

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMA MULTİFORMELİ OLGULARDA
IDH2 GEN MUTASYONU
VE
RAR β GENMETİLASYONUNUN
HASTALIK PROGNOZU İLE BİRLİKTE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

EMİNE İKBAL ÇİÇEK

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN**

EYLÜL 2011

KABUL ve ONAY SAYFASI

Emine İkbal ÇİÇEK' in Doktora tezi olarak hazırladığı "*Glioblastoma Multiformeli Olgularda IDH2 Gen Mutasyonu ve RARβ Gen Metilasyonunun Hastalık Prognozu ile Birlikte Değerlendirilmesi*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih: 14.09.2011

Üye: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Ali ARSLANTAŞ

Üye: Prof. Dr. Sibel BERKER

Üye: Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.09/2011 tarih ve 887.../4116... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM); intrakranial tümörlerin %12-15'ini ve tüm astrositik tümörlerin %50-60 kadarını oluşturan, beyin tümörleri içerisinde erişkin yaş grubunun en sık görülen ve en malign formu olan tümör tipidir. Primer ve sekonder olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. Beyinden orjin alan, de novo gelişen ve tüm GBM'lerin % 60 kadarını oluşturan primer tümörler, ileri yaşlarda ortaya çıkan tümörlerdir. Glioblastomların % 40 kadarını oluşturan, 45 yaşından daha genç olgularda ortaya çıkan, düşük derece (WHO Grade II) veya anaplastik astrositomadan daha malign anaplazi derecesine dönüşümü sonucunda oluşan tümörler de sekonder glioblastomlardır. Metabolik enzim kodlayan IDH gen mutasyonlarının glioblastoma karsinogenezinde önemli rolü olduğu 2008 yılında ortaya konmuştur. Ayrıca hücre sel sinyal yolağında ve hücre büyümesi ile farklılaşmasında rol oynayan RAR β geni hipermetilasyonunun erken tanı ve prognoz tahmininde bir marker olarak kullanılabilirliği farklı kanser tiplerinde öngörülmüştür. Ancak GBM verileri yetersizdir.

Bu nedenle çalışmamızda primer GBM olgularında IDH2 gen mutasyonu ile RAR β gen hipermetilasyon sıklığının belirlenmesi ve olguların klinik özellikleriyle ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Primer GBM tanısı alan 40 tümör dokusu örneğinden izole edilen tümör DNA'larında IDH2 gen mutasyonları dizi analizi yöntemi ile RAR β gen metilasyon paternleri de MS-HRM tekniği ile değerlendirilmiş ve elde edilen veriler hasta klinik bilgileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda IDH2 geni için dizi analizi sonucu mutasyon saptanmamıştır. RAR β gen metilasyonu analizlerinde %60 örnekte RAR β geni promotor hipermetilasyonu saptanmıştır.

Olgularımızın primer GBM olması nedeniyle IDH2 geninde mutasyon saptanmaması literatür bilgileri ile uyumlu bir bulgudur. RAR β gen metilasyonu, sıklığının GBM örneklerinde yüksek sıklıkta gözlendiği, olguların sağ kalım süresine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak özellikle RAR β gen metilasyon paterninin primer ve sekonder glioblastomlarda detaylı olarak geniş

araştırma populasyonlarında incelenmesinin gerekli olduğu, diğer kanser tiplerinde olduğu gibi erken dönem ve prognoz markeri olarak kullanılıp kullanılmayacağının değerlendirilmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Diğer taraftan, MS-HRM tekniğinin metilasyon paternlerine ilişkin taramalarda yüksek doğruluk, zaman ve emek tasarrufu açısından uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma multiforme, IDH2, RAR β metilasyon, MS-HRM

SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common adult type and most aggressive malignant primary brain tumor in humans, involving glial cells and accounting for 50-60% of all astrocytic brain tumor cases and 12-15 % of all intracranial tumors. According to the World Health Organization (WHO) classification of tumors of the central nervous system, glioblastomas are divided into two types according to their clinical course. Those that involve a preceding lower-grade glioma are defined as secondary glioblastomas and those with de novo development are defined as primary glioblastomas. Of all GBMs, about 60% are primary and the remainin 40% are secondary subtypes. The importance of mutations of IDH genes that encode metabolic enzymes involved in the citric acid cycle in glioblastoma carcinogenesis has been discovered in 2008 during a genome-wide analysis of glioblastomas and then, their roles have been largely analysed in low/high grade GBMs and in the diagnosis of primary/secondary GBMs. Besides, the supression of the retinoic acid receptor b expression involved in cellular growth and differentiation regulations by hypermethylation has been shown to be used as a marker in early diagnosis and prognosis predictions of various cancer cell types. However, RAR β gene suppression data is very limited in primary GBMs.

Therefore, the presented study was aimed both to determine the frequencies of IDH2 gene mutations and RAR β gene hypermethylation in primary GBMs, and to evaluate the relations of each with the clinical features of the cases. The DNA samples of totally 40 resected primer GBM tumors were analysed for IDH2 gene mutations by DNA sequencing technique and for hypermethylation patterns of RAR β gene by MS-HRM technique. The clinical features data of the cases were learned from case files.

No IDH2 gene mutation was detected in tumor samples whereas RAR β gene hypermethylation was seen in 60% of the samples. Since the analysed tumors were the primary GBMs, the data of undetected IDH2 gene mutation was in agreement with the

literature. However, the presented study showed that the RAR β gene promotor hypermethylation was highly frequent in primary GBMs. Although, the disease free survival time of the cases with methylated RAR β gene tumors was the highest, the difference was not statistically significant.

We concluded that RAR β gene methylation is a frequently seen aberration in GBMs and therefore the promotor suppression of this gene in primary/ secondary and low/high grade glial tumors should be determined in larger series to determine the usability of the methylation state of this gene as a marker for early diagnosis and/or prognostic evaluations. Moreover, it was concluded that the MS-HRM is an effective technique to screen samples for estimated DNA methylation levels.

Key words: Glioblastoma multiforme, IDH2, RAR β methylation, MS-HRM technique

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KANSER	3
2.1.1 Kanser hücrelerinin özellikleri	4
2.1.2. Karsinogeneziste Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler.....	5
2.1.3. Onkogenler	5
2.1.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin	6
2.1.5. DNA Tamir genleri.....	8
2.1.6. Epigenetik.....	8
2.1.5.1. Epigenetik Mekanizmalar.....	9
2.1.5.2.DNA Metilasyonu.....	10
2.1.5.3. Metilasyon ve Kanser.....	12
2.2. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİ	13

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

	Sayfa
2.2.1. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Görülme İnsidansı.....	14
2.2.2. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması.....	14
2.2.3. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Derecelendirilmesi.....	14
2.2.4. Etiyoloji.....	17
2.2.5. Epidemiyoloji.....	17
2.3. GLİAL TÜMÖRLER.....	18
2.3.1 Glioblastoma Multiforme (GBM).....	19
2.3.2. Histopatoloji.....	20
2.3.3. Primer ve Sekonder Glioblastomlar.....	20
2.3.4. Glioblastoma Multiformede Genetik Özellikler.....	21
2.3.4.1. EGFR (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü).....	23
2.3.4.2. P53.....	24
2.3.4.3. MDM2.....	24
2.3.4.4. CDKN2A.....	25
2.3.4.5. P16,CDK4 VE RB Yolu.....	25
2.3.4.6. PDGFR (Platelet Kökenli Büyüme Faktör Reseptör.....	25
2.3.4.7. Kromozom 10'da LOH, PTEN (MMAC1) ve DMBT1....	26
2.3.4.8. Kromozom 19q da LOH ve DCC Geni.....	26
2.3.4.9. MGMT.....	27
2.3.5 Glioblastomada Multiformede IDH2 Gen Mutasyonu.....	28

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

	Sayfa
2.3.5.1. IDH Gen Mutasyonlarının Fonksiyonel Sonuçları.....	29
2.4. GBM Olgularında Metilasyon.....	32
2.4.1. Retinoik Asit Reseptör Beta (RAR β) Geni.....	32
2.5. DNA Metilasyonunun Değerlendirebilmesi İçin Metodlar	34
2.5.1. Southern blot	34
2.5.2. Restriksiyon Enzim PZR.....	34
2.5.3. Bisülfit DNA Dizileme.....	35
2.5.4. Metilasyon Spesifik PZR (MSP).....	35
2.5.5. High Resolution Melting Curve (HRM) Analiz Yöntemi.....	36
2.5.5.1. MS-HRM.....	36
2.5.5.2. Bisülfit Modifikasyonu.....	37
2.6. DNA Dizi Analizi.....	38
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	40
3.1. Gereçler.....	40
3.1.1. Materyal seçimi.....	40
3.1.2. Kullanılan gereçler.....	40
3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	41
3.2. Yöntemler.....	42

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

	Sayfa
3.2.1. Magna Pure Compact DNA ekstraksiyon robotu ile GBM tümör dokularından DNA eldesi.....	42
3.2.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması.....	44
3.2.3. Elde Edilen DNA Ürününün Bisüfit Modifikasyon İşleminin yapılması	45
3.2.4. Modifiye Örneklerin MS-HRM Analizine Hazırlanması.....	47
3.3. Elde Edilen DNA'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Çoğaltılması.....	48
3.3.1. 20x TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	49
3.3.2. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle İncelenmesi.....	49
3.3.3. PZR Ürününün Saflaştırılması.....	51
3.3.4. PZR Sonrası Saflaştırılan Ürünlerin Otomatik DNA Dizi Analizine Hazır Hale Getirilmesi.....	51
3.3.5. Sekans Reaksiyonu Sonrası Pürifikasyon.....	52

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

	Sayfa
3.4. İstatistiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri.....	55
4.2. Araştırma Grubu Bireylerin MS-HRM Bulguları.....	55
4.3. Araştırma Grubu Bireylerin Dizi-Analizi Bulguları.....	61
4.4. Araştırma Grubu Bireylerinin IDH2 Gen Mutasyonu Durumuna Göre Sağ Kalım Sürelerinin İstatistiksel Analizi.....	61
4.5. Araştırma Grubu Bireylerinin RAR β Gen Metilasyonu Durumuna Göre Sağ Kalım Sürelerinin İstatistiksel Analizi.....	62
4.5.1. Kantitatif Metilasyon Ortalamaları.....	64
4.5.2. Kantitatif Metilasyon Değerlerine Göre Sağkalım Sürelerinin İstatistiksel Analizi.....	65
5. TARTIŞMA.....	66
6.1. Glioblastoma Örneklerinde RAR β Gen Hipermetilasyonunun Olguların Klinik Özellikleriyle İlişkisi	66
6.2. Glioblastoma Örneklerinde IDH2 Mutasyonunun Olguların Klinik Özellikleriyle İlişkisi.....	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Hücre içi DNA tamir sistemi	8
Şekil 2.2: DNA metilasyonundaki biyokimyasal yollar	11
Şekil 2.3: Artmış CpG adacıklarının muhtemel rolü ve tümör gelişiminde global DNA metilasyonunun azalması	12
Şekil 2.4: Primer beyin tümörlerinin yaşlara göre dağılımı	18
Şekil 2.5 : Glioma patogenezinin gelişmesinde rol oynayan genetik yollar	22
Şekil 2.6: Astrositik tümörlerde moleküler değişim.....	27
Şekil 2.7: Yabanıl tip IDH ve mutant durumdaki IDH genlerinin fonksiyonları	31
Şekil 2.9 : RAR- β geni DNA ve ligand bağlayıcı fonksiyonel bölgeleri.....	33
Şekil 3.1: Elde edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 3.2: IDH2 ekson 4 bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	50
Şekil 4.1: HRM unmetile kontrol DNA ve metile kontrol DNA pikleri.....	57
Şekil 4.2: RAR β geni için hasta grubunun metile ve unmetile pikleri.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

Sayfa

Şekil 4.3: 27, 36, 41 numaralı olguların metilasyon derecelerine göre (%50, %75, %100) metile kontrol DNA'lar ile uyumlu RAR β pik görüntüsü.....	59
Şekil 4.4 : 18.olgunun unmetile kontrol DNA ile uyumlu olan unmetile RAR β pik görüntüsü	60
Şekil 4.5: 43 numaralı olgunun IDH2 ekzon 4 dizi analizi görüntüsü	61
Şekil 6.1: IDH mutasyonlarının hot spot bölgeleri.....	75

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1: Onkogenler ve işlevleri	7
Tablo 2.2: Santral Sinir Sistemi tümörlerinin WHO sınıflandırması.....	15
Tablo 2.3 : Merkezi sinir sistemi tümörlerinin derecelendirmesi.....	16
Tablo 2.4: GBM'lerin ayırıcı tanısında klinik ve moleküler özellikler.....	34
Tablo 4.1: GBM beyin tümörlü olguların cinsiyet, yaş, metilasyon ve mutasyon tarama sonuçları.....	56
Tablo 4.2: Çalışma grubumuzun RAR β geni metilasyon oranları.....	57
Tablo 4.3: Olgu grubumuzun RAR β gen metilasyonuna göre ve MGMT metilasyonuna göre sağ kalım ortalaması.....	62
Tablo 4.4: RAR β gen metilasyonu gözlenen olguların uygulanan tedavi ile birlikte sağkalım sürelerinin değerlendirildiği istatistiksel analizi.....	63
Tablo 4.5: Unmetile RAR β ve unmetile MGMT gözlenen olguların uygulanan tedavi ile birlikte sağkalım sürelerinin değerlendirildiği istatistiksel analizi.....	64
Tablo 4.6: Olgu grubumuzun metilasyon oranlarına göre sağkalım tablosu.....	65
Tablo 6.1: Çalışmamızdaki RAR β bulgularının literatürle karşılaştırılması.....	70
Tablo 6.2: Çalışmamızdaki IDH2 bulgularının literatürle karşılaştırılması.....	78

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
AA	: Anaplastik astrositoma
a.a.	: Amino asit
b-FGF	: Beta-fibroblast büyüme faktörü
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CBTRUS	: Amerika Birleşik Devletleri Beyin Tümörleri Merkezi Kayıt Defteri
DCC	: Kolektral kanserde delesyona uğramış gen
DDG	: Düşük dereceli gliomalar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksi ribonükleik asit tri fosfat
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
EtBr	: Etidium bromid
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FH	: Fumarat hidrolaz
G	: Grade (evre)
GBM	: Glioblastoma multiforme
GFAP	: Glial fibriler asidik protein

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Simgeler	Açıklama
HDM	: Hücre dışı matriks
HGF/SF	: Hepatosit büyüme faktörü/dağılma faktörü
HIF	: Hipoksi indükte edilebilir faktör
HRM	: Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi
IDH	: İsositrat dehidrogenaz
kb	: Kilobaz
KPS	: Karnofsky performans skalası
LOH	: Heterozigosite kaybı
MDM-2	: Mouse double minute-2
MGMT	: O-6-Metilguanin DNA metiltransferaz
ml	: Mililitre
MS-HRM	: Metilasyona duyarlı yüksek çözünürlüklü erime eğrisi
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
O	: Oligodendroglioma
OA	: Oligodendroglial astrositom
OD	: Optik dansite
PBS	: Fosfat bazlı salin
PCV	: Prokarbazin

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Simgeler	Açıklama
PCR (PZR)	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PD-ECGF	: Platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörü
PDGFR	: Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü
PTEN	: Kromozom on üzerinde kayıp olan fosfataz ve tensin homologu
RARβ	: Retinoik asit reseptörü beta
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDH	: Süksinat dehidrogenaz
SSS	: Santral sinir sistemi
SPSS	: Sosyal bilimler için istatistik paketi
TCA	: Tri karboksil asit döngüsü
TET	: 10-11. Kromozom translokasyon enzimi
TGF α	: Transforme edici büyüme faktörü
TBE	: Tris borik asit EDTA
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
YDG	: Yüksek dereceli gliomalar
μL	: Mikrolitre
2-HG	: 2-Hidroksi glutarat

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Türkiye’de 16 merkezde yapılan bir çalışmaya göre, beyin tümörleri tüm kanser olguları içinde, erkek kanser hastalarının % 2.9’unu, kadın kanser hastalarının da % 2.6 sını oluşturmaktadır. Türkiye’de beyin tümörleri, sıklık sırasına göre ilk 10’a giren kanserler arasında olup; kadınlarda 9, erkeklerde de 10. sırada yer almaktadır (74). Hızlı çoğalma, beyin dokusuna invazyon, nekroz, anjiyogenez, mikrovasküler proliferasyon ve migrasyon gibi agresif özellikleri vardır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiye rağmen ortalama bir yıl yaşam süresi ile vücuttaki en kötü huylu tümörlerden birisidir. En uygun tedavi koşullarında bu süre ancak iki yıla kadar uzayabilmektedir (73).

Beyin tümörleri iki ana grup içerisinde toplanır: Beyinden orjin alan primer tümörler ve vücudun farklı bölgesinden orjin alıp beyine metastaz yapan sekonder tümörler. Primer beyin tümörleri daha nadir gözlenir ancak çoğunluğu maligndir. Primer beyin tümörlerinin en büyük alt grubu olan gliomalar orjin aldıkları bölgeye göre çeşitlilik gösterirler: Beyin veya spinal kanalda gelişen astrositomalar, beynin en alt bölgesinde gelişen beyin kökü gliomaları, beynin iç kısmında gelişen ependimomlar ve genellikle cerebrumda gelişen ve çok nadir gözlenen oligodendrogliomalar. Astrositomaların en ilerlemiş formu olan glioblastoma; derece IV astrositoma veya glioblastoma multiforme (GBM) olarak da isimlendirilir (31).

Dünya Sağlık Örgütü Sınıflamasına göre glioblastoma multiforme, gliomalar arasında en malign olanı ve en sık görülenidir. İntrakranial tümörlerin %12-15’ini ve tüm astrositik tümörlerin %50-60 kadarını oluşturur. Bu tümör tipi her yaşta görülebilir, ancak en sık gözlendiği yaş aralığı 45-70 yaş arasındadır. Çocukluk yaşlarında nadiren gözlenir. Erkek / kadın oranı 1.5 / 1 civarındadır. Geniş çeşitlilik gösteren lokalizasyon bölgeleri, morfolojisi, genetik özellikleri ve terapiye verdiği yanıt ile diğer tümör gruplarından ayrılır (68).

Glioma hastalarının prognozu büyük ölçüde histopatolojik malignite derecesi ile saptanmakla birlikte, her evrenin klinik seyri çok değişkendir. Astrositik tümörler bu açılarından çok heterojen bir grup olduğu için tümörün biyolojik davranışını sadece histolojik kriterlerle tahmin etmek zordur ve biyolojik belirleyicilerin yardımına ihtiyaç duyulmaktadır (41,44,52).

Glioblastomaların moleküler biyolojisini anlamak, erken tanı ve yeni tedavi hedeflerinin gelişmesini sağlamak amacıyla 1990'lardan bugüne kadar özellikle gliomanın genetik alt yapısı yoğun olarak araştırılmaktadır.

2008'de yapılan geniş çaplı genom analizinde IDH (isositrat dehidrogenaz) geninin 5 izoformundan IDH1/2 'nin mutant formları özellikle GBM hastalarında yüksek sıklıkta gözlenmiştir. Özellikle gliomagenезin erken dönemlerinde gerçekleştiği savunulmaktadır ve bu nedenle ileri derece tümörlerde sık gözlenmesi beklenmektedir.

Son yıllarda herhangi bir gen mutasyonu olmamasına rağmen ilgili genlerin ürün oluşturamaması ya da gerekenden fazla ürün sentezlenmesine neden olan metilasyon, asetilasyon, mikroRNA gibi epigenetik mekanizmaların karsinogenez sürecindeki rolleri detaylı olarak ortaya konmaktadır. Epigenetik mekanizmalardan biri olan metilasyon, kanser genlerinin ekspresyonlarındaki etkileri nedeniyle kanser alanında en eski ve en çok çalışılan mekanizma özelliği taşımaktadır. Glioblastomlarda da birçok genin epigenetik özellikle de metilasyon paternlerinde aberasyonlar olduğu, MGMT, RASSF1A, p16/INK4a, p15/INK4B vb. genlerin hipermetilasyonunun GBM hastalarının prognoz, tedavi protokolu seçimi, sürvi gibi klinik özelliklerde belirteç olabileceği bildirilmiştir (7,38).

Çalışmamızda GBM tanısı alan, IDH1 mutasyonu ile MGMT gen hipermetilasyon analizleri yapılmış olgularda IDH2 gen mutasyonu frekansının ortaya konması ile GBM gelişimi, tedaviye yanıt ve sağ kalım sürelerinin tümör baskılayıcı RAR β geni metilasyon paternleri ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Henüz yeni uygulama alanı bulan Methylation Specific-High Resolution Melting Point (MS-HRM) yönteminin de GBM örneklerinde kullanımının belirlenmesi de çalışmamızın diğer amacını oluşturmaktadır. Bilgilerimize göre GBM olguları için RAR β metilasyonu ile ilgili literatürde bilgi veren sadece bir yayın bulunmaktadır. Bu yüzden olgu grubumuz GBM hastalarında RAR β metilasyonu frekansının belirlenmesinde Dünya literatürüne temel oluşturacaktır. Ayrıca çalışmamız Türk toplumu ile yapılan IDH2 ve RAR β genlerine yönelik moleküler analizlerin gerçekleştirildiği ilk çalışma özelliği de taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Yaşlanan ve ölen hücre oranı ile yeni oluşan hücre oranı arasında bir denge söz konusudur. Bu denge hücre ileti sistem yolları, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, apoptozis ile ilgili yolların aktif veya inaktif hale gelmesi ile sağlanır. Ancak bu yollardaki düzensizlikler, hatalar, yollara dahil olan proteinlerdeki eksiklik veya yanlış davranışlar hücrenin kontrolsüz çoğalması ve/veya normale göre daha az oranda ölümü ya da ölmemesi, dolayısıyla dengenin bozulması ile sonuçlanır. Dengenin bozulmasına bağlı olarak apoptoz sınırlı düzeyde olurken proliferasyonun dengesiz şekilde çoğalması neoplazi gelişimine yol açmaktadır. Neoplazm yani tümör herhangi bir sınırlanma veya sonlanma göstermeyen, kontrol mekanizmalarının etkisinde kalmayan, hızlı, sınırsız ve anormal bir hücre çoğalması gösterir. Benign ve malign olmak üzere iki tiptir. Neoplastik hücreler yani, anormal çoğalma gösteren hücre topluluğu tek bir hücre kitlesi halindeyse bunlara “benign” tümörler denmektedir. Neoplazilerin malign özellik gösteren tipleri “kanser” olarak isimlendirilir. Bu tip neoplaziler çevre dokulara invaze olma özellikleri ile karakterizedirler(75,80).

2.1. KANSER

Kanser tek bir hastalık olmayıp tümör oluşumuna neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılan bir hücre siklus düzensizliğidir.

Kanser somatik mutasyonlardan veya kalıtlanmayan ancak somatik hücrelerde konsepsiyondan sonraki bir aşamada meydana gelen DNA mutasyonlarından kaynaklanan bir hastalıktır. Kanserin somatik mutasyon teorisi 1920’lerde ortaya atılmış olsa dahi 1960’lardan sonra kanser araştırmalarında kendini göstermeye başlamıştır. Son yıllarda epigenetik alanındaki yeni bilgiler kanser araştırmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır. Artık araştırmacılar kanserin tek başına mutasyonlardan kaynaklanmayan, DNA ve RNA düzeyindeki farklı mekanizmaların da devreye girdiği bir hastalık

olduğunu, ama temelde “Kanser genetik bir hastalıktır” kavramının gerçek olduğunu kabul etmektedirler.

Normal bir hücrenin proliferasyonu, DNA replikasyonu, sellüler farklılaşma, yaşlanma ve ölüm kompleks yollar aracılığıyla gerçekleşir ve düzenlenir. Bu yollarda görev alan enzimlerin tümü birer gen ürünüdürler. Dolayısıyla genlerde meydana gelen fonksiyon kaybı ya da fonksiyon kazancına neden olan başkalaşım ile gen ürünlerinin aktif veya inaktif hale getirilmeleri, normal sellüler süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır ki yaşama potansiyeli olan bu hücrelerin çoğalması ile kanserleşme ortaya çıkmaktadır (75,80,81).

2.1.1 Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser, hücrelerin sürekli çoğalarak birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Kanser gelişimi birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir (80,81). Normal hücrelerin özellikleri ile karşılaştırıldığında kanser hücresinde pek çok özelliğin yitirildiği ve yeni hücrel özelliklerin kazanıldığı gözlenmektedir:

- ❖ Büyüme sinyallerine bireysel yanıt sonucu kontrolsüz büyüme
- ❖ Büyümeyi engelleyici sinyallere duyarlılığın kaybı sonucu kontrolsüz büyüme
- ❖ Apoptosis kaybına bağlı olarak genetik hatalara, ekstrasellüler büyümeyi engelleyici sinyallere rağmen çoğalmanın devam etmesi
- ❖ Yaşlanma kapasitesi kaybı nedeniyle sınırsız replikasyon potansiyeli (ölümsüzlük)
- ❖ Anjiyogenez başarısına bağlı olarak tümörün pasif besin difüzyonunun olduğu yerlerde de gelişmesi
- ❖ Komşu dokulara invazyon yeteneği sonucu invaziv karsinom gelişimi
- ❖ Uzak bölgelerde metastaz yeteneği ki bu normal hücrelerde olmayıp sadece malign tümörlerde olan bir özelliktir.

Yukarıdaki çok aşamalı süreç genetik hataların tamir edilme yeteneğinin kaybı sonucu oluşur. Bu da mutasyon oranının artmasına (genomik instabilite), dolayısıyla diğer mutasyonların oluşmasına, düzen bozukluğuna yatkınlığın artmasına neden olur.

Hasara uğrayan ilk hücre kanserleşme sürecine girerek, klonal orjini oluşturur. Mutasyonun olduğu hücrenin bölünmesi ile meydana gelen yavru hücrelerde de aynı moleküler hatalar bulunmaktadır. Dolayısıyla monoklonal bir orijin gösterirler. Ancak bu hücreler, oluşan başkalaşımın hücrelere çoğalabilme yeteneği vermesine ve hataların tamir edilmemesine bağlı olarak, normal hücrelere göre daha hızlı proliferasyon olurlar. Bu hızlı proliferasyon sırasında moleküler düzeyde yeni mutasyonlar meydana gelebilir ki bu da monoklonal orijinin ilerleyen süreçlerde poliklonal hale gelmesine neden olmaktadır (75,80,81).

2.1.2. Karsinogenezde Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler

Karsinogenez çok aşamalı ve kompleks bir süreçtir. Temelinde hücre siklusunun gerçekleşmesi ile kontrolünde meydana gelen genomik ve epigenetik hataların yattığı söylenebilir.

Kanserin moleküler patogenezinde rol oynayan, başkalaşım /epigenetik mekanizmalar ile fonksiyonlarının bozulduğu/kaybolduğu gen grupları fonksiyonları açısından aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

- ✓ Onkogenler
- ✓ Tümör baskılayıcı genler
- ✓ DNA tamir genleri (80,81)

2.1.3. Onkogenler

Normal hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve proliferasyonu sürekli kontrol altındadır. İntraselüler gereksinim ve ekstraselüler ortamdan gelen sinyallerin hücre içerisine, nükleusa ulaştırılması çok sayıda proteinin rol oynadığı hücre “sinyal ileti sistemi” yolları sayesinde olur. Bu proteinleri kodlayan genler “protoonkogen” olarak isimlendirilir. Yani protoonkogenler normal hücrelerde sinyal iletimi ve mitotik sinyallerin düzenlenmesinde görev alan genlerdir. Bu genlerin mutant formları “onkogen” dir.

Protoonkogenin onkogenik fonksiyon kazanmasında farklı mekanizmalar rol oynar:

1. Protoonkogende oluşan nokta mutasyonu sonucu protein aktivitesinde artış ve regülasyon kaybı meydana gelir.
2. Protoonkogen dublikasyonu/amplifikasyonu sonucu protein miktarında artış
3. Protoonkogen mRNAsının uzun süre degrade olmadan stabil halde kalması normalden fazla proteinin üretilmesine neden olur.
4. Kromozom translokasyonuna bağlı olarak protoonkogenin bulunduğu kromozom bölgesinden kırılmaya bağlı onkogenik özellik kazanılması ya da her iki kromozom lokusunun translokasyona bağlı füzyon gen-füzyon protein oluşması.
5. Epigenetik mekanizmalara (hipometilasyon veya miRNA) bağlı olarak onkogenik aktivasyon ortaya çıkar ki bu da genomik dengesizlik ile ilişkilidir.

Bir protoonkogenin onkogenik hale gelmesinde rol oynayan mutasyon/epigenetik mekanizma dominant niteliktedir. Tek allel mutasyonu onkogenik özellik için yeterli olmaktadır (80,81). Protoonkogenlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması aşağıda Tablo 2.1’de verilmiştir.

2.1.4. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı gen (TBG) ürünleri normalde hücre siklusunu kontrol eden, hasarlı DNA’nın tamir edilmesi için DNA tamir mekanizmalarını devreye sokan ya da hasarlı hücreleri apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu inhibe eden genlerdir. Bu yüzden bu genler tümör ve metastaz gelişimini engellemektedirler.

Karsinogeneziste Knudson’ın klasik ‘iki vuruş’ hipotezine göre, onkogenlerin aksine TBG’lerin fonksiyon kaybı için genin her iki allelinin de kaybı veya inaktif hale gelmesi gerekmektedir. Bu modele göre, ailesel geçiş gösteren kanserlerde; ilk vuruş parental gamette TBG’nin bir allelinin mutasyona uğraması, ikinci vuruş ise diğer allelin farklı genetik mekanizmalar ile somatik mutasyonudur. (75,80,81).

Tablo 2.1. Onkogenler ve işlevleri

Protoonkogen	Örnek	Açıklama
Büyüme faktörleri veya mitojenler	SIS INT2 KGF	Hücrenin kendisi, komşu ya da uzak özelleşmiş hücre tarafından hücre proliferasyonunu uyarmak için salgılanan ligandlardır. Onkogen, gereksinim olmamasına rağmen hücrenin büyüme faktörlerini salgılamasını uyarabilir ki hücre otokrin döngü aracılığıyla ürettiği faktörleri ligand olarak kontrolsüz proliferasyonuna neden olur.
Reseptör tirozin kinazlar	EGFR, PDGFR, VEGFR, HER2/neu	Kinazlar diğer proteinlere fosfat grubunu bağlayarak onların aktif veya inaktif olmalarını sağlarlar. Reseptör kinazlar, hücre yüzeyinde reseptör proteinlere fosfat grubu bağlarlar. Tirozin kinazlar hedef proteinin tirozin amino asidine fosfat grubunu bağlarlar. Reseptörün ekstraselüler ortamdan gelen ligand olmamasına rağmen devamlı aktif halde kalmasına neden olurlar
Sitoplazmik tirozin kinazlar	SRC ailesi, ABL geni BTK ailesi	Sitoplazmik tirozin kinaz molekülleri hedef proteindeki tirozin amino asidini fosforilleyerek, o proteinin aktifleşmesini sağlar. Sürekli aktivasyonları ve onkogenik sinyal iletimi malign hücreli olayları hızlandırır.
Sitoplazmik serin/ threonin kinazlar	RAF kinaz, CDK	RAF,RAS tarafından aktive edilen ve ERK/MAP kinazın aktivasyonuna yol açar. CDK'lar hücre döngüsünü denetleyen, mitozun ana regülatörü olan siklin bağımlıdır. protein kinazlardır.
Düzenleyici GTPazlar	RAS (K-RAS, N-RAS H-RAS)	RAS küçük bir GTP'azdır, GTP'yi GDP'ye ve fosfata hidroliz eder. RAS, büyüme faktörü sinyal iletimi ile aktifleşir (EGFR gibi) ve büyüme sinyal yollarında ikili kontrol anahtarı gibi işlev gösterir (aktif/inaktif). RAS aktifliği sonrası hücre proliferasyonunu kontrol eden sitoplazmik proteinler RAF, MEK, ERK, MAPK'dır.
Transkripsiyon faktörleri	<u>MYC</u>	Hücre proliferasyonunu uyaran genlerin transkripsiyonlarını düzenlerler.

Bu durum aynı zamanda heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity = LOH) olarak da ifade edilmektedir. Bir alleli mutant diğer alleli de normal olan bireyde, normal olan allelin de mutant olması heterozigot mutant durumdan homozigot mutanta geçişi ifade eder ki bu da ilgili tümör baskılayıcı genin fonksiyonunu yitirmesi

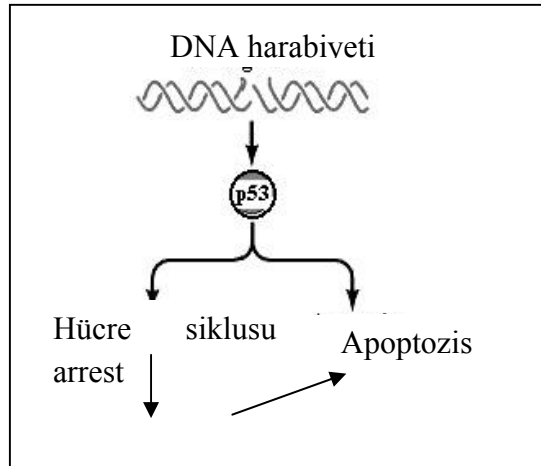
demektir. Mitotik kromozom ayrılamaması, tüm kromozomun kaybı, delesyon, somatik rekombinasyon ve son yıllarda üzerine yoğunlaşılın epigenetik olaylar LOH'a sebep olan mekanizmalar arasındadır.

Tümör baskılayıcı gen ürünleri hücre siklusunu baskılar veya apoptozisi uyarır ya da bazen her ikisini de gerçekleştirirler (75,80).

2.1.5. DNA Tamir genleri

. Bu genlerdeki mutasyon/epigenetik olaylar da kanser gelişimine neden olmaktadır. Ayrıca DNA tamirindeki azalmadan kaynaklanan artın mutasyon oranı diğler TBG'lerin inaktivasyonuna ve onkogenlerin de aktivasyonuna neden olur.

Gerek endojen gerekse ekzojen karsinojenler hücre siklusunda yavaşlamaya neden olmaktadır. Normal koşullarda bu yavaşlama sürecinde hücreler, DNA hasarını tamir etme fırsatı bulmaktadırlar. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse, hücre ya apoptozise uğrar ya da hasarlı DNA'yı içeren hücre bölünmeye devam ederek mutasyon birikimine ve dolayısıyla karsinogeneze neden olmaktadır (Şekil 2.1) (75,80).



Şekil 2.1: Hücre içi DNA tamir sistemi

2.1.6. Epigenetik

İlk olarak, 1950'lerde Conrad Waddington tarafından önerilen Epigenetik terimi günümüzde "DNA dizisindeki değışimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz

bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler” olarak tanımlanmaktadır.

Epigenetik değişimler DNA veya RNA da genlerin sessizleşmesine (silencing) yani protein üretemez hale gelmelerine neden olan mekanizmalardır ve geni inaktive/aktive edici bir mutasyon gibi genetik mekanizmayla eşdeğerdirler. Ancak epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Normal hücrelerde gen ekspresyon kontrolünde görev alan mekanizmalardır. Farklı epigenetik mekanizmalar embriyonel gelişimde, farklılaşmada, proliferasyon, genom bütünlüğünün korunması vb. süreçlerde rol oynarlar. Transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel aşamalarda görev alan farklı epigenetik mekanizmalar bulunmaktadır (23,25).

2.1.6.1. Epigenetik Mekanizmalar

1. Transkripsiyonel

- A. Histon modifikasyonları
- B. DNA metilasyonu

Bu mekanizmalar esas olarak transkripsiyon regülatörlerinin DNA'ya ulaşabilirliğini etkilerler. Transkripsiyon sürecinin başlaması engellenir.

2. Post - transkripsiyonel

- A. RNAi

Transkripsiyon sonrası, mRNA'nın sitoplazmada translasyon aşamasını bloke eden mikro RNA'lar bu grupta yer almaktadırlar. MikroRNA'lar küçük, 21-25 nükleotit uzunluğundaki RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun epigenetik kontrolünden sorumludurlar. Bu mikroRNA'lardaki mutasyonlar onkogen ya da TBG davranışı gösterirler.

DNA'nın epigenetik olarak tekrar düzenlenmesi, her kansere spesifik epigenom haritalarının çıkarılması, özellikle 2000'li yıllardan itibaren epigenetik mekanizmaların karsinogenez sürecinde büyük rol oynadıklarının belirlenmesi ile başlamış ve halen çok yoğun olarak devam etmektedir. Son yıllarda kanserin moleküler mekanizmasının

belirlenmesinin yanı sıra, erken tanı, tedaviye yanıt gibi klinik özelliklerle de marker olarak kullanılabilirlikleri araştırılmaktadır.

DNA metilasyonu, kanser gelişiminde ilk ve en çok etkisinin değerlendirildiği epigenetik mekanizmadır (23,25).

2.1.6.2. DNA Metilasyonu

Metilasyon, DNA dizisinde sitozin ve guanin dinükleotidlerinde (CpG) sitozinin 5' Karbonuna metil grubunun bağlanması ve 5-metil sitozinin (5mC) oluşmasıdır (Şekil 2.2). Normal bir hücrede, DNA'daki tüm nükleotidlerin % 0.75-1 kadarı 5mC şeklindedir ve genomdaki tüm CpG dinükleotidlerinin % 70-80 kadarını etkiler. Sitozin metilasyonu CpG dinükleotidlerinin dışında CpA veya CpT dinükleotidlerinde de gözlenir. Ancak farklılaşmış hücrelerde CpG dışındaki metilasyon çok nadirdir, kök hücrelerinin bir özelliği olarak ifade edilir.

Kromatin inaktivasyonuna bağlı olarak ökromatin yapının heterokromatin hale dönüşümünün genlerin promoter bölgelerindeki DNA metilasyonu ile düzenlendiği, buna karşılık histon asetilasyonunun kromatini ve DNA demetilasyonunu aktive ettiği ve böylece gen sessizleşmesinden sorumlu faktörün ortamdan uzaklaştırıldığı uzun zamandan beri bilinmektedir. DNA ve histonların doğal kovalent modifikasyonları epigenom olarak ifade edilmektedir ve embriyonel, fetal ve postnatal dönemlerde farklılıklar gözleendiği gibi organizmanın farklı dokularında da epigenom çeşitliliği sözkonusudur. Yani gelişimde, hücre farklılaşmasında ana görevi epigenom üstlenmektedir. Ayrıca çevresel faktörlere yanıtta da epigenomik değişimler gözlenmektedir. (75,80).

İnsan genomunda CpG dinükleotidi dağılımında iki grup karşımıza çıkmaktadır.

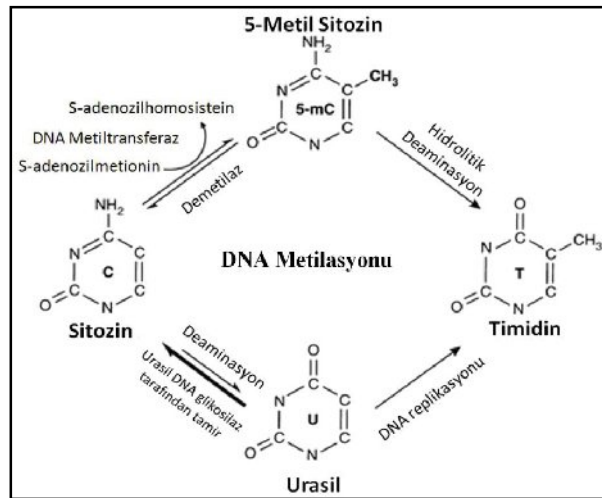
- i. CpG adacıkları: Gen promoter bölgelerinde lokalizedirler.
- ii. Genomda dağınık halde bulunan CpG dinükleotidleri: Özellikle genomdaki tekrar dizileri, sentromer ve mikrosatellit DNAlardaki dağınık CpG dinükleotidlerinin normal hücrelerde hipermetile halde oldukları, böylece genom bütünlüğünün korunduğu, çevresel ajanlara

yanıt verilebildiği ifade edilmektedir. Bu dizilerdeki hipometilasyonun genomik instabilitesi ile ilişkisi ortaya konmuştur.

İnsan genomunda 29.000, demetler halinde bulunan CpG den zengin adacık bulunduğu hesaplanmıştır. Bu adacıklar, CpG dinükleotidleri açısından zengin ve genin 5' promoter bölgesi ile genin birinci ekzonunun 5' ucunda lokalizedirler. Ortalama % 60 insan geninde CpG adacığı bulunmaktadır ki bu genlerin ekspresyonu doku spesifiktir. Aktif olan genlerin CpG adacıkları metile değildirlir ve transkripsiyonun başlaması için gerekli enzimler için hedeftirler.

CpG adacığı metilasyonuna bağılı olarak genin sessizleşmesi için önerilen iki mekanizma bulunmaktadır: Birinci mekanizma metilli DNA'ya bağlanan proteinler (MBP) tarafından metilli DNA'nın tanınması ve transkripsiyon baskılayıcılarının aktif hale gelmelerinin sağlanmasıdır. Diğer öne sürülen mekanizmaya göre ise CpG adacığı hipermetilasyon düzeyinin artmasına bağılı olarak transkripsiyon faktörlerinin ve polimeraz enziminin genin promoter bölgesine bağlanmalarının engellenmesidir.

DNA metilasyonu ilk olarak virüsler ve diğere DNA patojenlerine karşı bir korunma mekanizması olarak belirlenmiştir. Normal koşullarda, DNA metilasyonu differensiasyonda, genomik imprintingde, X kromozomu inaktivasyonunda ve tekrar dizilerinin inaktivasyonunda rol oynamaktadır. (23,67).



Şekil 2.2: DNA metilasyonundaki biyokimyasal yollar (23)

2.1.6.3. Metilasyon ve Kanser

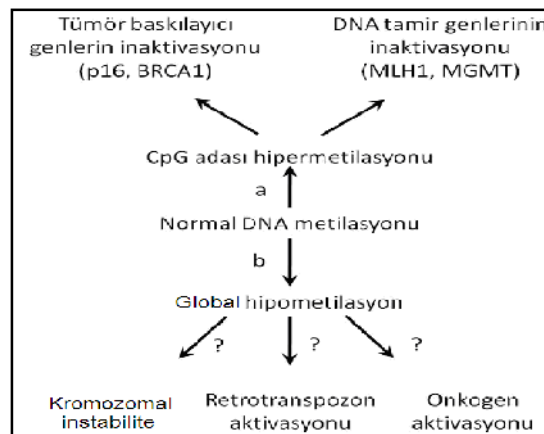
Özellikle son iki dekatlık süre içerisinde, DNA metilasyonunun sadece kanser gelişiminde değil aynı zamanda progresyonunda, tedavide de çok önemli olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. Metilasyona spesifik anti-kanser tedavi protokolleri geliştirilmiştir. Kanserde iki epigenetik olay çok önemlidir.

1. Genomik Hipometilasyon

Normal hücrelerle karşılaştırıldığında malignant hücreler, genel oranının azalması gibi, DNA metilasyonu açısından major değişimler göstermektedir (Şekil 2.3).

Pek çok kanser tipinde, TBG'lerin CpG adacıklarında hipermetilasyon olmasına karşın LINE1 gibi uzun araya girmiş diziler ile sentromer ve satelit DNA'ları gibi tekrarlayan DNA elemanlarında genellikle hipometilasyon dikkati çekmektedir (23,25).

Global hipometilasyonun protoonkogen aktivasyonunda ve kromozomal instabilitede etkili olduğu düşünülmektedir. Kanserde, genellikle global hipometilasyon ile birlikte kanser tipinde rol oynayan genlerin promoter bölge hipermetilasyon anomalileleri birlikte gözlenmektedir (Şekil 2.3). CpG adacık hipermetilasyonu özellikle kanserin başlangıç basamağına spesifiktir ancak tümör gelişiminin ilerleyen aşamalarında da etkisi rapor edilmiştir.



Şekil 2.3: Artmış CpG adacıklarının muhtemel rolü ve tümör gelişiminde global DNA metilasyonunun azalması (25) (a) CpG artmış metilasyonu, tümör baskılayıcı ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna yol açar. (b) Azalmış global DNA metilasyonunun kromozom stabilitesini azaltma, retrotransposon elemanlarının aktivasyonu (insersiyonel mutageneze yol açar) ya da onkogenlerin aktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir.

Kanserlerde hipermetile olan genler tümör oluşumunu, invazyonunu, metastazını baskılayan veya oluşan DNA hasarlarını tamir eden tümör baskılayıcı genlerdir (TBG). Ailesel kanser formlarına neden olan genlerin %50'sinin sporadik kanser olgularında hipermetilasyona uğradıkları gösterilmiştir Yapılan birçok çalışmada germline olarak kalıtılan ilk mutasyondan sonra ikinci mutasyonun/vuruşun gerçekleşmesinde en önemli mekanizmalardan birisinin metilasyon olduğu gösterilmiştir (23,25,71)

2.2. MERKEZİ SINIR SİSTEMİ TÜMÖRLERİ

Santral sinir sistemi, kranium ve vertebral kanal içinde sınırlandırılmıştır. Meninks adı verilen bağ dokudan oluşan membranlarla çevrilidir. Sinir dokusu yapısal olarak 2 hücre tipi içerir; nöronlar ve glia (nöroglia) hücreleri. Nöronlar morfolojik ve fonksiyonel olarak serebellumun internal granüler tabakasını oluşturan küçük yuvarlak hücrelerden, primer motor korteksin geniş piramidal Betz hücrelerine kadar farklılık gösteren heterojen bir ailedir (31). Glial hücreler ise santral sinir sisteminde en çok bulunan ve sistemi destekleyen hücrelerdir. Nöronların aksine elektriksel uyarıları iletmezler aksine nöronları koruyan, destekleyen, nöron beslenmesi ve merkezi sinir sisteminin savunmasını sağlayan hücrelerdir. Glial hücreler ile nöronlar arasında ve glial hücrelerle vasküler hücreler arasında çift yönlü kominikasyon vardır. Astrositler, oligodendrositler, ependimal hücreler ve mikroglialar santral sinir sisteminde bulunan glial hücre tipleridir.

Oligodendrositler; sitoplazmik uzantıları ile nöronların aksonlarını kuşatarak santral sinir sistemindeki myelin kılıfı yaparlar. Rutin kesitlerde küçük, yuvarlak, lenfosit benzeri nükleusları ve halo şeklinde çekilmiş sitoplazmaları ile tanınırlar.

Ependimal hücreler; serebral ventrikülleri kaplarlar ve koroid pleksusun örtücü hücreleri ile yakın ilişkilidirler.

Mikroglialar; nöral tüpten değil, kemik iliğindeki öncül hücrelerden köken alırlar. Kısa uzantılara sahip, uzun, küçük hücrelerdir. Sinir dokusunun fagositik hücreleri olup makrofajlar gibi fonksiyon görürler (32,35,70).

Astrositler; glia hücreleri içinde sayısı en fazla olanlardır. Yapısal destek sağlar, onarım işlemlerinde, metabolik değişimlerde görevlidirler ve kan-beyin bariyerinin elemanıdır (18,35).

2.2.1. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Görülme İnsidansı

Amerika Beyin Tümörü Kayıt Merkezi'nin (Central Brain Tumor Registry Of The United States-CBTRUS) yayınladığı rapora göre primer beyin tümörü (benign ve malign) insidansı yüzbinde 11.4 ve 23.5 arasında değişmektedir (11). Türkiye'de ise beyin tümörleri tüm kanser olguları içerisinde kadınlarda %3.99, erkeklerde ise %3.77 oranında görülmektedir (74).

2.2.2. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması.

Santral sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması onkogenezdaki hücre tipine, nöroglial fibrillerin varlığına veya yokluğuna, büyümenin makroskopik özelliklerine ve hücrel atipi derecesine göre yapılmaktadır. WHO tarafından 2007 yılındaki histolojik kriterlere dayanılarak yapılan sınıflandırmada, tüm tümörler 7 ana gruba ayrılmıştır (37) (Tablo 2.2)

2.2.3. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Derecelendirilmesi

Dünya Sağlık Örgütü'nün beyin tümörlerini derecelendirmesinde atipi, mitoz, endotelial proliferasyon ve nekroz gibi histopatolojik özellikleri dikkate alınmıştır (Tablo 2.3).

Tümör, tabloda belirtilen özelliklerden hiçbirisini taşıyorsa derece 1, birisini (genellikle atipi) taşıyorsa derece 2, ikisini taşıyorsa derece 3, daha fazlasını taşıyorsa derece 4 olarak tanımlanmaktadır.

Histopatolojik Derece :

Gx: Araştırılmamış

G1: İyi diferansiye tümör.

G2: Orta derecede differansiye tümör.

G3: Kötü differansiye tümör.

G4: Andifferansiyetümör

Tablo 2.2: Santral Sinir Sistemi tümörlerinin WHO sınıflandırması (41)

1. Nöroepitelial doku tümörleri	Ganglioglioma
Astrositik Tümörler	Anaplastik gangliogliom
Pilositik astrositom	Santral nörositom
Pilomiksoid astrositom	Ekstraventriküler nörositom
Subependimal dev hücreli astrosito	Serebellar liponörositom
Pleomorfik ksantoastrositom	Papiller glionöronal tümör
Diffüz astrositom	Paraganliom
Fibriler astrositom	4. ventrikülün glionöral tümörü
Gemistositik astrositom	Pineal bölge tümörleri
Protoplasmik astrositom	Pineositoma
Anaplastik astrositom	Pineoblastoma
Glioblastoma	İntermediyer farklılık gösteren pineal tm
Dev hücreli glioblastom	Pineal bölge papiller tümörü
Gliosarkom	Embriyonal tümörler
Gliomatosis serebri	Medulloblastom
Oligodendrogial tümörler	Primitif nöroektodermal tümör
Oligodendroglioma	Atipik teratoid/rabdoid tümör
Anaplastik oligodendrogliom	2.Kranial ve paraspinal sinir tümörleri
Oligoastrositik tümörler	Scwannom
Oligoastrositom	Nörofibrom
Anaplastik oligoastrositom	Perinörom
Ependimal tümörler	Malign periferel sinir kılıfı tümörleri
Subependimoma	3.Meninkslerin tümörleri
Miksopapiller ependimom	Meningoepitelial hücre tümörleri
Ependimoma	Mezenkimal tümörler
Sellüler	Primer melanositik lezyonlar
Papiller	Histogenezi bilinmeyen tümörler
Clear cell	4.Lenfoma ve hematopoetik tümörler
Tanisitik	5.Germ hücreli tümörler
Anaplastik ependimom	Germinom
Koroid pleksus tümörleri	Embriyonal karsinom
Koroid pleksus papillomu	Yolk sak tümörü
Atipik koroid pleksus papillomu	Koryokarsinom
Koroid pleksus karsinomu	Teratom
Diğer nöroepitelial tümörler	Mikst germ hücre tümörleri
Astroblastom	6.Sellar bölge tümörleri
3.ventrikülün kordoid glioması	Kraniofarengiom
Angiosentrik glioma	Granüler hücreli tümör
Nörönal ve miks nörönal-gliyal tümörler	Pituisitoma
Serebellum displastik gangliositoması	Adenohipofiz onkositoması
Desmoplastik infantil astrositom	7.Metastatik tümörler
Gangliositom	

Tablo 2.3 : Merkezi sinir sistemi tümörlerinin derecelendirilmesi (41)

	I	II	III	IV
Astroitik tümörler				
Subependimal dev hücreli tümör	X			
Pilositik astrositom	X			
Pilomiksoid astrositom		X		
Diffüz astrositom		X		
Pleomorfik ksantoastroitom		X		
Anaplastik astrositom			X	
Glioblastom				X
Dev hücreli glioblastom				X
Glisarkom				X
Oligoastroitik tümörler				
Oligoastroitom		X		
Anaplastik oligoastroitom			X	
Ependimal tümörler				
Subependimom	X			
Miksopapiller ependimom	X			
Ependimom		X		
Anaplastik ependimom			X	
Koroid pleksus tümörleri				
Koroid pleksus papillomu	X			
Atipik koroid pleksus papillomu		X		
Koroid pleksus karsinomu			X	
Diğer nöroepitelial tümörler				
Anjiyosentrik gliom	X			
3. ventrikül koroid gliomu		X		
Nöronal ve miks nörogliyal tümörler				
Gangliositom	X			
Gangliogliom	X			
Anaplastik gangliogliom			X	
Desmoplastik infantil astrositom ve gangliogliom	X			
Disembrioplastik nöroepitelial tümör	X			
Santral nörositom		X		
Ekstraventriküler nörositom		X		
Serebellar liponörositom		X		
Spinal kord paragangliogliomu	X			
Papiller glionöronal tümör	X			
4. ventrikülün glionöral tümörü	X			

2.2.4. Etiyoloji

Beyin tümörlerinin etiyojisi konusunda çeşitli varsayımlar ileri sürülmüşse de bu konuda kesin bir sonuca ulaşılamamıştır. Travma, hormonal faktörler, çevre ve genetik faktörler önemle üzerinde durulan etkenler arasındadır (1).

Kanserojen madde içeren, özellikle Petro-kimya sanayi artıkları ile temas edenler ile manyetik alan içerisinde çalışanlar ve özellikle radyasyon alanlarda beyin tümörü görülme sıklığının arttığına ilişkin veriler bulunmaktadır (1). Santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinin, nörofibromatozis (tip 1 ve 2), tüberoz skleroz, Li-Fraumeni sendromu, von Hippel-Lindau hastalığı, famiyal polipozis ve nevoid bazal hücreli karsinoma gibi herediter hastalıklarla birlikte görülmesi ve moleküler, sitogenetik açıdan yapılan çalışmalarda elde edilen genetik bozukluklar, beyin tümörlerinin etiyojisinde genetik faktörlerin de rolünü ortaya koymuştur (8).

2.2.5. Epidemiyoloji

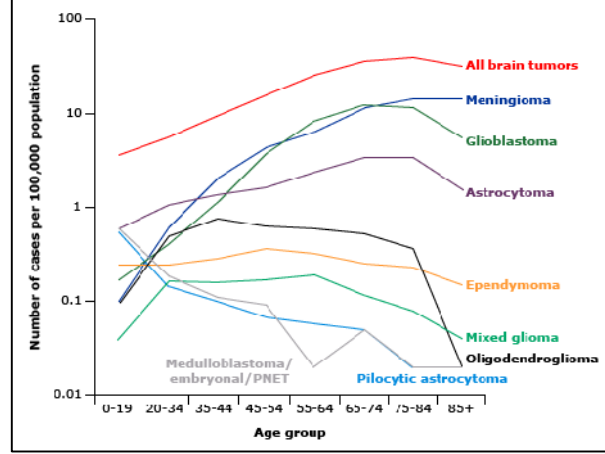
Santral sinir sistemi tümörlerinin yaş dağılımı incelendiğinde, çocukluk çağında sıklıkla ortaya çıktığı gözlenmektedir. Santral sinir sistemi tümörleri içinde, 15 yaşında gelişen primer tümörlerin yaklaşık % 40-45'inin, erişkin yaş grubunda ise % 50-60'ının astrositer kökenli tümörler olduğu görülmektedir. Dolayısıyla astrositomalar her yaşta gelişebilen tümörlerdir. Ancak genç yaşlarda gelişen tümörlerin daha çok düşük derece iken ileri yaşlarda yüksek derece astrositomların sıklıkla gözlendiği bildirilmektedir (Şekil 2.4). Yirmili yaşlardan 70'li yaşlara kadar giderek artan bir sıklık göstererek 70 yaşından sonra tekrar sıklığında azalma görülmektedir. Hemen tüm yaş gruplarında erkeklerde kadınlara göre hafif bir fazlalık saptanmaktadır. Yaşlı grupta en sık görülen tümörler glioblastom, metastatik karsinom, menenjiom ve Schwannom'dur (30).

Dekatlara göre en sık görülen tümörleri şu şekilde sınıflandırabiliriz.

1. ve 2. dekatta; Medulloblastom, ependimom, pilositik astrositom (posterior fossa tümörleri) ile kraniofarinjiom ve koroid pleksus tümörleri,

3. - 5. dekatta; Diffüz astrositom, anaplastik astrositom, oligodendrogliom, ependimom (serebral hemisferler) ile menenjiom,

6. ve 7. dekatta; Glioblastom, anaplastik astrositom, anaplastik oligodendroglom, metastatik karsinomlar, lenfoma (serebral hemisferler), menenjiom, Schwannom, pitüiter adenom (30).



Şekil 2.4: Primer beyin tümörlerinin yaşlara göre dağılımı (24)

(Tüm beyin tümörleri grubu kranial ve spinal sinir tümörlerini, hemangioblastomaları, primer lenfomaları, germ hücre tümörlerini, sellar bölge tümörlerini içermektedir. Astrositoma grubu diffüz astrositomaları, anaplastik astrositomaları, unique astrositoma varyantlarını ve özelleştirilmeyen astrositomaları içermektedir (PNET: primitive neuroectodermal tumor).

2.3. GLİAL TÜMÖRLER

Glia ya da nöroglia denilen beyindeki destekleyici hücrelerin neoplastik değişimi sonucunda “gliomalar” olarak isimlendirilen tümör grubu gelişmektedir. Genelde intraaksiyal yerleşimli, kapsülsüz ve diffüz büyüme gösteren tümörlerdir. Gliomalar astrosit, oligodendrosit ve ependimal hücre kökenli olabilmesine karşın bazen terim olarak astrositoma ve glioma değişen biçimde birbirini yerine kullanılabilir. Tüm glial tümörler hücresel tiplerine göre 4 gruba ayrılmaktadır (11).

- 1- Astrositik tümörler
- 2- Oligodendriogial tümörler
- 3- Ependimal tümörler
- 4- Miks glial tümörler

Astrositomlar tüm glial tümörlerin %80-85'ini oluştururlar. Astrositomlar artan anaplazi oranlarına ve histopatolojik görünümüne göre dört dereceye (grade) ayrılmaktadır.

1- Piloitik	WHO DERECE I
2-Diffüz Astrositom	WHO DERECE II
3-Anaplastik Astrositom	WHO DERECE III
4-Glioblastoma Multiforme	WHO DERECE IV

Derece arttıkça gerek atipi, damarlanma, mitoz özellikleri ile karakterize büyüme potansiyeli, gerekse prognoz bakımından kötüleşme söz konusudur. Derece 1 astrositomlar, iyi farklılaşmış gliomlardır ve bu terim pilositik astrositomlar, subependimal dev hücreli astrositomlar, pleomorfik ksantoastrositomlar için kullanılır. Derece 2 astrositomlar, diffüz astrositomlar olarak da adlandırılırlar. Anaplastik astrositomalar, derece 3 düzeyindeki astrositik tümörler olup “Malign” astrositom veya yüksek dereceli astrositom olarak da bilinirler. GBM, derece 4 astrositom olup, en malign astrositik tümördür. Tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak % 38'ini AA ve GBM oluşturur (12).

2.3.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)

Kötü diferansiye astrositlerden oluşan en malign astrositik tümördür. Glioblastoma multiforme erişkin yaş grubunun en sık görülen ve en malign olan beyin tümörüdür.

1863 yılında Virchow tarafından glial orjinli tümör olarak belirlenmiştir. 1914 yılında Mallory tarafından spongioblastoma multiforme terimi kullanılmıştır. 1929 yılında Bailey ve Cushing bu terimi glioblastoma multiforme olarak değiştirmiştir. Daha ayrıntılı tanım Zülch, Russell ve Rubinstein tarafından verilmiştir. Günümüzde glioblastom, glioblastoma multiforme ile eşanlamlı kullanılmaktadır (33).

Yaklaşık olarak tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %50-60'ını oluşturur (27). İnsidans piki 45-70 yaş arasındadır. Glioblastom hastalarında ortalama sağkalım süresi 12-18 aydır. Fakat \square 60 yaş üstü hastalarda ortalama sağkalım daha kısadır (11). Zürih Üniversitesi Hastanesindeki 1003 glioblastomlu hastanın %70'i

bu yaş grubundadır. Biyopsilerde ortalama yaş 53 olup erkekler daha sık olarak etkilenmektedir (erkek/kadın oranı 1.5/1 şeklindedir). Benzer olarak Dohrman, glioblastomların %8,8'inin çocuklarda görüldüğünü bildirmiştir. Ultrasonografi ile en erken gestasyonun 29. haftasında tespit edilebilmektedir (33).

2.3.2. Histopatoloji

Glioblastom, sıklıkla pleomorfik, belirgin nükleer atipi ve mitotik aktivite içeren astrositik hücrelerden oluşur. Belirgin mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz esas tanısal işaretlerdir. Glioblastome multiforme terimi tümörün histopatolojisinin çeşitliliğini ifade eder. Glioblastomdaki bölgesel heterojenite, özellikle stereotaktik biyopsiye dayanan tanılarda ciddi histopatolojik zorluklara neden olmaktadır.

Belirgin mikrovasküler çoğalma ve/veya nekroz önemli tanı kriterlerindedir. Doku örneklerinde, tümör merkezinde büyük nekrotik alanlar, periferde ise canlı tümör hücreleri kümelenmiştir Glioblastomlar bölgesel farklılıklar gösterdikleri için doku örneklerinin az olması durumunda histopatolojik tanı güçleşmektedir (27,62).

2.3.3. Primer ve Sekonder Glioblastomlar

Glioblastomalar; primer glioblastoma ve sekonder glioblastoma olarak iki alt grupta değerlendirilmektedirler. Ancak iki alt grup tanımı ve bunların birbirlerinden ayırt edilmesi gerektiği ilk kez 1940 da Alman nöropatolog Hans-Joachim Scherer tarafından vurgulanmıştır.

Primer glioblastomlar 50 yaşından daha büyük olguların % 60 kadarını içerir. Bu ileri derece tümörler de novo ortaya çıkan, klinik ve/veya histopatolojik daha az malign prekürsör lezyon öyküsü olmayan, üç aydan daha kısa klinik öykü ile kendini gösteren tümör tipidir. İlk semptomdan histolojik tanıya kadarki ana dönem 6.3 aydır (3,47).

Glioblastomların geri kalan % 40 kadarını oluşturan sekonder glioblastomlar 45 yaşından daha genç olgularda ortaya çıkan, düşük derece (WHO Grade II) veya anaplastik astrositomadan daha malign anaplazi derecesine dönüşümü sonucunda oluşan tümörlerdir. Malign progresyon için gerekli süre 12 aydan daha kısa olabildiği gibi 10 yılı da geçebilmektedir ki ortalama progresyon süresi 4-5 yıl olarak bildirilmektedir.

Ayrıca ortalama sağkalım süresi sekonder glioblastoma hastalarında 12-15 aydır. Bu süre primer glioblastoma hastalarına göre daha uzun bir süredir. Bu farkın nedeninin sekonder glioblastoma hastalarının yaş grubunun genç olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (47,54,56).

Tüm astrositik neoplaziler birlikte değerlendirildiğinde, en fazla genetik aberasyonları içeren, farklı yolların anomalilerinin görüldüğü tümörler glioblastomlardır. Ayrıca moleküler yöntemlerdeki gelişmelere bağlı olarak glioblastomların moleküler patogeneze bakıldığında farklı genetik yollardan orjin aldıkları, farklı yaşlardaki olguları etkiledikleri ve bugün kullanılan terapilere farklı yanıtlar verdikleri için sekonder ve primer glioblastomların farklı hastalık antitelerinden oluştuğuna dair kanıtlar artmaktadır (3).

2.3.4. Glioblastoma Multiformede Genetik Özellikler

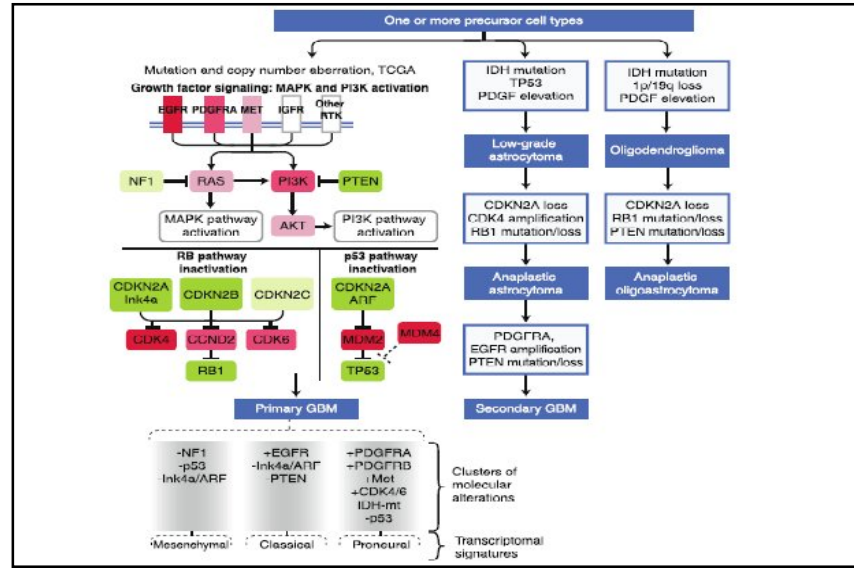
Gliomaların genetik özellikleri Nörofibromatöz ve Li-Fraumeni sendromunun moleküler temellerinin açıklandığı 1980'lerin son dönemlerinden bugüne kadar yapılan çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Son yıllarda geniş olgu-kontrol serilerinde gerçekleştirilen tüm genom asosiasyon çalışmaları düşük penetrans gösteren genlerin belirlenmesini sağlamıştır (56).

Primer ve sekonder GBM'ler histolojik olarak birbirlerinden ayrılamazlar. Ancak moleküler düzeyde her tipin farklı genetik anomalileri vardır ve her birinin ortak histopatolojik sonuca ulaşan farklı moleküler rotalara bağlı olarak oluştukları uzun zamandan beri üzerinde düşünülen bir konudur. Diffüz astrositomlar (düşük derece astrositom, WHO Grade II) ve anaplastik astrositomların (WHO Grade III) moleküler patolojisi sekonder GBM patogenezi ile aynı özellikleri taşımaktadır (32).

Oligodendroglioma ve astrositom WHO klasifikasyonu özellikle morfolojik özelliklere göre yapılmaktadır. Ancak bu iki tip de farklı tümör gelişim yolları sergilemektedirler. Örneğin oligoastrositomlar 1p/19q delesyonları ile ilişkili iken astrositomlar P53 mutasyonları ile bağlantılıdır ve her iki moleküler olay birbirlerinden farklıdır. Bu nedenle tümör tipi ve derecesini belirlemede sadece

histopatolojik özellikler yetersiz kalmaktadır. Tümörün genetik fenotipini de belirlemek kesin tümör tipi ayrımı, yaşam süresi ve tedavi için yol gösterici olmaktadır (9,32).

Primer tümörlerin moleküler patogenezi belirlemek amacıyla geniş olgu-kontrol serilerinde yapılan çalışmalarda 601 gen dizilenmiş ve bu genlerden sadece birkaç tanesinin rekürrent anomaliler gösterdiği saptanmıştır. Bu genler arasında TP53 (%42), PTEN (% 33), NF1 (%21), EGFR (%18), RB1 (%11), ve fofosotidilinozitol 3-kinaz (PI3K) alt birimleri (kombine şekilde %17) rapor edilmiştir (6).



Şekil 2.5: Glioma patogenezinin gelişmesinde rol oynayan genetik yollar (6)

Şekil 2.5.'in sol panelinde primer GBM'lerde yüksek prevalans gösteren gen değişimlerinin büyüme faktörlerini ve intraselüler ortamdaki sinyal yollarını nasıl uyardığı, bu arada P53 ve RB gibi TBG'lerin fonksiyonlarını nasıl inhibe ettikleri gözlenmektedir. EGFR, PDGFRA, veya MET büyüme faktör reseptörlerinin mutasyon/amplifikasyon ile aktivasyonu sık gözlenen ve birbirleriyle bağlantı gösteren anomalilerdir (Şekil 2.5). NF1 kaybının tüm bu anomalilerin dışında olması farklı bir patojenik rota olasılığını düşündürmektedir. PI3K'nın direkt aktivasyonu alt birimlerinin mutasyonları ile oluşmaktadır. Bildirilen pek çok mutasyonun fonksiyonel özellikleri henüz yeni belirlenmesine rağmen, PI3K mutasyonu ile PI3K inhibitörü olan PTEN delesyonunun birbirlerinden bağımsız oldukları düşünülmektedir. Tüm belirtilen anomaliler birlikte değerlendirildiğinde geniş serilerde incelenen tümörlerin % 88'den

fazlasında bu yolakları aktive eden en az bir mutasyona sahip oldukları gözlenmiştir. Tümör baskılayıcı genlerden P53 ve RB'un düzenleyici görevi üstlenen yolakları olguların sırasıyla %87 ve % 78 'inde mutasyon ve/veya kopya sayısı değişimleri ile engellendiği gözlenmiştir. MDM2 amplifikasyonu, MDM4 amplifikasyonu ve P53 mutasyonları da birbirlerinden bağımsız olduklarından P53 TBG'nin temel hedef olduğu söylenebilir. Aynı şey CDK4/6 ve RB gen mutasyonu için de geçerli gibi gözükmektedir. Bu yolakta da RB hedef olarak alınmaktadır. CDKN2A delesyonları primer GBM'lerde oldukça prevalan olan bir anomalidir ve p16/Ink4a ile p14/ARF proteinlerini etkilemektedir ki bu da sırasıyla RB ve P53 fonksiyonlarının inhibisyonuna neden olmaktadır. Primer tümörler de novo olarak ortaya çıktıkları için patogenezdaki olaylar dizisini belirlemede güçlükler yaşanmaktadır. Ancak en sık gözlenen anomaliler arasında kromozom 7 kazancı ile CDKN2A delesyonunun erken dönemde ortaya çıkan olaylar olduğu, yüksek EGFR amplifikasyonunun ise geç dönemde olduğu düşünülmektedir (6).

Gliomaların protein düzeylerinin değerlendirilmesi ile alt gruplarının belirlenmesini hedefleyen pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. Verhaak ve ark. ları transkript özelliklerine göre gliomaları pronöral, mezenşimal, klasik ve nöral olarak dört gruba ayırmıştır (85). Pronöral, mezenşimal ve klasik alt gruplarının farklı moleküler anomaliler gösterdikleri Şekil 2.5'de görülmektedir. Klasik tip, EGFR amplifikasyonu ve P16 ile PTEN delesyonları ile karakterize iken mezenşimal tipte NF1, P53 ile CDKN2A kaybı/mutasyonu gözlenmektedir. Pronöral tipte PDGFRA, CDK4, CDK6 ve hafif düzeyde MET genlerinin ileri düzeydeki amplifikasyonları ile IDH1, PI3K ve P53 kaybı/mutasyonunun sıklıkla gözlendiği bildirilmektedir. Dördüncü alt tip olan nöral GBM'lerde ise diğer alt gruplarda gözlenen anomaliler görülmekte olup spesifik rekürren anomali belirlenmemiştir (10).

2.3.4.1. EGFR (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü)

Epidermal Büyüme Faktörü reseptörü glioma, akciğer ve kolorektal kanser gibi pek çok kanser tipinde anahtar rol üstlenmiş transmembran glikoproteindir. EGF ve TGF α (transforming growth factor) gibi ekstra sellüler ligandların hücre içerisine girmelerini sağlayan reseptördür. Kromozom 7p11.2 de lokalizedir. Glioblastom

olgularının üçte birinden fazlasında EGFR amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu gözlenmektedir. EGFR amplifikasyonu gösteren GBM'lerde aynı zamanda tipik olarak kromozom 10 kaybı da birliktelik gösterir ki bu PTEN geni kaybını yansıtmaktadır (73).

İmmünohistokimyasal çalışmalarda primer GBM'lerin %60 'ından fazlasında ve sekonder GBM'lerin %10 kadarında aşırı EGFR ekspresyonu gösterilmiştir. Amplifikasyonu ise yaklaşık %30-40 oranında görülmüştür (52). En çok gözlenen mutasyon, ekzon 2-7'de görülen çerçeve kayması mutasyonu sonucu oluşan fonksiyon kazanımıdır. Mutasyon sonucu glioma hücrelerinde proliferasyon ve invazyon meydana gelir. GBM'de 35 yaşın altındaki hasta popülasyonunda EGFR amplifikasyonunun bulunmadığı, özellikle p53 mutasyonunun bulunduğu belirtilmektedir. Anaplastik glioblastomlardan GBM'e geçişte etkili olduğu ifade edilmektedir (53).

2.3.4.2. P53

Hücre siklusu DNA hasarı tamiri, apoptozis ve neovaskularizasyonda önemli rol oynayan kromozom 17p'de lokalize bir tümör süpresör genidir. Astrositik beyin tümörlerindeki ilk genetik değişiklik p53 mutasyonudur. Görülme sıklığı %25-30'dur. p53 mutasyonları primer GBM'de daha düşük oranda gözlenirken (%10) sekonder GBM'lerde daha yüksek oranda (%65) bildirilmiştir (71). p53 protein akümüasyonu, p53 mutasyonundan daha sıktır ve yine sekonder GBM'de primere göre daha fazla görülür (50,51,60,75).

2.3.4.3. MDM2

P53 ile kompleks oluşturan MDM2 proteini, P53'ün transkripsiyonel aktivitesini yok eder. MDM2 p53'ün inhibitörü olarak 12q'da yer alır. Bu yüzden, MDM2 amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, p53'ün düzenlediği hücre büyüme kontrolünden kaçışın alternatif yoludur. Amplifikasyonu GBM'lerde %10'dan az oranda görülmekte olup bunların hepsi p53 mutasyonu taşımayan primer GBM olgularıdır (52,77). MDM2 proteininin aşırı ekspresyonu, primer GBM'lerin %50'sinden fazlasında görülmektedir. Bunun aksine sekonder GBM'lerde aşırı protein ekspresyonu olguların sadece %10 kadarında saptanmaktadır (5). Özet olarak, gen amplifikasyonu olmadan MDM2'nin

aşırı ekspresyonu, tipik olarak p53 mutasyonu taşımayan primer GBM'ler için genetik belirleyicidir (52,73,75).

2.3.4.4. CDKN2A

CDKN2A lokusunun gen ürünleri p16 ve p14'tür. Tümör baskılayıcı gen olan P14, MDM2 tarafından uyarılan P53 degradasyonu ve transkripsiyonel sessizliğini engelleyerek P53'ü aktif hale getirir. P14 ekspresyon kaybı, GBM'lerde %76 oranında görülmekte olup moleküler patolojisinde delesyonla birlikte hipermetilasyonun da etkili olduğu bilinmektedir (47,50).

2.3.4.5. P16, CDK4 VE RB YOLU

Kromozom 9p21'de lokalize olan P16/INK4a bir TBG'dir ve hücre büyümesini siklin bağımlı kinazlardan CDK4 ve CDK6'yı inhibe ederek kontrol eder. P16 ekspresyon kaybı durumunda, CDK'ların aşırı ekspresyon ve amplifikasyonu dolayısıyla kontrolsüz selüler proliferasyon oluşmaktadır ki bu özellik RB fonksiyon kaybı sonucunda da hücre siklusunun kontrolünün bozulması olarak kendini gösterir. Bu yoldaki bozukluklar, primer ve sekonder GBM'lerin her ikisinde de yaklaşık % 40-50 oranında gözlenmektedir. Her ikisinde de RB ekspresyon veya CDK4 amplifikasyon sıklığı eşit oranda görülürken, P16 delesyonu belirgin olarak primer GBM'lerde daha sık görülmektedir. EGFR amplifikasyonu olan GBM olgularının büyük kısmında P16 delesyonu eşlik etmektedir. Bu da; primer GBM'lerin üçte birinde görülen, ancak sekonder GBM'lerde görülmeyen P16 delesyonu verisini desteklemektedir (50,64).

2.3.4.6. PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Reseptor)

Bağ dokusu ve glia için bir majör mitojen olan PDGF, A ve B zincirlerinin birleşiminden oluşur. Bu ligandlar tirozin kinaz reseptör ailesinden PDGFR- α ve PDGFR- β reseptörleri tarafından tanınır. PDGFR- α 'nın aşırı ekspresyonu, hem düşük hem de yüksek dereceli astrositomalarda bildirilmiştir. PDGFR- α 'nın amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, sekonder GBM oluşum yolu için tipiktir ve p53 mutasyonu gibi ilk görülen değişikliktir (61,68). Primer tümörlerin oluş yollarından birinin PDGFRA

formu yeniden düzenlenmeleri olduğu düşünülmektedir. Bu formun EGFR den sonra yüksek oranda amplifiye olan ikinci aday gen olduğu, amplifikasyonun hücre sinyal iletimini bozarak selüler proliferasyona neden olduğu tahmin edilmektedir (64,73).

2.3.4.7. Kromozom 10'da LOH, PTEN (MMAC1) ve DMBT1

Kromozom 10p, 10q23 ve 10q25-26 lokuslarında veya tüm kromozom 10 heterozigosite kaybı (LOH), GBM'lerde en sık görülen değişikliklerdir (50,51). Tümör baskılayıcı gen olan PTEN mutasyonu veya kaybı, %30 GBM olgusunda gözlenmektedir. Buna karşılık PTEN delesyonu diffüz astrositoma ve anaplastik astrositomada nadir gözlenmektedir (Şekil 2.8).

Deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1) geni, kromozom 10q25-26'da lokalize bir TBG'dir. Bir diğer gen ise MYC antagonisti MXI 1'dir. GBM'li olguların % 23- 38 kadarında delesyonları rapor edilmiştir (51,73).

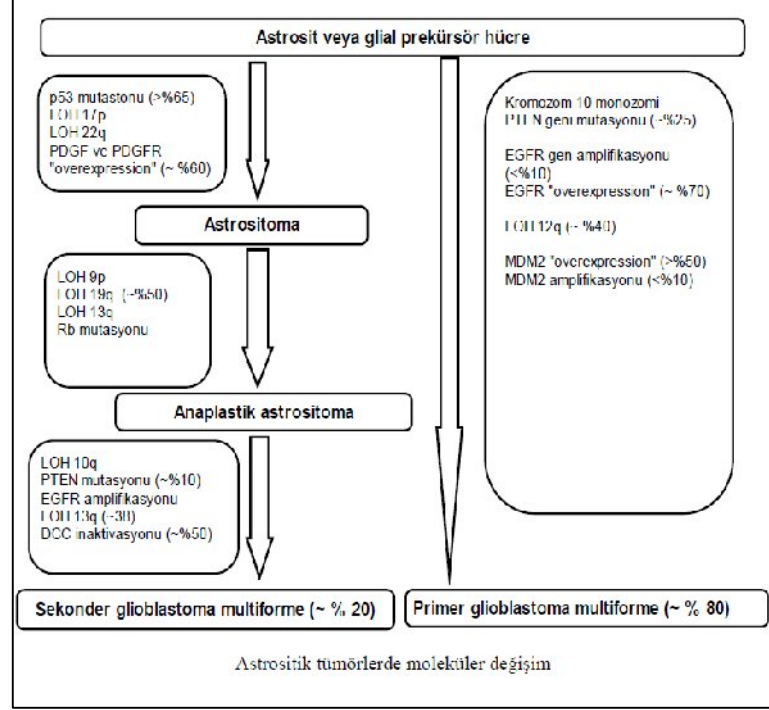
Kromozom 10 kaybı GBM oluşumu için çok önemlidir. Diffüz astrositoma veya anaplastik astrositoma'dan GBM'ye transforme olan olgularda sıklıkla 10q'da heterozigosite vardır. Primer GBM'de tüm kromozom 10'da kayıp varken, sekonder GBM'de heterozigosite kaybı kromozom 10q ile sınırlıdır (50,73).

2.3.4.8. Kromozom 19q da LOH ve DCC Geni

Kromozom 19q da LOH daha sıklıkla oligodendrogliomda (%70) gözlenirken, düşük dereceli astrositomların, AA ve GBM'ye dönüşümünde 19q kaybını etkili olduğu düşünülmektedir. Kromozom 19q LOH si ;diffüz astrositomda ~ %15, AA da ~ %45 ve sekonder GBM de %54 gözlenirken, primer GBM'de ancak % 6 düzeyinde gözlenmiştir. Bu da, 19q LOH'nin düşük dereceli astrositomların malign formlara dönüşümünde rol aldığını desteklemektedir.

“Deleted in colorectal cancer” (DCC) geni, nöral adhezyon molekül ailesine bağlı bir tümör baskılayıcı gendir ve 18. kromozomda lokalizedir. İmmunohistokimyasal çalışmalarda, bu gene ait protein yokluğu astrositomada (G II)

%7, sekonder glioblastomda %47 düzeyinde saptanırken, primer glioblastomda %25 düzeyinde saptanmıştır (52,58).



Şekil 2.6: Astrositik tümörlerde moleküler değişim (73)

2.3.4.9. MGMT

Gliomaların tedavisinde kullanılan alkilizan nitrozürelere guaninin 6. oksijen atomuyla birleşerek hücreye zararlı DNA bileşikleri oluştururlar. DNA bileşkesi, çaprazında bulunan sitozin ile de bağlanarak DNA zincir kırılmasına yol açar. O6-Metil Guanin Metil Transferaz (MGMT) hücreye zararlı olan alkil gruplarını guaninin 6. pozisyonundan kesip çıkartmadan kendi sistin birimine bağlayarak uzaklaştıran bir DNA tamir proteini'dir. Üzerindeki sistine alkil grubunun bağlanması ile MGMT inaktive olur. Böylece proteinin bir intihar molekülü gibi görev yapması ve hasarı tamir ederken kendi işlevini kaybetmesi söz konusudur. Bu nedenle MGMT protein düzeyi hasarlı hücrelerde önem taşımaktadır. Proteinin translasyonu promotör bölgesinin metillenmesi ile kontrol edilmektedir. MGMT geninin metillenerek sessizleştirildiği

durumlarda, alkil grupları DNA hasarına yol açmaktadır ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (57).

MGMT enziminin, alkil gruplarını DNA molekülünden uzaklaştırarak hasarı tamir etmesi ile tümör hücreleri alkilleyici ilaçlara karşı direnç geliştirirler. Ancak promotor bölgesi metillenerek etkisiz hale getirilen MGMT enzimi, hasarlı DNA molekülünü onaramadığı için tümör hücresi apoptoz süreci sonunda kaybedilir.

DNA tamir enzimi kodlayan MGMT geninin promotor hipermetilasyonu primer GBM'de % 36 ve sekonder GBM'de %75 oranında görülmektedir ki bu son yıllarda. Temazolomid tedavis için iyi prognoz göstergesi olarak kullanılmaktadır (9,13).

2.3.5 Glioblastoma Multiformede IDH2 Gen Mutasyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalar gliomanın genetik alt yapısına yoğunlaşmıştır. 2008'de yapılan geniş çaplı genom analizinde daha önce tanımlanmamış olan metabolik enzim kodlayan bir gen IDH1'i tanımlamışlardır. İnsan genomu 5 adet IDH genine sahiptir. Bu 5 gen nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) ve nikotinamid adenin dinükloetid'in (NAD) koenzimleridir.

IDH1 sitoplazma ve peroksizomda lokalize IDH2 ve IDH3 ise mitokondride lokalizedir. IDH1/2 mutasyonları %70 oranında WHO derece II ve III astrositomada, oligodendroglioma ve sekonder gliomada görülmektedir. IDH1 mutasyonu taşımayan tümörlerde sıklıkla IDH1 ile analog aminoasit kodlayan IDH2'de mutasyon saptanmıştır. Gliomada IDH1'in en sık R132H mutasyonu (G395A) arjinin aminoasitinin histidine, IDH2'nin R172K mutasyonu (G515A) ise arjinin lizine dönüşümüne neden olmaktadır (69).

IDH1 mutasyonları kanser vakaları arasında son dönemlerde önemli derecede yerini almaktadır. Daha az sıklıkla IDH2 mutasyonları da bu dilim içinde yer alır.

Son dönemde yapılan ileri analizler IDH1/2 mutasyonlarının yeni bir prognostik marker olduğu sonucunu vermiştir. IDH1/2 mutasyonuna sahip glioma hastalarının bu mutasyonu taşımayanlara göre daha uzun yaşam süresine sahip olduğu, Ichimura ve arkadaşlarının yaptıkları çok basamaklı çalışmalarla desteklenmiştir (26).

2.3.5.1. IDH Gen Mutasyonlarının Fonksiyonel Sonuçları

IDH mutasyonlarının keşfinden bu zamana kadar, IDH1-2 mutasyonlarının insan kanserlerindeki yeri hala gizemini korumaktadır. IDH mutasyonları genellikle spesifik gen ekspresyon biçimleri ile ilişkilendirilmiştir ve gliomagenizde mutasyona sahip olan ve olmayan spesifik tümör tiplerinin ayırımına ışık tutar. IDH gen profilinin belirlenmesi ölümcül kanser gruplarının klinik değerlendirmesi için bir kılavuz görevi görür. Ve birçok tümör tipi için kurtarıcı bir prognostik faktördür. Bu nedenle IDH1-2'nin genetik durumu, klinik-preklinik çalışmaların planlanması için gelecekte kullanılabilir olacaktır.

IDH mutasyon çalışmaları halen tamamlanmamış ve tartışmalı olmasına rağmen, çalışmalar diagnostik ve teröpatik uygulamalara ışık tutmaktadır. IDH1-2 mutasyonları primer ve sekonder GBM ayırımında güçlü bir ayıraç ve prognoz tayini için daha spesifik bir biyomarker'dır. Bu durum histopatolojik analizde, tümör tipi için belirleyici olabilir. IDH1-2 mutasyonlarının tek bir amino asit lokalizasyonuna sahip olması, bu genetik değişimin diagnostik amaçlar için kullanımını kolaylaştırmaktadır (38,61).

IDH genlerinin hücrel metabolizmadaki rolleri kesinlik kazanmamakla beraber IDH1 lipid metabolizması ve glikoz toleransı için, IDH2 oksidatif solunum düzenlenmesinde görev alır. Normal hücrel metabolizmadaki rolleri yanında, oksidatif indirgeme esnasında hücrel cevabı sağlarlar.

IDH genlerinin mutasyona uğraması durumunda hücreler oksidatif stresin etkilerine açık hale gelirler. Mutasyon sonucu anormal olarak üretilen metabolitler nedeniyle glioma gelişimi için risk artar. Anormal hücrel fonksiyonlar sonucu gerek oksidatif strese maruziyet, gerekse yeni enzimatik görevler kazanımı sonucunda biriken doğal olmayan metabolitler (2-Hidroksi Glutarat (2-HG)), hücreleri dış etkenlere (kemoterapi, radyoterapi, ROS, gamma iridasyon vb.) karşı daha hassas hale getirir.

IDH2 mitokondride lokalizedir. IDH2 isositrattan α -ketoglutarata oksidatif dekarboksilasyonu katalizler ve NAD(P)^+ 'dan NAD(P)H oluşumunu redükte eder. Bu işlem isositratın oksalosuksinata oksidasyonunu gerektirir elektron alıcısı olarak NADPH 'de işleme girer. Devamında oksalosuksinat dekarboksile olarak α -ketoglutarat formuna dönüşür. IDH2 birçok dokuda TCA döngüsünün regülasyonu için anahtar rol

oyun. TCA döngüsü için isositratın, α -ketoglutarat dönüşümü fonksiyonunu üstlenir (38,41,54,61).

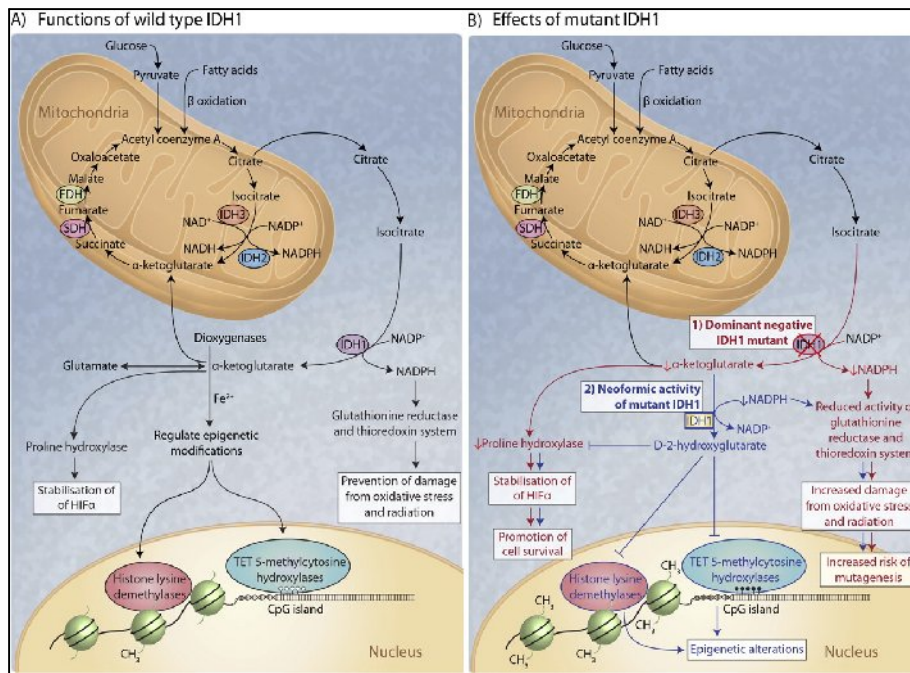
Memeli hücrelerinde IDH aktivitesi, bir çeşit oksidatif indirgeme çeşidinde artıştan sorumludur. Her iki türdeki enzimde NADPH üretebilir. Eşit orandaki düşük glutatyonun glutatyon redüktaz ile parçalanması için gereklidir. Aynı zamanda thioeredoksin sistem aktivitesi için gereklidir. Bu 2 işlemde hücrenin oksidatif zarara karşı korunma yöntemidir. Ek olarak α -ketoglutarat güçlü bir antioksidan olarak hizmet eder ve IDH1-2 her ikisi bu bileşenin aktivitesini değiştirebilirler.

IDH2 mutasyonu wild tiplerin normal fonksiyonunu bozarak, substrata olan affiniteyi düşürür. Mutasyon sonucu inaktif katalitik heterodimer formasyonu oluşur ve isositratın α -ketoglutarat dönüşümü inhibe olur. İleri çalışmalar mutasyona uğramış IDH2'nin NADPH'den NADP dönüşümü esnasında α -ketoglutarattan 2-HG'a dönüşüme neden olduğunu belirtmiştir (38,61).

Normal hücrelerde, α -ketoglutarat 60'dan fazla dioksijenaz enzimin alt birimidir. Bu enzimler içerisinde pek çok histon lizin metiltransferazlar ile 5-metil sitozin hidroksilazın TET (Ten-Eleven Translocation enzyme) ailesi bulunmaktadır. TET, 5-metilsitozinin 5-hidroksimetilsitozin dönüşümünde görev alır yani DNA metilasyonu oluşumunda etkilidir. Histone lizin metiltransferaz enzimleri histon proteinlerinin metilasyonunda görev alırlar ki histon metilasyonu diğer bir gen ekspresyon kontrol mekanizmasıdır. Glioma hücrelerinde IDH1 mutasyonu neomorfik enzim aktivitesine neden olur, yani α -ketoglutarat, 2-hidroksiglutarata indirgenir ve NADPH kullanılır. 2-HG hücreler için toksiktir bunu glutamat, α -KG kullanan enzimlerin ve TET 5-metilsitozin hidroksilazların yarışmalı olarak inhibisyonunu yaparak gerçekleştirir. Böylece hem α -ketoglutarat azalması hem de 2-hidroksiglutarat artması histon lizin metiltransferaz ile 5-metilsitozin hidroksilaz enzimlerinin çalışmasını engellemekte, normal selüler epigenetik süreçlerin gerçekleşmesini engellemektedirler (56,61) (Şekil 2.9). IDH1-2 mutasyonu taşıyan kanser dokusu örnekleri kanserli olmayan hücrelere göre 100 kat daha fazla konsantrasyonda 2-HG içermektedir. 2-HG birikimi progresif nöronal defektler ve gliomaları içeren beyin tümörleri için artmış risk ile karakterizedir. Beyinde 2-HG artması sonucu ROS

seviyesinde artış olur bu da potansiyel olarak kanser gelişimi riskinde artışa neden olur (38).

Glioma spesifik CpG adacık metilatör fenotipi ile kolorektal kanser CpG adacık metilatör fenotipi birbirlerine çok benzemektedirler ve her ikisindeki ortak bulgu çok sayıda genomik lokusta hipermetilasyonun olmasıdır. Kolorektal kanserlerde olduğu gibi gliomalarda da IDH mutasyonları ile metilatör fenotipler yakın ilişki içerisindedirler (38,56,61).



Şekil 2.7: Yabancıl tip IDH ve mutant durumdaki IDH genlerinin fonksiyonları (21)

IDH mutasyonları glioma patogeneğinde ve spesifik glioma alt tiplerinin tanımlanmasında merkezi bir rol alır. IDH gen profilinin belirlenmesi ölümcül kanser gruplarının klinik değerlendirmesi için bir kılavuz görevi görür. Ve birçok tümör tipi için kurtarıcı bir prognostik faktör olur. Bu nedenle IDH gen mutasyon profillerinin, preklinik çalışmalar için gelecekte kullanılabilirliği desteklenmektedir. IDH1/2 mutasyonu primer ve sekonder GBM ayırımında güçlü bir ayıraç ve en başarılı prognoz tayini için spesifik bir biyomarkerdir. Bu durum histopatolojik analiz için yetersiz materyal olan olgular için yarar sağlamaktadır (41,54,61,69).

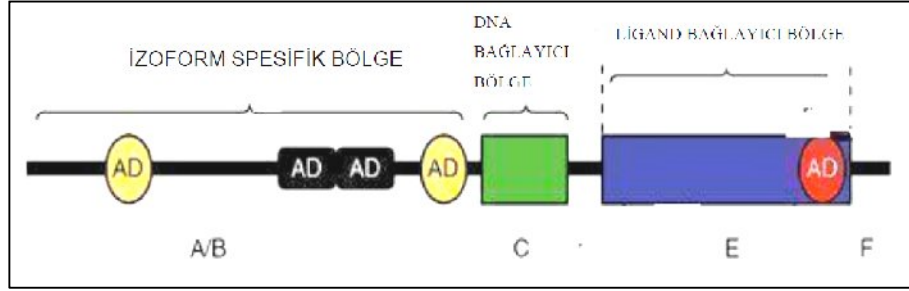
2.4. GBM Olgularında Metilasyon

İnsan ve fare beyin dokusu vücutta en yüksek seviyede 5 metil sitozin içeren dokudur. Beyin dokusunu etkileyen çeşitli mutasyon ve metilasyon paternlerinin beyin fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir (ICF ve Rett Sendromu). Kanser hücrelerinde metillendiği gösterilen ilk genler Kalsitonin ve MyoD dir. Bu bilgi, promotor metilasyonunun tümör baskılayıcı genlerin susturulması yoluyla kanser patogenezinde rol oynadığı hipotezinin oluşmasını sağlamıştır. Bunu takip eden çalışmalarda ise Rb, VHL ve P16 genlerinin bazı sporadik tümörlerde metile olduğu tespit edilmiştir.

Beyin tümörleri için anormal DNA metilasyonu ilk olarak 20 yıl önce ortaya konmasına rağmen bugüne kadar bu konuda çok fazla bir ilerleme kaydedilmemiştir. Beyin dokusunda anormal metilasyona aday genler üzerindeki çalışmalar, hücre siklusunun regülasyonunu baskılayan (RB, CDKN2A, CDKN2B, p73, PTEN) hücre çoğalması ve hücre-hücre etkileşiminde yer alan (EMP3, E-Cadherin, RASSF1A), DNA tamiri ve ilaç direncine neden olan (MGMT, SOX10) apoptoziste etkili olan (DAPkinase), anjiyogenez (THSB1) ve invazyona neden olan genler (TIMP3)'deki metilasyon paternleri üzerine yoğunlaşmıştır (8,17,53). Ancak çalışmalar arasında farklılıkların olmasına bağlı olarak glial tümörlerde metilasyonun etki mekanizmaları henüz kesinlik kazanmamıştır (7,13,57).

2.4.1. Retinoik Asit Reseptör Beta (RAR β) Geni

Kromozom 3p de lokalize RAR β geni troit-steroit hormon reseptör süper ailesine üye protein kodlamaktadır. Retinoik asit cevabını başlatan bir nükleer reseptör olarak görev yapar. Retinoik asit reseptörü β 'yı kodlayan RAR β geni, (önceden HAP; RRB2; NR1B2 olarak da adlandırılmıştır) somatik hücre hibridizasyonu ve in situ hibridizasyon metotlarıyla kromozom 3p24 bölgesinde 25443028-25614427 nükleotidleri arasına haritalanmıştır (Şekil 2.10). Bu gen özellikle epiteliyal dokularda baskın bir ekspresyon paterni göstermektedir.



Şekil 2.8: RAR- β geni DNA ve ligand bağlayıcı fonksiyonel bölgeleri (2). Evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olan C ve E bölgeleri kutularla gösterilmiş, değişken olan sekanslar (A/B, D ve F) ise siyah bar ile gösterilmiştir. N terminal ucu (A/B bölgesi) bir otonom transkripsiyonel aktivasyon işlevi içermektedir (AF-1). Yüksek oranda korunmuş olan C bölgesi dizi spesifik DNA tanınması işlevini gören DNA bağlanma bölgesini kodlamaktadır.

RAR β geni, P1 ve P2 promotörlerinin etkisiyle alternatif kırılma sonucu dört farklı izoform oluşturmaktadır. RAR β 1 ve RAR β 3 izoformları P1 promotöründen transkribe olmakta, RAR β 2 ve RAR β 4 izoformları ise P2 promotörünü kullanmaktadır. İnsanlarda tanımlanan üç RAR β izoformu β 1, β 2, ve β 4'tür. β 1 ve β 2 izoformları nükleusta yer alırken, β 4 izoformu sitoplazmada lokalizedir. RAR β geninin anlatımını yaptığı protein, bir nükleer hormon reseptörü olup birçok başka genin çalışmasını düzenlemektedir. ELF3, NCOA2, ZNF42 ve CDNK1A genlerinin ekspresyonları RAR β tarafından düzenlenmektedir. (2,43).

RAR β ürünü olan reseptör, biyolojik olarak vitamin A'nın aktif formu olan retinoik asit ile bağlanır. Embriyonik dönem morfogenezin, hücrel sinyal yolağında ve hücre büyümesi ile farklılaşmasında yer alır. RAR β transkriptinin fare sinir sisteminin embriyonik dönem gelişiminde, belirgin noktalarda yer aldığı gösterilmiştir (40).

RAR β geninin çocukluk çağı intrakraniyal ependimomlarında ve koroid pleksus tümörlerinde metile halde bulunduğu bildirilmiştir (57) . Ancak RAR β gen hipermetilasyonunun GBM patogenezindeki durumu henüz bilinmemektedir. Glioblastom olgularında RAR β geni metilasyonu sadece Piperi ve ark.'ları tarafından değerlendirilmiştir. Çalışmalarında 23 derece II-IV tümörde %58.8 metilasyon oranı saptamışlardır. Ayrıca GBM hastalarında RAR β geninin metilasyonu ve tümör derecesi ile pozitif korelasyon kurulmuş, primer GBM progresyonunda agresif fenotip ile ilişkilendirilmiştir (53). Ancak bu tümör grubunda RAR β 'nın rolüne ilişkin veri eksikliği sözkonusudur.

2.5. DNA Metilasyonunun Değerlendirebilmesi İçin Metodlar

Bir genin hipermetilasyon oranı ile aktivasyon kaybı arasındaki ilişki farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Analiz edilen dokularda düşük orandaki metilasyon paternini saptayabilen yöntem arayışı, beraberinde pek çok metilasyon analiz yöntemlerinin uygulama alanı bulmasını sağlamıştır. Genlerin metilasyon derecelerinin ölçülmesinde çok çeşitli metodlar kullanılmaktadır: Southern blot analizi, bisüfit genomik DNA dizi analizi, restriksiyon enzim-PCR, MSP ve metilasyona duyarlı tek nükleotid primer extension (MS-SNuPE), metilasyon sensitive HRM (MS-HRM) bu yöntemlerden bazılarıdır (29).

2.5.1. Southern blot

Southern blot, DNA metilasyon analizinde en sık kullanılan metoddur. Bu metodda; genomik DNA, aynı dizilim için spesifik olan metilasyona duyarlı olan ve duyarlı olmayan endonükleazlarla kesilir (örneğin: HpaII ve MspI). Daha sonra restriksiyon fragmentleri agaroz jelde ayrılarak bir membrana transfer edilir ve hedef DNA dizisi için spesifik olan bir proba hibridize edilir. Bu tekniğin sınırlamaları ise:

- (1) Southern blot analizi için gereken DNA miktarıdır (örnek başına 5-10 µg). Bu ise özellikle tümör örnekleri küçük olduğu zaman engelleyicidir.
- (2) Tamamlanmamış enzim kesimi sonuçları etkileyebilir, değerlendirme zorlaşır.
- (3) Metilli DNA miktarını kesin belirlemede sınırlıdır (29).

2.5.2. Restriksiyon Enzim PCR

Genomik DNA metilasyona duyarlı olan ve duyarlı olmayan restriksiyon enzimleri ile kesilir ve daha sonra parçalanmış DNA hedef dizinin kanatları olan primerlerle amplifiye edilir. Metilasyon-sensitive endonükleazların kullanımı, eğer hedef dizi metilenmiş CpG alanları içeriyorsa tahmin edilen bir büyüklükte DNA amplifikasyonu gerçekleşir. Metilasyon-insensitive bir endonükleazın kullanımı ile, hedef DNA dizisinin metilasyon durumu ne olursa olsun amplifikasyon olası olmayacaktır. Bu tekniğin en büyük sınırlaması, enzim kesiminin tamamlanmak

zorunda olmasıdır. Diğer sınırlama ise, eğer hedef bölgede pek çok CpG alanı varsa, bazıları metillenmiş bazıları metillenmemiş, elde edilen sonuçlar yetersiz olacaktır (29)

2.5.3. Bisülfıt DNA Dizileme

Bisülfıt metodu, 5-metilsitozin içeren DNA dizisi için, genlerin metilasyon derecelerinin analizi için yeni tekniklerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu teknik genomik DNA'daki tek 5-metilsitozinlerin (5-MC) bile ortaya çıkarılması için mükemmel bir araçtır.

Metod tek iplikçikli DNA' daki bütün Sitozin'leri sodyum bisülfıtın Urasil'e deamine etmesi temeline dayanır. Bu sırada 5-MC değişmeden kalır. Daha sonra bu modifiye edilmiş DNA, değiştirilmiş dizi için spesifik olan bir primer seti kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Bu amplifikasyonda tüm Urasil'ler (değiştirilmiş Sitozin'ler) Timin olarak amplifiye olurken, yalnızca 5-MC'ler Sitozin olarak kalır. Amplifiye olmuş fragmentlere ya direkt olarak ya da her bir molekülün klonlanmasından sonra dizi analizi yapılabilir. Klonlama stratejisi alleller arası metilasyon farklılıklarının analizi için çok kullanışlıdır. Bisülfıt dönüşümünün tamamlandığının kanıtlanması çok önemlidir, çünkü metillenmiş CpG alanlarındaki Sitozinlerin bisülfıt muamelesine dirençli olabileceği rapor edilmiştir (29).

2.5.4. Metilasyon Spesifik PZR (MSP)

MSP ilk olarak Herman et al. tarafından tanımlanmış bir tekniktir. Bisülfıt muamelesi sonrası metillenmiş ve metillenmemiş DNA arasında bulunan sekans farklılıkları bu yöntemde avantaj olarak kullanılır. Sitozinler Urasile deamine olurlar, PZR sırasında da Timine replike olurlar. PZR'dan sonra amplifiye olmuş DNA; metillenmemiş veya metillenmiş sekanslar için spesifik olan primer çifti ile elde edilir. MSP; DNA' nın verilmiş bir bölgesindeki metilasyonun varlığının analizi için oldukça hızlı ve nitel bir yöntemdir. Genomik DNA' nın tamamlanmamış bisülfıt modifikasyonu da metillenmiş C' ler için yanlış pozitif sonuç verebilir (29).

2.5.5. Yüksek Çözünürlük Erime Eğrisi (HRM) Analiz Yöntemi

HRM analizi, real-time PZR'nin kullanıma girmesi ile birlikte 1997'de geliştirilen bir yöntemdir. Mutasyon taraması ve genotiplendirme başta olmak üzere genetik haritalama, asosiyasyon çalışmaları, aday gen taraması, DNA metilasyon analizi gibi birçok çalışmada kullanılabilir. Uygulaması kolay ve hızlı bir yöntemdir. Yöntemi uygularken, standart PZR bileşenlerine ve çift zincirli DNA'nın varlığında floresan sinyal veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır. Artan sıcaklığa karşılık, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması ile floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelmektedir. Florometrik cihazlar, sıcaklık artışına bağlı olarak değişen bu sinyal şiddetini görüntüleyecek şekilde tasarlanmıştır (48).

HRM analizinin diğer gen tarama yöntemlerine göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Yöntem, 'kapalı tüp sistemi' olarak adlandırılmaktadır. Bunun temel nedeni, PZR'nin tamamlanmasından sonra, HRM'nin PZR ile aynı tüpte gerçekleştirilmesidir. Bu durum PZR ürünlerinden gelebilecek laboratuvar kontaminasyon riskini ve analiz süresini azaltmaktadır. Çünkü HRM için veri eldesi ve analizi PZR'den sonra 10-15 dk içinde gerçekleşmektedir. Veri eldesi 2sn'deki 0,1-1,0°C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesi ile elde edilir. Artan her 0,1°C için ölçüm alınabilmektedir. Bu nedenle çözünürlük yüksektir (36,48).

2.5.5.1. MS-HRM

Kanserde mortalitenin düşürülmesinde en önemli basamak erken tanıdır. Metilasyon değişikliklerinin de kanser oluşumunun erken basamaklarında olduğu düşünülürse, metilasyon kalıbı değişikliklerinin incelenmesi mortalitenin azaltılması yönünden umut vericidir.

HRM tekniği ile metilasyon çalışmaları için de kullanılabilen bir yöntemdir. İncelenmek istenilen DNA yapısındaki CpG adalarında metilasyon olup olmadığının değerlendirilebilmesi için metile olan ve olmayan C nükleotidlerini birbirinden ayırabilmek gerekir.

Metilasyona duyarlı HRM protokolü metilasyon profili bilinmeyen örnek DNA'nın PZR ürünü ile unmetile ve metile kontrol DNA'ların PZR ürünlerinin karşılaştırılmasına dayanır. PZR için unmetile DNA ve metile DNA'ya göre dizayn edilen primerler kullanılır. PZR sonrası oluşan ürünler sodyum bisülfid modifikasyonuna sokulan template DNA'nın metilasyonuna bağlıdır. Modifikasyon sonrası metile sitozinler değişmeden kalarak PZR esnasında guaninle eşleşerek 3 hidrojen bağı yapar. Unmetile sitozinler modifikasyonla urasile dönüşüm yapar. PZR esnasında timin bazı ile eşleşme gerçekleşir. Ve unmetile DNA A-T eşleşmesi ile 2 hidrojen bağına sahip olur (82). Bu nedenle metile ve unmetile DNA'ların PZR ürünleri HRM de termal denatürasyon esnasında farklı erime profilleri gösterir (82,83).

2.5.5.2. Bisülfid Modifikasyonu

DNA'daki metilasyon durumu en iyi şekilde sodyum bisülfid kullanılarak tespit edilebilir. Sodyum bisülfid, tek iplik DNA'da lokalize olan sitozini deamine eder. Bu reaksiyonda DNA, önce denatürasyon ile tek zincirli forma geçer. Ardından sırasıyla; sitozinin bisülfid reaksiyonu ile sitozin sülfonata, hidrolitik deaminasyon ile urasil sülfonata ve alkali desülfonasyon ile urasile dönüşümü gerçekleşir (Şekil 2.12). Böylece tüm sitozinler urasile dönüşür, ancak "metile sitozin", sitozin olarak kalır.

Bu yöntemde çok fazla veri noktası kullanıldığından erime eğrileri daha keskindir ve ampikondaki ufak farklılıklar saptanabilir. Diğer bir avantajı cihaz bünyesinde bulunan yazılım sayesinde uç nokta floresan, ısı kayması ve internal oligonükleotid belirleyiciler ile normalizasyon yapılmaktadır.

Çalışmamızda, Türkiye'de metilasyon taramasında yeni bir teknik olan "Methylation Sensitive High Resolution Melting Curve" (MS-HRM) yönteminin uygulanması, ilk defa bir Türk hasta grubunda MS-HRM yöntemi ile RAR β geni promotör metillenmesi sıklığının araştırılması hedeflenmiştir. Tez çalışmamızda literatürde yer alan çalışmalarda GBM prognozunda bir genetik faktör olarak öne sürülen RAR β geni promotör bölge hipermetilasyonunun rolü incelenmiştir.

2.6. DNA Dizi Analizi

İnsan genom projesi ile insan genomunun tümünün baz dizisinin çıkarılması hedeflenmiştir. %99 oranında tamamlanan çalışma DNA dizileme teknolojilerine de yeni boyutlar kazandırmıştır. Temel olarak DNA dizilenmesi konusunda iki teknik vardır: Bunlar Maxim-Gilbert ve Sanger yöntemleridir.

Maxim-Gilbert: Bu yöntemde floresan veya başka bir yöntemle işaretlenmiş bir DNA bölgesi belli bir baza spesifik kimyasal reaksiyonlarla parçalanarak fragmanlara ayrılır. Her spesifik reaksiyon için ayrı bir kuyu kullanılarak poliakrilamid jelde yürütülür ve görüntülenerek baz dizisi belirlenir.

Sanger: Bu yöntemde in-vitro ortamda DNA sentezi sırasında sentezi durdurucu ddNTP moleküllerinin ortama eklenmesi ile sentezin durdurulması amaçlanır. ddNTP'ler normalde DNA sentezi sırasında zincirin uzaması için bağ sağlayan 3' oksijen molekülüne sahip değildir. İşaretli primerler veya ddNTP'ler varlığında DNA dizisi 4 farklı reaksiyon yapılarak (her reaksiyon için bir ddNTP) poliakrilamid jelde veya her ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) farklı floresan boya ile işaretlenerek otomatik kapiler elektroforez sistemlerinde bütün baz dizisi elde edilebilir. Deneysel olarak DNA'nın dizilenmesi dört aşamadan oluşur:

1. PZR: Dizileme yapacağımız genomik bölgenin sınırlandırılmasını ve çoğaltılmasını sağlar.

2. PZR sonrası pürifikasyon: PZR sonrası ortamda bazı artık ürünlerin (primer artıkları, dNTPs ve enzim) ortamdan uzaklaştırılması işlemidir.

3. Döngü dizileme: Döngü dizileme durdurucu nükleotitlerin (ddNTPs) eklenmesi için yapılan asimetric bir PZR'dır. Standart PZR'dan farklı olarak tek bir primer ve durdurucu nükleotitler ortama eklenir ve rutin denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları ile floresan işaretli ddNTPs bağlanması sağlanır. Böylece otomatik dizi analiz sisteminin okuması için hazır fragmanlar oluşturulur.

4. Döngü dizileme ürünlerinin pürifikasyonu ve otomatik dizi analizi sistemine yüklenmesi: Döngü dizileme sonrası ortamda bulunan artıkların uzaklaştırılması dizilemenin başarılı olmasında çok etkilidir (45).

Bu çalışmada GBM tanısı alan, IDH1 mutasyonu ile MGMT gen hipermetilasyon analizleri yapılmış olgularda IDH2 gen mutasyonu frekansının ortaya konması ile GBM gelişimi, tedaviye yanıt ve sağ kalım sürelerinin tümör baskılayıcı RAR β geni metilasyon paternleri ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Henüz yeni uygulama alanı bulan Methylation Specific-High Resolution Melting Point (MS-HRM) yönteminin de GBM örneklerinde kullanımının belirlenmesi de çalışmamızın diğer amacını oluşturmaktadır. Bilgilerimize göre GBM olguları için RAR β metilasyonu ile ilgili literatürde bilgi veren sadece bir yayın bulunmaktadır. Bu yüzden olgu grubumuz GBM hastalarında RAR β metilasyonu frekansının belirlenmesinde dünya literatürüne temel oluşturacaktır. Ayrıca çalışmamız Türk toplumu ile yapılan IDH2 ve RARB genlerine yönelik moleküler analizlerin gerçekleştirildiği ilk çalışma özelliği de taşımaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada GBM tanısı almış olgulardan alınan ve IDH1 geni mutasyon analizleri ile MGMT gen metilasyon analizleri gerçekleştirilmiş tümör örneklerinin, IDH2 gen mutasyonu ve RAR β gen metilasyon paternleri açısından değerlendirilmesi, klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. IDH2 geni, DNA dizi analizi ile ve RAR β gen metilasyon patern analizleri de Methylation Sensitive High Resolution Melting Curve (MS-HRM) tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bulgular, olguların klinik ve histopatolojik özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Materyal seçimi

Çalışmamızda, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı tarafından opere edilen ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı konan 40 olguya ilişkin tümör örnekleri çalışmaya alınmıştır. Olgulardan 26’sı erkek, 14 ‘ü de kadındır.

Çalışmada moleküler yöntemlerde kullanılan araç-gereçler ile kimyasal maddeler aşağıda liste halinde belirtilmiştir:

3.1.2. Kullanılan gereçler

- Mikro pipet takımı ve uçları (2–20–100–1000 μ l) (Gilson)
- Kapaklı santrifüj tüpleri (1,5 ml)
- Kapaklı ependorf Tüpü (1,5 ml lik)
- Falkon tüp (30 ml) (Sterile universal container tube)
- Strip tüpü ve kapağı (0,2 ml Greiner bio one)

- Buzdolabı (Arçelik)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Vorteks (Heidolph)
- MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Robotu (Roche)
- Spektrofotometre (Eppendorf)
- Thermal Cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)
- Deep Freeze (Meraeus)
- LightCycler ® 480 Real Time PCR (Roche)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, colorless (50 plates/kutu) (Roche)
- PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
- 3130 için 96 Well Plate Septa
- 3130x3100 series plate base 96 well
- 3130 için 96' lık well reaction plate
- 3130x3100 series plate retainer 96 well

3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

- RPMI–1640 Medium (modified, 500 ml+10,25 ml 200mM L-glutamine, SigMa)
- PBS solusyonu (500 ml distile su içine 4g NaCl, 0.1g KCl, 0.57g Na₂HPO₄.2H₂O, 0.1g KH₂PO₄ eklenerek oluşturulan tampon solusyonu)
- MagNa Pure DNA Tissue Lysis Buffer (100ml) (Roche)
- Proteinase K, Recombinant, PCR grade (100mg liyofilize) (Roche)
- MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I– Large volume (32 isolation) (Roche)
- Epiect ® Bisulfite Kit (48) (Qiagen)
- CpGenome TMUniversal Methylated DNA (10µg / 100µl)
- CpGenome TMUniversal Unmethylated DNA (5µg / 50µl)X

- 2 vials (Millipore-Chemicon ® International)
- LightCycler ® 480 High Resolution Melting Master kiti (5ml / 500 reaksiyon) (Roche)
- dNTP Seti (Fermentas)
- MgCl₂ (PCR için) (Fermentas)
- 10XPCR buffer (Fermentas)
- Taq DNA polimeraz (Fermentas)
- Distile Su
- Moleküler Weight Marker (Promega, GibcoBRL)
- 6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
- Agaroz (Sigma)
- Etidyum Bromid (Sigma)
- ExoSAP-IT® PCR clean-up buffer (USB/ Affymetrix)
- BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit
- Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)

3.2. Yöntemler

Çalışmamızda taze doku örneklerinden öncelikle DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Magna Pure Compact DNA ekstraksiyon robotu ile GBM tümör dokularından DNA eldesi

Patoloji Anabilim Dalı tarafından, GBM tümör tanısı konmuş ve tümör içeren bölgeden alınan doku örneği Anabilim Dalımıza ulaştırılmıştır.

1. Ayrılan tümör örneği petri kutusu içine aktarılmış ve üzerine 2ml PBS buffer eklenerek 2 kez yıkanmıştır.

2. Doku parçaları petri kutularında mekanik olarak bistüri ile kıyılarak ve ezilerek parçalanmıştır.
3. Kıyılan ve ezilen dokular 500 µl PBS solüsyonu eklenerek 1,5 ml tüplere alınmış ve bir süre vortekslenmiştir.
4. Üzerine 200µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer + 20 µl Proteinaz K konularak tekrar vorteks yapılmıştır, 56⁰ C ‘ de çalkalamalı su banyosunda iki ya da üç saat bekletilmiştir.
5. Tüpler her yarım saatte su banyosundan alınarak homojenizasyon için vortekslenerek dokular homojenize hale getirilmiştir.
6. MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Robotu protokolü ‘‘Total Nucleic Acid Plasma 500’’, ‘‘sample volume 500 µl’’ ve ‘‘elution volume 200 µl ‘‘ olarak ayarlanmış, yüklenen örneklerin isimleri yazılarak kartuş ve tüpleri yerleştirilmiştir.
7. Homojenize sıvı haline gelmiş dokuların üzerine PBS eklenerek total volume 500 µl olacak şekilde robota yüklenmiştir.
8. Elde edilen DNA örnekleri %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiş ve DNA örneklerinin nanogram cinsinden miktarı spektrofotometrede ölçülmüştür.

Tümörlere ilişkin DNA ürünleri, bisülfid modifikasyonu ve DNA dizi analizi yapılmak üzere - 20 °C de saklanmışlardır.

3.2.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması

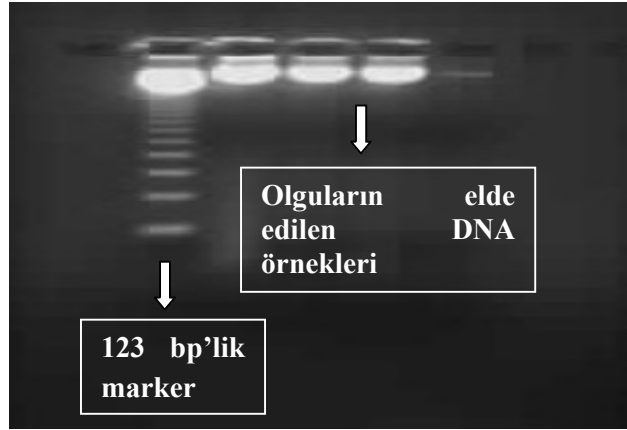
260 nm'deki OD değeri kullanılarak örneklerin konsantrasyonları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{sulandırma oranı}$$

-DNA örneklerinin saflığı OD260/OD280 oranı kullanılarak değerlendirilmiştir.

-Hazırlanan örneklerin spektrofotometrede (NanoDrop) 260nm ve 280nm'deki dalga boylarında OD ölçümleri yapılmıştır.

-Bu DNA'ların intakt olup olmadıkları %1'lik agaroz jelde 1µl DNA örneği yürütülerek kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1: Elde edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü

3.2.3. Elde Edilen DNA Ürününün Bisülfite Modifikasyonu İşleminin Yapılması

Elde edilen DNA ürünlerinin bisülfite modifikasyonu işlemi için EpiTect® Bisulfite Kit (48) (Qiagen) kullanılmıştır. Kitin kullanma el kitabında (EpiTect Bisulfite Handbook 04/2006) 40 µl hacim içinde 1–500 ng DNA ürünleri için önerilen “Düşük konsantrasyon DNA’daki unmetile sitozinlerin sodyum bisülfite dönüşümü” protokolü uygulanmıştır:

- Modifiye edilecek DNA ürünleri - 20 °C’den çıkarılarak çözülmeye bırakılmıştır.
- Bisülfite karışım çıkarılarak her tüp (8 örnek modifiye etmek üzere hazırlanan kit içeriği) içerisine 800 µl RNase free su eklenmiş ve 5 dakika kadar vorteksenerek karıştırılmıştır.
- 200 µl PCR tüpüne 10 µl DNA, 10 µl RNase free su, 85 µl Bisülfite miks, 35 µl DNA protect buffer konularak total 140 µl hacim elde edilmiştir.
- Termal cycler cihazı kit kullanım klavuzunda yer alan programa ayarlanmıştır.

İşlem	Zaman	Sıcaklık
Denatürasyon	5 dk	95 °C
İnkübasyon	25 dk	60 °C
Denatürasyon	5 dk	95 °C
İnkübasyon	85 dk	60 °C
Denatürasyon	5 dk	95 °C
İnkübasyon	175 dk	60 °C

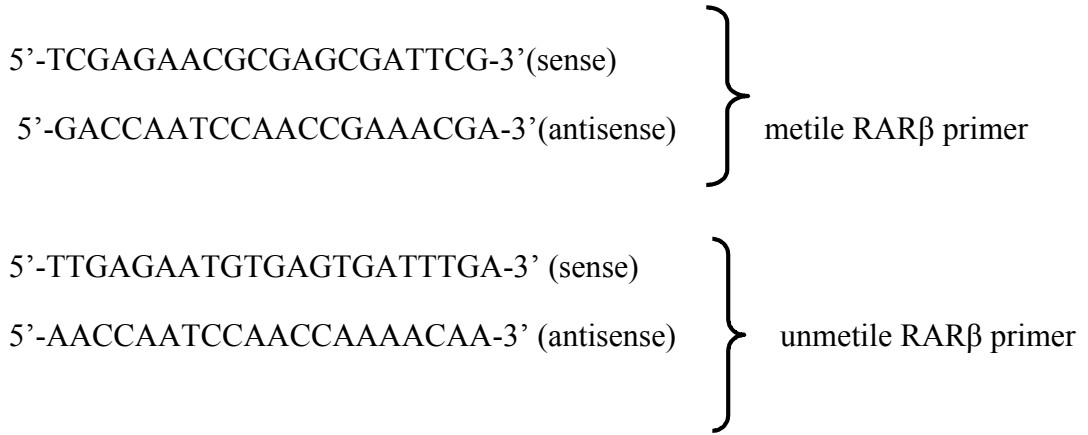
- Program sonunda elde edilen ürünler yıkanarak temizlenme aşamalarına geçilmek üzere 1,5 ml tüplere alınmış ve hafifçe vorteksleyerek tüplere 560 µl taze hazırlanmış Buffer BL eklenerek vortekslenerek karışım kit içeriği olan spin tüplerine aktarılmıştır.
- Spin tüpleri toplama tüplerine yerleştirilerek son hızda 1 dakika santrifüj edilerek, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiş ve tüpe 500 µl Buffer BW eklenerek son hızda 1 dakika santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiştir.
- Her tüpe 500 µl Buffer BD eklenerek spin tüplerinin kapakları kapatılmış, 15 dakika 15–25 °C oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında son hızda 1 dk. santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek spin tüpleri tekrar yerleştirilmiştir.
- Her tüpe 500 µl Buffer BW eklenerek son hızda 1 dakika santrifüj edilmiş, toplama tüplerine süzülen atık dökülerek işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Spin tüpleri yeni toplama tüplerine yerleştirilmiş, son hızda 1 dakika santrifüj edilerek kalan sıvılar tamamen uzaklaştırılmaya çalışılmıştır.
- Spin tüpleri tekrar temiz ependorf tüplerine alınmış, spin tüplerinin ortasında bulunan membrana 40 µl Buffer EB eklenerek 15 000g (12 000rpm) hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşama sonunda ependorf tüplerinde bisüfit modifikasyon işlemi gerçekleşmiş olan pürifiye DNA ürünü toplanmıştır.
- Son aşamada spin tüplere iki kere 40 µl EB buffer eklenerek 80 µl toplam hacimli dönüştürülmüş ürün elde edilmiştir. Her örneğe iki kere bisüfit modifikasyon işlemi uygulanarak toplam 160 µl ürünle HRM metilasyon aşamasına geçilmiştir.

- HRM aşamasında kullanılacak olan pozitif/metile kontrol örneği CpGenome™ Universal Methylated DNA (Millipore-Chemicon® International) ve negatif/unmetile kontrol örneği CpGenome™ Universal Unmethylated DNA (Millipore-Chemicon® International) bu aşamada modifiye edilmiştir.

3.2.4. Modifiye Örneklerin MS-HRM Analizine Hazırlanması

Bu aşamadaki işlemler LightCycler® 480 real time PCR (Roche) cihazında uygulanmıştır. Cihazla uyumlu olan ‘‘LightCycler® 480 High Resolution Melting Master ‘‘ kiti kullanılarak PCR amplifikasyonu ve yüksek rezolüsyonlu erime analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda metilasyon paterni değerlendirilen RARβ primer dizileri aşağıda verilmiştir.

RARβ promotor bölgesi için primer



RARβ promotor metilasyonu analizi için bisülfid modifikasyonu tamamlanmış DNA örneklerinden LightCycler Probe Master Mix kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde karışım hazırlanmıştır.

Su, PCR-grade (vial 2)	3 µl
Primer-probe mix 10× conc.	2 µl
LightCycler® 480 Probes Master, 2× conc. (vial 1)	10 µl
<hr/>	
Toplam	15 µl

LightCycler Probe Master Mix kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde reaksiyon programı real-time PCR cihazına girilmiştir.

3.3. Elde Edilen DNA'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Çoğaltılması

IDH2 geninin promotor bölgesini çoğaltmak için uygulanan PZR reaksiyonları, 50 µl toplam hacimde, 3 µl DNA örneği kullanılarak ve aşağıda belirtilen PZR karışımı hazırlanarak gerçekleştirilmiştir:

Kalıp DNA	4 µl
10x reaksiyon tamponu	5 µl
2.5 mM dNTP	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
İleri primer	1 µl (10 pmol)
Ters primer	1 µl (10 pmol)
sdH ₂ O	30.4 µl
Taq DNA polimeraz	0.6 µl (3 ünite)
<hr/>	
Toplam :	50 µl PZR reaksiyon karışımı

Hazırlanan örnekler DNA çift zincirinin açılması, olası proteaz kontaminasyonunun önlenmesi ve ekzonükleaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için

95°C`de 7 dakika denatüre edilmiştir. Daha sonra sıcaklık, kullanılan primer çiftleri için uygun programlama yapılarak gerçekleştirilmiştir:

94 °C	45 saniye	} 35 döngü
60 °C	45 saniye	
72 °C	45 saniye	

En son basamakta 72 °C de 10 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

IDH2 Ekson 4 Primeri

F1- 5'-CTGCCTCTTTGTGGCCTAAG-3'

R1- 5'-ATTCTGGTTGAAAGATGGCG-3'

3.3.1. 20x TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması;

121 gr Tris (1M), 61.7 gr borik asit (1M) ve 7.44 gr EDTA(20mM) tartılarak, 1000 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımı ile çözündürülmüştür. Bu stok solusyondan 50 ml'lik kısım 950 ml distile su ile karıştırılarak 1xTBE tamponu hazırlanmıştır.

3.3.2. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile İncelenmesi

- PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonunun başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir.

- 6 gram agaroz tartılıp bir beher içinde 1xTBE solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında %100 lük güçten %10 luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak berrak bir görüntü elde edilene kadar kaynatılmıştır.

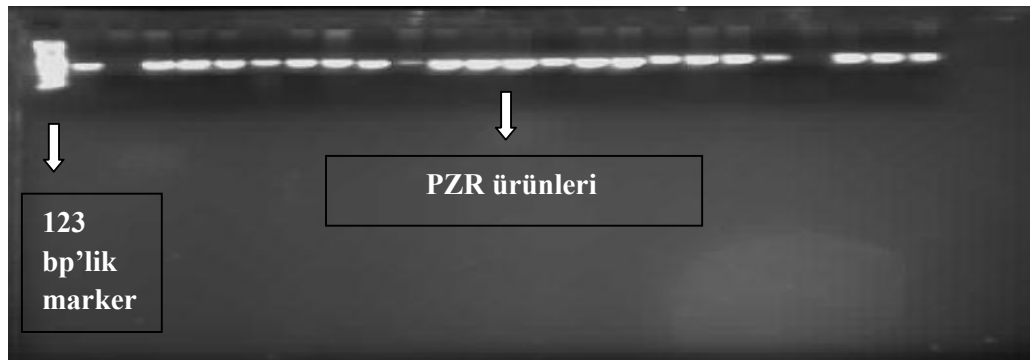
- Agaroz jel, 0.5 µg/ml olacak şekilde hazırlanan etidyum bromür çözeltisi ilave edilmiştir (15µl).

- DNA yükleme kuyucukları oluşturmak amacıyla elektroforez jel dökme tablasına tarak yerleştirilip, çözelti yaklaşık 50-60°C`ye kadar soğutulduktan sonra jel tablasına dökülmüştür.

- 30 dakika jelin polimerleşmesi için beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra üzerine, iyon hareketini sağlamak için kullanılan 1xTBE (Tris-Borik asit- EDTA) tamponu ilave edilmiştir.

- Amplifikasyon ürünlerinden alınan 6 µl DNA örneği, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir ve 75 V` luk elektrik akımı verilmiştir.

- Yükleme tamponunda bulunan brom-fenol mavisi boya yaklaşık 5-10 cm ilerledikten sonra, elektroforez işlemi durdurulmuştur. Boyanan jel, UV lambası altında gözlemlenerek, reaksiyon sonucu oluşan PZR bantları incelenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: IDH2 ekson 4 bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.3.3. PZR Ürününün Saflaştırılması

- PZR ürününden 5 µl alınarak ayrı PZR tüpleri (strip) içine konulmuştur. Üzerine 2 µl ExoSAP- IT eklenmiştir.

- Toplam miktarı 7 µl olan karışım thermal cycler cihazında

- 37°C → 15 dakika
- 80°C → 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

- Süre sonunda saflaştırılan ürünler cycle-sequencing için uygun duruma gelmiştir.

3.3.4. PZR Sonrası Saflaştırılan Ürünlerin Otomatik DNA Dizi Analizine Hazır Hale Getirilmesi

Bu tez çalışmasında, amplifiye olmuş ürünlerin DNA dizi analizi ABI 3130 Genetic Analyzer cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ABI Dizi Analizi Yazılımı yardımıyla incelenmiştir.

Daha önceden PZR temizleme kiti kullanılarak saflaştırılmış olan amplifikasyon ürünlerinin otomatik DNA dizi analizi reaksiyonu, BigDye® Terminator V3.1 DNA Dizi analizi kitinin kullanma yöntemi doğrultusunda aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır:

Sekans Karışımı:

Big Dye® reaksiyon karışımı:	4µl
Primer (10 pmol/µl):	1µl
PZR ürünü:	2µl
sdH2O:	3µl

Toplam: 10µl

BigDye® Cycle Sequencing ABI 9700 PZR Reaksiyon Programı:

96°C	10 saniye	} 35 döngü
50°C	5 saniye	
60°C	4dakika	

3.3.5. Sekans Reaksiyonu Sonrası Pürifikasyon

Sekans reaksiyonunun otomatik sekans aletinin kapiler elektroforez sisteminde yürütülmesinden önce son bir saflaştırma işlemi daha yapılmaktadır. Sekans sonrası saflaştırma işlemi, aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir:

Thermal cyler içinden çıkan örnekler Dyex protokolüne tabi tutulmuştur.

1. Dyex tüplerinin kapakları 45°C açılarak hafifçe vorteks yapılır ve altındaki emniyet çubuğu kırılarak toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
2. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek numaralandırılmış ependorflara aktarılmıştır.

3. Dyex tüplerinin kapakları açılarak üzerine cycle sequencing ürünlerinin tamamı jeli delmeyecek şekilde dyex tüplerine aktarılmıştır.
4. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek ependorfta toplanan örnekler ABI 3130 cihaz tüplerine aktarılır ve cihaza yüklenmiştir.
5. Program sonunda sekans analiz programı kullanılarak olgu örneklerine ait dizi analizi pikleri görüntülenmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Genetik değişimler (mutasyon), epigenetik değişimler (metilasyon) ve hasta yaşı arasındaki ilişki Ki-kare testi / kullanılarak değerlendirilmiştir. Hasta sağkalımları Kaplan- Meier istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak alındı. Analizler "Statistical Package for the Social Services" (SPSS) yazılım programına taşınarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı tarafından opere edilen ve histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı alan, takibinde IDH1 gen mutasyon ve MGMT metilasyon analizleri tamamlanan 40 olgunun tümör örnekleri çalışmaya alınmıştır. Robot aracılığıyla elde edilen DNA örneklerinden RAR β promotor metilasyonu MS-HRM ile ve IDH2 gen mutasyonu ise dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri, histopatolojik bilgileri, kemoterapi yanıtları hasta dosyalarından ve Nöroşirürji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

Çalışmamızda RAR β geni promotor metilasyonu MS-HRM yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada Real-time PCR Sistemine (LightCycler 480 Roche) yüklenen örnekler, analiz sonrasında “Tm Calling”, Gene Scanning” ve “Difference plot” veri tabanlarıyla karşılaştırılmışlardır. Tüm örnekler için her üç veri tabanında da benzer bulgulara ulaşılmıştır. Verilerin sunulmasında Tm calling veri tabanı temel alınmıştır. Bu analiz yönteminde normalize erime profilleri direkt olarak karşılaştırılmakta, olgulara ilişkin örneklerdeki DNA metilasyon düzeyi, metile/unmetile oranı bilinen standartların erime profillerine benzerliklerine göre değerlendirilmektedir. Bu algorithmada olgulara ilişkin PZR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri ile metile olmayanın metile olana oranının bilindiği kontrol PZR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen metile ve unmetile kontrol DNA pikleri, hasta DNA örneklerinin pikleri ile karşılaştırılarak her örneğin metilasyon paterni belirlenmiştir. Bu değerlendirmede kullanılan kontrol gruplarına ve hasta gruplarına ait yazılım grafikleri aşağıda verilmiştir.

Dizi analizi için hastaların taze doku örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde IDH2 mutasyonu ABI Prizm 3130 ile çalışılmıştır. Analiz sonrasında elde edilen sonuçlar BioEdit v5 ile değerlendirilmiştir.

4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri:

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 14'ü kadın, 26'sı erkek olup, kadınların yaş ortalaması $51,71 \pm 3,98$, erkeklerin yaş ortalaması da $58,07 \pm 2,71$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.1.)

4.2. Araştırma Grubu Bireylerin MS-HRM Bulguları:

Glioblastoma Multiformeli 40 olgunun 24 tanesinde (% 60) farklı kantitatif oranlarda RAR β metilasyonu saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). RAR β metilasyonunun hasta yaşı ve cinsiyeti dikkate alınarak T-testi ve ki-kare testi ile değerlendirilmesi sonucu anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($p=0.329$, $p=0.099$). Çalışma grubu örneklerinin tümünün derece IV tipi tümör örnekleri olması nedeniyle de istatistiksel olarak bu parametre değerlendirmeye dahil edilmemiştir.

Tablo 4.1 : GBM beyin tümörlü olguların cinsiyet, yaş, metilasyon ve mutasyon tarama sonuçları

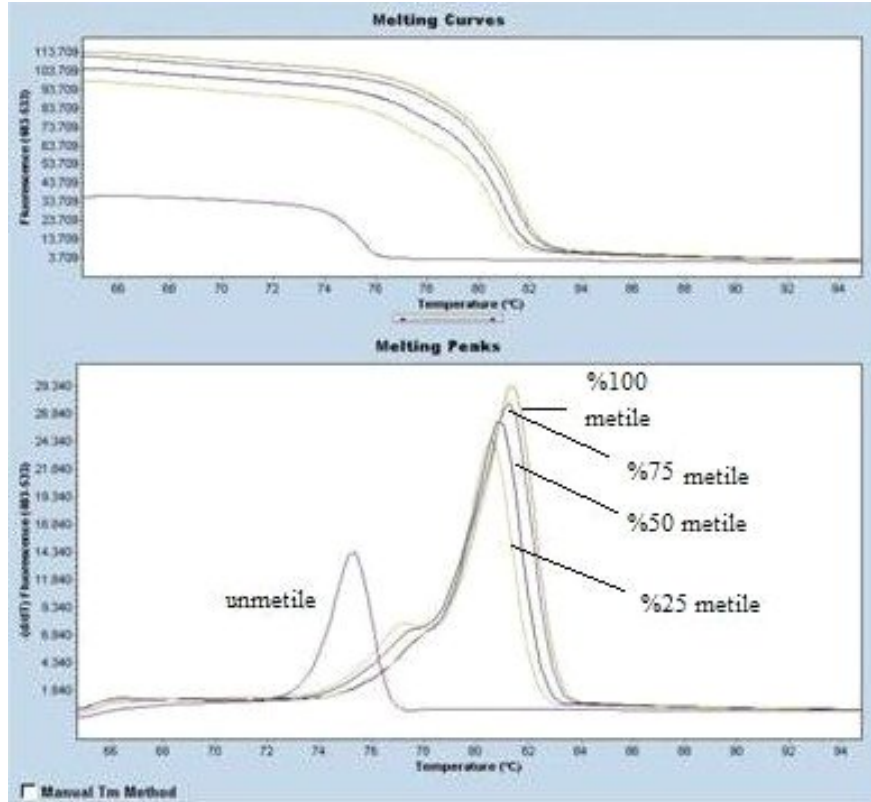
Hasta no.	Cinsiyet	Yaş	MS-HRM Analizi		Mutasyon	
			MGMT*	-RAR β	IDH1*	IDH2
2	E	56	-	-	-	-
3	E	71	-	-	-	-
4	E	51	-	+	-	-
5	E	40	-	+	-	-
6	K	52	-	-	-	-
7	E	64	+	-	-	-
8	E	21	-	+	+	-
9	E	40	+	-	-	-
10	E	48	-	+	+	-
11	E	54	-	-	-	-
12	E	75	-	-	-	-
13	K	59	+	+	-	-
14	E	50	-	-	-	-
16	E	85	+	-	-	-
17	E	77	-	-	-	-
18	E	56	+	+	-	-
19	E	74	-	-	-	-
20	E	59	+	+	-	-
22	E	65	-	+	-	-
23	K	14	-	+	-	-
24	E	63	-	-	-	-
25	E	59	+	+	-	-
27	K	58	-	+	-	-
28	E	67	-	+	-	-
29	K	51	+	-	-	-
30	E	43	-	+	+	-
31	K	46	+	+	+	-
32	K	61	-	+	-	-
33	K	74	+	+	-	-
34	E	50	-	+	-	-
35	K	73	-	+	-	-
36	E	66	+	+	-	-
38	K	58	+	-	-	-
39	K	38	+	-	-	-
40	K	48	-	+	-	-
41	E	54	-	+	-	-
42	E	55	-	-	-	-
43	K	47	-	+	+	-
44	E	63	-	+	-	-
45	K	45	-	+	-	-

(*: GBM

olgularında IDH1 mutasyonu ve MGMT metilasyonunun araştırılması adlı çalışma sonuçları)

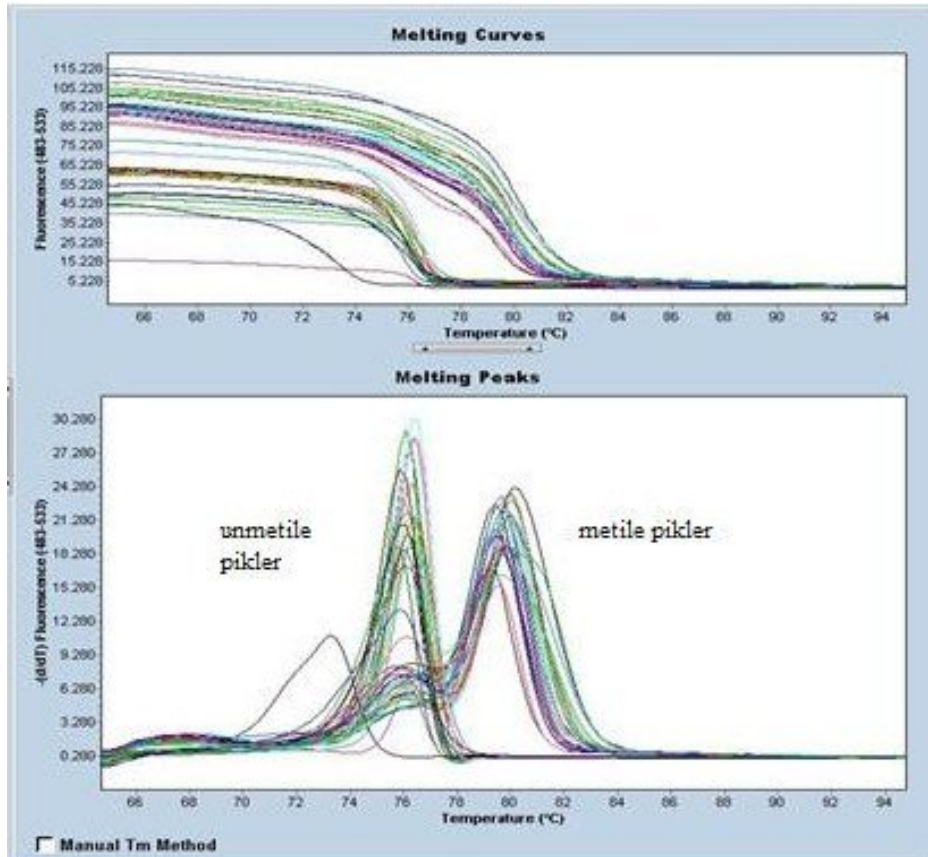
Tablo 4.2: Çalışma grubumuzun RAR β geni metilasyon oranları

RAR β Metilasyonu			
Metile Hasta (n)	Unmetile Hasta(n)	Toplam Hasta (n)	Metilasyon (%)
24	16	40	60



Şekil 4.1: HRM unmetile kontrol DNA ve metile kontrol DNA pikleri

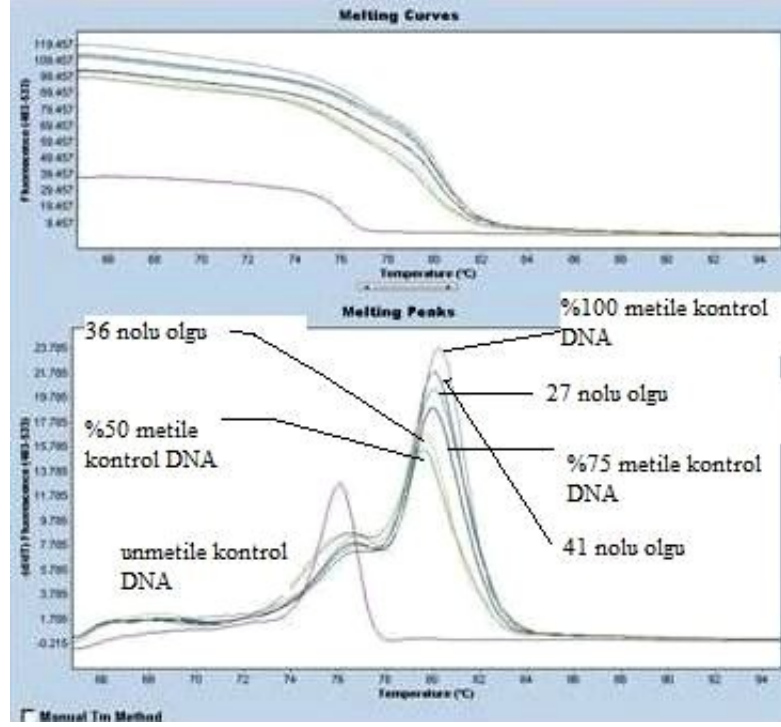
Pozitif/metile kontrol, negatif/unmetile kontrol örnekleri ve bunların %75, %50, %25 ara değer örneklerinin floresan piklerine göre erime eğrileri şekil 4.1 'de verilmiştir. Düşük erime sıcaklığı urasil nükleotidlerine çevrilmiş olan unmetile sitozin nükleotidleri içeren örnekleri ifade ederken yüksek erime sıcaklığı metile sitozin nükleotidlerini göstermektedir. Metilasyon oranlarına göre ısılarda da göreceli farklılıklar gözlenmektedir.



Şekil 4.2: RAR β geni için hasta grubunun metile ve unmetile pikleri (unmetile ve metile olgu gruplarına ait farklı Tm derecelerinde alınan pikler görülmektedir.)

Unmetile örnekler için ~ 76 °C, metile örnekler için ~ 81 °C olarak belirlenmiştir. Örnek DNA'larının erime ısıları verileri metile/pozitif ve unmetile/negatif kontrollerin ısı verileri ile "Tm calling" yazılım programına göre değerlendirilmiştir. Bu algoritmada örneklerin erime profilleri metilli veya unmetilli olarak farklılık göstermektedir. Metilli

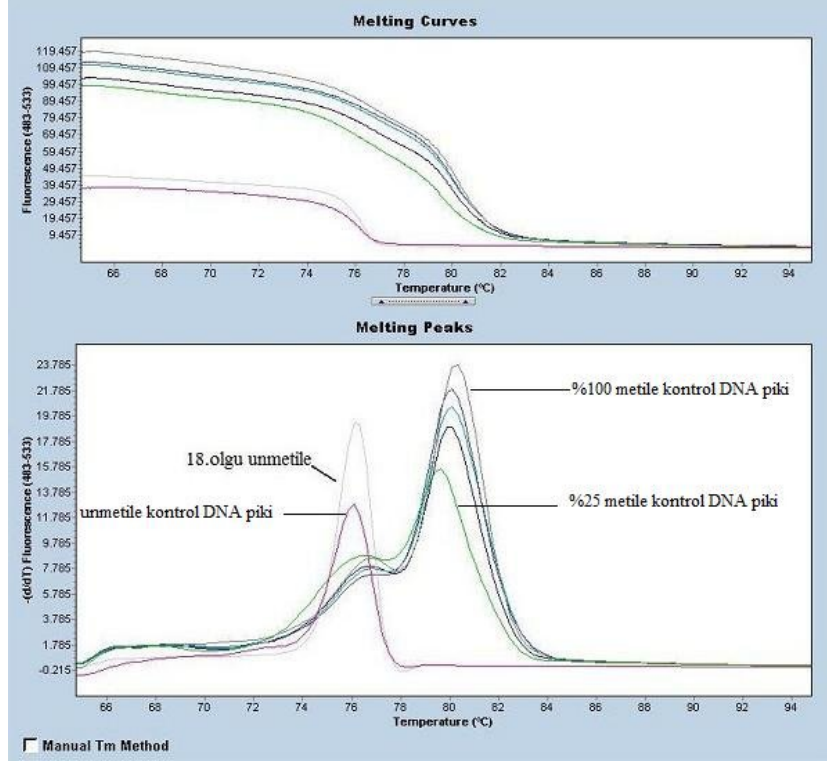
DNA'dan amplifiye olan ürünler amplikonda bulunan CpG dizileri nedeniyle daha yüksek Tm derecesine sahiptirler. Metilli olmayan sitozin nükleotidleri bisülfid modifikasyonu ile urasil nükleotidlerine dönüştürüldükleri için Tm dereceleri daha düşüktür (Şekil 4.2) .



Şekil 4.3: 27, 36, 41 numaralı olguların metilasyon derecelerine göre (%50, %75, %100) metile kontrol DNA'lar ile uyumlu RAR β pik görüntüsü

Tm=81,5°C 'de %100 metile kontrol DNA'ya ait amplifikasyon piki ile uyumlu gösteren 27.olguya ait amplifikasyon piki görülmektedir. Olgu %100 metile olarak değerlendirmeye alınmıştır. Tm= ~81°C 'de %75 metile kontrol DNA'ya ait amplifikasyon piki ile uyum gösteren 41.olguya ait amplifikasyon piki görülmektedir. Olgu %75 metile olarak değerlendirilmiştir. Tm= ~80°C 'de %50 metile kontrol DNA

ile uyum gösteren 36. Olguya ait amplifikasyon piki görülmektedir. Olgu %50 metile olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).

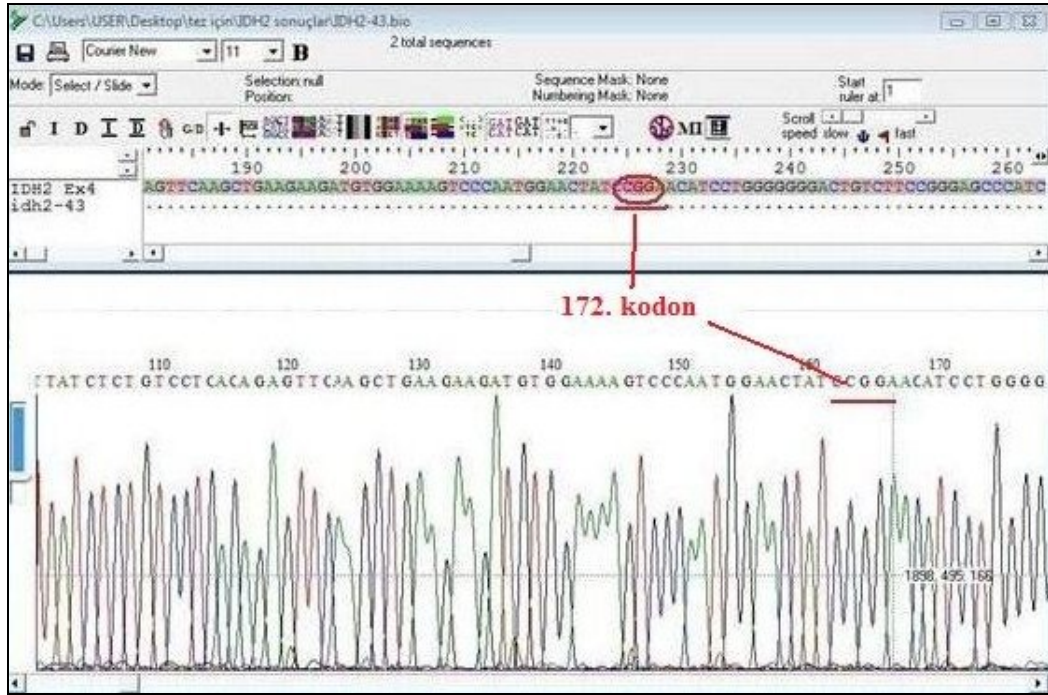


Şekil 4.4: 18.olgunun unmetile kontrol DNA ile uyumlu olan unmetile RAR β pik görüntüsü (T_m = ~76 °C de unmetile kontrol DNA ile çakışan 18. olguya ait amplifikasyon piki görülmektedir)

Tümör örneklerinden 24 tanesinin metilasyon oranlarına göre yaptığımız değerlendirmede örneklerin 3 tanesi % 25 metile, 5 tanesi % 50 metile, 4 tanesi % 75 metile ve 12 olgu % 100 oranında RAR β geni hipermetilasyonu göstermişlerdir. Örneklerin tümü GBM olduğu için metilasyon oranları ve tümör derecesi ile bağlantısı irdelenememiştir. Ancak metilasyon oranları ile olgu sağkalım süreleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca olguların MGMT ve RAR β metilasyon durumları ile sağ kalım süre karşılaştırılmaları da gerçekleştirilmiş ve bulgular Bölüm 4.5’de verilmiştir.

4.3. Araştırma Grubu Bireylerin Dizi-Analizi Bulguları:

IDH2 geni mutasyonlarının ekzon 4 de yerleşmesi nedeniyle çalışmamızda GBM tanılı 40 olgunun tümör örneklerinde bu genin ekzon 4 genomik dizisinin mutasyon taraması DNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar NCBI insan genomik dizisi veri tabanı ile karşılaştırılmış ve BioEdit v5 yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu çalışma grubu doku örneklerinde herhangi bir polimorfizm veya mutasyon saptanmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: 43 numaralı olgunun mutasyon saptanmayan IDH2 ekzon 4 de 172.kodon dizisi

4.4. Araştırma Grubu Bireylerinin IDH2 Gen Mutasyonu Durumuna Göre Sağ Kalım Sürelerinin İstatistiksel Analizi

Olguların sağ kalım süreleri hastalara ait bilgilerin bulunduğu hasta dosyalarından temin edilmiştir. İstatistiksel analiz için Kaplan-Meier testi kullanılmıştır.

Çalışma grubumuzda IDH2 geni için mutasyon saptanmamıştır. Tüm olgularımızın sağkalım süre ortalaması ~17 ay olarak belirlenmiştir.

4.5. Araştırma Grubu Bireylerinin RAR β Gen Metilasyonu (+/-) Durumuna Göre Sağ Kalım Sürelerinin İstatistiksel Analizi

IDH1 mutasyonu ve MGMT metilasyonu değerlendirmesi yapılmış 40 hastada % 60 oranında RAR β metilasyonu saptanmıştır. RAR β metilasyonu saptanan olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, metile olmayan olguların ise 15 ay olarak hesaplanmıştır. (Tablo 4.3). Olguların MGMT ve RAR β metilasyon durumlarına göre de sağ kalım süreleri hesaplanmış ve gruplar birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Olgu grubumuzun RAR β ve MGMT genleri metilasyon oranlarına göre ortalama sağ kalım süreleri

	Sağkalım süresi (ay)
Metile RAR β (n=24)	19
Unmetile RAR β (n= 16)	15
Metile RAR β +Metile MGMT* (n=7)	14
Unmetile RAR β + Unmetile MGMT* (n=11)	10

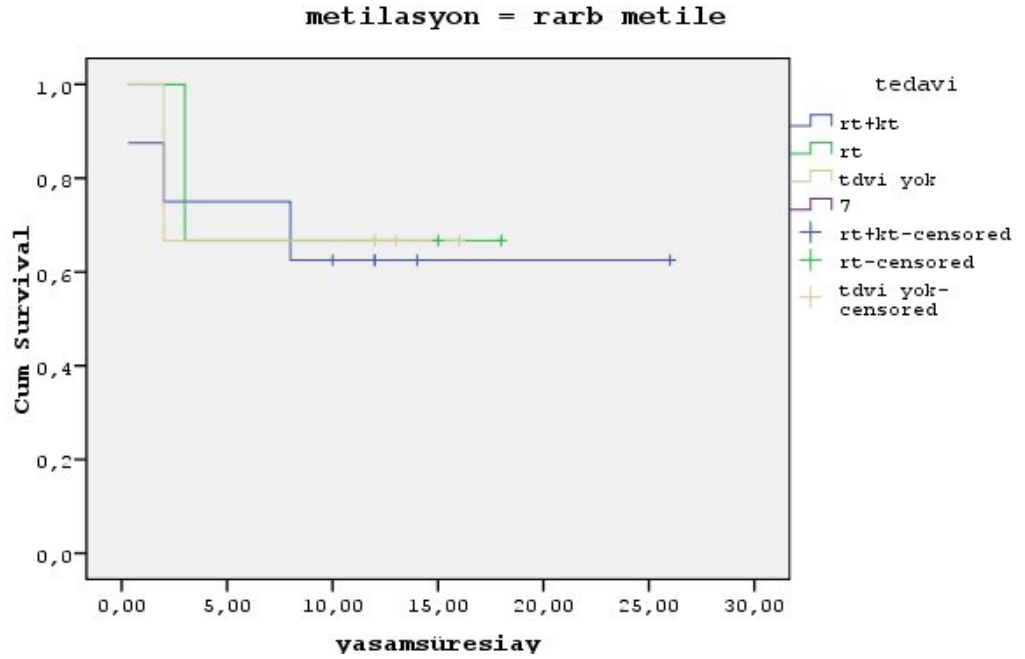
(*: GBM olgularında IDH1 mutasyonu ve MGMT metilasyonunun araştırılması adlı çalışma sonuçları)

Çalışma olgularımızdan 28 olgu tedavi almış, geri kalan 12 olgunun hasta dosyalarında herhangi bir tedavi protokolu belirtilmemiştir. Tedavi alan olgulardan bir tanesi sadece kemoterapi, 9 olgu sadece radyoterapi, geriye kalan 17 olgu radyoterapi

ve kemoterapiyi birlikte almışlardır. Tedavi alan ve almayan olgular RAR β ve MGMT metilasyon paternlerine göre sağ kalım süreleri açısından karşılaştırılmışlardır.

İstatiksel olarak tedavi alan olgular değerlendirildiğinde kemoterapi ve radyoterapiyi birlikte alan olgular 25 aylık bir sağkalım grafiği çizmiştir. Sadece radyoterapi alan olgular ya da hiçbir tedavi protokolü uygulanmayan olgularda ise 15-20 aylık sağ kalım gözlenmiştir ki aralarında belirgin bir farklılık vardır (Tablo 4.4).

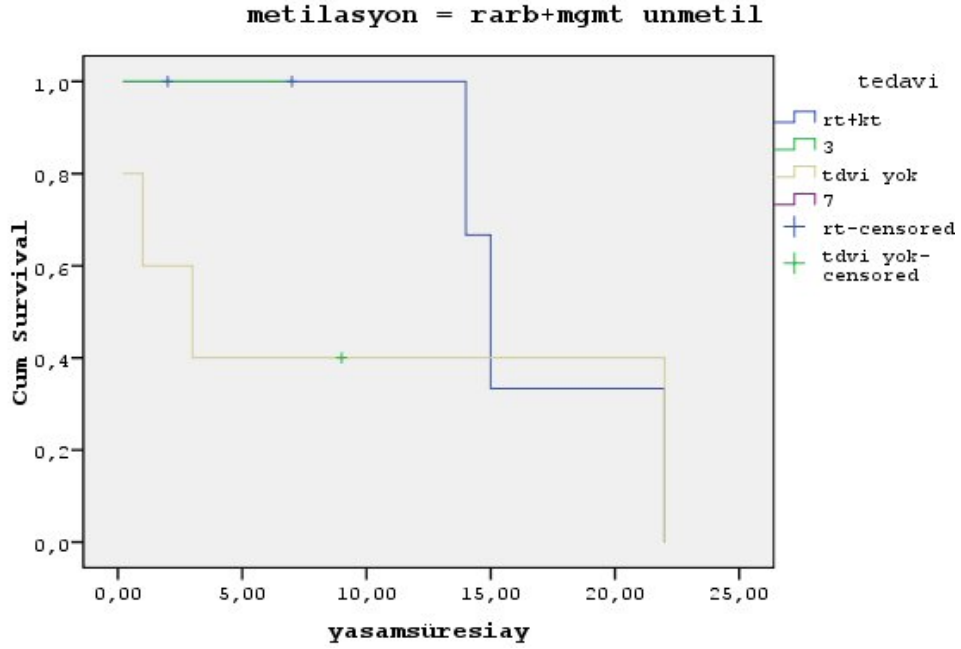
Tablo 4.4: RAR β gen metilasyonu gözlenen olguların uygulanan tedavi ile birlikte sağkalım sürelerinin değerlendirildiği istatistiksel analizi



RAR β unmetile olan olgular, MGMT ve RAR β genlerinin birlikte metile olduğu olgular için istatistiksel değerlendirme, hasta sayısı azlığı nedeniyle yapılamamıştır.

MGMT ve RAR β genlerinin metile olmadığı tedavi alan olguları sağ kalım süreleri açısından değerlendirdiğimizde 22 aylık bir sağkalım süresi gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: unmetile RAR β ve unmetile MGMT gözlenen olguların uygulanan tedavi ile birlikte sağkalım sürelerinin değerlendirildiği istatistiksel analizi



Her 2 genin unmetile olarak bulunduğu olgularda radyoterapi ve kemoterapi alan olgular ya da her 2 tedavi protokolu uygulanmamış olgular arasında yaşam süresi olarak farklılık tespit edilmemiştir.

4.5.1. Kantitatif Metilasyon Ortalamaları

Çalışmada MS-HRM yöntemini kullanırken plate kuyucuklarına hasta gruplarının örnekleriyle birlikte kantitatif olarak metilasyon durumlarını bildiğimiz pozitif/metile kontrol örneği CpGenome™ Universal Methylated DNA (Millipore-

Chemicon ® International) ile negatif/unmetile kontrol örneği CpGenome™ Universal Unmethylated DNA (Millipore-Chemicon ® International) ve bunların seyreltilmesi ile elde edilen %25, %50 ve %75 ara değerleri de yüklenmiştir. LightCycler ® 480 Real Time PCR (Roche) cihazının yazılım programları (Tm Calling, Gene Scanning ve Difference plot) aracılığıyla kontrol örnekleri baz alınarak tüm çalışma gruplarının kantitatif metilasyon değerlerinin ortalaması alınmıştır.

4.5.2. Kantitatif Metilasyon Değerlerine Göre Sağkalım Sürelerinin İstatistiksel Analizi

Çalışmamızda olgu grubumuzun RARβ geni kantitatif metilasyon oranlarına (unmetile, %25, %50, %75, %100 oranında metile) göre sağkalım süreleri Kaplan-Meier testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Olgu sayılarının azlığı nedeniyle örnekler unmetile, < % 50 metile ve > % 50 metile olarak üç gruba ayrılarak karşılaştırılmışlardır. Yapılan değerlendirmede olguların sağ kalım süreleri açısından %50 nin altı ve üstü metilasyona sahip gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Olgu grubumuzun metilasyon oranlarına göre sağkalım tablosu

	Unmetile	%25 ve % 50 Metile	% 75 Metile	% 100 Metile
Olgu Sayısı	16	8	4	12
Ortalama Sağkalım Süresi (ay)	15	20	16	16
İstatistiksel Anlamlılık	p>0,005			

6. TARTIŞMA

Gliomalar sinir destek dokusunun değişimi ile oluşan, fenotipik olarak karmaşık yapıları ve “standart olmayan” tedavi biçimleri ile etkiledikleri hasta grubunda seyir şeklinin halen karanlıkta kaldığı bir tümör grubudur. Tüm tümörlerin % 1-2’sini ve tüm intrakranial tümörlerin % 40-45’ini oluştururlar ve en ölümcül, morbiditesi en fazla olan grupturlar. Gliomaların iki ayrı yolakla geliştiği bilinmektedir. Primer GBM’da malignitede en ileri evre, tümörün doğrudan doğruya teşhis edildiği, 50-60 yaşlarındaki hastaların bulunduğu grup olarak tanımlanmaktadır. Sağkalım süresi aylarla ifade edilebilecek kadar düşüktür. Sekonder GBM ise düşük dereceli olarak daha genç yaş grubunda saptanabilmekte ve derece ilerleyerek gelişmektedir. Derece ilerleme süreleri içinde önceki gruba göre tedavi yöntemi konusunda fikir birliği bulunmayan bu ikinci gruptaki tümörlerde belirlenen moleküler değişimler, tedavi yönteminin seçimi ve sağ kalımın uzatılabilmesi için yol göstereceklerdir (38,54,61).

6.1. Glioblastoma Örneklerinde RARβ Gen Hipermetilasyonunun Olguların Klinik Özellikleri ile İlişkisi

CpG adalarının anormal metillenmesi kanser dokusunda çeşitli tümör baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesi açısından genlerde fonksiyon kaybıyla sonuçlanan mutasyonlara ve delesyonlara alternatif bir mekanizmadır.

DNA metilasyonu MS-PZR veya sodium bisülfid dizileme yöntemleri ve benzer birçok yöntemle araştırılabilmektedir. MS-HRM de hızlı ve kolay bir yöntem olması, ayrıca unmetile DNA örneği içerisindeki % 0,1 oranındaki metile DNA’yı tespit edebilmesi açısından hassas bir yöntemdir (48).

Çalışmamızda tüm GBM doku örneklerinde MS-HRM tekniği ile başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Diğer bir metilasyon yöntemi olan ve diğer çalışmalarda uyguladığımız MS-PZR yöntemine göre zaman, kolaylık, güvenilirlik açısından karşılaştırıldığında,

MS-HRM yönteminin rutin analizlerde, taramalarda kullanımının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızın bulgular bölümünde de belirtildiği gibi, GBM tanısı almış 40 olguya ilişkin IDH1 gen mutasyonu ile MGMT gen metilasyon analizleri tamamlanmış tümör doku örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklerde son yıllarda farklı kanser türlerinde yoğun olarak incelenen RAR β geni metilasyon paternlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. RAR β geni promotor metilasyonu akciğer kanseri, gastrik kanser, prostat kanseri ve hematolojik neoplazmlar olmak üzere birçok kanser tipinde incelenmiştir. Ancak literatür değerlendirmesinde RAR β geni hipermetilasyonunun gliomagenез üzerinde etkisi olduğu savunulmakla birlikte RAR β promotor metilasyonunun GBM örneklerindeki durumunu değerlendiren sadece bir asosiyasyon çalışmasına rastlanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen bulgular sadece ilgili araştırma verileri ile karşılaştırılacaktır. Dolayısıyla verilerimiz tartışmaya açıktır. Diğer taraftan, çalışma GBM olgularında RAR β hipermetilasyon sıklığı ve GBM arasındaki ilişkiyi araştıran Türkiye'deki ilk çalışma olma özelliğini de taşımaktadır.

Piperi ve arkadaşları tümör ilişkili dört (VEGF, COX-2, IL-6, IL-8) genin 23 glioma örneğinde metilasyon durumunu analiz etmişler ve inflamasyon, anjiyogenik araçlar ile bağlantılı olarak klinik sonuçlarını araştırmışlardır. Altı tane derece II ve 17 tane derece IV GBM örneğinde RAR β ve MGMT metilasyon oranlarını sırasıyla %58,8 ve %70,58 olarak bildirmişlerdir. Tümör evresi, nekroz derecesi ile RAR β ve MGMT metilasyon oranı arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirilmişlerdir (57). Araştırmacıların değerlendirdiği örneklerden sadece derece IV GBM olguları arasında ise metilasyon oranı % 42 dolaylarındadır. Bizim çalışmamızda saptadığımız % 60 hipermetilasyon örneği, Piperi ve ark.nın oranından daha yüksektir. Ancak bu farklılığın temelinde metodolojik farklılıkların yattığını düşünüyoruz. Araştırmacılar yöntem olarak MS-PZR yöntemini kullanmışlardır ki düşük orandaki metilasyonları saptama konusunda çalışmamızda kullandığımız MS-HRM'in daha sensitif olduğu bilinmektedir (7,57). Diğer taraftan olgu sayısı da insidans değerlendirmesinde etkili olabilir

Diğer taraftan Piperi ve ark.'nın hasta grubunda erken evre glioblastomlu 6 olgunun tümünde de RAR β metilasyonu saptandığı ifade edilmiştir. Bu da RAR β gen metilasyonunun karsinogenez sürecinin erken evrelerinde rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmamızda sadece GBM olgularında değerlendirme yapıldığı için bu yönde bir verimiz bulunmamaktadır.

RAR β geninin DNA metilasyonu ile sessizleşmesi ilk olarak Cote ve ark.ları tarafından kolon kanserlerinde bildirilmiş ve daha sonra bu genin pek çok farklı kanser tipinde de hipermetilasyon aracılığıyla sessizleştiği doğrulanmıştır (14). RAR β nükleer transkripsiyonel düzenleyicilerin tiroid-steroid hormon reseptör ailesi üyesidir. Vitamin A'nın biyolojik olarak aktif formu olan retinoik asite bağlanır ve embriyonik morfogenez, hücre büyüme ve farklılaşmasında selüler sinyal iletiminde görev alan bir tümör baskılayıcı gendir. RAR β transkriptinin dağılımının fare sinir sistemi gelişimi sırasında belirli olaylarla bağlantısının çok anlamlı olduğu, çocukluk çağı intrakraniyel ependimomların gelişimi ile koroid pleksus tümörlerinde metilli olduğu belirtilmiştir (57).

Olasz ve ark.'nın baş boyun kanserlerinde yaptıkları çalışmada RAR β geninin metilasyon, allelik kayıp ve ekspresyon açısından değerlendirdikleri çalışmalarında RAR β hipermetilasyonu ile ekspresyon azalması arasında ileri düzeyde korelasyon olduğunu, buna karşılık RAR β lokusu 3p24'ün allelik kaybının (%45.2) mRNA düzeyini çok etkilemediğini bildirmişlerdir (55). Gen ekspresyonu ile RAR β allelik kaybı arasında korelasyonun olmaması meme karsinomunda ve özafagus kanserlerinde de bildirilmiştir. RAR β 'nin TBG olduğu dikkate alındığında normal olan ikinci allelin retinoidler tarafından uyarıldığını söyleyebiliriz. Ancak, RAR β metilasyonunun artması ile gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde azalması, RAR β baskılanmasında metilasyonun esas rolü üstlendiğini göstermektedir. RAR β ekspresyon kaybının karsinogenezin erken döneminde gelişmesi LOH ve hipermetilasyon olaylarının erken dönemde olduğunu göstermektedir. Olasz ve ark.ları bu genin metilasyon patern analizinin erken kanser

tanısı için belirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir (55). Glial hücrelerde bu yönde çalışma bulunmamaktadır. Ancak Piperi ve ark.nın hasta serilerinde derece II tümör örneklerinde %100 oranında metilasyon saptanması (57), acaba glioblastomlar için de bir erken tanı markerı olabilir mi sorusunu akla getirmektedir. Bu yönde çalışmaların gerçekleştirilmesi gerektiğine inanıyoruz.

Diğer taraftan, retinoik asit yanıtında aracı olduğu için RAR β kemoterapi için de bir marker olabilir. Retinoidlere olan rezistans kemoterapi için önemli olabilir. Çünkü promoter hipermetilasyonu RAR β baskılanmasının temel nedenidir ve retinoidlere dirençte hipermetilasyon etkili olabilir. Baş boyun ve meme kanserlerinde belirtilen bu yararların glioblastomlarda da detaylı olarak incelenmesi gerekir.

Çalışma grubumuzun sağkalım oranlarının analizi Kaplan-Meier testi ile gerçekleştirilmiştir. Metilasyon gözlenen olgular ile metilasyon tespit edilmemiş olguların sağkalım süreleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Metilasyonun olmadığı olgularda ortalama sağkalım süresi 15 ay iken RAR β metilasyonu saptanan olgular için bu süre 19 ay olarak belirlenmiştir. Piperi ve ark.nın çalışmasında da metilasyon gözlenen ve gözlenmeyen olgularda sağkalım süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (57). Metilasyonun yaş ile birlikte arttığı gerçeği doğrultusunda çalışmamızda metilasyon olan ve olmayan olgular yaşları açısından karşılaştırılmışlardır. Metilasyonu pozitif olan olguların yaş ortalaması 52,7 yıl iken metile olmayan olguların yaş ortalaması 60,4 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Tablo 6.1: Çalışmamızdaki RAR β hipermetilasyon bulgularının literatürle karşılaştırılması

Literatürler	Histopatolojik Tanı	Çalışılan Olgu Sayısı	Yöntem	Araştırılan Genler	Sonuç
Piperi C. ve ark.2010	Derece II- Derece IV (GBM)	6 olgu G II 17 olgu GBM	MS-PZR	RAR β +MGMT*	Tüm örneklerde %58,8 RAR β %70,58 MGMT*, GBM olgularında %42 RAR β met
Çalışmamız 2011	Derece IV (GBM)	40	MS-HRM	RAR β	% 60 RAR β met.

(*: GBM olgularında IDH1 mutasyonu ve MGMT metilasyonunun araştırılması adlı çalışma sonuçları)

6.2. Glioblastoma Örneklerinde IDH2 Mutasyonunun Olguların Klinik Özellikleri ile İlişkisi

Histolojik olarak tanıda bir farklılık göstermemesine rağmen, primer ve sekonder GBM birbirlerinden farklı iki hastalık alt grubudur. Farklı genetik lezyonlar ve farklı yolaklar aracılığıyla farklı yaş gruplarındaki hastalar etkilenir. Popülasyon temelli çalışma verilerine göre GBM'lerin >%90 primer GBM'dir ve daha düşük dereceden gelişme, agresif hale gelme gibi bir özelliği yoktur. Primer GBM'ler de novo gelişen tümörlerdir. Daha önce de ifade edildiği gibi yaşlı bireylerde gelişir ve prognoz açısından daha kötü bir karakter gösterir. Bunun aksine sekonder GBM, düşük derece astrositomlardan gelişen, erken yaşta bireyleri tutar ve prognoz açısından primer tümöre göre daha iyi olan tümör tipidir (56).

Spesifik onkogenik değişimlerle GBM bağlantısına rağmen, klinik olarak birbirlerinden çok farklı olan bu iki grubu kesin olarak ayırma olanağı yoktur. Ayrıca, spesifik genetik anomalilerin bilinmesine rağmen farklı yolaklarla gelişen tümörlere etki edecek hedefe yönelik terapi olanağı mümkün olmamaktadır ve bu nedenle başarı oranı düşük kalmaktadır. Standart yaklaşım cerrahi müdahale sonrası oral alkilleyici ajan olan temozolomid ile kemoterapi ve radyoterapidir.

Parsons ve ark. gliomaların tanı ve prognostik alt gruplarını belirlemek, yeni onkojenik değişimlerle yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya konması amacıyla yaptıkları çalışmada 22 GBM örneğinde 20661 geni dizilemişlerdir. Çok sayıda aday genin belirlenmesinin yanı sıra örneklerin % 12 sinde kromozom 2q22 de lokalize olan IDH1 allelik kaybı ortak bulgu olarak bildirilmiştir. IDH1 mutasyonları, R132. konumda histidin veya serin değişiminden kaynaklanan heterozigot mutasyonlardır (56).

IDH mutasyonlarının keşfinden bugüne kadar bu anomalinin insan kanserlerindeki yeri hala gizemini korumaktadır. Zhao ve arkadaşları mutasyonun IDH fonksiyonunu yitirmesine ve mutasyon taşıyan tümörlerde, taşımayanlara göre hipoksia-inducible factor alt ünitesi (HIF-1 α) miktarının daha yüksek seviyede olduğunu belirtmişlerdir (87). Bunun sonucunda bu geni tümör supresör gen olarak değerlendirmişlerdir (38,61,69). Fakat Dang ve arkadaşları tek bir metabolitin (2-hidroksiglutarat) değerinde yükselme saptamışlardır. Elde ettikleri sonuçlar in vivo olarak 2-HG'ın aşırı birikimine katıldığını ve gliomanın malignant progresyonuna neden olduğunu belirtmektedir. Beyinde 2-HG artması sonucu reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) seviyesinde artış olmakta, bu da potansiyel olarak kanser gelişimi riskinde artışa yol açmaktadır. 2-HG, hücreler için toksiktir (Bölüm 2.3.5). Bu yüzden IDH genlerinin onkogen olduğunu savunmaktadırlar (15). “Fonksiyon kaybı” varsayımına karşı sunulan diğer bir bulgu da IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının hemen tümünün missens mutasyon olmaları, enzim substrat bağlanma bölgesindeki birkaç iyi korunmuş arginin rezidülerini etkilemeleridir. Genellikle TBG'lerdeki fonksiyon kayıplarıyla ilgili nonsens, çerçeve kayması ya da gen delesyonları gibi genetik

değişimler ya dikkati çekmeyecek kadar nadir ya da bugüne kadar hiç bildirilmemiş olmasıdır.

IDH geninin IDH1 ve IDH2 olarak iki izoformunun glioblastoma multiformede mutant olarak bulunduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (15,38,59,61,69,86). IDH2 mitokondride lokalizasyon göstermekte olup mutasyonlar sonucu yeni fonksiyon kazanımı ile gliomageneze katkıda buldukları bildirilmiştir. Ancak IDH1-2 mutasyonlarının çoğunlukla sekonder tümörlerde gözleendiği, primer tümörlerde IDH1 mutasyonunun %5, IDH2 mutasyonunun da yok denecek kadar az düzeyde olduğu (% 0,1) bildirilmiştir (22).

Gliomannın WHO derece II-III olmak üzere 2 alt tipinde IDH mutasyonları daha sık gözlenmektedir. Bu bulgular astrosit ve oligodendrosit dönüşümünde, erken evre glioma gelişimi için gözlenen mutasyonlar olduğunu destekler. IDH1-IDH2 mutasyonlarının WHO derece II-III gliomlarda sık görülmesi bu tümör tiplerinden köken alan sekonder GBM olgularında bu mutasyonların daha sık görülmesinin nedenini de ortaya koyar. IDH1-IDH2 mutasyonlarının tek bir amino asit lokalizasyonuna sahip olması bu mutasyon taramasının diagnostik amaçla kullanımını kolaylaştırır. Örneğin IDH mutasyonunun pilositik astrositoma ile diffuz astrositoma ayrımı için yardımcı teknik olarak kullanılabilceğini araştırmacılar bildirmiştir. Çünkü bu tümör tiplerinin histopatolojik kriterlere göre ayrımı zor olabilmektedir (26,38,54,61).

Glioma olgularında IDH2 gen mutasyonu literatürde IDH1'e göre daha nadir gözlenen bir genetik değişimdir. Bu nedenle mutasyonu yakalayabilmek için daha geniş olgu serilerine ihtiyaç vardır.

Christian Hartmann ve arkadaşları sitozolik NADP bağımlı isositrat dehidrogenaz kodlayan IDH1'in somatik mutasyonları astrositoma, oligodendroglioma ve oligo astrositomada (WHO derece II-III) majör olarak gözleendiğini belirtmişlerdir. Bu genin mitokondriyal formu olan IDH2 aynı tip tümörlerde daha az sıklıkla

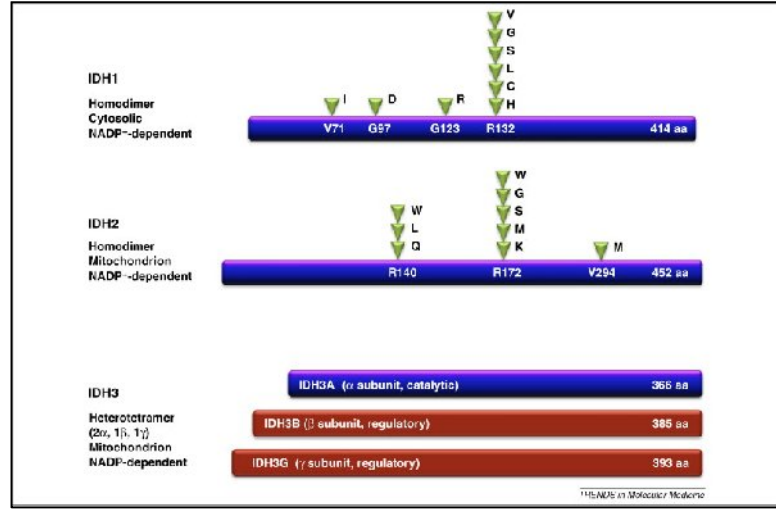
görülmektedir. Elde ettikleri verilere dayanarak anaplastik astrositoma, oligodendroglioma, oligodendroglial astrositoma, hastalarının eğer IDH1-2 mutasyonu taşıyorlarsa, mutasyon taşımayan hastalara göre prognoz olarak daha iyi bir tablo çizdiklerini bildirmişlerdir. Mutasyon sıklığını ve tipini belirlemek için 1010 diffüz glioma ile çalışılmıştır ve 31 IDH2 mutasyonu tespit etmişlerdir (22). Yöntem olarak direkt sekanslama seçilmiştir. Önceki çalışmalardaki veriler IDH2 mutasyonunun IDH1 mutasyonu gözlenmeyen glioma olgularında tespit edildiğini bildirmiştir. Bu nedenle 2 gen birlikte çalışmaya alınmıştır. 712 IDH1 mutasyonu taşıyan hastada wild tip IDH2, 27 IDH2 mutasyonu taşıyan hastada wild tip IDH1 ve 4 tanesinde her ikisinde de mutasyon gözlenmiştir. Bu çalışmada IDH2 mutasyon sıklığı % 3,1 olarak belirlenmiştir. Histoloji ayırımında ise; IDH1 astrositik histoloji ile yakın ilişkili iken IDH2 oligodendroglial tümörlerde yaygındır (22,38,61).

Sonoda Y. ve arkadaşları 125 frozen glial tümör dokusunda DNA dizi analizi yöntemi ile IDH1-IDH2 genlerinin mutasyon taramasını yapmışlardır. Yapılan çalışmada prognostik belirteçler elimine edilerek 125 glioma hastasının dizilemesi yapılmıştır. IDH1 geni için hot spot R132 ve IDH2 için ise ekzon 4 R172 dikkate alınmıştır. WHO derece II-III glioma hastaları ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 125 örneğin 39 tanesinde IDH1 R132H mutasyonu saptanmış ve IDH1'de mutasyon saptanmayan sadece bir anaplastik astrositoma örneğinde IDH2 R172S (AGG>AGT) mutasyonu saptanmıştır. Çalışmada tanı koyulduğu zamandaki hasta yaşı, cinsiyeti, operasyon öncesi Karnofsky performansı skorlaması (KPS) istatistiksel analizde The Mann-Whitney testi kullanılarak elde edilen verilerle ortalama sağ kalım belirlenmiştir (69) . Bu çalışmada tüm glial tümör çeşitleri içinde sadece bir anaplastik astrositoma hastasında IDH2 mutasyonu saptanmıştır (69). Çalışmamızda saptanan IDH2 yabancı tip alleli taşıyan olgulardaki ortalama yaşam süresi Sonoda ve ark.'nın 22 aylık süresi ile çok farklılık göstermemektedir. Ancak bu değerlendirmede hasta grubunun daha az malign tümöre sahip olgular olması, sağkalım süresinin daha uzun olarak belirlenmesini açıklamaktadır.

Raynaud S. ve arkadaşları 48 düşük derece gliomada, 58 primer glioma ve 94 meme kanseri olgusunda yaptıkları çalışmada IDH1 ve IDH2 ekson 4 mutasyon taramasını gerçekleştirmişler ve elde edilen sonuçları hematopoetik hastalıklarla yapılan çalışma verileriyle karşılaştırmışlardır. Yapılan değerlendirmede IDH2 mutasyonu gözlenmemiştir. Hematopoetik hastalıklarla kıyaslandığında IDH2'nin bu grupta, IDH1 mutasyonlarının ise sinir sisteminde daha belirgin olarak gözlendiğini ifade etmişlerdir. 94 meme kanseri örneğinde ise IDH1-2 mutasyonları saptanmamıştır. Bu nedenle IDH2 mutasyonunun hematopoietik hastalıklarla yakın ilişkili olduğu, bununla beraber nadiren gözlenen IDH2 mutasyonlarının da oligodendroglial tümörlerde astrositomalara göre daha belirgin olduğu vurgulanmıştır (59).

Çalışmamızda dizileme sonucu tümör örneklerinde IDH2 gen mutasyonu saptanmamıştır. Bu verimiz literatür ile uyumludur. Çünkü klinik bilgiler doğrultusunda çalışmaya dahil ettiğimiz tüm olgular primer GBM tanısı alan olgulardır ki bu IDH2 gen mutasyonlarının olmayışı ile de doğrulanmıştır. Ancak burada GBM alt tipinin belirlenmesinde MS-HRM tekniği ile IDH1-2 mutasyonlarının rutin, diagnostik analizlerinin yapılmasının klinisyenlere yardımcı olacağı görüşündeyiz.

Bugüne kadar bu iki izoforma ilişkin GBM'lerde yapılan dizileme, mutasyon analizlerinde Şekil 6.1.'de de gösterildiği gibi IDH2 geni mutasyonlarının ekzon 4 de özellikle R 172 ve R 140 da nükleotid transisyonu olarak lokalize olduğu, yani bu bölgelerin hot spot bölgeler olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda IDH2 geninin ekzon 4'ü dizilenmiştir.



Şekil 6.1: IDH mutasyonlarının hot spot bölgeleri (15)

Yan ve arkadaşları 445 santral sinir sistemi tümörü ve 494 santral sinir sistemi tümörü olmayan dokuda IDH1 ve IDH2 genlerini sekanslamışlar, 9 tanesinde IDH2 ekzon 4 mutasyonu saptamışlardır. Saptanan mutasyonlar 2 dokuda R172G, 3 dokuda R172M ve 4 tümör dokusunda da R172K olarak bildirilmiştir. Tümör tiplerindeki dağılım ise; 30 diffuz astrositomadan 2 tanesinde, 52 anaplastik astrositomadan 2 tanesinde, 36 anaplastik oligodendrogliomadan 3 tanesinde IDH2 mutasyonu saptanmıştır. Mutasyonlar ile hastaların histolojik tanı tarihi, hastanın son kontrol tarihi ya da ölüm tarihi bilgileri değerlendirilerek ortalama sağkalım belirlenmeye çalışılmıştır. Anaplastik astrositoma ya da glioblastoma hastalarında IDH1-IDH2 mutasyonu taşıyanların, yabanıl tip allele sahip olanlara göre daha genç yaşta oldukları, IDH1-IDH2 mutasyonu taşıyan anaplastik astrositomalı hasta yaşı ortalaması 34 iken, yabanıl tip allele sahip olanlar için ortalama yaş 56 olarak bildirilmiştir (86). IDH1-IDH2 mutasyonu taşıyan Glioblastoma multiforme tanısı almış hastalar için ortalama yaş 32 iken yabanıl tip allele taşıyan hastalar için ortalama yaş 59 olarak bildirilmiştir. Parsons ve arkadaşları mutasyon görülme yaşını 33 yaş, yabanıl tip allele taşıyan hastalarda ise ortalama yaş 53 olarak rapor etmişlerdir (56). Ichimura ve ark. ise mutasyon taşıyan hastalar için ortalama yaş 41, yabanıl tip allele taşıyan hastalar için ortalama yaş 56 olarak bildirmişlerdir (26).

Bu sonuca göre IDH1-IDH2 mutasyonlarının erken yaştaki hastalarda daha sık gözleendiği belirtilmiştir ki bu sekonder GBM tanımına da uymaktadır. Çalışmamızda olgu grubumuzda mutasyon saptanmadığı için böyle bir istatistiksel oranlama yapılamamıştır. Fakat çalışma grubumuzun hepsi yabancı tip allele sahip olduğu için genel yaş ortalaması 54.5 ± 2 olarak belirlenmiştir. Bu bulgu literatürde yabancı tip allele sahip GBM hastaları ile uyumlu bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Son dönemlerde yapılan geniş çaplı analizler, IDH1-2 mutasyonlarının yeni bir prognostik belirteç olabileceğini göstermektedir. IDH1-2 mutasyonuna sahip glioma hastalarının bu mutasyonu taşımayanlara göre daha uzun yaşam süresine sahip olduğunu Ichimura ve arkadaşları yaptıkları çok basamaklı çalışmalarla göstermiştir. Fakat prognostik bir faktör olarak tümör tipi, evresi ya da yaş ile ilişki kurmaktan kaçınmışlardır (26,38,54,61).

Almanya'da NOA 04 no'lu çalışma, primer olarak radyoterapi veya kemoterapi alan, IDH1/2 mutasyonu taşıyan, WHO derece III gliomalar ile yapılmıştır. Bu çalışmada ve EORTC 26951 numaralı çalışmada tek başına radyoterapi ya da PCV ile kombine tedavi alan olgular hastalıkta progresyon göstermemişlerdir. Bu durumda çalışmacılar şöyle bir hipotezi savunmuşlardır; IDH mutasyonu sonucu bozulan enzim aktivitesi ile hücrelerde biriken metabolitler hücreleri alınan tedaviye karşı hassas hale getirirler ve uygulanan tedavideki başarı oranı artar. Bu nedenle her iki çalışmada IDH mutasyonu ve uzun sağ kalımı desteklemektedir (79,84). Bizim çalışmamızda hasta sağkalımı için yapılan değerlendirmede ise IDH2 yabancı tip alleli taşıyan 40 olguluk serimizin ortalama sağkalım süresi ~17 ay olarak tespit edilmiştir. Literatürde IDH2 mutasyonu taşıyan hastalar için ortalama sağkalım 31 ay, yabancı tip allel taşıyan hastalarda ise 15 ay olarak bildirilmiştir. Bu bulgu, IDH2 mutasyonu olan vakalarda sağ kalım süresinin uzadığını göstermesi açısından önemli bir bulgudur. Diğer taraftan çalışmamızda yabancı tip IDH2 ye sahip olgulardaki sağ kalım ortalamasının literatür ile uyumlu olduğu da gözlenmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmalar (79,84) sonucunda IDH1-IDH2 genleri anaplastik astrositoma hastaları için artmış sağkalım ile

ilişkilendirilmiş, mutasyonu taşıyan hastalarda ortalama sağkalım 50 ay, mutasyonu taşımayanlarda 22 ay olarak belirtilmiştir.

Martin J. van den Bent ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 159 anaplastik oligodendroglial tümör örneğinde sekanslama ile mutasyon analizini gerçekleştirmişlerdir. Toplam 151 hastada 1p19q delesyonu ve 118 hastada da MGMT promotor metilasyonu gözlenmiştir. Bu olgulardan 73 tanesinde IDH1 mutasyonu ve sadece bir hastada IDH2 mutasyonu saptanmıştır. IDH mutasyonlarının radyoterapi ve radyoterapi/PCV tedavisi alan hastalarda, progresyonsuz sağkalım ve sağkalım süresinin artması açısından prognostik olduğunu belirtmişlerdir. Retrospektif çalışmalarda da derece II-III glial tümörlerde IDH1-2 mutasyon varlığının sağkalım için prognostik etkisi olduğunu vurgulamışlardır (84).

Bugüne kadar IDH mutasyon taramaları Sanger sekanslama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme altın standart olarak kabul edilmekle birlikte Sanger dizilemenin, yabancı tip gen dizisinin bulunduğu bir ortamda mutant olanları belirleme duyarlılığının % 20 dolaylarında olduğu Temmuz 2011 de yayınlanan Gupta ve ark.nın çalışmasında belirtilmektedir (21). Mutant allel oranının yüksek sıklıkta olması gerektiği, beyin tümör biyopsilerinin tümör olmayan dokularlada yüksek oranda kontamine olmasına bağlı olarak özellikle beyin tümörlerinde yanlış negatif sonuç olasılığının yüksek olabileceği ifade edilmektedir.

Somatik mutasyonların taramasında pyrosequencing yönteminin özellikle kantitatif veri vermesi nedeniyle de güvenilirliğinin daha yüksek olduğu, yabancı tip ortamında %5 veya %7 mutant allel sıklığını saptayabildiğini bildirmektedirler (21). Bu durum özellikle sekonder tümörlerde düşük derece tümör örneklerinde normal beyin parankiması içerisinde düşük oranda glioma hücreleri bulunduğu için büyük bir risk oluşturacaktır düşüncesindeyiz. Çalışmamızda primer GBM olgularının olması, ayrıca ileri derece tümörler değerlendirildiği için altın standart yöntem olan sekanslama ile elde ettiğimiz verilerin güvenilir olduğu görüşündeyiz.

Tablo 6.2: Çalışmamızdaki IDH2 bulgularının literatürle karşılaştırılması

Literatürler	Histopatolojik Tanı	Çalışılan Olgu Sayısı	Yöntem	Araştırılan Genler	Elde Edilen Sonuç
Yan ve ark. 2009	diffuz astrositoma, anaplastik astro., anaplastik oligodendrogl	445	Dizi Analizi	IDH1-2	%0.5 IDH2 mutasyonu
Sonoda Y. ve ark. 2009	Sekonder GBM WHO G II-III	125	Dizi Analizi	IDH1-2	%31 IDH1 mut %0.8 IDH2 mut
Hartmann C. ve ark. 2010	Sekonder GBM WHO G II-III	1010	Dizi Analizi	IDH1-2	%70 IDH1 mut %3 IDH2 mut
Raynaud S. ve ark. 2010	Düşük grade glioma, primer glioma, meme kanseri	200	Dizi Analizi	IDH1-2	Mutasyon yok
van den Bent ve ark. 2010	Anaplastik oligodendroglioma	159	Dizi Analizi	IDH1-2	%46 IDH1 mut %0.6 IDH2mut
Çalışmamız 2011	Primer GBM WHO G IV	40	Dizi Analizi	IDH2	Mutasyon saptanmadı

Sonuç olarak IDH genlerinin primer ve sekonder GBM kesin tanısı için analiz edilmesi gerektiği görüşünü destekliyoruz. Ayrıca sekonder GBM de düşük ya da ileri evre tanısı için de IDH mutasyonlarının histopatolojik verilere göre daha net bilgiler verdiği literatür bilgisiyle de desteklenmiştir.

Gliomalarda IDH mutasyonlarının sadece tanı için değil prognoz açısından da klinisyenlere büyük faydalar sağlaması nedeniyle rutin analizlere sokulması gerektiği düşüncesindeyiz. Diğer taraftan RAR β gen metilasyonunun diğer kanser tiplerindeki durumu değerlendirilerek gliomalarda da marker olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu görüşündeyiz. Ancak bu gene ilişkin geniş populasyonlarda, ekspresyon çalışmaları ile birlikte analizlerin yapılmasının gerekli olduğu, bu çalışmanın devamının bu planlama ile gerçekleştirilmesi gerektiğine inanıyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, IDH1 mutasyonları ile MGMT metilasyon paternleri bilinen 40 GBM olgusunun tümör dokusunda, IDH2 ve RAR β genlerinin GBM moleküler patolojisi ile ilişkisinin ortaya konması amacıyla IDH2 gen mutasyonu ve RAR β gen metilasyonu analizleri gerçekleştirilmiştir. Mutasyon taraması olarak DNA dizi analizi ve metilasyon araştırması için de MS-HRM yöntemleri kullanılmıştır.

40 olguya ait örnekte IDH2 geni için mutasyon saptanmamıştır. Örneklerimizin primer tümör ön tanısına bağlı olarak bu bulgu IDH2 geni için daha önce yapılmış araştırma verileri ile uyumlu bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

1) Çalışmamızın devamının farklı tümör tiplerindeki (primer- sekonder / erken derece-ileri evre) IDH2 mutasyon sıklığı ile IDH mutasyonunun neden olduğu metilatör fenotipin değerlendirilmesi olarak düşünülmektedir.

2) Çalışma grubumuzun RAR β gen metilasyonu için metilasyon frekansı belirlenmiştir. Olgu grubumuzdaki metilasyon oranı literatürle uyumlu bulunmuştur.

3) Metilasyon çalışması için solid tümörlerde MS-HRM uygulamasının literatürlerle uyumlu bulguları dahilinde güvenilir, uygulanabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 4) IDH2 gen mutasyonu açısından olgu grubumuzun ortalama sağkalımı belirlenmiştir. Elde edilen bulgu literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

5) Olgu grubumuzda metilasyon gözlenen ve gözlenmeyen olguların ortalama sağkalımları belirlenmiş, bunun sonucunda RAR β geni için metile olan grupta daha uzun sağkalım tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonucu bu konuda daha önce yapılmış çalışmanın sonucu ile farklıdır. Bu nedenle yeni bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

6) GBM olguları ile RAR β gen metilasyonu için yapılmış çalışma sayısının azlığı nedeniyle daha geniş olgu serileri ile ekspresyon paternlerinin de incelendiği yeni çalışmalar yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak son yıllarda glioma biyolojisi ve genetiğindeki gelişmeler yeni markerlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu markerlerin bazıları tanısal değer taşıırken, diğerleri hasta prognozu ve tedaviye yanıtı tahmin etmede çok yardımcı olmaktadır. Bu nedenle gliomalarda genetik testlerin uygulanması artık rutin klinik uygulama haline gelmektedir. Ayrıca gliomaların sınıflandırılmasında histolojik kriterler yanında moleküler kriterlerin de çok önemli olduğu ve takip eden WHO sınıflamasında IDH mutasyonları gibi pek çok moleküler marker sonuçlarının da dikkate alınacağı düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adilay, H.U., 2006, Glioblastoma Multiforme ve Benign Meningiom Olgularında Tümör Dokusunda Ölçülen Çinko, Demir ve Kadmiyum Düzeylerinin Karşılaştırılması, Uzmanlık tezi, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
2. Benbrook, D.L., E.; Pfahl, M. , 1988, A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature*,. 333: p. 669-672.
3. Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y., 2003, Primary Brain Tumours in Adults. *Lancet*; 361; 323-331,.
4. Biernat, W., Kleihues, P., 1997, Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J. Neuropathol Exp Neurol* 56:180-185,
5. Bondy, M. W., Wrensch, M., Krytys, A.P., 1994, Genetics of primary brain tumors: a review. *J Neurooncol*;18(1):69-81
6. Buatti, J.M., Marcus, R.B., Mendenhall, W.M., 1996, Accelerated hyperfractionated radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 34: 785-792.
7. Burgess, R., Jenkins, R., Zhang, Z., 2008, Epigenetic changes in gliomas *Cancer Biology & Therapy* 7:9, 1326-1334
8. Cancer Facts and figures, 2002, American Cancer Society, Surveillance Research, Atlanta.
9. Candece, L.G., Prayson, A.R., 2010, The Pathobiology of Glioma Tumors. *Annu Rev Pathol.*;5:33-50
10. Carlotti, C.G., Dirks, P.B., Rutka, J.T., Basic brain tumor biology: invasion, angiogenesis and proliferation. In: Batjer HH, Loftus CM, eds. *Textbook of neurological surgery*. Volume II, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins
11. CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) 2002-2003-2008, Report on Primary Brain Tumors in the United States. Chicago, Central Brain Tumor Registry of the United States, 2003-2008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

12. Chosdol, K., 2002 Molecular pathways of glial tumorigenesis. *Current Science*;82(6):648-54.
13. Costello, J.F., 2003, DNA Methylation in Brain Development and Glioma Genesis *Frontiers in Bioscience* 8, s175-184
14. Cote, S., Sinnett, D., Momparler, R.L., 1998, Demethylation by 5-aza-28-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* ; 9:743–50.
15. Dang, L., Jin, S., Su, S.M., 2010, IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia *Trends in Molecular Medicine* Volume 16, Issue 9, Pages 387-397
16. Davis, F.G., McCarty, B.J., 2000, Epidemiology of brain tumors. *Curr opin in neurology*;13;635-40.
17. Fischer, I., Gagner, J.P., Law, M., Newcomb, E.W., Zagzag, D., 2005, Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 15:297- 310.
18. Garber, K., 2010, Oncometabolite? IDH1 Discoveries Raise Possibility of New Metabolism Targets in Brain Cancers and Leukemia Oxford University Press. DOI: 10.1093
19. Gurney, J.G., 2001, Brain and other central nervous system tumors: rates, trends and epidemiology. *Curr Opin in oncology*;13:160-6
20. Gultekin, S.H., Dalmau, J., Graus, Y., Posner, J.B., Rosenblum, M.K., 1998, Neuronal differentiation in human brain tumors. A study of 112 central neuroepithelial neoplasms. *Am J Surg Pathol* .;22:195–200.
21. Gupta, R., Webb-Myers, R., Flanagan, S., Buckland, M. E., 2011, Isocitrate dehydrogenase mutations in diffuse gliomas: clinical and aetiological implications, *J Clin Pathol*

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

22. Hartmann, C., Meyer, J., Bals, J., 2010, Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas.
23. [_http://ctf.edu.tr/KanserOlusumundaEpigenetik.ppt](http://ctf.edu.tr/KanserOlusumundaEpigenetik.ppt)
24. <http://uptodate.com/contents/incidence-of-primary-brain-tumors>
25. <http://yunus.hacettepe.edu.tr/mergen/derleme/depigenetik.pdf>
26. Ichimura, K., Pearson, D.M., 2009, IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas *Neuro-Oncology* 11, 341–347.
27. Ironside, C.V., Moss, T.H., Louis, D.N., 2002, *Astrocytic Tumours. Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours*, 1. basım, Churchill-Livingstone, London, 53-121.
28. Ironside, C.V., Moss, T.H., Louis, D.N., 2002, *An introduction to tumours of the nervous system. Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours*, 1.basım, Churchill-Livingstone, London, 1-16.
29. Işık, S., 2009, *Epigenetik ve Epigenomik*
30. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 1998, *Sinir dokusu ve sinir sistemi. Temel Histoloji*, 8.basım, Barış kitabevi, İstanbul, 152-180.
31. Karlsson, U.L., Leibel, S.A., Wallner, K., Davis, L.W., Brady, L.W., 1998, *Primary intracranial Neoplasms. Perez CA, Brady LW. Principles and Practise of Radiation Oncology. Third ED. ,Philadelphia: J.B Lippincot Company, 777-822.*
32. Kitange, G.J., et al., 2003, Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Curr Opin Oncol.* 15(3): p.197-203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

33. Kleihues, P., Cavenee, W.K., 2000, Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
34. Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., 1993, The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathol*; 3(3):255-68
35. Kumar, V., Cotran, R., Robbins, S.L., 2000, Sinir sistemi. Temel Patoloji, 6.basım, Nobel Kitabevi, İstanbul, 713-745.
36. Kuzpınar, A., 2007, High Resolution Melting Curve (HRM) Analiz Yönteminin Delesyon Tipi Mutasyonların Saptanmasında Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi Ankara
37. Lamdzus, K., Schmidt, N.O., Jin, L., Lateral, J., Zagzag, D., Way, D., Witte, M., Weinand, M., Goldberg, I.D., Westphal, M., Rosen, E.M., 1998, Scatter factor promotes motility of human glioma and neurovascular endothelial cells. *Int J Cancer* 5:75;19-28.
38. Lei, Y., Song-tao, Q.I., Zhi-yong, L.I., 2010, Analysis of isocitrate dehydrogenase-1/2 gene mutations in gliomas *Chin Med J*;123(24):3697-3705
39. Levin, V.A., Leibel, S.A., Gutin, P.H., 2001, Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita VT Jr, Hellmar S, Rosenberg SA, eds: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp 2100-60.
40. Losi-guembarovski, R., Kuasne, H., Guembarovski, A.L., Rainho, C.A., Colus, I.M., 2007, DNA methylation patterns of the CDH1, RAR β and SFN genes in choroid plexus tumors. *Cancer Genet.cytogenet.* 179:140-5
41. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., 2007, WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.
42. Malmer, B., Gronberg, H., Bergenheim, T., 1999, Familial aggregation of astrocytoma in northern sweden: an epidemiological cohort study. *Int J Cancer*;81: 366-70

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

43. Mattei, J.F., Marchio, A., Tiollais, P., Dejean, A., 1988, Assignment of the human hap retinoic acid receptor RAR-beta gene to the p24 band of chromosome 3. *Hum. Genet.*, 80: p. 189-190.
44. McKinney, P.A., 2004, Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;75:12-17.
45. McPherson, M.J., Moller, S.G., 2006, PCR, 2nd edition. Taylor&Francis Group, MPG BOOKS Limited, Bodmin, Cornwall, UK.
46. Merlo, A., 2003, Genes and Pathways driving Glioblastomas in Humans and Murine Disease Models. *Neurosurgery Reviews*; 26; 145-158.
47. Mikkelsen, T., Cairncross, J.G., Cavenee, W.K., 1991, Genetics of the malignant progression of astrocytoma. *J Cell Biochem* 46:3-8.
48. Montgomery, J., Wittwer, J.T., Palais, R., ve Zhou, R., 2007, Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols*, 2 (1), 59-66.
49. Nagane, M., Huang, H.J., Cavenee, W.K., 1997, Advances in the molecular genetics of gliomas. *Curr Opin Oncol* 9:215-222.
50. Nakamura, M., Watanabe, T., 2001, p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11:159-168.
51. Nilsson, A., Ribom, D., Eriksson, A., Hartman, M., Engler, H., Langstrom, B., 2001, Positron emission tomography (11) C-methionine and survival in patients with low-grade gliomas. *Cancer*;15:92(6):1541-9.
52. Ohgaki, H., 2005, Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25: 1-7
53. Ohgaki, H., Kleihues, P., 2005, Population Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:479-489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

54. Ohgaki, H., Kleihues, P., 2009, Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 12, 2235–2241
55. Olasz, J., Juhász, A., Remenár, E., Engi, H., Bak, M., Csuka, O., Kásler, M., 2007, RAR beta2 suppression in head and neck squamous cell carcinoma correlates with site, histology and age. *Oncol Rep.*105-12
56. Parsons, D.W., Jones, S., Zhang , X., 2008, An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme
57. Piperi, C., Themistocleous, M.S., Papavassiliou, G.A.,2010, High Incidence of MGMT and RAR β Promoter Methylation in Primary Glioblastomas: Association with Histopathological Characteristics, Inflammatory Mediators and Clinical Outcome
58. Rasheed, B.K., Bigner, S.H., 1991, Genetic alterations in glioma and medulloblastoma. *Cancer Metastasis Rev* 10:289-299.
59. Raynaud, S., Carbuccia, N., Colin, C., 2010, Absence of R140Q mutation of isocitrate dehydrogenase 2 in gliomas and breast cancers
60. Reifenberger, G., Collins, V.P., 2004,Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82: 656-670.
61. Reitman, Z.J., Yan, H., 2010, Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism *J Natl Cancer Inst*;102:932–941
62. Rosai, J., 2004, Central Nervous System. *Surgical Pathology*, 9.basım, Mosby, 2503-522.
63. Rothman, K.J., Loughin, J.E., Funch, D.P., 1996, Overall mortality of cellular telephone customer. *Epidemiology*;7:303-5
64. Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., 1995, Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie2 in blood vessel formation. *Nature* 376:70-74
65. Sayek, P., *Beyin Tümörleri ve Tedavisi, Temel Cerrahi*. 3.baskı. Güneş Kitabevi. p. 2300-54

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

66. Segal, D.H., Germano, I.M., Bederson, J.B., 1997, Effects of basic fibroblast factor on in vivo cerebral tumorigenesis in rats. *Neurosurgery* 40:1027-1033.
67. Singal, R., Ginder, G.D., DNA methylation. *Blood*, 1999;93(12):4059-4070.
68. Smith, J.S., Jenkins, R.B., 2000, Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications, *Frontiers in Bioscience* 5:213-231
69. Sonoda, Y., Kumabe, T., Nakamura, T., 2009, Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients *Cancer Sci*; 100: 1996–1998
70. Sternberg, S.S., 1997, Central Nervous System. *Histology for Pathologists*, 2.basım, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 243-285.
71. Strathdee, G., Brown, R., Aberrant DNA methylation in Cancer: potential clinical interventions. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002;4:1-17.
72. Tsai, J.C., Goldman, C.K., Gillespie, G.Y., 1995, Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF, BB and bFGF. *J Neurosurg* 82: 864-873.
73. Türk Nöroşirurji Derneği Bülteni, Gliom Gelişimi ve Değişimine Moleküler Bir Bakış, 2004,ss.3-8.
74. Türk Tabipler Birliği (TTB), 2006. Türkiye Cumhuriyeti sağlık istatistikleri. (İkinci baskı ss. 43-62) Ankara
75. Walter, P., Roberts, K., Raff, M., Lewis, J., Johnson, A., Alberts, B., 2002, *Molecular Biology Of The Cell*, Garland Science, USA
76. Watanabe, K., Tachibana, O., 1996, Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-224.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

77. Watanabe, K., 1997, Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.*, 3(4): p. 523-30.
78. Weinber, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer Cell, Vol. 100, 57–70
79. Wesseling, P., Ruiter, D.J., Burger, P.C., 1997, Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol* 32: 253-265.
80. William, S.K., Cummings, M.R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636 s.
81. Willard, F.H., McInnes, R.R., Nussbaum, R.L., Boerkoel III, C.F., 2005, *Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi* 311-332 s.
82. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., Hansen, L.L., 2008, Methylation-sensitive high-resolution melting *Nature Protocols* Vol.3 No.1
83. Wong, E.M., Dobrovic, A., 2011, Assessing gene-specific methylation using HRM-based analysis. *Methods Mol Biol.*;687:207-17.
84. Van den Bent, M.J., Dubbink, H.J., Marie, Y., 2010, IDH1 and IDH2 Mutations Are Prognostic but not Predictive for Outcome in Anaplastic Oligodendroglial Tumors: A Report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res*; 16(5)
85. Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom E., 2010, Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, *Cancer Cell*, Volume 17, Issue 1, 98-110
86. Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., 2009, IDH1 and IDH2 Mutations in Glioma
87. Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., 2009, Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 α , *Science*, Vol. 324 no. 5924 p. 261-265

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Emine İkbal ÇİÇEK

Doğum Tarihi ve Yeri : 09.07.1982- ANKARA

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

İletişim Adresleri : Şeker M. Turanoğlu S. Şeker Apt. 1/10 ESKİŞEHİR

emine.ikbal@gmail.com

0 554 253 40 30 / 0 222 230 47 02

Eğitim Durumu

2005 - 2011 ESOĞÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Lisans Sonrası Direk Doktora Programı

2001 - 2005 ESOĞÜ Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü-ESKİŞEHİR

Lisans

1996 – 2000 Prof.Dr.Orhan Oğuz Lisesi (YDA)-ESKİŞEHİR

Lise

1994 – 1996 Gazneliler Ortaokulu-ANKARA

Ortaokul

1991 – 1994 Ahmet Andiçen İlkokulu-ANKARA

İlkokul

1989 – 1991 Sedat Celasun İlkokulu-ANKARA

İlkokul

Üye Olduğu Kuruluşlar:

- Tıbbi Genetik Derneği
- Türkiye Biyologlar Derneği

Uluslar Arası Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1.Cantürk M., Çilingir O., Özdemir M., Emre R., Aldemir Ö., Durak B., Çiçek İ., Önür, H., Artan S.,

"Subtelomerik FISH yöntemiyle saptanan kriptik 14q delesyonu ve 19p duplikasyonlu olgu"

VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi

2.Artan S., Uludağ A.,Şener T.,Durak B.,Çilingir O.,Çiçek E.İ.,Yurdakul H.,Kurtçu K.,

"Prenatal Tanıda Saptanan t(10;12)(q22;q22) Vakası:Olgu Sunumu"

VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi

Katıldığı Ulusal Bilimsel Toplantılar

1. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006

2. I.Ulusal Ege Sempozyumu, 2006

3. 6th European Cytogenetics Conference, 2007

4. VIII. Ulusal Tibbi Genetik Kongresi,2008