,52	9,73E-06	5,01
hsa-miR-3137	3,2	3,83	1,67	2,29	0,0052	2,28
hsa-miR-3138	4,57	3,82	1,67	2,73	0,0005	3,32
hsa-miR-3139	4,83	6,38	3,29	1,94	0,02	1,7
hsa-miR-3140	4,63	2,32	2,99	2	0,17	0,77
hsa-miR-3141	10,88	7,92	5,24	2,08	0,0001	3,97
hsa-miR-3144-5p	4,34	2,55	1,98	2,19	0,02	1,7
hsa-miR-3145	4,78	3,84	1,68	2,84	0,0003	3,46
hsa-miR-3146	4,8	6,4	3,29	1,94	0,02	1,7
hsa-miR-3147	4,47	5,07	2,8	1,81	0,04	1,4
hsa-miR-3154	3,42	4,86	5,79	1,69	0,25	0,6
hsa-miR-3155	4,71	2,48	2,3	2,05	0,03	1,52
hsa-miR-3162	8,82	3,61	3,83	2,44	0,0004	3,41
hsa-miR-3172	4,06	4,89	2,29	2,13	0,0063	2,2
hsa-miR-3174	10,17	7,36	6,67	1,53	0,07	1,15
hsa-miR-3198	3,91	2,26	3,04	1,73	0,35	0,46
hsa-miR-4286	7,01	4,97	2,85	2,46	0,0005	3,34
hsa-miR-4288	3,49	5,06	1,67	3,03	8,95E-05	4,05
hsa-miR-4290	3,75	6,46	1,68	3,84	2,03E-07	6,69
hsa-miR-4291	5,09	3,81	1,67	3,05	0,0002	3,75
hsa-miR-4292	5,22	5,19	2,8	1,86	0,02	1,7
hsa-miR-4293	6,23	2,31	2,44	2,7	0,0007	3,18
hsa-miR-4295	4,85	2,32	1,77	2,75	0,0011	2,97
hsa-miR-4296	4,98	2,56	1,68	2,96	0,0005	3,27
hsa-miR-4297	3,68	3,8	1,67	2,27	0,0046	2,34
hsa-miR-4298	6,38	2,52	2,06	3,09	3,92E-05	4,41
hsa-miR-4299	5,2	3,82	1,97	2,63	0,0017	2,77
hsa-miR-4301	4,91	3,73	2,37	2,07	0,03	1,52
hsa-miR-4303	4,98	3,6	2,12	2,35	0,0092	2,04
hsa-miR-4304	3,42	2,24	1,67	2,04	0,04	1,4
hsa-miR-4305	3,41	2,41	1,73	1,97	0,06	1,22
hsa-miR-4306	10,25	12,27	13,15	1,28	0,03	1,52
hsa-miR-4307	3,26	2,53	2,5	1,31	0,69	0,16
hsa-miR-4308	4,83	7,83	2,89	2,71	3,35E-05	4,47
hsa-miR-4309	4,61	5,04	3,26	1,54	0,18	0,74
hsa-miR-4310	4,96	4,85	2,14	2,32	0,0009	3,05
hsa-miR-4314	3,3	2,51	1,67	1,97	0,05	1,3
hsa-miR-4315	4,79	3,82	1,68	2,85	0,0003	3,47
hsa-miR-4316	4,79	6,65	4,04	1,65	0,09	1,05
hsa-miR-4317	5,98	3,7	2,52	2,37	0,0037	2,44
hsa-miR-4324	18,25	18,43	18,09	1,02	0,23	0,64
hsa-miR-4325	6,14	2,5	2,37	2,6	0,0007	3,18



**Şekil 33.** Beyin tümörü tanılı olguların miRNA ekspresyonlarının tanı gruplarına göre karşılaştırılması

## BÖLÜM IV

### 4.1. TARTIŞMA

Günümüze kadar, beyin tümörlerinde miRNA ekspresyon çalışmalarının yayınlanan büyük bir kısmı çok az sayıda tümör ve sınırlı miRNA array platformlarında gerçekleştirilmiştir. Malzkorn ve ark.' ları 4 olgu, Chan ve ark.' ları 5 olgu, Ciafre ark.' ları 9 olgu, Yang ve ark.' ları 14 olgu ve Rao ve ark.' ları 39 olgu ile beyin tümörlerinde miRNA ekspresyon profillerini çalışmışlardır (20, 31, 130, 154, 192). Çalışmamızda 50 beyin tümörlü olguda miRNA ekspresyonu çalışılmış olup birçok çalışmaya göre daha geniş olgu serilerinde daha çok sayıda miRNA değerlendirilmeye alınmıştır.

Beyin tümörü ile ilgili çok az sayıda çalışmada primer hücre kültürü kullanılmıştır (19, 42, 74, 153). Hücre kültürü, onkoloji araştırmaları için en önemli araçlardan birisidir. Bağımsız kanser tipleri ile ilişkili ve kanser fizyolojisini anlamada biyokimya ve moleküler biyolojinin çalışıldığı benzersiz bir sistemdir (113). Primer kültürleri de içine alan in vitro kanser modellerinin avantajları yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. İyi karakterize edilmiş in vitro kanser modellerinin tekrarlanabilirliğinin sınırlı olması bunlardan birisidir. Ayrıca primer kültürler birkaç tip stromal ve infiltre hücre tipi içerebilirler ve bu da verileri yorumlamada karışıklığa sebep olabilir. Bununla birlikte, intakt dokudaki hücresel etkileşimleri



daha iyi yansıtmaktadır (113). İlave olarak kısa süreli primer hücre kültürünün (<10 pasaj) tümör biyolojisini daha iyi yansıttığı da göz önünde bulundurulmalıdır (42). Çalışmamızda primer hücre kültürü ile ilgili olumsuzlukları en aza indirmek için gerekli hassasiyet gösterilmiştir. Eksplant kültürü yapılan beyin tümörü örneğinin eş parçası patolojik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca hücre kültürüne özgü değişiklikleri ekarte etmek için tüm olguların 4. pasajları miRNA ekspresyonları için çalışılmıştır. In vitro kanser modeli ile çalışmak beyin tümörü miRNA profiline önemli katkılarda bulunmuştur.

Birçok çalışmada, DBTRG-05MG, U-118 MG, U-87 MG, A-172, LN-18, M059J, M059K, LN229, T98G, U138MG v.b. beyin tümörü hücre hatları in vitro kanser modeli olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda U-87 MG, U-118 MG ve LN-18 beyin tümörü hücre hatları GBM modeli olarak ve olgu gruplarındaki miRNA ekspresyon değişimlerinin GBM fenotipine benzerliklerini değerlendirmek için kullanıldı.

GBM' de en kapsamlı çalışılan miRNA' lardan birisi miR-21' dir ve GBM' de en anlamlı aşırı-eksprese olan (normal beyine göre tümörlerde 100 kat daha yüksek ekspresyon) miRNA' lardan biri olarak tanımlanmıştır (20). Hüresel ve moleküler kanıtlar miR-21' in GBM biyolojisinde hücre sağkalımı ve göçü gibi çeşitli fonksiyonları regüle ettiğini göstermektedir (55). miR-21' in GBM' de önemli bir onkogenik miRNA olduğu belirtilmektedir. Özellikle, miR-21' in inhibisyonunun hücre sağkalımı ve ayrıca GBM hücrelerinin bir takım kemo-terapötik ajanlara ve TNF-ilişkili ligandlara karşı sensitivitesinin artmasını sağladığı gösterilmiştir (20, 37, 118, 156). miR-21' in anti-apoptotik etkisi hücre döngüsünün düzenlenmesini etkileyebilmektedir. miR-21' in "knock-down" u hücre döngüsü arestini indükler.

Ayrıca miR-21' in PTEN' i direkt olarak hedeflediği veya PTEN-bağımsız yolak aracılığıyla EGFR/Akt hücre sağkalım yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (156, 200). İlave olarak, miR-21, sağkalım ve hücre döngüsü arestini, p53-aracılı ve mitokondriyal apoptotik yollar ile kısmen HNRPK ve Tap63' ün direkt regülasyonu yoluyla da gerçekleştirmektedir (143). Yüksek miR-21 ekspresyonu hücre proliferasyonu/döngüsündeki fonksiyonlarına ek olarak, GBM, meme ve prostat kanserlerinde hücre migrasyonu ve invazyonunu kolaylaştırmaktadır. miR-21 susturulmuş gliom hücrelerinin gen ekspresyon analizleri ile miR-21 hedeflerinin, ekstraselüler matriks modellemesi ve vasküler gelişimde fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. Özellikle matriks metalloproteaz (MMPs) inhibitörleri olan RECK ve TIMP3' ün GBM hücre göçü ve invazyonunu kolaylaştırmak için miR-21 tarafından direkt olarak hedeflendiği gösterilmiştir (35, 55). Meme ve/veya prostat kanserlerinde hücre göçünde miR-21' in önemli hedefleri oldukları gösterilen Tropomiyosin 1, PDCD4, Maspin, RhoB, ve MARCKS genlerinin gliom hücre göçünde de önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (35, 118).

DA, AO ve GBM olgularında miR-21 ekspresyonu en yüksek olarak belirlenmiş ve olgu grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 18). Conti ve ark, yaptıkları çalışmada miR-21 ekspresyonunun gliom örneklerinde yukarı-regüle olduğunu bulmuşlardır (36). miR-21' in aşırı ekspresyonu hücre döngüsü arresti, anti apoptotik etkisi, metastaz ve invazyon özellikleri ile beyin tümörü fenotipini oluşturduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

let-7 ailesi üyeleri tümör supresör miRNA' lardır (48, 104, 112, 169). let-7' nin kanserlerde aşağı-regüle olduğu ve bunun da proto-onkogenlerden RAS, HMGA2,

MYC, integrin beta 3, onkofetal gen IMP-1 ve miRNA maturasyon RNAaz dicer' in yukarı-regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Let-7b' nin, siklin D1, D3 ve A' nin ve siklin bağımlı kinaz (Cdk) 4' ün ekspresyonlarını aşağı-regüle ettiği gösterilmiştir (10, 54, 89, 111, 133, 139, 144, 146, 160, 173). Kanser kök hücrelerinde ve kanser-başlatıcı hücrelerde let-7 miRNA ekspresyonu düşük seviyelerdedir ve bu da diferansiasyonu artırmaktadır. HMGA2 susturulması ile kendi kendini yenilemeyi etkilemeden diferansiasyonun arttığı, H-RAS' in susturulması ile diferansiasyonu etkilemeden, kendi kendini yenilemeyi azalttığı gösterilmiş ve hedeflerini susturarak let-7' nin kök hücre benzeri özellikleri regüle ettiği ileri sürülmüştür (44, 195). Lin28 ve Lin28b, let-7 miRNA ailesinin prekürsörlerinin terminal ucu ile ilişkili olan RNA bağlayıcı proteinler olarak görev görmekte ve onların olgun miRNA' lara dönüşümünü engellemektedir (73, 141, 150, 159, 176). Lin28 ve Lin28b' nin kanserlerde aşırı-eksprese olduğu bilinmektedir ve bu mekanizma let-7' nin aşağı-modülasyonunu ve devamındaki "downstream" etkileri açıklamaktadır (69, 127, 177, 185).

Çalışmamızda ilginç olarak DA, AO ve GBM tanılı tüm olgularda ve beyin tümörü hücre hatlarında let-7 ailesinin ekspresyon değerleri yüksek olarak belirlendi. Çalışmamızdaki miRNA ekspresyonları, miRanda veri tabanındaki U-87 miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında uyumlu çıkmaktadır. miRanda U-87 veri tabanındaki miR-21 ekspresyon değerini (0,106) 1 olarak kabul edersek let-7a ekspresyonu 1,10 (0,117/0,106) ve let-7b ekspresyonu 1,23 (0,130/0,106) olmaktadır. Çalışmamızda GBM grubunda, miR-21 ekspresyon değeri 21,95' i (Tablo 18) 1 olarak kabul edersek let-7a ekspresyonu 0,99 (21,80/21,98) ve let-7b

ekspresyonu 0,98 (21,52/21,98) olmaktadır. miRanda veritabanındaki let-7 ekspresyonları miR-21 ekspresyonundan biraz yüksektir. Çalışmamızda ise let-7 ekspresyonu miR-21 ekspresyonuna benzerdir.

miR-23a miR-23a~27a~24-2 kümesinin ilk üyesidir ve çeşitli kanserlerde rol oynar. Onkogenik transkripsiyon faktörü c-Myc glutamin katabolizmasını, hücre döngüsünü ve glukoz metabolizmasını regüle eder. c-Myc' in glutamin katabolizmasındaki stimüle edici rolü kısmen miR-23a ve miR-23b' nin represyonu ile edilir. miR-23b, miR-23b~27b~24-1 kümesinden orijinlenir ve olgun sekansında miR-23a' nın olgun sekansına göre bir nükleotid farklıdır. P-493 B lenfoma hücrelerinde ve PC3 prostat kanser hücrelerinde miR-23a/b baskılanmasına yol açan artmış c-Myc gözlemlenmiştir. miR-23a/b, hedef proteinleri olan mitokondriyal glutaminazın daha yüksek ekspresyonuna yol açar ve bu da kanser hücrelerinde biyoenerji, nükleotid biyosentezi ve redoks homeostazi için gereklidir. Ayrıca miR-23a~27a~24-2' nin direkt olarak PML-RARA onkogeni tarafından baskılandığını gözlemlenmiştir (26).

miR-23a yukarı-regülasyonun kanserlerde gözlemlendiğine dair çalışmalar da mevcuttur. Meng ve ark. miR-23a' nın (ve miR-27a) yukarı regülasyonunu insan mesane kanserlerinde rapor etmiştir (136). Gottardo ve ark. normal dokularla karşılaştırıldığında kolangiositlerde yukarı-regülasyonunu rapor etmiştir (64). Mi ve ark. miR-23a, miR-24 ve miR-27a' nın AML' lerde farklı şekilde eksprese edildiğini göstermişlerdir (137). miR-23' ün artış/azalışı birçok çalışmada rapor edilmiş olsa da bunun kanserin nedeni mi yoksa kanserin sonucu mu olduğu henüz bilinmemektedir (26). miR-23a ekspresyonu olgu tümör grupları ile tümör hücre hatları arasında benzer olup anlamlı bir fark göstermemiştir.

miR-124' ün kontrole oranla yüksek evre gliomlarda aşağı-regüle olduğunu bulmuşlardır. Bu mikroRNA ayrıca yetişkin nöral kök hücre farklılaşması sırasında yukarı-regüledir ve miR-124' ün tümör kök hücre popülasyonlarındaki yukarı-regülasyonu tümör kök hücrelerinin nöral farklılaşmasını destekler ve G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hücre döngüsü arestini indükleyerek tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Hücre döngüsü arresti CDK6 ekspresyonunun inhibisyonu yolu ile gerçekleşmektedir (116, 167). Tümör olgu gruplarında miR-124 ekspresyonu saptanmadı. Azalan miR-124 ekspresyonu ile CDK6' nın inhibisyonunun gerçekleştirilemediği ve hücre döngüsü arrestinden kurtularak tümör hücrelerinin proliferasyonunu indüklediğini düşünmekteyiz.

GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları GBM hücre hatları ile karşılaştırıldığında mir-495 ve miR-432 ekspresyonlarının 2 kat anlamlı olarak arttığı belirlendi.

mir-495 ve miR-432 ekspresyonunun tümör biyolojisi üzerine etkisi ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Huang ve ark. (79) hepatoselüler karsinomda yüksek miR-432 ekspresyonunun kısa hastaliksız sağkalımla ilişkili olduğunu, D'Angelo ve arkadaşları (41) büyüme hormonu salgılayan adenomlarda aşağı-regüle olduğunu göstermişlerdir. Verslues ve ark. meme kanseri hücrelerinde miR-495' in oldukça yukarı-regüle olduğunu ve tümörögenezi, hücre invazyonunu ve proliferasyonu indüklediğini bulmuşlardır (84). mir-495 ve miR-432' nin varsayılan hedef genlerinden (Tablo 12) ortak olan CDKN2B' dir. Gliom gelişimi ve progresyonu, tümör supresör genlerin (CDKN2A ve CDKN2B ) ve DNA tamir genlerinin (PARP1, PRKDC ve ERCC2) fonksiyonel inaktivasyonu ve ayrıca onkogen ve proto-onkogenlerin (EGF ve

ERBB2) aktivasyonuna bağılıdır. CDKN2B, Siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür ve hücre büyümesini ve hücre döngüsü G1 progresyonunu regüle etmektedir. Glioblastom hücrelerinde CDKN2A eksikliğinde, CDKN2B' nin aşırı ekspresyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği, replikatif senesensi indüklediği ve telomeraz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (122). GBM tanılı olgularda miR-432 yukarı-regülasyonunun CDKN2B ekspresyonunu inhibe edebileceğini düşünmekteyiz. CDKN2B' nin baskılanması ile büyüme inhibisyonundan, telomerazı aktive ederek senesenssten kurtulduğunu ileri sürebiliriz. Bu ilginç bulgunun ışığında, GBM tanılı olgularda CDKN2B' nin ekspresyon ve protein düzeyinde incelenmesi gerektiğini önermekteyiz.

GBM grubunda miR-20a-3p ekspresyonu GBM tümör hatları ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 6 kat anlamlı azalma saptanmıştır. Yao ve ark. düşük gradeli gliomlara göre yüksek gradeli gliomlarda yüksek miR-20a-3p ekspresyonunun bulunduğunu göstermişler ve miR-20a' nın gliom hücrelerinin büyümesini teşvik edici bir etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (193). miR-20a-3p olası hedef genlerinden biri olan TOPORS, topoizomeraz-I ve p53- bağlayan ubiquitin ligazı kodlamaktadır. Hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve hücre döngüsünün inhibisyonu ve G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> evresinde hücre birikimi indükleyici etkilerinden dolayı tümör supresör olarak tanımlanmıştır (12). Gliomlardaki grade artışı ile korele olan miR-20a-3p ekspresyonunun artışının TOPORS' un baskılanmasına neden olduğunu ve gliomagenezde rol oynayan genler arasında yer alabileceğini ileri sürebiliriz. Bu bulgunun da gen ekspresyonu ve protein düzeyinde incelenmesi gereklidir.

GBM' de ekspresyon değişimlerinin altında yatan regülatör bir ağ önerilmektedir ve burada miR-124 ve miR-132 anahtar roller oynar. Bu ağın merkezinde REST/CoREST kompleksi bulunmaktadır. REST, nöronal olmayan hücrelerde nöronal genlerin bir represörüdür ve CoREST ve Sin3 kompleksinin bir parçası olarak görev yapar (3, 67). REST' in beyin tümörlerinde yukarı-regüle olduğu bilinmektedir. Diğer bir transkripsiyon faktörü YY1, gen ekspresyonunun bir aktivatörü olarak tanımlanmıştır. Oligodenrositik farklılaşma için histon deasetilazlarla etkileşime girer ve REST' in direkt regülatörüdür (87).

REST 'in GBM regülatörleri olarak bilinen miR-124 ve miR-132' yi aşığı-regüle ettiği bilinmektedir ve bu miRNA' ların hedeflerinin GBM' de yukarı-regüle edildiği ileri sürülmüştür (34, 88). miR-124, bir "feedback loop" a sahiptir ve CoREST' i aşığı-regüle eder. COREST ve SCP1 REST kompleksi fonksiyonunu artırması ile, CDK4' ün hücre döngüsü progresyonu ile ve PTB1 diferansiasyonunun inhibisyonu ile miR-124 regülasyon kaybına neden olduğu belirtilmiştir (129). PTBP1, LAMC1, ve SCP1, miR-124' ün valide edilmiş hedefleridirler (175). SOX2, LIN28, KDM5A ve EP300 de miR-132' nin valide edilmiş hedefleridir. SOX2 ve LIN28, önemli kök hücre faktörleridirler (131). miR-124 aşığı-regülasyonu aracılığıyla hem proliferasyona ve farklılaşmanın inhibisyonuna hem de miR-132 aşığı-regülasyonu aracılığıyla kök hücre faktörlerinin ekspresyonuna ve epigenetik değişikliklere yol açar. Beyin tümörü olgu gruplarımızda miR-124 ekspresyonu hiç saptanmamış ve GBM olgu grubumuzdaki miR-132 ekspresyonu ise AO grubuna göre 4 kat azalmış olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, miRNA ve transkripsiyon faktörlerinin karşılıklı etkileşimleri ve/veya regülasyonlarının GBM fenotipinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

GBM olgu grubundaki miR-34c ekspresyonu AO grubuna göre 4 kat anlamlı azalmıştır. Spurgers ve ark. DNA hasarı ve onkogenik aktivasyon gibi olaylarda, miR-34a ve miR-34b/miR-34c bölgelerinin p53 interaksiyonu ile direkt olarak regüle edildiğini göstermiştir. Böylece, miR-34 ailesinin p53 hedefleri olarak tanımlanması, p53 denetimli genlerin repertuarını miRNA' ları da içerecek şekilde genişletmiş ve senesens, hücre döngüsü aresti ve apoptoz, miR-34 ektopik ekspresyonu biyolojik yanıtta dahil edilmiştir. Hücre döngüsü aresti ve apoptoz, p53 aktivasyonunun sonucu olduğu için miR-34 genleri p53 ile tümör baskılanmasının önemli mediyatörleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Gözlenen biyolojik etkilerle uyumlu çeşitli gen hedefleri tanımlanmıştır. Siklin E2, siklin bağımlı kinaz 4 ve hepatosit büyüme faktörü MET' in, miR-34 ekspresyonu ile aşağı-regüle edildiğini göstermişlerdir. İlginç olarak p53' ün p53-indüklenmiş hücre döngüsü arestinde payı olan CDK4 ve siklinlerin aşağı-regülasyonunu indüklediğini ve bu proteinlerin aşağı-regülasyonunun miR-34 indüksiyonu aracılı olabileceğini önermişlerdir (170). GBM grubunda, miR-34c ekspresyonunun baskılanmasının p53' ün miR-34 indüksiyonu aracılı hücre döngüsü aresti ve apoptozdan kaçış için suprese edebileceğini düşünmekteyiz. miR-34' ün baskılanmasına neden olan gen veya genler belirlenebildiği takdirde GBM' de yeni bir gen hedefli tedavi geliştirilebileceğine inanmaktayız.

GBM hücre hatları ile AO olgu grubunu karşılaştırdığımızda mir-204 ekspresyonu 6 kat artış göstermiştir. miR-204' ü valide olan hedef genleri açısından değerlendirdiğimizde gliom ile ilgili anlamlı bir gen belirlenemedi.



DA olgu grubundaki miRNA ekspresyonları GBM hücre hatları ile karşılaştırıldığında anlamlı miRNA ekspresyon farklılıkları göstermekle birlikte AO ve GBM olgu grupları ile karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark bulunmamıştır. DA' nın AO ve GBM miRNA ekspresyon profil benzerliğini, köken aldıkları glial progenitör hücreye benzerlikleri ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak miRNA ekspresyon profilleri GBM tanılı olgular ile AO tanılı olgular arasında anlamlı farklılıklar sergilemiştir. Tümör gelişiminde miRNA' ların regüle ettiği varsayılan yeni genlerin etkili olabileceği vurgulanmıştır. Gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde kopya sayısı, metilasyon ve transkripsiyon faktörlerinin ortaklaşa rol aldığı hatırlanarak bu çalışma, anlamlı olabilecek miRNA regülasyonuna açıklama getirmiştir. miRNA ekspresyonunun regülasyonunun beyin tümöründe spesifik bir gen hedefini olumlu bir şekilde etkileyebildiğini düşünmekteyiz. miRNA tedavi yönteminin başarılı şekilde uygulanabilmesi için geniş kapsamlı yeni araştırmalara gereksinim olduğunu önermekteyiz.

## BÖLÜM V

### 5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda 2007-2011 yılları arasında beyin tümörü tanısı almış 50 (19K, 31E) olgunun (32 olgu glioblastoma multiforme, 10 diffüz astrostom ve 8 anaplastik oligodendrogliom) miRNA ekspresyon profilleri çalışıldı. Anlamli değişim gösteren miRNA'ların varsayılan hedef genleri 7 veri tabanı (DIANA-microT, Targetscan, miRDB, RNA22-HSA, TARGETMINER, PICTAR-VERT ve miRanda) kullanarak belirlendi. miR-21 ekspresyonunun tüm olgularda yüksek düzeyde olduğu ve mir-124 ekspresyonunun olmadığı bulundu.

GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında miR-495 ve miR-432 ekspresyonları 2 kat anlamli artma ve miR-708-3p, mir-339-5p ve miR-4286 ekspresyonları 4 kat, mir-331-3p, miR-625-3p ve miR-20a-3p 5 kat azalma gösterdi.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları, GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında miR-34c-3p, miR-132-5p, mir-605, miR-3130-3p, miR-3127, mir-517a-pre, mir-548b-3p, miR-921, miR-769-5p' de anlamli artma saptandı.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında mir-204 ekspresyonunun 6 kat anlamlı olarak azaldığı belirlendi.

DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları, beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında 18 miRNA ekspresyonu anlamlı artma ve 7 miRNA ekspresyonu anlamlı azalma gösterdi.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları, DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında anlamlı değişim saptanmadı. DA, AO ve GBM olgularının miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 29 miRNA ekspresyonunun anlamlı farklılık gösterdiği bulundu.

GBM tanılı olgularda GBM hücre hatlarına göre mir-495 ve miR-432' in yukarı-regüle olduğu saptandı. mir-495 ve miR-432 varsayılan hedef genlerinden ortak olan CDKN2B' dir. CDKN2B' nin baskılanması ile büyüme inhibisyonundan, telomerazı aktive ederek senensensten kurtulduğunu ileri sürebiliriz. Bu ilginç bulgunun ışığında, GBM tanılı olgularda CDKN2B' nin ekspresyon ve protein düzeyinde incelenmesi gerektiğini önermekteyiz.

GBM tümör hatlarındaki miR-20a-3p ekspresyonu GBM olgu grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 6 kat anlamlı artma saptanmıştır. miR-20a-3p ekspresyonun artışının TOPORS' un baskılanmasına neden olduğunu ve gliomagenezde rol oynayan genler arasında yer alabileceğini ileri sürebiliriz. Bu bulgunun da gen ekspresyonu ve protein düzeyinde incelenmesini önermekteyiz.

GBM olgu grubundaki miR-34c ekspresyonunun AO grubuna göre 4 kat anlamlı azaldığı saptanmıştır. GBM grubunda, miR-34c ekspresyonunun

baskılanması p53' ün miR-34 indüksiyonu aracılı hücre döngüsü aresti ve apoptozdan kaçış için suprese edebileceğini düşünmekteyiz. miR-34' ün baskılanmasına neden olan gen veya genlerin belirlenmesini önermekteyiz. Genler belirlenebildiği takdirde GBM' de yeni bir gen hedefli tedavi geliştirilebileceğine inanmaktayız.

## BÖLÜM VI

### 6.1. ÖZET

#### DİFFÜZ VE YÜKSEK DERECELİ GLİAL TÜMÖRLERDE miRNA EKSPRESYON

#### DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Beyin tümörleri hastalıkların heterojen bir spektrumunu kapsar. Malin gliomlar yetişkinlerde en agresif ve en sık görülen gruptur ve astrositik veya oligodendroglial farklılaşmanın değişen dereceli çeşitli alttiplerini kapsar. Bu çalışmada diffüz ve anaplastik beyin tümörlü olgularda miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda 2007-2011 yılları arasında beyin tümörü tanısı almış (32 glioblastoma multiforme, 10 diffüz astrositom ve 8 anaplastik oligodendrogliom) 50 (19K, 31E) olgunun ve beyin tümörü hücre hatlarının (U-87 MG, U-118 MG ve LN18) miRNA ekspresyon profilleri mikroarray yöntemi ile çalışıldı. Anlamli değişim gösteren miRNA'ların varsayılan hedef genleri 7 veri tabanı kullanarak belirlendi. miR-21 ekspresyonunun tüm olgularda yüksek düzeyde olduğu ve mir-124 ekspresyonunun olmadığı bulundu.

GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında miR-495 ve miR-432 ekspresyonları 2 kat anlamli artma ve

miR-708-3p, mir-339-5p ve miR-4286 ekspresyonları 4 kat, mir-331-3p, miR-625-3p ve miR-20a-3p 5 kat azalma gösterdi.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları GBM tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında miR-34c-3p, miR-132-5p, mir-605, miR-3130-3p, miR-3127, mir-517a-pre, mir-548b-3p, miR-921, miR-769-5p' de anlamlı artma saptandı.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında mir-204 ekspresyonunun 6 kat anlamlı olarak azaldığı belirlendi.

DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları beyin tümörü hücre hatları ile karşılaştırıldığında 18 miRNA ekspresyonu anlamlı artma ve 7 miRNA ekspresyonu anlamlı azalma gösterdi.

AO tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları DA tanısı almış olguların miRNA ekspresyonları ile karşılaştırıldığında anlamlı değişim saptanmadı. DA, AO ve GBM olgularının miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 29 miRNA ekspresyonunun anlamlı farklılık gösterdiği bulundu.

Sonuç olarak miRNA ekspresyon profilleri GBM tanılı olgular ile AO tanılı olgularda arasında anlamlı farklılıklar sergilemiştir. Tümör gelişiminde miRNA' ların regüle ettiği varsayılan yeni genlerin etkili olabileceği vurgulanmıştır. Gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde kopya sayısı, metilasyon ve transkripsiyon faktörlerinin ortaklaşa rol aldığı hatırlanarak bu çalışma, anlamlı olabilecek miRNA regülasyonuna açıklama getirmiştir. miRNA' nın ekspresyonunun regülasyonu beyin tümöründe spesifik bir gen hedefini olumlu bir şekilde etkileyebilir. miRNA tedavi

yönteminin başarılı şekilde uygulanabilmesi için geniş kapsamlı yeni araştırmalara gereksinim olduğunu önermekteyiz.

## 6.2. ABSTRACT

### DETECTION of miRNA EXPRESSION CHANGES in DIFFUSE and HIGH GRADE GLIAL TUMORS

Brain tumors include a heterogeneous spectrum of diseases. Malignant gliomas are the most aggressive and the most common group in adults and include various subtypes of varying degrees of astrocytic and oligodendroglial differentiation. In this study, it was aimed to determine the expression profiles of miRNAs in patients with diffuse and anaplastic brain tumors.

miRNA expression profiles of 50 cases (19F, 31M) diagnosed with brain tumor (32 glioblastoma multiforme, 10 diffuse astrocytoma, 8 anaplastic oligodendroglioma) between the years 2007-2011 in Ege University Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery and of brain tumor cell lines (U-87 MG, U-118 MG and LN18) studied by the microarray method. Significant changes in miRNAs' putative target genes were identified by using 7 data base. In all cases miR-21 expression level was high and no mir-124 expression was detected.

When miRNA expressions of patients who were diagnosed GBM, compared to brain tumor cell lines, miR-495 and miR-432 expression showed significant 2-fold increase, and miR-708-3p, mir-339-5p and miR-4286 expressions 4-fold, mir-331-3p, miR-625-3p, and miR-20a-3p showed 5-fold reduction

miRNA expressions compared with patients who were diagnosed GBM and AO, it was detected that miR-34c-3p, miR-132-5p, mir-605, miR-3130-3p, miR-3127,



mir-517a-pre, mir-548b-3p, miR-921, miR-769-5p were significantly increased.

It was detected that mir-204 expression was significantly decreased 6 times in cases who were diagnosed with AO compared to brain tumor cell lines.

miRNA expression profiles of patients diagnosed with DA compared with brain tumor cell lines, miRNA expression was significantly increased at 18 of total and significantly decreased in 7 of all.

No statistically significant change was detected miRNA expression of cases diagnosed with AO compared with DA. miRNA expressions of DA, AO and GBM cases compared and significant differences were found in 29 miRNA expression.

As a result, miRNA expression profiles of cases with GBM showed significant differences between patients diagnosed with AO. It was emphasized that, new genes could be effective in tumor development supposed to be regulated by miRNAs. In the regulation of gene expression; copy number, methylation and transcription factors having roles was recollected, this study may be significant in the regulation of miRNA to account. Regulation of miRNA expression can affect a specific gene target in brain tumors in a positive way. To implement miRNA treatment method successfully, we suggest a wide range of new research.

## BÖLÜM VII

### 7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing, *Cell*, 13;113(6):673-6
2. Ambros, V., Chen, X. (2007). The regulation of genes and genomes by small RNAs, *Development*, 134(9):1635-1641
3. Andrés, M.E., Burger, C., Peral-Rubio, M.J., Battaglioli, E., Anderson, M.E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N., Mandel, G. (1999). CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17):9873-8
4. Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output, *Nature*, 455(7209):64-71
5. Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature*, 444(7120):756-60
6. Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116(2):281-97
7. 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 Res*, 1;67(9):4010-5
8. Birney, E., Stamatoyannopoulos, JA., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, TR., Margulies, EH., Weng, Z. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1Y of the human genome by the ENCODE pilot project, *Nature*, 14;447(7146):799-816
9. Bohnsack, MT., Czaplinski, K., Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs, *10(2):185-91*
10. Boyerinas, B., Park, SM., Shomron, N., Hedegaard, MM., Vinther, J., Andersen, JS., Feig, C., Xu, J., Burge, CB., Peter, ME. (2008). Identification of let-7-regulated oncofetal genes, *Cancer Res*, 68(8):2587-91
11. Boyle, P., Levin, B. (2008). Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu Dünya Kanser Raporu
12. Bredel, M., Bredel, C., Juric, D., Harsh, G.R., Vogel, H., Recht, L.D., Sikic, B.I. (2005). High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors, *Cancer Res*, 65(10):4088-96

13. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition, *PLoS Biol*, 3(3):e85
14. Burger, P.C. (2006). Supratentorial primitive neuroectodermal tumor (sPNET), *Brain Pathol*, 16(1):86
15. Bushati, N., Cohen, S.M. (2007). microRNA functions, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:175-205
16. Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, *RNA*, 10(12):1957-66
17. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, 99(24):15524-9
18. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc Natl Acad Sci*, 101(9):2999-3004
19. Caretti, V., Jansen, MH., van Vuurden, DG., Lagerweij, T., Bugiani, M., Horsman, I., Wessels, H., van der Valk, P., Cloos, J., Noske, DP. Vandertop, WP., Wesseling, P., Wurdinger, T., Hulleman, E., Kaspers, GJ. (2012). Implementation of a Multi-Institutional Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Autopsy Protocol and Characterization of a Primary Cell Culture, *Neuropathol Appl Neurobiol*. [Epub ahead of print]
20. Chan, J.A., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res*, 65(14):6029-33
21. Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, *Nat Genet*, 40(1):43-50
22. Chaudhry, M.A., Sachdeva, H., Omaruddin, R.A. (2010). Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways, *DNA Cell Biol*, 29(9):553-61
23. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation, *Science*, 303(5654):83-6
24. Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing, *Nature*, 436(7051):740-4
25. Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P. (2005). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis, *Nucleic Acids Res*, 33(4):1290-7
26. Chhabra, R., Dubey, R., Saini, N. (2010). Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases, *Mol Cancer*, 3;9:232
27. Cho, W.C. (2007). OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers, *Mol Cancer*, 6:60
28. Cho, W.C. (2010). MicroRNAs in cancer - from research to therapy, *Biochim Biophys Acta*, 1805(2):209-17

29. Cho, W.C. (2010). MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy, *Int J Biochem Cell Biol*, 42(8):1273-81
30. Cho, WC. (2011). MicroRNAs in Cancer Translational Research
31. Ciafrè, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C.G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C.M., Farace, M.G. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma, *Biochem Biophys Res Commun.*, 334(4):1351-8
32. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7):2464
33. Cobbers, J.M., Wolter, M., Reifemberger, J., Ring, G.U., Jessen, F., An, H.X., Niederacher, D., Schmidt, E.E., Ichimura, K., Floeth, F., Kirsch, L., Borchard, F., Louis, D.N., Collins, V.P., Reifemberger, G. (1998). Frequent inactivation of CDKN2A and rare mutation of TP53 in PCNSL. *Brain Pathol*, 8(2):263–276
34. Conaco, C., Otto, S., Han, J.J., Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14;103(7):2422-7
35. Connolly, E.C., Van, D. K., Rogler, L.E., Rogler, C.E. (2010). Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB, *Mol Cancer Res*, 8(5):691-700
36. Conti, A., Aguenouz, M., La, T.D., Tomasello, C., Cardali, S., Angileri, F.F., Maio, F., Cama, A., Germanò, A., Vita, G., Tomasello, F. J. (2009). miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors, *Neurooncol*, 93(3):325-32
37. Corsten, M.F., Miranda, R., Kasmieh, R., Krichevsky, A.M., Weissleder, R., Shah, K. (2007). MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas, *Cancer Res*, 67(19):8994-9000
38. Cortez, M.A., Nicoloso, M.S., Shimizu, M., Rossi, S., Gopisetty, G., Molina, J.R., Carlotti, C. Jr., Tirapelli, D., Neder, L., Brassesco, M.S., Scrideli, C.A., Tone, L.G., Georgescu, M.M., Zhang, W., Pudevalli, V., Calin, G.A. (2010). miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma, *Genes Chromosomes Cancer*, 49(11):981-90
39. Costa, F.F. (2005). Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology, *Gene*, 357(2):83-94
40. Cowland, J.B., Hother, C., Grønbaek, K. (2007). MicroRNAs and cancer. *APMIS*, 115(10):1090-106
41. D'Angelo, D., Palmieri, D., Mussnich, P., Roche, M., Wierinckx, A., Raverot G, Fedele, M., Croce, C.M., Trouillas, J., Fusco, A. (2012). Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1, *J Clin Endocrinol Metab*, 97(7):E1128-38
42. De Witt Hamer, PC., Van Tilborg, AA., Eijk, PP., Sminia, P., Troost, D., Van Noorden, CJ., Ylstra, B., Leenstra, S. (2008) The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids, *Oncogene*, 27(14):2091-6

43. Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster, Thomas-Tikhonenko A. *Nat Genet*, 38(9):1060-5
44. Dröge, P., Davey, CA. (2008). Do cells let-7 determine stemness?, *Cell Stem Cell*, 2(1):8-9
45. Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjörn, M., Hansen, H.F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E.M., Kauppinen, S. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates, *Nature*, 452(7189):896-9
46. Ernst, A., Campos, B., Meier, J., Devens, F., Liesenberg, F., Wolter, M., Reifenberger, G., Herold-Mende, C., Lichter, P., Radlwimmer, B. (2010). De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures, *Oncogene*, 29(23):3411-22
47. Esquela-Kerscher, A., Slack, FJ. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer, *Nat Rev. Cancer*, 6(4):259-69
48. Esquela-Kerscher, A., Trang, P., Wiggins, JF., Patrawala, L., Cheng, A., Ford, L., Weidhaas, JB., Brown, D., Bader, AG., Slack, FJ. (2008). The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer, *Cell Cycle*, 7(6):759-64
49. Evans, S.M., Judy, K.D., Dunphy, I., Jenkins, W.T., Hwang, W.T., Nelson, P.T., Lustig, R.A., Jenkins, K., Magarelli, D.P., Hahn, S.M., Collins, R.A., Grady, M.S., Koch, C.J. (2004). Hypoxia is important in the biology and aggression of human glioblastoma, *Clin Cancer Res*, 10(24):8177-84
50. Favaro, E., Ramachandran, A., McCormick, R., Gee, H., Blancher, C., Crosby, M., Devlin, C., Blick, C., Buffa, F., Li, J.L., Vojnovic, B., Pires das Neves, R., Glazer, P., Iborra, F., Ivan, M., Ragoussis, J., Harris, AL. (2010). MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU, *PLoS One*, 5(4):e10345
51. Ferretti, E., De Smaele, E., Po, A., Di Marcotullio, L., Tosi, E., Espinola, M.S, Di Rocco, C., Riccardi, R., Giangaspero, F., Farcomeni, A., Nofroni, I., Laneve, P., Gioia, U., Caffarelli, E., Bozzoni, I., Screpanti, I., Gulino, A. (2009). MicroRNA profiling in human medulloblastoma, *Int J Cancer*, 124(3):568-77
52. Filippini, G., Maisonneuve, P., McCredie, M. (2002). Relation of childhood brain tumors to exposure of parents and children to tobacco smoke: the SEARCH international case-control study. *Surveillance of Environmental Aspects Related to Cancer in Human*, *Int J Cancer*, 100: 206-213
53. Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M. (2007). Epidemiology of brain tumors, *Neurol Clin*, 25: 867-90, vii
54. Forman, JJ., Legesse-Miller, A., Collier, HA. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(39):14879-84
55. Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, CC., Burchard, J., Linsley, PS., Krichevsky, AM. (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators, *Mol Cell Biol*, (17):5369-80
56. Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of

- tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma, *Cancer Res*, 64(19):7011-21
57. Gangaraju, V.K., Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2):116-25
  58. Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., Dang, C.V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism, *Nature*, 458(7239):762-5
  59. Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., Croce, C.M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer, *Trends Mol Med*, 12(12):580-7
  60. Gillies, J.K., Lorimer, I.A. (2007). Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma, *Cell Cycle*, 6(16):2005-9
  61. Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., Schier, A.F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish, *Science*, 308(5723):833-8
  62. Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Nuovo, G., Palatini, J., De Lay, M., Van Brocklyn, J., Ostrowski, M.C., Chiocca, E.A. (2010). MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells, *Lawler SE. Mol Cell*, 37(5):620-32
  63. Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H.B., Chiocca, E.A. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal, *Lawler S. Cancer Res*, 68(22):9125-30
  64. Gottardo, F., Liu, C.G., Ferracin, M., Calin, G.A., Fasan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L.G., Croce, C.M., Baffa, R. (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers, *Urol Oncol*, 25(5):387-92
  65. Gramantieri, L., Fornari, F., Callegari, E., Sabbioni, S., Lanza, G., Croce, C.M., Bolondi, L., Negrini, M. (2008). MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma, *J Cell Mol Med*, 12(6A):2189-204
  66. Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res*, D154-8
  67. Grimes, J.A., Nielsen, S.J., Battaglioli, E., Miska, E.A., Speh, J.C., Berry, D.L., Atouf, F., Holdener, B.C., Mandel, G., Kouzarides, T. (2000). The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex, *J Biol Chem*, 275(13):9461-7
  68. Guessous, F., Zhang, Y., Kofman, A., Catania, A., Li, Y., Schiff, D., Purow, B. (2010). microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells, *Abounader R. Cell Cycle*, 9(6):1031-6
  69. Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., Aburatani, H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma, *Gene*, 384:51-61
  70. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells, *Nature*, 404(6775):293-6
  71. Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing, *Genes Dev.*, 18(24):3016-27

72. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., Hammond, S.M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene, *Nature*, 435(7043):828-33
73. Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., Kim, VN. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA, *Mol Cell*, 32(2):276-84
74. Higgins, SC., Steingrimsdottir, H., Pilkington, GJ. J (2010). Human, mouse or rat? Species authentication of glioma-derived cell cultures, *Neurosci Methods*, 194(1):139-43
75. <http://www.atcc.org>
76. <http://www.genbilim.com/content/view/7944/33/>
77. <http://www.microrna.ic.cz/mirna4.html>
78. <http://www.saglikhatti.org/beyin-cerebrum.html>
79. Huang, Y.H., Lin, K.H., Chen, H.C., Chang, M.L., Hsu, C.W., Lai, M.W., Chen, T.C., Lee, W.C., Tseng, Y.H., Yeh, C.T. (2012). Identification of postoperative prognostic microRNA predictors in hepatocellular carcinoma, *PLoS One*, 7(5):e37188
80. Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(47):16961-6
81. Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., Holland, E.C. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo, *Genes Dev.*, 23(11):1327-37
82. Hutvagner, G., Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex, *Science*, 297(5589):2056-60
83. Hwang, H.W., Mendell, J.T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis, *Br J Cancer*, 94(6):776-80
84. Hwang-Verslues, W.W., Chang, P.H., Wei, P.C., Yang, C.Y., Huang, C.K., Kuo, W.H., Shew, J.Y., Chang, K.J., Lee, E.Y., Lee, W.H. (2011). miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1, *Oncogene*, 30(21):2463-74
85. Idogawa, M., Sasaki, Y., Suzuki, H., Mita, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T. (2009). A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells, *Clin Cancer*, 15(11):3725-32
86. Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C.D., Bishop, J.M., Felsher, D.W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC, *Science*, 297(5578):102-4
87. Jiang, L., Yao, M., Shi, J., Shen, P., Niu, G., Fei, J. (2008). Yin yang 1 directly regulates the transcription of RE-1 silencing transcription factor, *J Neurosci Res.*, 86(6):1209-16
88. Johnson, R., Zuccato, C., Belyaev, N.D., Guest, D.J., Cattaneo, E., Buckley, N.J. (2008). A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease, *Neurobiol Dis*, 29(3):438-45
89. Johnson, SM., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A.,

- Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family, *Cell*, 120(5):635-47
90. Jörg-Christian Tonn, Manfred Westphal, James T. Rutka. (2010). *Oncology of CNS Tumors*
  91. Judkins, A.R., Ellison, D.W. (2010). Ependyoblastoma: dear, damned, distracting diagnosis, farewell!\*, *Brain Pathol.*, 20(1):133-9
  92. Kapsimali, M., Kloosterman, W.P., de Bruijn, E., Rosa, F., Plasterk, R.H., Wilson, S.W. (2007). MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system, *Genome Biol.*, 8(8):R173
  93. Karginov, F.V., Conaco, C., Xuan, Z., Schmidt, B.H., Parker, J.S., Mandel, G., Hannon, G.J. (2007). A biochemical approach to identifying microRNA targets, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(49):19291-6
  94. Karp, X., Ambros, V. (2005). Encountering microRNAs in cell fate signaling, *Science*, 310(5752):1288-9
  95. Kawase-Koga, Y., Otaegi, G., Sun, T. (2009). Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system, *Dev Dyn.*, 238(11):2800-12
  96. Kefas, B., Comeau, L., Erdle, N., Montgomery, E., Amos, S., Purow, B. (2010). Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells, *Neuro Oncol.*, 12(11):1102-12
  97. Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fine, H., Chiocca, E.A., Lawler, S., Purow, B. (2008). microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma, *Cancer Res.*, 68(10):3566-72
  98. Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. Elegans*, *Genes Dev.*, 15(20):2654-9
  99. Kim, H., Huang, W., Jiang, X., Pennicooke, B., Park, P.J., Johnson, M.D. (2010). Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107(5):2183-8
  100. Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6(5):376-85
  101. Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., Mendell, J.R., Mendell, J.T. (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model, *Cell*, 137(6):1005-17
  102. Krützfeldt, J., Kuwajima, S., Braich, R., Rajeev, K.G., Pena, J., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel M. *Nucleic Acids Res.* (2007). Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs, 35(9):2885-92
  103. Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.G., Croce, C.M., Negrini, M., Calin, G.A., Ivan, M. (2007). A microRNA signature of hypoxia, *Mol Cell Biol.*, 27(5):1859-67
  104. Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(10):3903-8
  105. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science*, 294(5543):853-8



106. Lavon, I., Zrihan, D., Granit, A., Einstein, O., Fainstein, N., Cohen, MA., Cohen, MA., Zelikovitch, B., Shoshan, Y., Spektor, S., Reubinoff, BE., Felig, Y., Gerlitz, O., Ben-Hur, T., Smith, Y., Siegal, T. (2010). Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells, *Neuro Oncol.*, 12(5):422-33
107. Lawinger, P., Venugopal, R., Guo, ZS., Immaneni, A., Sengupta, D., Lu, W., Rastelli, L., Marin Dias Carneiro, A., Levin, V., Fuller, GN., Echelard, Y., Majumder, S. (2000). The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells, *Nat Med.*, 6(7):826-31
108. Lee, RC., Feinbaum, RL., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 3;75(5):843-54
109. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, VN. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 25;425(6956):415-9
110. Lee, Y., Jeon, K., Lee, JT., Kim, S., Kim, VN. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO J.*, 2;21(17):4663-70
111. Lee, YS., Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene, *Genes Dev*, 21(9):1025-30
112. Legesse-Miller, A., Elemento, O., Pfau, SJ., Forman, JJ., Tavazoie, S., Colle, HA. (2009). let-7 Overexpression leads to an increased fraction of cells in G2/M, direct down-regulation of Cdc34, and stabilization of Wee1 kinase in primary fibroblasts, *J Biol Chem*, 284(11):6605-9
113. Lerescu, L., Tucureanu, C., Caraş, I., Neagu, S., Melinceanu, L., Sălăgeanu, A. (2008). Primary cell culture of human adenocarcinomas--practical considerations, *Roum Arch Microbiol Immunol*, 67(3-4):55-66
114. Lewis, BP., Burge, CB., Bartel, DP. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell*, 14;120(1):15-20
115. Lewis, BP., Shih, IH., Jones-Rhoades, MW., Bartel, DP., Burge, CB. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets, *Cell*, 26;115(7):787-98
116. Li, KK., Pang, JC., Ching, AK., Wong, CK., Kong, X., Wang, Y., Zhou, L., Chen, Z., Ng, HK. (2009). miR-124 is frequently down-regulated in medulloblastoma and is a negative regulator of SLC16A1, *Hum Pathol.*;40(9):1234-43.
117. Li, M., Lee, KF., Lu, Y., Clarke, I., Shih, D., Eberhart, C., Collins, VP., Van Meter, T., Picard, D., Zhou, L., Boutros, PC., Modena, P., Liang, ML., Scherer, SW., Bouffet, E., Rutka, JT., Pomeroy, SL., Lau, CC., Taylor, MD., Gajjar, A., Dirks, PB., Hawkins, CE., Huang, A. (2009). Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors, *Cancer Cell*. 8;16(6):533-46
118. Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P., Huang, Y. (2009). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 383(3):280-5
119. Li, Y., Guessous, F., Zhang, Y., Dipierro, C., Kefas, B., Johnson, E., Marcinkiewicz, L., Jiang, J., Yang, Y., Schmittgen, TD., Lopes, B., Schiff, D., Purow, B., Abounader, R. (2009). MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes, *Cancer Res.*, 69(19):7569-76

120. Lim, LP., Lau, NC., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, JM., Castle, J., Bartel, DP., Linsley, PS., Johnson, JM. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs, *Nature*, 433(7027):769-73
121. Liu, HL., Hua, MY., Yang, HW., Huang, CY., Chu, PC., Wu, JS., Tseng, IC., Wang, JJ., Yen, TC., Chen, PY., Wei, KC. (2010). Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(34):15205-10
122. Liu, Y., Shete, S., Hosking, F., Robertson, L., Houlston, R., Bondy, M. (2010). Genetic advances in glioma: susceptibility genes and Networks, *Curr Opin Genet Dev.*, 20(3):239-44
123. Lonn, S., Klaeboe, L., Hall, P. (2004). Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries, *Int J Cancer*, 108: 450-455
124. Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Junker, M., Oefner, PJ., Bogdahn, U., Wischhusen, J., Spang, R., Storch, A., Beier, CP. (2010). Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin, *Cancer Res.*, 70(5):2030-40
125. Louis, DN., Ohgaki, H., Wiestler, OD., Cavenee, WK., Burger, PC., Jouvet, A., Scheithauer, BW., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta Neuropathol*, 114(2):97-109
126. Lu, J., Getz, G., Miska, EA., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, BL., Mak, RH., Ferrando, AA., Downing, JR., Jacks, T., Horvitz, HR., Golub, TR. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 435(7043):834-8
127. Lu, L., Katsaros, D., Shaverdashvili, K., Qian, B., Wu, Y., de la Longrais, IA., Preti, M., Menato, G., Yu, H. (2009). Pluripotent factor lin-28 and its homologue lin-28b in epithelial ovarian cancer and their associations with disease outcomes and expression of let-7a and IGF-II, *Eur J Cancer*, 45(12):2212-8
128. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, JE., Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors, *Science*, 303(5654):95-8
129. Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A., Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing, *Mol Cell.*, 27(3):435-48
130. Malzkorn, B., Wolter, M., Liesenberg, F., Grzendowski, M., Stühler, K., Meyer, HE., Reifenberger, G. (2010). Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas, *Brain Pathol*, 20(3):539-50
131. Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R., Young, R.A. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells, *Cell*, 134(3):521-33
132. Mavrakis, KJ., Wolfe, AL., Oricchio, E., Palomero, T., de Keersmaecker, K., McJunkin, K., Zuber, J., James, T., Khan, AA., Leslie, CS., Parker, JS., Paddison,

- PJ., Tam, W., Ferrando, A., Wendel, HG. (2010). Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia, *Nat Cell Biol.*;12(4):372-9
133. Mayr, C., Hemann, MT., Bartel, DP. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation, *Science*, 315(5818):1576-9
  134. Medina, PP., Nolde, M., Slack, FJ. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma, *Nature*, 467(7311):86-90
  135. Méndez, O., Zavadil, J., Esencay, M., Lukyanov, Y., Santovasi, D., Wang, SC., Newcomb, EW., Zagzag, D. (2010). Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres, *Mol Cancer*, 1;9:133
  136. Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, JT., Jiang, J., Schmittgen, TD., Patel, T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines, *Gastroenterology*, 130(7):2113-29
  137. Mi, S., Lu, J., Sun, M., Li, Z., Zhang, H., Neilly, MB., Wang, Y., Qian, Z., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, SK., Le Beau, MM., Larson, RA., Golub, TR., Rowley, JD., Chen, J. (2007). MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(50):19971-6
  138. Michael, MZ., O' Connor, SM., van Holst Pellekaan, NG., Young, GP., James, RJ. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia, *Mol Cancer Res*, 1(12):882-91
  139. Müller, DW., Bosserhoff, AK. (2008). Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma, *Oncogene*, 27(52):6698-706
  140. Nass, D., Rosenwald, S., Meiri, E., Gilad, S., Tabibian-Keissar, H., Schlosberg, A., Kuker, H., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Kharenko, O., Sitbon, E., Lithwick Yanai, G., Elyakim, E., Cholak, H., Gibori, H., Spector, Y., Bentwich, Z., Barshack, I., Rosenfeld, N. (2009). MiR-92b and miR-9/9\* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors, *Brain Pathol*, 19(3):375-83
  141. Newman, MA., Thomson, JM., Hammond, SM. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing, *RNA*, 14(8):1539-49
  142. Olsen, PH., Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation, *Dev Biol.*, 216(2):671-80
  143. Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., Kosik, KS. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells, *Cancer Res.*, 68(19):8164-72
  144. Park, SM., Shell, S., Radjabi, AR., Schickel, R., Feig, C., Boyerinas, B., Dinulescu, DM., Lengyel, E., Peter, ME. (2007). Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2, *Cell Cycle*, 6(21):2585-90
  145. Pasquinelli, AE., Reinhart, BJ., Slack, F., Martindale, MQ., Kuroda, MI., Maller, B., Hayward, DC., Ball, EE., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A.,

- Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA, *Nature*, 408(6808):86-9
146. Peng, Y., Laser, J., Shi, G., Mittal, K., Melamed, J., Lee, P., Wei, JJ. (2008). Antiproliferative effects by Let-7 repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma, *Mol Cancer Res*, 6(4):663-73
  147. Petersen, CP., Bordeleau, ME., Pelletier, J., Sharp, PA. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells, *Mol Cell*, 21(4):533-42
  148. Pfister, S., Remke, M., Castoldi, M., Bai, AH., Muckenthaler, MU., Kulozik, A., von Deimling, A., Pscherer, A., Lichter, P., Korshunov, A. (2009). Novel genomic amplification targeting the microRNA cluster at 19q13.42 in a pediatric embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes, *Acta Neuropathol*, 117(4):457-64
  149. Pierson, J., Hostager, B., Fan, R., Vibhakar, R.J. (2008). Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma, *Neurooncol.*;90(1):1-7
  150. Piskounova, E., Viswanathan, SR., Janas, M., LaPierre, RJ., Daley, GQ., Sliz, P., Gregory, RI. (2008). Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28, *J Biol Chem*, 283(31):21310-4
  151. Pollack, IF., Boyett, JM., Yates, AJ., Burger, PC., Gilles, FH., Davis, RL., Finlay, JL. (2003). The influence of central review on outcome associations in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 experience, *Neuro Oncol.*, 5(3):197-207
  152. Poy, MN., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, PE., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion, *Nature*, 432(7014):226-30
  153. Rao, S., Sengupta, R., Choe, EJ., Woerner, BM., Jackson, E., Sun, T., Leonard, J., Piwnica-Worms, D., Rubin, JB. (2012). CXCL12 mediates trophic interactions between endothelial and tumor cells in glioblastoma, *PLoS One*, 7(3):e33005
  154. Rao, SA., Santosh, V., Somasundaram, K. (2010). Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma, *Mod Pathol.*, 23(10):1404-17
  155. Reinhart, BJ., Slack, FJ., Basson, M., Pasquinelli, AE., Bettinger, JC., Rougvie, AE., Horvitz, HR., Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 403(6772):901-6
  156. Ren, Y., Zhou, X., Mei, M., Yuan, XB., Han, L., Wang, GX., Jia, ZF., Xu, P., Pu, PY., Kang, CS. (2010). MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol, *BMC Cancer*, 10:27
  157. Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., Lebanony, D., Goren, Y., Silberschein, E., Targan, N., Ben-Ari, A., Gilad, S., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Feinmesser, M., Kharenko, O., Nativ, O., Nass, D., Perelman, M., Yosepovich, A., Shalmon, B., Polak-Charcon, S., Fridman, E., Avniel, A., Bentwich, I., Bentwich, Z., Cohen, D., Chajut, A., Barshack, I. (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin, *Nat Biotechnol.*, 26(4):462-9

158. Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA World, *Science*, 294(5543):797-9
159. Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, EE., Nitsch, R., Wulczyn, FG. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment, *Nat Cell Biol*, 10(8):987-93
160. Sampson, VB., Rong, NH., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, NJ., Dunn, SP., Krueger, LJ. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells, *Cancer Res*, 67(20):9762-70
161. Sasayama, T., Nishihara, M., Kondoh, T., Hosoda, K., Kohmura, E. (2009). MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC, *Int J Cancer*, 125(6):1407-13
162. Scherr, M., Venturini, L., Battmer, K., Schaller-Schoenitz, M., Schaefer, D., Dallmann, I., Ganser, A., Eder, M. (2007). Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function, *Nucleic Acids Res.*, 35(22):e149
163. Schwarz, DS., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, PD. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell*, 115(2):199-208
164. Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs, *Nature*, 455(7209):58-63
165. Shenouda, SK., Alahari, SK. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?, *Cancer Metastasis Rev.*, 28(3-4):369-78
166. Shi, L., Cheng, Z., Zhang, J., Li, R., Zhao, P., Fu, Z., You, Y. (2008). hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells, *Brain Res.*, 1236:185-93
167. Silber, J., Lim, DA., Petritsch, C., Persson, AI., Maunakea, AK., Yu, M., Vandenberg, SR., Ginzinger, DG., James, CD., Costello, JF., Bergers, G., Weiss, WA., Alvarez-Buylla, A., Hodgson, JG. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells, *BMC Med.*, 6:14
168. Singh, SK., Hawkins, C., Clarke, ID., Squire, JA., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, RM., Cusimano, MD., Dirks, PB. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, 432(7015):396-401
169. Slack, F. (2009). let-7 microRNA reduces tumor growth, *Cell Cycle*, 8(12):1823
170. Spurgers, KB., Gold, DL., Coombes, KR., Bohnenstiehl, NL., Mullins, B., Meyn, RE., Logothetis, CJ., McDonnell, TJ. (2006). Identification of cell cycle regulatory genes as principal targets of p53-mediated transcriptional repression, *J Biol Chem*, 81(35):25134-42
171. Su, X., Gopalakrishnan, V., Stearns, D., Aldape, K., Lang, FF., Fuller, G., Snyder, E., Eberhart, CG., Majumder, S. (2006). Abnormal expression of REST/NRSF and Myc in neural stem/progenitor cells causes cerebellar tumors by blocking neuronal differentiation, *Mol Cell Biol.*, 26(5):1666-78
172. Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., Takahashi, T. (2008). Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster, *Cancer Res.*, 68(14):5540-5
173. Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., Takahashi, T. (2008). let-7

- regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop, *Carcinogenesis*, 29(11):2073-7
174. Turnog Bülten 6, Kasim 2008
  175. Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., Lee, S.K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development, *Genes Dev.*, 21(7):744-9
  176. Viswanathan, SR., Daley, GQ., Gregory, RI. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28, *Science*, 320(5872):97-100
  177. Viswanathan, SR., Powers, JT., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, TL., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, LA., Lockhart, VL., Shah, SP., Tanwar, PS., Mermel, CH., Beroukhim, R., Azam, M., Teixeira, J., Meyerson, M., Hughes, TP., Llovet, JM., Radich, J., Mullighan, CG., Golub, TR., Sorensen, PH., Daley, GQ. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies, *Nat Genet*, 41(7):843-8
  178. Volinia, S., Calin, GA., Liu, CG., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, RL., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, CC., Croce, CM. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(7):2257-61
  179. Wang, B., Love, TM., Call, ME., Doench, JG., Novina, CD. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro, *Mol Cell*, 22(4):553-60
  180. Wang, F., Xue, X., Wei, J., An, Y., Yao, J., Cai, H., Wu, J., Dai, C., Qian, Z., Xu Z., Miao, Y. (2010). hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations, *Br J Cancer*. 10;103(4):567-74
  181. Wang, MY., Lu, KV., Zhu, S., Dia, EQ., Vivanco, I., Shackleford, GM., Cavenee, WK., Mellinghoff, IK., Cloughesy, TF., Sawyers, CL., Mischel, PS. (2006). Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells, *Cancer Res.*, 66(16):7864-9
  182. Washietl, S., Pedersen, JS., Korbil, JO., Stocsits, C., Gruber, AR., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Reiche, K., Tanzer, A., Ucla, C., Wyss, C., Antonarakis, SE., Denoeud, F., Lagarde, J., Drenkow, J., Kapranov, P., Gingeras, TR., Guigó, R., Snyder, M., Gerstein, MB., Reymond, A., Hofacker, IL., Stadler, PF. (2007). Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome, *Genome Res.*, 17(6):852-64
  183. Webster, RJ., Giles, KM., Price, KJ., Zhang, PM., Mattick, JS., Leedman, PJ. (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7, *J Biol Chem.*, 284(9):5731-41
  184. Wechsler-Reya, R., Scott, MP. (2001). The developmental biology of brain tumors, *Annu Rev Neurosci*, 24:385-428
  185. West, JA., Viswanathan, SR., Yabuuchi, A., Cunniff, K., Takeuchi, A., Park, IH., Sero, JE., Zhu, H., Perez-Atayde, A., Frazier, AL., Surani, MA., Daley, GQ. (2009). A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy, *Nature*, 460(7257):909-13
  186. Wiemer, EA. (2007). The role of microRNAs in cancer: no small matter, *Eur*

- J Cancer, 43(10):1529-1544
187. Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell*, 75(5):855-62
  188. Wu, L., Fan, J., Belasco, JG. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(11):4034-9
  189. Würdinger, T., Tannous, BA., Saydam, O., Skog, J., Grau, S., Soutschek, J., Weissleder, R., Breakefield, XO., Krichevsky, AM. (2008). miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells, *Cancer Cell*, 14(5):382-93
  190. Xia, H., Qi, Y., Ng, SS., Chen, X., Li, D., Chen, S., Ge, R., Jiang, S., Li, G., Chen, Y., He, ML., Kung, HF., Lai, L., Lin, MC. (2009). microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs, *Brain Res.*, 1269:158-65
  191. Xu, P., Guo, M., Hay, BA. (2004). MicroRNAs and the regulation of cell death, *Trends Genet.*, 20(12):617-24
  192. Yang, G., Zhang, R., Chen, X., Mu, Y., Ai, J., Shi, C., Liu, Y., Shi, C., Sun, L., Rainov, NG., Li, H., Yang, B., Zhao, S. (2011). MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status, *J Mol Med.*, 89(10):1037-50
  193. Yao, X., Li, W., Wang, Y., Ding, Z., Hou, W., Zeng, M., Deng, G., Zhang, J., Yang, H. (2012). Expression of hsa-miR-20a in human glioma tissues and its effect on the proliferation of human glioma cells in vitro, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 32(2):198-201
  194. Yoo, AS., Staahl, BT., Chen, L., Crabtree, GR. (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development, *Nature*, 30;460(7255):642-6
  195. Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., Song, E. (2007). *let-7* regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells, *Cell*, 131(6):1109-23
  196. Zhang, B., Pan, X., Cobb, GP., Anderson, TA. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors, *Dev Biol.*, 302(1):1-12
  197. Zhang, C., Han, L., Zhang, A., Yang, W., Zhou, X., Pu, P., Du, Y., Zeng, H., Kang, C. (2010 Jun). Global changes of mRNA expression reveals an increased activity of the interferon-induced signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway by repression of miR-221/222 in glioblastoma U251 cells, *Int J Oncol.*, 36(6):1503-12
  198. Zhang, Y., Zhang, YF., Bryant, J., Charles, A., Boado, RJ., Pardridge, WM. (2004). Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer, *Clin Cancer Res.*, 10(11):3667-77
  199. Zhao, T., Li, J., Chen, AF. (2010). MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 299(1):E110-6
  200. Zhou, X., Ren, Y., Moore, L., Mei, M., You, Y., Xu, P., Wang, B., Wang, G., Jia, Z., Pu, P., Zhang, W., Kang, C. (2010). Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status, *Lab Invest.*, 90(2):144-55

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Söke' de doğdum. İlk öğrenimimi Söke Kocagözoğlu İlkokulu' nda, orta öğrenimimi ise Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi' nde tamamladım. 1999 – 2000 öğretim yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladım ve 2004 yılında mezun oldum. 2004-2006 yılları arasında, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'n da yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2006 yılında başladığım Doktora eğitimime halen devam etmekteyim.