

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİOBLASTOMA MULTİFORME TÜRÖR HÜCRELERİNDE
NÜKLEOSTEMİN İFADESİNİN TANI VE PROGNOZDA ETKİNLİĞİ

EZGİ ÇALIŞKAN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

ANKARA

2011

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU danışmanlığında, Ezgi ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../.... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Enstitü Müdürü

Glioblastoma Multiforme Tümör Hücrelerinde Nükleostemin İfadesinin Tanı ve Prognozda Etkinliği

ÖZET

Çoğalmakta olan hücrelerde oldukça fazla eksprese edilen Nükleostemin hücre proliferasyonunun düzenlenmesi için oldukça gerekli bir proteindir. Nükleostemin geni görünüşe göre hem kök hücrelerin hem de bazı kanser hücreleri tiplerinin proliferasyonunun düzenlenmesinde gereklidir. Nükleosteminin, hücreler çoğalırken erken multipotent evrede bol miktarda ifade edilir fakat farklılaşmanın başında aniden ve tamamen kaybolduğu öne sürülmüştür. Asıl olarak Nükleostemin, kök hücrelerde ve çeşitli kanser hücre hatlarında eksprese edilir fakat erişkin dokuların farklılaşmış hücrelerinde eksprese edilmemektedir. Buna göre Nükleostemin'in kanser hücreleri ve kök hücrelerin kendini yenilemesinin sürdürülmesinde rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle bu tez çalışması ile Glioblastoma Multiforme beyin tümörünün saptanmasında prognostik önemi olabileceği düşünülen Nükleostemin'in ifadesine bakılması amaçlanmaktadır. Bu çalışma sonunda bu hastalığın tanı ve prognozunda etkili olabileceği düşünülen yeni bir belirteçin oluşturulabilmesi için zemin hazırlanması hedeflenmektedir. Yapılan analiz sonucunda GBM tümör hücrelerinde NS'nin tanı ve tedavide hedef olarak kullanılamayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nükleostemin, Eş Zamanlı PCR, Glioblastoma Multiforme

The Efficiency of Nucleostemin Expression in The Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma Multiforme Tumor Cells.

ABSTRACT

Nucleostemin, which is limited quite a lot inside enhancing cells, is a necessary protein for regularizing cell proliferation. Apparently, nucleostemin gene is mandatory for regularizing cell proliferation of both stem cells and some types of cancerous cells. Nucleostemin expressed abundantly in early multipotent phase while cells are generating but it will disappear suddenly and completely in the beginning of differentiation. Mainly, nucleostemin is limited inside stem cells and some cancerous cell lines but it could not be limited inside differentiated cells of adult tissues. According to this, it has been proofed that nucleostemin has a role in sustaining the self-perpetuation of cancerous and stem cells. Therefore, it's been aimed in this thesis to observe the definition of Nucleostemin which has been considered to have a prognostic role in determining Glioblastoma Multiforme brain tumour. As a result of this thesis, it's been aimed to provide basis to develop a new indicator which could be effective in diagnosis and prognosis this illness. In consequence of analyses made, it's been considered that diagnose and prognose of NS inside GBM tumour cells could not be used as a target.

Key words: Nucleostemin, Real Time PCR, Glioblastoma Multiforme

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgisini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na, laboratuvar çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ar. Gör. Tülin ÖZKAN ve Dr. Buket ALTINOK'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma, tez süresince destekleri ile yanımda olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, beni her zaman destekleyen annem Gülten ÇALIŞKAN ve babam Mustafa ÇALIŞKAN'a,

Tez çalışmam süresince karşılaştığım her türlü zorlukta sabırla beni destekleyen ve her zaman yanımda olan nişanlım Erol TOSUNKARA'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez sevgili aileme adanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Nükleostemin	4
2.1.1. Omurgalılarda Nükleosteminin Ortaya Çıkışı	7
2.1.2. Nükleosteminin Yapısı ve Lokalizasyonu	7
2.1.3. Nükleosteminin Diğer Proteinler ile Etkileşimi	11
2.1.4. Nükleosteminin Olası İşlevleri ve Biyolojik Fonksiyonu	13
2.1.5. Nükleostemin ve Doku Rejenerasyonu	20
2.2. Glioblastoma Multiforme	21
2.2.1. Glioblastoma Multiformenin Genetik Özellikleri	25
2.2.2. Epidemiyoloji	30
2.2.3. Glioblastoma Multiforme'nin yerleşim bölgeleri	32
2.2.4. GBM Tedavisi	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar	33
3.1.1. Kullanılan GBM Hücre Serileri	33
3.1.2. Hücreleri Çoğaltmak İçin Hazırlanan Besiyeri	34
3.1.3 RNA İzolasyonu	34

3.1.3.1. RNA Ölçümü	35
3.1.4. cDNA Sentezi	35
3.1.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	36
3.2 Yöntemler	37
3.2.1. Hücre Serilerinin Hücre Kültürü	37
3.2.1.1. Hücre serilerinin kültür işleminden sonra hücrelerin toplanması	38
3.2.2. RNA İzolasyonu	38
3.2.2.1. RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi	40
3.2.2.2. RNA'nın kantitasyonu	41
3.2.3. cDNA İzolasyonu	41
3.2.4. RT-PZR	42
3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	45
4. BULGULAR	45
4.1. Dokuların Elde Edilmesi	45
4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları	47
4.3. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları	49
4.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Analiz Sonuçları	51
4.4.1. Amplifikasyon eğrileri ve ortalama Cp değerleri	51
4.4.2. Erime eğrisi (melting curve) analizi ve sonuçları	55
4.4.3. Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanması ve sonuçları	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Farklı türlerdeki nükleostemin, GNL3L ve Ngp-1 proteinlerinin şematik diyagramları
- Şekil 2.2. Nükleostemin (NS), GNL3L ve Ngp-1'in U2OS hücrelerindeki hücre içi dağılımları
- Şekil 2.3. Nükleostemin geninin yerleşimi
- Şekil 2.4. Memeli nükleosteminin alt birimleri
- Şekil 2.5. Nükleosteminin çekirdek ile nükleoplazma arasındaki gidiş gelişi
- Şekil 2.6. NS ve GNL3L'nin diğer proteinlerle etkileşimi
- Şekil 2.7. NS'nin hücre döngüsünün ilerlemesindeki rolleri
- Şekil 2.8. Primer ve Sekonder GBM'deki önde gelen genetik değişimler
- Şekil 2.9. Glioblastoma Multiforme, düşük grade astrositom ve anaplastik astrositomda saptanan majör genetik değişiklikler
- Şekil 3.1. Farklı zamanlarda tümör dokularından elde edilen RNA örneklerinin agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntüleri
- Şekil 4.1. (a) Nükleostemin amplifikasyon eğrisi grafiği
- Şekil 4.1. (b) G6PDH amplifikasyon eğrisi grafiği
- Şekil 4.2. Tipik bir erime eğrisi grafiği
- Şekil 4.3. (a) Nükleostemin erime eğrisi grafiği
- Şekil 4.3. (b) G6PDH erime eğrisi grafiği
- Şekil 4.4. Nükleostemin genine göre hastaların tümör dokularındaki gen ifade değişimleri
- Şekil 4.5. P53 genine göre hastaların tümör dokularındaki gen ifade değişimleri
- Şekil 4.6. NS ve P53 genlerinin ifade değişimlerinin karşılaştırılması

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. WHO santral sinir sistemi tümörleri histolojik sınıflandırması

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan hücre serilerinin genel özellikleri

Çizelge 3.2. (a) NS için RT-PZR'da kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Çizelge 3.2. (b) P53 için RT-PZR'da kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Çizelge 4.1. Doku örneği alınan hastalara ait genel bilgiler

Çizelge 4.2. Hasta örnekleri ve hücre serilerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Çizelge 4.3. 1 µg RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Çizelge 4.4. (a) Nükleostemin İçin Tümör Doku Örnekleri ve Sağlıklı Doku Havuzu ortalama Cp değerleri

Çizelge 4.4. (b) p53 İçin Tümör Doku Örnekleri ve Sağlıklı Doku Havuzu ortalama Cp değerleri

Çizelge 4.5. (a) Örneklerin NS gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log₂ tabanındaki karşılıkları

Çizelge 4.5. (b) Örneklerin p53 gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log₂ tabanındaki karşılıkları

SİMGELER DİZİNİ

ARF	Alternative Reading Frame
Ca ⁺²	Kalsiyum İyonu
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	Distile Su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Ethylenediaminetetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	Fötal Dana Serumu
G6PD	Glikoz 6 Fosfatdehidrogenaz
GBM	Glioblastoma Multiforme
GNL3L	Guanine Nucleotide Binding Protein Like-3
GTP	Guanosine-5'-Triphosphate
HDM2	İnsan Double Minute 2
KKH	Kanser Kök Hücresi
LOH	Heterozigosite kaybı

MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MDM2	Mouse Double Minute 2
Mg ⁺²	Magnezyum İyonu
MPSNT	Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörü
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	Nükleer Faktör κB
NKH	Nöral Kök Hücre
NS	Nükleostemin
NST-1	Nematod Nükleostemini
P53	Tümör Baskılayıcı Protein 53
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PDGFRA	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü A
PRB1	Retinoblastom Yatkınlık Lokusu Protein 1
PTEN	Fosfat ve Tensin Homoloğu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCF	Rölatif Santrifüj Gücü
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSL1D1	Ribozomal L1 Domain Containing 1
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TERT	Telomeraz Revers Transkriptaz
TRF1	Telomeric Repeat Binding Factor 1
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzün ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kanserde tedaviyi olanaklı kılmayı amaçlayan kanser araştırmacıları kanserin biyolojik kökeni, kansere eğilimi artıran genetik değişiklikler ve kanser oluşumuna katılan genler ve sinyal ileti yollarını aydınlatma alanlarında büyük gelişmeler kat etmektedir. Son yıllarda kanser araştırmalarında dikkati çeken ve tedavide yardımcı yeni hedef moleküllerin ve belirteçlerin ortaya çıkmasını sağlayan en önemli gelişmelerden biri kanser kök hücrelerinin keşfedilmesi olmuştur.

Kök hücreler, kendi-kendilerini yenileme ve belirli organa veya dokuya özel karakteristikleri olan, olgun hücreye farklılaşan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Kök hücre biyolojisinde en önemli konu; kendi-kendini yenileme ve farklılaşmayı düzenleyen mekanizmalarını anlama çabalarıdır. Farklı organlardaki kök hücrelerin gelişim potansiyelinin değişik olmasına karşın, bütün kök hücreler kendi kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki dengeyi korumakla yükümlüdür. Kanserle ilgili birçok sinyal ileti sistemi kök hücrelerin kendi-kendini yenileme ve farklılaşmasını da düzenlemektedir. Normal ve transforme olmuş kök hücrelerin kendi-kendilerini yenileme mekanizmaları benzer sinyal ileti sistemleri ile, fakat farklı şekilde düzenlenmektedir. Normalde kök hücrelerinin kendi-kendilerini yenilemesini düzenleyen sinyal ileti sistemleri, sistemde aksilik olduğunda tümör oluşumuna öncülük eder. Bunun yanı sıra sinyal yollarının anlaşılması kadar kök hücrelerin farklılaşmasında rol aldığı düşünölen ve bölünen hücrelerde belirteç olarak kabul edilebilecek bazı çekirdek ve sitoplazma proteinlerinin ekspresyonlarının araştırılması da oldukça önem kazanmıştır.

Yapılan çalışmalarda normal kök hücreler ile kanser kök hücreleri arasında bir çok benzerlik bulunduğu saptanmıştır. Kanser kök hücre teorisine göre, bunlar kanser hücrelerinin kendi-kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliği olan alt gruplarıdır. Yalnız bu iki özelliğe sahip hücreler “Kanser Kök Hücresi” (KKH) olarak adlandırılır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sayesinde kan, meme, beyin, dalak, baş ve boyun, kolon, deri, ve yumurtalık kanserlerinde KKH'lerin olduğu bildirilmektedir (Singh *et al.* 2004, Li *et al.* 2007, Prince *et al.* 2007).

İmmün yetersiz farelerde yapılan fonksiyonel çalışmalar tümörde, yalnızca belli grup hücrelerin tümör büyümesini sağladığını, fakat diğer hücrelerin sağlamadığını göstermektedir. Bu da kanser kök hücrelerinin kendi-kendini yenileme ve farklılaşma olmak üzere iki ana görevi olduğunu göstermektedir (Al-Hajj *et al.* 2004).

Kanser kök hücre hipotezi ile kanserin, tümör dokusunda oluşan kök veya nc hücrelerden oluştuğu ne sürülmektedir. Kanseri başlatan hücreler olarak da adlandırılan kanser kök hücreleri, kanserin başlaması, ilerlemesi ve klasik tedavi şekillerine direnç göstermesinden sorumludurlar. Multi-potent dokuya özgü, yetişkin kök hücrelerde ve nc hücrelerde ortaya çıkan genetik ve epigenetik değişikliklerin, kanser kök hücrelerinde tümör oluşumuna öncülük ettiği birçok araştırıcı tarafından gösterilmektedir. Tümör gelişimindeki kanser kök hücre modeli, hasta tümör dokusundan izole edilen son derece lösemik veya tümörijenik kanser kök hücrelerinin *in vivo* ve *ex vitro* olarak farklılaşmış kanser hücre kitlesi oluşturduğu ve bunların lösemi veya tümör oluşumundan sorumlu olduğunun gösterilmesi ile desteklenmektedir (Mimeault *et al.* 2007).

Glioblastoma Multiforme (GBM), günümüzde yaygın olarak rastlanan ve mortalitesi oldukça yüksek bir beyin tümörü tipidir. Erişkinlerde en sık rastlanan ve en malign beyin tümörü olmakla beraber hızlı ilerlemesinin yanı sıra evre dokulara çabuk ve yoğun yayılması nedeni ile de tedavisi oldukça zordur. Tümörün tamamının cerrahi olarak çıkarılması da genellikle mümkün olmamaktadır. Aynı tümör dokusunda ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının değişmesinden dolayı ‘‘multiform’’ olarak isimlendirilmektedir. Tüm kanserlerde olduğu gibi GBM dokusuna ait tümör hücrelerinde de yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, anjiyogenez, kontrolsüz bölünme, doku invazyonu ve apoptoza direnç görülmektedir.

Son zamanlarda birçok çalışma beyin tümörü hücrelerinin fenotip, sinyalizasyon ve davranış açısından nöral kök hücrelere benzediğini göstermiştir. Bu benzerliklerin ışığı altında beyin tümörlerinin kök hücrelerden meydana geldiği ve kendini yenilemede nöral kök hücreler ile aynı stratejiyi izlediği desteklenmiştir.

Tüm bu bilgilere dayanılarak beyin tümörlerinin kanser kök hücrelerini içerdiği ve kanser kök hücrelerinin tümör gelişiminde kritik bir role sahip olduğu öngörülmektedir (Mahshid *et al.* 2010).

Nükleostemin'in işlevsel olarak embriyonun erken evreleri için gerekli olduğu kadar, nöral kök hücrelerin ve kanser hücrelerinin çoğalabilmesi için de gerekli olduğu bilinmektedir (Tsai and McKay 2002, Beekman *et al.* 2006). Çekirdek proteinleri, ribozom biyogenezi ve p53 fonksiyonlarını kontrol ederek hücre bölünmesi ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Nükleosteminin gen ürünü de bir çekirdek proteindir. Nükleosteminin embriyonik kök hücreler ve primitif kemik iliği hücrelerinde çokça ifadelenirken hücre farklılaşmasının başında aniden ortadan kaybolduğu 2002 yılında Tsai ve McKay tarafından öne sürülmüştür.. Bu nedenle kök hücrelerin ve kanser hücrelerinin kendi kendini yenileme ve farklılaşma evresinde oldukça önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Normal kök hücrelerin yanı sıra literatürde nükleosteminin özefajiyal yassı hücre karsinomu, prostat kanseri, meme kanseri, mide ve karaciğer kanseri, renal karsinom ve akciğer kanser hücreleri gibi kanser hücrelerinde eksprese olduğu bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında; normal kök hücreler ile kanser kök hücreleri arasındaki benzerlikten yola çıkılarak, birçok kök hücre tipinde ve insan kanser hücrelerinde oldukça fazla miktarda ifadelendiği bilinen ve normal kök hücrelerde kendini yenileme ve doku onarımından sorumlu bir çekirdek proteini olan Nükleosteminin, en malign beyin tümörlerinden biri olan Glioblastoma Multiforme tümör dokularından elde edilen hücrelerdeki ekspresyon miktarının saptanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Nükleostemin

Nükleostemin (NS) ilk olarak 2002 yılında Tsai ve McKay tarafından tanımlanmış, kendini yenileme ve doku onarımından sorumlu olan bir çekirdek proteindir (nükleo-stem-in). İsmindeki “stem” eki de çekirdek içinde bulunması dolayısı ile verilmiştir. Nükleostemin p-53 ve MDM2’ye bağlanan, çekirdekcik ile nükleoplazma arasında gidip gelen bir GTP-bağlanma proteindir. NS; G1-S ve G2-M hücre döngüsü geçişlerinde rol alarak hücre döngüsünün devamlılığının sağlanması, öncü rRNA işlenmesi, nükleoplazmik translokasyon ile stres cevabı, hücre yaşlanma (selüler senesens) ve hücre çoğalmasının inhibisyonu gibi bir çok farklı hücresel süreçte görev almaktadır (Huang *et al.*, 2011).

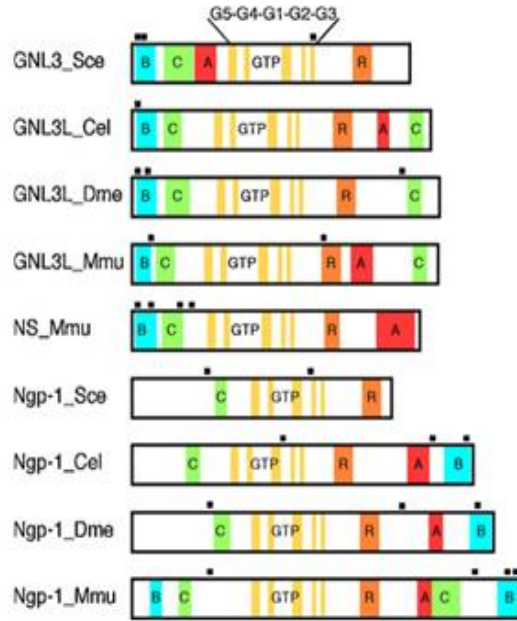
İlk olarak nöral kök hücrelerde ve erişkin memeli testisinde yüksek olarak ifadelendiği görülen nükleostemin (Tsai and McKay 2002) daha sonra hücre döngüsünün kontrolü, tümör oluşumu ve hücre yaşlanması ile ilgili olan çalışmaların odak noktası olmuştur (Tsai and Meng 2009). Memeli nükleostemini aslında nöral kök hücreler (NKH) ve insan kanser hücrelerinde bol miktarda bulunan bir gen olarak tanımlanmışsa da daha sonraları birçok kök hücre tipinde de oldukça fazla miktarda ifadelendiği bulunmuştur (Tsai and McKay 2002, Baddoo *et al.* 2003). Nükleosteminin işlevsel olarak embriyonun erken evreleri için gerekli olduğu kadar, nöral kök hücrelerin ve kanser hücrelerinin çoğalabilmesi için de gerekli olduğu bildirilmiştir (Tsai ve McKay 2002, Beekman *et al.* 2006). İlk tanımlandığı yıl olan 2002’den bu yana memelilerde (Baddoo *et al.* 2003, Beekman *et al.* 2006, Zhu *et al.* 2006, Ma and Pederson 2007, Dai *et al.* 2008, Meng *et al.* 2008, Ohmura *et al.* 2008), kurbağalarda (Beekman *et al.* 2006), semenderlerde (Maki *et al.* 2007), nematodlarda (Kudron and Reinke 2008), meyve sineğinde (Kaplan *et al.* 2008) ve mayada (Du *et al.* 2006) olmak üzere nükleosteminin biyolojisini ve nükleostemin ile ilişkili genleri araştıran çalışmaların sayısı giderek artmıştır.

NS, çok yakın bir tarihte tümör süpresör protein olan p 53'e bağlanan ve hücre çoğalmasını düzenleyen bir protein olarak tanımlanmıştır. NS ekspresyonu genellikle hücre döngüsünden çıkmadan önce farklılaşmanın erken evresinde azalmaktadır. Ayrıca NS'nin knockdown'u önemli bir şekilde kanser hücresi ve kök hücre çoğalmasını engellemektedir. Çalışmalardan elde edilen bu ilk gözlemler NS'nin hem kök hücrelerdeki multipotensi hem de kanser hücresi ve kök hücrelerin çoğalmasını düzenlediği şeklinde bilgilerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Son yapılan çalışmalar ise NS'nin aslında büyük ölçüde birçok normal çoğalmakta olan hücrede de kanser hücrelerinde olduğu gibi ifadelendiğini göstermiştir. Son zamanlarda yapılmış çoğu çalışmada ise NS'nin aslında sadece kanser ve kök hücrelerde değil farklılaşmış bazı normal hücrelerde de sentezlenebildiğini ortaya çıkarmıştır (Yoshida *et al.*, 2011).

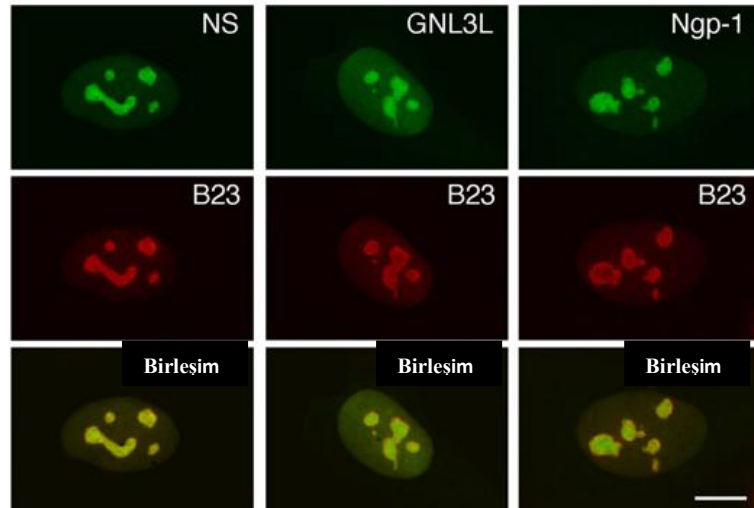
Protein yapısı nedeniyle nükleostemin, prokaryotlardan ökaryotlara kadar farklı türlerde bulunan YlqF/YawG GTPase ailesine mensup bir proteindir (Leipe *et al.* 2002). Ökaryotlarda; nükleostemin, GNL3L (guanine nucleotide binding protein like-3) ve Ngp-1 (nucleolar GTP binding protein-1) proteinleri YlqF/YawG GTPase ailesinin içinde GTP bağlama bölgeleri olan proteinler olarak tanımlanmıştır ve bu proteinler YlqF/YawG GTPase ailesinin alt grup proteinleridir. Bu proteinler birbirleri ile çok sıkı bir ilişki içinde olup (Şekil 2.1.), ağırlıklı olarak nükleolus (çekirdekcik) içinde yerleşmişlerdir (Şekil 2.2.) (Tsai and Meng 2009).

Birçok YlqF/YawG proteininin (nükleostemin, GNL3L ve Ngp-1 dahil) GTP'yi bağladığı görülmüştür (Meng *et al.* 2006, Tsai and McKay 2005); ancak çok azının GTPaz aktivitesine sahip olduğu deneysel olarak onaylanmıştır (Tsai and Meng 2009).

Erişkin memeli dokularında, nükleostemin yüksek miktarda sadece testislerde ifadelenirken (Tsai and McKay 2002), GNL3L ise öncelikli olarak beyincik ve ön beyinde ifadelenmektedir (Yasumoto *et al.* 2007). Sinirsel gelişim sırasında, GNL3L farklılaşmamış nöral kök hücrelerde (NKH) daha düşük seviyede ifadelenirken nükleostemin, ağırlıklı olarak farklılaşmamış NKH'lerde ve erken nöroepitelial öncüllerinde ifadelenmektedir (Tsai and McKay 2002).



Şekil 2.1. Farklı türlerdeki nükleostemin, GNL3L ve Ngp-1 proteinlerinin şematik diyagramları. Kısaltmalar: Sce, *Saccharomyces cerevisiae*; Cel, *Caenorhabditis elegans*; Dme, *Drosophila melanogaster*; Mmu, *Mus musculus*; B, temel; C, çift kıvrımlı; GTP, GTP-bağlama motifleri (G5*, G4, G1, G2, ve G3); R, RNA-bağlama; A, asidik. Protein yapıları farede de insanda olduğu gibi aynıdır (Tsai and Meng, 2009)



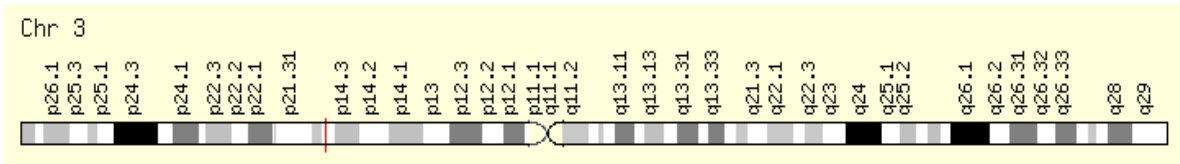
Şekil 2.2. Nükleostemin (NS), GNL3L ve Ngp-1'in U2OS hücrelerindeki hücre içi dağılımları. Yeşil renkte görülen C-ucuna bağlanan yeşil floresan boya, kırmızı renkte görülen anti-B23 immünofloresan boya ile boyanmış proteinler. Sarı renkte görülen ise kırmızı ve yeşil görüntüleri üst üste çakıştırarak elde edilmiş görüntü (Tsai and Meng 2009)

2.1.1. Omurgahlarda nükleosteminin ortaya çıkışı

Evrimsel süreçte nükleostemin alt familya genlerinin varlığı ve değişimi mevcut olan tüm veri tabanlarında yapılan geniş çapta bir araştırma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırmaların sonucunda nükleostemin alt familya genleri olarak tanımlanan nükleostemin (NS), GNL3L ve Ngp-1 genlerinin tüm omurgalı türlerinde, bulunduğu türe özgü olan ayrı genler olduğu bulunmuştur. Fakat ilginç bir şekilde, *Drosophila melanogaster* (CG3983), *Caenorhabditis elegans* (K01C8.9), *Saccharomyces cerevisiae* (Nug1) ve *Schizosaccharomyces pombe* (Grn1)'nin tamamen sekanslanan genomlarında hem nükleostemin hem de GNL3L'nin yalnızca tek bir homoloğu bulunmuştur ve bu homoloğa GNL3 adı verilmiştir. *Anopheles gambiae* ve *Arabidopsis thaliana* gibi henüz genom sekansları tamamlanmamış olan omurgasız türleri için ise hala sadece bir tane GNL3 ve Ngp-1 tanımlanmıştır. GNL3'ün protein ürünleri, insan nükleostemini ve GNL3L'sine benzer bir homoloji taşıırken, Ngp-1 ise mayadan insana yüksek derecede korunmuş tek bir gen olarak varlığını sürdürmektedir (Tsai and Meng 2009).

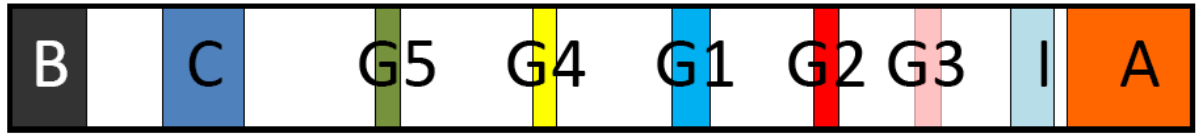
2.1.2. Nükleosteminin yapısı ve lokalizasyonu

Nükleostemin çekirdek içinde yer almaktadır. Üçüncü kromozomun p kolunda yer alan nükleostemin geninin büyüklüğü 8578 bazdır. Nükleostemin 549 aminoasit dizisinden oluşan, yaklaşık olarak 61993 Da büyüklüğünde olan bir proteindir (Genecards 2009) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Üçüncü kromozom üzerinde yer alan nükleostemin geninin yerleşimi p21.31 ile p14.3 bantları arasında gösterilmektedir (<http://www.genecards.org/cgi-bin / carddisp .pl? gene=GNL3>)

Nükleostemin yapısal olarak; bir NH₂- terminal ana (B) domain, bir ‘coiled-coil’ (C) domain, beş GTP-bağlayıcı motif (G5, G4, G1, G2 ve G3), bir COOH-terminal asidik domain (A) ve G3 motif ile A domain arasında yer alan engelleyici (I) domainden meydana gelmektedir (Şekil 2.4). Nükleolar lokalizasyon için NH₂-terminal ana domaine ihtiyaç duyulmaktadır. C-domain, I-domain veya A-domaindeki delesyonlar çekirdekçikteki nükleosteminin statik dağılımını etkilemez. Bu durum B-domain ve GTP-bağlayıcı motifin nükleosteminin nükleolar hedeflenmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. I-domain, GTP bağlanmadığında NS’nin nükleolar tutuklanmasını bloklamaktadır (Tsai and McKay, 2005). Nükleosteminin nükleolar lokalizasyonu için GTP-bağlayıcı motifler gereklidir. Hücre içi GTP seviyesinin azalması sadece NS’nin çekirdeksel translokasyonuna değil aynı zamanda NS’nin belli bir MDM2 bağımlı yolda ani proteozomal degradasyonunda da sebep olmaktadır (Huang *et al.*, 2011).



Şekil 2.4. Memeli nükleosteminin alt birimleri. 1-47 (46 adet) arası amino asitleri içeren N-terminal ana domain (B), ana domaini izleyen ‘coiled-coil’ domain, ‘coiled-coil’ domaini izleyen beş adet GTP-bağlayıcı motifler, GTP-bağlayıcı motifleri takip eden engelleyici domain (I). (Tsai and McKay, 2005)

Nükleostemin, nükleoplazmada düşük oranda bulunur (Tsai and McKay 2002). Çekirdekçik ile nükleoplazma arasında çift yönlü olarak taşınır. Bu çift yönlü olarak gidip geliş hızlı ve hücre tipinden bağımsız bir olaydır (Tsai and McKay 2005). GTP-bağlayıcı motiflerini çekirdekçik ile nükleoplazma arasında geçişi kontrol etmede bir moleküler anahtar olarak kullanılmaktadır. B-domain ve GTP-bağlayıcı motiflerinin her ikisi de nükleosteminin nükleolar lokalizasyonuna katkıda bulunur. NS, RNA sentezinin inhibisyonunu da kapsayan çeşitli hücrel stres etkenlerine cevaben çekirdekçikten nükleoplazmaya gidip gelmektedir (Huang *et al.*, 2011). GTP-bağlayıcı motiflerin uzaklaştırılması sonucunda p53 bağımlı apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. Buna göre de Nükleostemin’in p53 aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir (Tsai and McKay 2002).

Nükleosteminin, nükleolar lokalizasyon ve fizyolojik koşullar altında tümör baskılayıcı p53 ile etkileşim için gerekli olan bir ana domain içerdiği bilinmektedir (Tsai and McKay 2005). Nükleosteminin iki GTP bağlanma motifleri taşıyan amino ucu nükleosteminin çekirdek için yerleşimi için önemlidir. Nükleosteminin yapısında ayrıca bir çift kıvrımlı bükülme bölgesi ve asidik karboksil ucu yer almaktadır (Bernardi and Pandolfi 2003).

G1 veya G4 GTP-bağlayıcı domainin delesyonu hücre döngüsünün durdurulmasına ve apoptoza neden olurken, NH₂-terminal ana domainin delesyonu hücre döngüsüne giren hücrelerin sayısında artışa ve daha az hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. G1 ve ana domainin her ikisinin de delesyonu bazı hücreleri apoptoz aracılı hücre ölümünden kurtarır (Tsai and McKay 2002, Dai *et al.* 2008). Böylece, nükleostemin, kök hücreler ve kanser hücrelerinde hücre döngüsü devamlılığının kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Zhang *et al.* 2009).

NS'nin siRNA ile susturulma deneyleri veya proteolitik parçalanması sonucu tamamen kaybolması p53 artışı, hücre döngüsünün durması veya apoptoza neden olurken, heterozigot olarak kaybolması ise hücre yaşlanmaya sebep olmaktadır (Huang *et al.*, 2011).

Nükleosteminin çekirdek ve nükleoplazma arasındaki gidiş gelişinin kontrolü GTP bağlanması ile olabileceği düşünülmektedir. GTP bağlı olmadığında çekirdekte yerleştiği bilinmektedir (Bernardi and Pandolfi 2003, Misteli 2005). Nükleosteminin amino ucundaki temel bölge, çekirdekte yer alması ve p53 etkileşimi için gereklidir (Bernardi and Pandolfi 2003) (Şekil 2.5.).

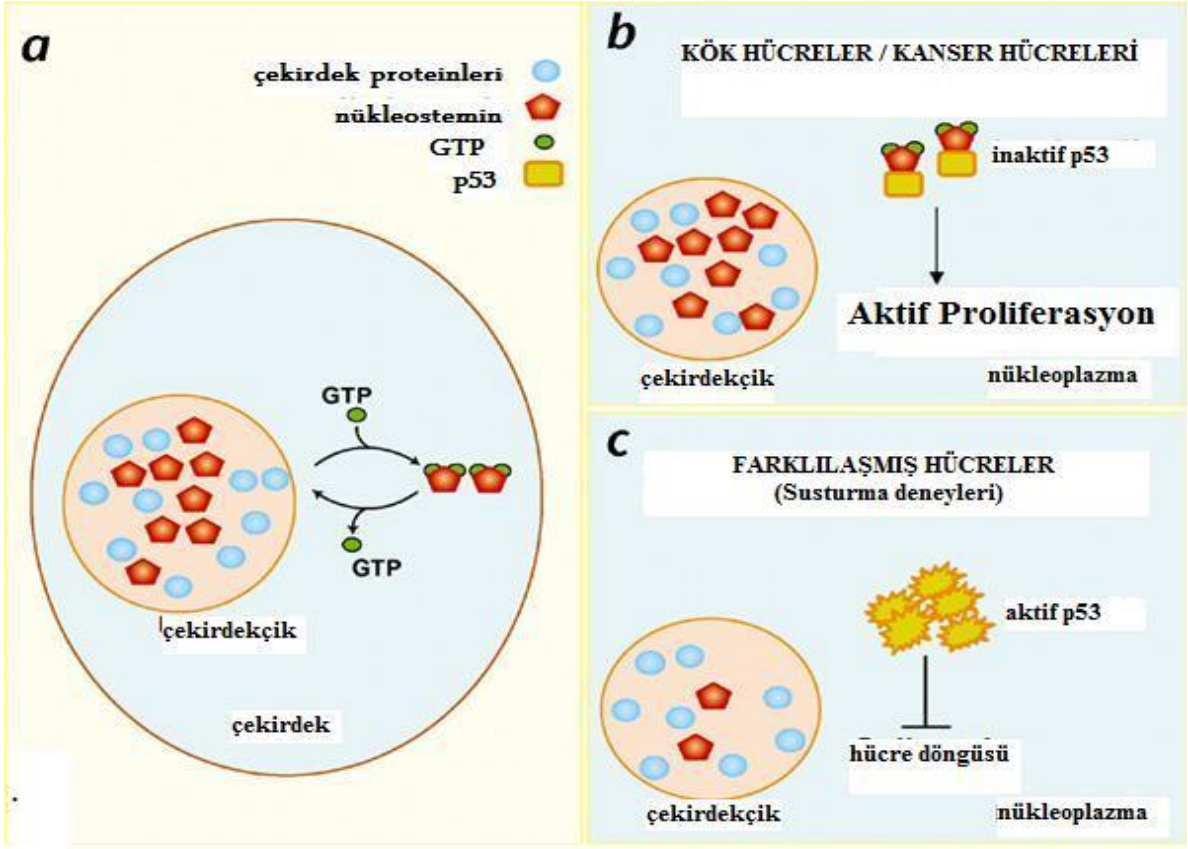
Huang ve arkadaşlarının 2011 yılında reaktif oksijen türlerinin (ROS) NS oligomerizasyonu ve protein degradasyonunu düzenlemesi üzerine yaptığı çalışmada NS'nin 9 adet sistein rezidusu içerdiği bildirilmiştir. 9 adet sistein rezidusu içeren NS, oksidatif strese cevaben oligomerler oluşturmaktadır. Sisteinlerin oksidatif modifikasyonları; protein konformasyonu, aktivitesi, lokalizasyonu, stabilitesi veya başka proteinlerle etkileşimde değişimlere neden olmaktadır.

ROS'lar; NS oligomerizasyonuna, bozulmuş protein degradasyonuna ve daha bariz oksidatif koşullar altında NS'nin çözünürlüğünün azalarak çekirdekte tutuklu kalmasına sebep olmaktadır (Huang *et al.*, 2011).

ROS seviyeleri proteinleri GTP tüketimi ile bozunmaya karşı dengede tutsa da aynı zamanda NS protein ekspresyonunun bazal seviyesini artırmaktadır. Ancak ROS'un NS protein seviyelerini nasıl düzenlediği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Huang ve arkadaşları bu durum için bir hipotez öne sürmüşlerdir. Bu hipoteze göre; potansiyel bir mekanizma, yüksek moleküler ağırlıklı NS oligomerlerinin ROS aracılı formasyonu tarafından NS'nin degradasyonunun düzenlenmesine yol açmaktadır. Bu oligomerler azalmış NS proteolizi tarafından oluşturulmaktadır. Alternatif olarak ROS seviyelerinin, sürmekte olan NS degradasyonundan sorumlu proteazların aktivitesini direkt olarak değiştirebileceği öne sürülmüştür. NS'nin hücrel lokalizasyonu, NS'nin fonksiyonunun düzenlenmesinde rol alan bir diğer ana faktördür.

Gidip gelen bir protein olarak NS çekirdekteki çekirdeğe doğru serbest kaldığında hem MDM2 hem de p53 ile bağlanmaya meyillidir. Artan oksidasyon ile beraber NS çekirdekte tutuklu kalarak geri dönüşümü olmayan bir oksidasyona uğrar ve çözünmez fraksiyonlara dönüşür.

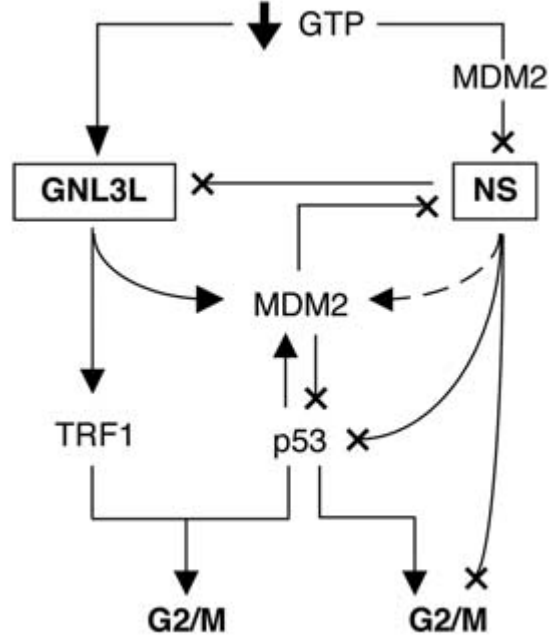
Artan ROS seviyeleri NS fonksiyonu tamir edilemez bir biçimde değiştirmektedir. NS, iki adet nükleolar hedefleme bölgesi içerir. Bu bölgeler N-terminal ana domain ve GTP-bağlanma domainidir. Bu iki domainin delesyonu büyük ölçüde nükleoplazmik birikmeye sebep olmaktadır. Dört adet sistein içeren bir bölümün delesyonu hem protein seviyesinin hem de nükleolar lokalizasyonunun azalmasına neden olur (Huang *et al.*, 2011).



Şekil 2.5. Nükleosteminin çekirdek ile nükleoplazma arasındaki gidiş gelişini. (a) İki ayrı GTP bağlama bölgesi içeren nükleosteminin çekirdek ve nükleoplazma arasındaki gidiş gelişinin düzenlenmesi GTP bağlanması ile olmaktadır. GTP'ler ayrıldığında çekirdekçikte bulunan nükleostemin, GTP'ler bağlandığında nükleoplazmada yer alır. (b) Kanser hücreleri veya kök hücrelerde nükleosteminin gen ifadesinin artışı ile, GTP bağlı nükleosteminlerin nükleoplazmaya çıkarak amino ucu temel bölgesi ile p53'e bağlanıp, p53'ün hücrede birikmesi önlenerek aktif hücre bölünmesine neden olur. (c) Hücre farklılaşması sırasında nükleostemin, p53'ün etkinleştirilmesi ve belli bir düzeyde tutulması yönünde çalışmaktadır. Nükleosteminin aşırı ifadelmesi veya delesyon mutasyonları sonucunda hücre, yaşam döngüsünden çıkmakta veya apoptozis ile ortadan kalkmaktadır (Bernardi and Pandolfi 2003)

2.1.3. Nükleosteminin diğer proteinlerle etkileşimi

Memelilerde proteinlerin birçoğunun nükleosteminle etkileşim içinde olduğu görülmektedir. Fonksiyonel sonuçlar, nükleosteminin p53 (Ma and Pederson 2007, Tsai and McKay 2002), MDM2 (Mouse double minute 2) (Dai *et al.* 2008, Meng *et al.* 2008), TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) (Zhu *et al.* 2006), ARF (alternative reading frame) (Ma and Pederson 2007) ve RSL1D1 (ribosomal L1 domain containing 1) (Meng *et al.* 2006) ile etkileşim içinde olduğunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. GNL3L ve NS'nin diğer proteinlerle etkileşimi. GNL3L ve NS, MDM2-p53 yolağında karmaşık düzenleyici bir ağ oluşturmaktadır. Her iki protein de MDM2'nin dengede tutulmasında benzer faaliyetler gösterir ancak düzenleme biçimlerinde farklılıklar bulunmaktadır. Ok işaretleri ve X'ler sırası ile uyarıcı veya baskılayıcı fonksiyonları belirtmektedir. Kesikli çizgiler ise nükleolar mekanizmalar tarafından düzenlenen bir olayı göstermektedir (Meng et al., 2011)

p53, MDM2, RSL1D1 (ribosomal L1 domain-containing 1) ve TRF-1 (telomeric repeat binding factor 1) gibi bir takım çekirdek proteinleri NS ile etkileşim içerisindedir. Bu farklı proteinlerin NS ile etkileşimi sayesinde olan regülasyonları, hücre döngüsünün fonksiyonel değişimi ve telomer devamlılığında önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bu regülasyonun mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Huang *et al.*, 2011). Çoğu Nükleostemin etkileşimli proteinler GNL3L'ye karşı benzer bağlayıcı afiniteler göstermektedir.

Nükleostemin ile etkileşen RSL1D1, östrojen-ilişkili reseptör (ERR) ailesi proteinleri ve sadece GNL3L bağlayan TERT (telomeras revers transkriptaz) ise GNL3L ile nadir ilişkili proteinler arasında yer almaktadır. RSL1D1 bağlanması nükleosteminin nükleolar birikiminde rol oynamaktadır. (Fu ve Collins, 2007; Yasumoto ve ark., 2007). Buna bağlı olarak GNL3L ve RSL1D1 arasında bir etkileşim olmaması GNL3L'nin çekirdekte çok kısa süre kalmasını açıklayabilir (Meng *et al.* 2006). GNL3L, bir tek yolda TRF1 ile etkileşimden kaynaklanan zıt etkiler gösterebilir.

GNL3L, TRF1 protein dengesi üzerinde TRF1'in ubiquitilasyonunu önleyen bir ters etki gösterirken nükleosteminin aşırı ifadenmesi TRF1'in degradasyonunu destekler (Zhu *et al.* 2009).

Yoshida ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışma, NS'nin çoğalmayı destekleyen fonksiyonunun sadece p53'e bağlanabilme aktivitesi ile ilgili olmayabileceği fikrini ortaya atmıştır ve NS'nin p53 dışında başka araçlar ile de bağlantılı olabileceğini söylemektedir. Bu araçlardan biri olarak p27 geni gösterilmektedir. NS'nin p27 ekspresyonunu düzenleyebildiği ve bu molekül aracılığı ile hücre döngüsünün durmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Oral yassı hücre karsinoması hücrelerinde yapılan bu çalışma NS'nin hücre döngüsünü durdurmak için p53 bağımsız bir yolağı kontrol edebileceğini öne sürmektedir (Yoshida *et al.*, 2011).

2.1.4. Nükleosteminin olası işlevleri ve biyolojik fonksiyonu

Nükleostemin (NS); embriyonik kök hücreler, erişkin merkezi sinir sistemi hücreleri, kemik iliğindeki primitif hücreler ve meme kanseri, renal karsinom ve akciğer kanser hücreleri gibi kanser hücrelerinin çekirdekçisinde ve kanser hücre hatlarında lokalize olmuş ancak bazı erişkin dokuların farklılaşmış hücrelerinde bulunmayan nükleolar bir proteindir (Tsai and McKay 2002, Liu *et al.* 2004). Esas olarak nükleostemin bir p53 bağlama proteindir. Çoğalmakta olan hücrelerde oldukça fazla eksprese edilen nükleostemin hücre proliferasyonunun düzenlenmesi için gereklidir. İlk olarak farklılaşmış hücelere nazaran insan kök hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilen bir protein olarak keşfedilmiş ve temelde sinirsel kök hücrelerde (NKHler) ve insan kanser hücrelerinde ekspresyonu artmış bir gen olarak tanımlanmıştır (Tsai and McKay 2002).

Daha sonra kök hücrelerin diğer birçok türlerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Baddoo *et al.* 2003, Tsai and McKay 2002). Ayrıca belirli kanser tiplerinde de ekspresyonu saptanmıştır (Kaplan *et al.* 2008).

İşlevsel olarak, erken embriyogenez için olduğu kadar (Beekman *et al.* 2006, Zhu *et al.* 2006) embriyonik NKH'lerin ve insan kanser hücrelerinin (Tsai and McKay 2002) *in vitro* çoğalması için de gereklidir. Erken embriyogenezde nükleostemin ve nükleostemin-ilişkili genlerin gerekli bir rolü olduğu tüm türler için saptanmıştır (Tsai and Meng 2009).

Nükleostemin, düzenleyici yollarda görev alır ancak hakkındaki kanser ve kök hücrelerde eksprese edilmesine rağmen bazı farklılaşmış hücrelerde neden bulunmadığı, ekspresyon hatalarının hangi tümörlerde olduğu ve mekanizmaları, kanser hücrelerindeki reaktivasyonunun zamanlamasının ne olduğu gibi esaslar tam olarak bilinmemektedir (Liu *et al.* 2004). Kök hücre ve kanser hücreleri arasında bulunan benzerliklere göre tümörler normal kök hücrelerin dönüşümünden kaynaklanabilmektedir. Bazı sinyal yollarının kök hücre ve kanser hücrelerinde kendini yenileme durumunu düzenleyebildiği düşünülmektedir (Reya *et al.* 2001). Nükleosteminin ekspresyon seviyesi belirgin olarak embriyo dönemi ve kök hücrelerin farklılaşmasından dolayı erişkin gelişimi süresince azalır. Örneğin, tercihen nöroepitelial öncüllerinde embriyogenez süresince eksprese edilir ancak merkezi sinir sistemi farklılaşması boyunca ekspresyonu azalır. Ayrıca nükleosteminin ekspresyonu erişkin kemik iliği hematopoetik kök hücrelerinde de görülürken, işlenmiş B-lenfositlerde ve granüositlerde bulunmamaktadır (Liu *et al.* 2004).

Nükleostemin esas olarak hücre büyümesinde ribozom biyogenezinin gerçekleşmesi gibi anahtar olayların meydana geldiği çekirdekçikte lokalize olur. Bu durumda nükleolar ve nükleoplazmik bölge arasındaki nükleostemin miktarı çekirdekçiğin aktivitesini düzenlemek için bir yol sağlayabilir (Tsai and McKay 2005). Bu fikrin temeli çekirdekçiğin boyutu, nükleolar aktivite ve hücre büyüme oranı arasındaki pozitif korelasyonun gösterilmesine dayanmaktadır (Derenzini *et al.* 1998, 2000). Özellikle öncül RNA yapımında ribozom biyogenezinin bir parçası olarak yeni bir role sahiptir (Romanova *et al.* 2009).

Nükleosteminin kanser hücreleri ve kök hücrelerinde hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Özellikle mide kanseri, karaciğer kanseri (Liu *et al.* 2004) ve prostat kanserinde (Liu *et al.* 2008) büyümenin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Prostat kanserinin bulunduğu dokularda ve hücre serilerinde nükleostemin ifadesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmada nükleosteminin gen ifadesi susturulduğunda prostat kanseri hücre serisi PC-3'ün çoğalabilme kapasitesinin anlamlı oranda baskılandığı gösterilmiştir (Liu *et al.* 2008).

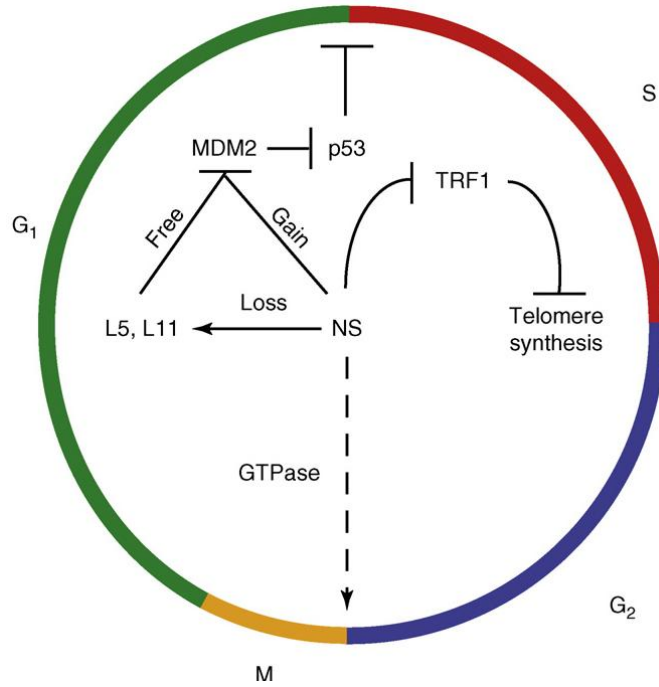
Nükleosteminin, nöron, kanser ve embriyonik kök hücrelerde ve kanser hücre serilerinde de ifadelendiği belirlenmiştir (Tsai and McKay 2002, Yang *et al.* 2005, Maki *et al.* 2007, Liu *et al.* 2008, Ma and Pederson 2008). Hemen hepsinde ilginç olan bulgu nükleostemin gen ifadesinin hücrel farklılaşma ile birlikte belirgin bir şekilde azalmasıdır. Nükleostemin, embriyogenez sırasında nöroepitel öncü hücrelerinde ve yetişkin kemik iliği hematopoietik kök hücrelerde ve yetişkin kemik iliği hematopoietik kök hücrelerinde ifadelenmektedir (Kafienah *et al.* 2006).

Kemik iliği kök hücreleri osteositlere farklılaştığında nükleostemin ifadesinin baskılandığı belirlenmiştir (Bernardi and Pandolfi 2003, Kafienah *et al.* 2006). Yaghoobi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2005) nükleosteminin, kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmasını sürdürmede rol aldığı ve farklılaşmış hücrelerin çoğunda ifadelenmediği belirtilmiştir (Yaghoobi *et al.* 2005).

Sıçan kemik iliği stroma hücrelerinde, nöronal farklılaşmaya yönlendirilmeden önce ve sonra, proliferasyonun ve farklılaşmanın düzenlenmesinde anahtar rol oynayan nükleostemin, Oct-4 ve Nanog gibi proteinlerin ifadelenmeleri ile karşılaştırılmıştır (Yaghoobi *et al.* 2005). Elde edilen veriler göstermiştir ki, Oct-4 ve Nanog proteinleri farklılaşmış veya nöronal farklılaşma gösteren hücrelerde hiç ifadelenmemekte, nükleostemin bu proteinlerin aksine farklılaşmamış kemik iliği kök hücrelerinde yüksek düzeyde ifadelenmektedir (Yaghoobi *et al.* 2005).

Bu verilerden yola çıkarak hücrede önemli düzenleyici işlevleri olan proteinlerden biri olan nükleosteminin kardiyak kök hücre kültüründeki yüksek ifadenmesi hücre çoğalmasını artırırken, kromozomlarda telomer uzunluğu aynı kalmakta ve farklılaşma durmaktadır (Siddiqi, S. ve ark., 2008).

Nükleostemin hücre çekirdeğinde, Murine Double Minute-2 (MDM-2) proteini ile fiziksel olarak ilişki içindedir ve MDM-2'nin merkezindeki asidik bölgeye bağlanır (Dai *et al.* 2008). Nükleostemin miktarının artması, p53'e bağlanarak p-53'ün yıkımını sağlayan MDM-2 proteininin tutulmasına neden olur. Bu durum hücrede p53'ün ubiquitinlenerek yıkılmasını engeller. Hücrede p53'ün birikmesi sonucunda hücre döngüsü G1 aşamasında kalır ve hücre bölünmesi engellenmiş olur (Dai *et al.* 2008) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Nükleosteminin hücre döngüsünün ilerlemesindeki rolleri. NS'nin hem kaybı hem de artışı p53'ü aktive eder ve MDM2-p53 iletişim ağının bozulması nedeni ile hücre G1 aşamasında tutuklu kalır. NS'nin kaybının nükleolar L5 ve L11 proteinlerinin nükleoplazmaya salınmasına sebep olduğu ve bu proteinlerin nükleoplazmada MDM2'ye bağlanarak MDM2'nin ubiquitin ligaz aktivitesini engellediği öngörülmektedir. Buna karşın fazla ifadenmiş NS ise direkt olarak MDM2 ile etkileşim içerisindedir ve bu durum da MDM2'nin ubiquitin ligaz aktivitesini p53 birikmesine yol açarak engellemektedir. NS'nin ayrıca bir telomeraz inhibitörü olan TRF1'in görevini de engelleyerek telomeraz sentezinin devamlılığında rolü olduğu düşünülmektedir (Ma and Pederson, 2008).

Dai ve arkadaşlarının 2005’de yaptığı çalışmada nükleostemin geninin susturulması sonucunda MDM-2’nin L5 ve L11 ribozomal proteinlerle etkileşime girerek yine p53 yıkımını engellediği gösterilmiştir. Hücresel nükleostemin miktarının MDM-2 üzerinden hücre döngüsü kontrol noktalarını p53 bağımlı olarak denetlediği gösterilmiştir (Dai *et al.* 2008).

Nükleosteminin *in vivo* ortamdaki fizyolojik rolü, nükleostemin alelleri etkisizleştirilmiş mutant fare çalışmaları ile belirlenmeye çalışılmıştır. Nükleostemin^{-/-} embriyoların 4. günde öldükleri belirlenmiştir (Beekman *et al.* 2006). Nükleostemin mutant blastosistlerin kullanıldığı araştırmalar sonucu elde edilen verilere göre pluripotensinin sürdürülmesinde, çekirdekçik bütünlüğünün korunmasında ve embriyonik kök hücrelerin yaşamını sürdürmesinde gerekli olmadığı, ancak nükleostemin alelleri homozigot mutant olan blastosistlerde fonksiyonel p53’ün yokluğunda bile S fazına girişi engellediği belirlenmiştir (Beekman *et al.* 2006).

Bu veriler doğrultusunda şu sonuç elde edilmektedir; nükleosteminin atasal fonksiyonu p53’den bağımsız olarak, kök hücre/öncü hücre çoğalma oranının kontrolünü sağlamaktır (Beekman *et al.* 2006). Nükleosteminin bu oranın kontrolünü sağlarken asimetric bölünme mekanizmalarında bir fonksiyonunun olup olmadığı konusunda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Asimetric hücre bölünmesi sitoplazmik determinantların yerleşimine ve mitoz mekiği mikrotübülüslerinin düzgün dizilmiş olmasına bağlıdır. Halkalı solucanda germ kök hücrelerinin bölünmesinde ve larva büyümeleri için nükleosteminin gerekli olduğu belirlenmiştir (Kudron and Reinke 2008). Nükleosteminin ribozom biyogenezini etkileyerek veya kök hücreye özgü ve çoğalma yeteneği yüksek hücrelerde olduğu gibi çekirdek kökenli diğer aktiviteleri etkileyerek çoğalmayı kontrol edip etmediği çok açık değildir. Ancak bu çalışmada halkalı solucandaki nükleostemin (nst-1) geninin yokluğu soma hücresindeki büyüme hasarı nedeniyle larva aşamasında durdurulmuş fenotipe yol açmaktadır. Nst-1 mutantlarda ribozom biyogenezindeki hasar nedeniyle rRNA’ların düzeylerinin düştüğü ileri sürülmektedir (Kudron and Reinke 2008).

Nükleostemin “telomeric repeat-binding factor 1(TRF1)” ile de ilişki içindedir ve bu proteinin yıkımını arttırmaktadır (Zhu *et al.* 2006). Ancak bunu ubiquitinasyon aracılığıyla yapmadığı düşünülmektedir. TRF1 embriyogenezin erken safhalarında önemlidir ve telomer uzunluğunu olumsuz yönde etkiler. Bu çalışma nükleosteminin fare embriyon fibroblastlarının yaşlanmasının gecikmesi ve erken embriyogenezle ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır (Zhu *et al.* 2006).

H1299 (p53’süz küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi) hücre dizisinde çekirdekte nükleostemin varlığı gösterilmiştir. Bu protein hücre döngüsünün interfaz aşamasında çekirdekte yoğun bir şekilde gözlenirken nükleoplazmadaki miktarı düşük olarak gözlenmiştir. Mitoz bölünmede ise nükleosteminin çekirdek bölgesi ile ilişkisinin azaldığı ve sitoplazmaya yayıldığı belirlenmiştir (Tsai and McKay 2002).

Nükleostemin delesyonu G2-M ve G1-S hücre döngüsü fazlarının değişiminde hatalara neden olmaktadır. GNL3L bağlanması, kendi koaktivatörü ile yarışarak ve telomer uzamasını engelleyerek ERR familyası proteinlerinin transkripsiyonel aktivitelerini baskılar, bu da GNL3L’nin nükleosteminden daha geniş aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Nükleostemin ve GNL3L’nin tek bir yolda zıt etkiler ortaya koyabileceğini destekleyen tek kanıt onların TRF1 ile olan etkileşimlerinden gelmektedir. Nükleostemin’in aşırı ekspresyonu TRF1’in degradasyonunu düzenler (Zhu *et al.* 2006); buna karşın GNL3L, onun ubiquitinasyonunu engelleyerek TRF1 protein stabilitesi üzerinde zıt bir etki yaratmaktadır (Zhu *et al.* 2009).

Tümör baskılayıcı p53’ün destabilizasyonu veya inaktivasyonu hücre proliferasyonunun devamlılığını sağlamak için gerekmektedir (Vogelstein *et al.* 2000). Bununla birlikte, p53’ün hücre döngüsünün devamlılığı veya döngüden çıkıştan sorumlu birçok potansiyel upstream regülatörlerinin neler olduğu hala tam anlamıyla bilinmemektedir (Tsai and McKay 2002, Baddoo *et al.* 2003, Liu *et al.* 2004).

p53; hipoksi, besin kıtlığı, ısı şoku ve DNA hasarının da dahil olduğu pek çok stres sinyaline karşılık hücre döngüsünün durdurulmasına neden olan esas düzenleyici proteindir (Vogelstein *et al.* 2000, Vousden 2006). Bu uyarıcılar sık sık nükleolar organizasyonda düzensizlik başlatır ve p53 aktivasyonuna neden olur. Tüm bu veriler çekirdekçiğin strese cevaben hücre döngüsünün modülasyonunda rol oynadığını kanıtlamaktadır (Rubbi and Milner 2003, Horn and Vousden 2004, Raksa *et al.* 2006).

Nükleostemin ve p53 öncelikle nükleoplazmik bir etkileşim aracılığıyla çalışır (Tsai and McKay 2002, Tsai and McKay 2005). Tümör baskılayıcı protein olan p53, çeşitli stres durumlarında DNA tamiri, senesens, apoptozis ve hücre döngüsü durdurulmasına neden olan protein ürünleri üreten birçok hedef geni düzenlemektedir. Stres altında olmayan hücrelerde, p53 inhibitörü olan MDM2 (Murine Double Minute-2) tarafından düşük seviyede tutulur. MDM2, p53'ün negatif regülatörüdür. Çeşitli streslere cevaben p53, MDM2'nin inhibisyonu aracılığıyla dengede tutulur ve fazlaca aktive edilir. Bu stresler DNA hasarı, onkogenik ve nükleolar streslerdir. DNA hasarı hem p53 hem de MDM2'nin fosforilasyonunu indükler ve dolayısıyla p53'ü aktive eder (Meng *et al.*, 2011).

Onkogenik stresler ise tümör baskılayıcı protein olan p14ARF (alternate reading frame [ARF])'nin ekspresyonunu indükler. P14ARF, MDM2'ye bağlanarak onu inhibe eder ve MDM2'nin p53'e bağlanmasını önler. P14ARF MDM2'ye bağlanarak onun çekirdekçikte tutulmasını sağlar. Böylece MDM2 p53'e bağlanamaz ve p53 degradasyonu gerçekleşemez. P14ARF, p53'ün pozitif regülatörüdür.

Tümör baskılayıcı p14ARF kesin olarak nükleostemin ile ribozom-seyrek nükleolar bölgelerde kolokalizdir. P14ARF, nükleosteminin bir upstream regülatörüdür (Ma and Pederson 2007). Nükleostemin'in p53 ile etkileşimi olduğu düşünülürken (Tsai and McKay 2002), p14ARF'nin, p53'ü degrade eden MDM2'ye bağlanarak p53'ü degradasyona karşı stabilize ettiği bilinmektedir. Nükleosteminin ortamda bulunmaması p53'ü up-regüle eder. Nükleofosmin ve Nükleolin gibi bir çok nükleolar protein ve L5, L11, L23 ve S7 gibi ribozomal proteinler MDM2'ye direk olarak bağlanabilir ve p53'ün aktivasyonuna olanak verir (Ma and Pederson 2007).

Nükleostemin'in fazla ekspresyonunun N-terminal ana domaini aracılığıyla p53'ü aktifleştirerek hücre farklılaşmasını durdurmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Ancak p53'ü nasıl aktifleştirdiği ve MDM2 aktivitesi üzerinde bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Mu-Shui ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma nükleosteminin hem fazla ekspresyonunun hem de azalmasının MDM2 aktivitesini inhibe ederek p53'ü aktive ettiğini insan H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu) ve U2OS (insan osteosarkoma) hücre serilerinde göstermiştir. Nükleostemin, fazla eksprese edildiğinde direk olarak MDM2'ye bağlanarak p53'ü dengede tutup p53 bağımlı hücre döngüsünün durdurulmasını indükler (Mu-Shui *et al.* 2008).

Nükleosteminin fazla ekspresyonu ayrıca hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu etki kısmen nükleosteminin p53'e bağlanma yeteneğine dayandırılabilir (Zhu *et al.* 2006). Nükleostemin dinamik olarak çekirdekçik ile çekirdek plazması (nükleoplazma) arasında gidip gelir ve bu değiş tokuş GTP bağlama bölgesi sayesinde olur (Tsai and McKay 2005). Nükleostemin, çekirdekçik ile nükleoplazma arasında gidip gelirken nükleoplazmada MDM2 ile etkileşmektedir. MDM2, nükleosteminin merkezi 'coiled-coil domaini' içeren bölümüne bağlanır. Nükleostemin çekirdekçiğin ribozomlardan kısmen yoksun olan bölgelerinde (nasent) toplanmaktadır (Politz *et al.* 2005).

Ayrıca NS'nin fazla ekspresyonu endojen p53 aktivasyonu ile G1 arrestine yol açar (Mu-Shui *et al.* 2008). Nükleosteminin siRNA ile yıkımı da p53ü indükleyip G1 arrestine neden olmaktadır. G1 fazındaki hücre döngüsü bloklanması sonucunda hücre proliferasyonunun da inhibisyona uğradığı gösterilmiştir (Mu-Shui *et al.* 2008).

2.1.5. Nükleostemin ve doku rejenerasyonu

Hasar görmüş dokuları yenileme ve tamir etme kabiliyeti çok hücreli organizmaların yaşamlarının devamı için oldukça önemlidir ve iki mekanizma ile gerçekleştirilebilir. Bir tanesi kendisini yenileyebilen ve bir çok olgun kök hücreye başkalaşabilen rezerv bir hücre popülasyonunu oluşturmaktır.

Diğeri ise hasara karşılık olarak zaten farklılaşmış hücrelerin hücre döngüsüne tekrar girişini sağlamaktır. Bu açıdan bakıldığında nükleostemin, multipotent kök/progenitör hücreler ile olan bağlantısı dolayısıyla doku yenilenmesi ile ilişkilidir (Tsai and Meng 2009).

2.2. Glioblastoma Multiforme

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) 2000 yılında astrositik tümörleri anaplazi derecesine göre sınıflandırmıştır.

Çizelge 2.1. WHO santral sinir sistemi tümörleri histolojik sınıflandırması

NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ

1. Astrositik tümörler

- a. Diffüz astrositoma
 1. Fibriler astrositoma
 2. Protoplazmik astrositoma
 3. Gemiositik astrositoma
- b. Anaplastik astrositoma
- c. Glioblastoma multiforme
 1. Dev hücreli glioblastoma
 2. Gliosarkom
- d. Pleomorfik ksantroastrostitom
- e. Subependimal dev hücreli astrositom

2. Oligodendroglial tümörler

- a. Oligodendrogliom
- b. Anaplastik oligodendrogliom

3. Mixed gliomalar

- a. Oligoastrostitom
- b. Anaplastik oligoastrostitom

4. Ependimal tümörler

- a. Ependimoma
 1. Sellüler
 2. Papiller
 3. Clear cell
 4. Tanisitik
- b. Anaplastik ependimoma

- c. Miksopapiller ependimoma
- d. subependimoma

5. Koroid plexus tümörleri

- a. Koroid pleksus papillomu
- b. Koroid pleksus karsinomu

6. Nöronal ve mixt nöroglial tümörler

- a. Gangliositom
- b. Serebellumun displastik gangliositomu
- c. Desmoplastik infantil astrositom
- d. Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör
- e. Gangliogliom
- f. Anaplastik gangliogliom
- g. Santral nörositom
- h. Serebellar liponörositom
- i. Filum terminalenin paragangliomu

7. Nöroblastik tümörler

- a. Olfaktor nöroblastom (estesionöroblastom)
- b. Olfaktor nöroepitelyom
- c. Adrenal gland ve sempatik sinir sistemi nöroblastomu

8. Pineal parenkimal tümörler

- a. Pineasitom
- b. Pineablastom
- c. Orta derecede diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör

9. Embriyonal tümörler

- a. Medullaepitelyom
- b. Ependimoblastom
- c. Medullablastom
 - 1. Desmoblastik medullablastom
 - 2. Large cell medulloblastom
 - 3. Medullomyoblastom
 - 4. Melanositik medulloblastom
- d. Supratentoryel primitif nöroektodermal tümörler
 - 1. Nöroblastom
 - 2. ganglionöroblastom
- e. Atipik teratoid/rabdoid tümör

10. Orijini belirsiz glial tümörler

- a. Astroblastom
- b. Gliamatosis serebri
- c. 3. ventrikül koroid gliomu

PERİFERİK SİNİR TÜMÖRLERİ

1. Schwannoma

- a. Sellüler
- b. Pleksiform
- c. melanositik

2. Nörofibrom

- a. Pleksiform

3. Perinörom

- a. İntranöral perinörom
- b. Yumuşak doku perinöromu

4. Malign periferik sinir kılıfı tümörleri (MPSNT)

- a. Epiteloid
- b. Diverjant mezenkimal ve / veya epiteloid farklılaşma gösteren MPSNT
- c. Melanotik
- d. Melanotik psammomatöz

SELLAR BÖLGE TÜMÖRLERİ

1. Kraniofaringeom

- a. Adamantinomatöz
- b. Papiller

2. Granüler hücreli tümör

Bu sınıflandırmaya göre astrositik tümörler; pilositik astrositom (grade I), diffüz astrositom (grade II), anaplastik astrositom (grade III) ve glioblastoma multiforme (grade IV) olarak derecelendirilmiştir (Durmaz and Vural 2007). Bu tümörlerin görülme yaşı ve sıklığı birbirlerinden farklıdır. Son 15-20 yılda primer beyin tümörlerinin görülme oranının arttığı belirtilmiştir (Blumenthal and Schulman 2005). Yetişkinlerde saptanan en yaygın beyin tümörü Glioblastoma Multiforme (GBM)'dir. GBM, tüm beyin tümörlerinin %20-25'ini oluşturur. WHO, GBM'i nekroz ve vasküler proliferasyon özelliklerine göre grade IV olarak sınıflandırmaktadır.

GBM, kendi kendine çoğalma, kontrolsüz gelişme, dokuya invazyon yapabilme, apoptotik uyarıya direnç gösterme ve yeni kan damarı oluşturabilme gibi malign fenotipik özelliklere sahiptir (Sathornsumetee and Rich 2007).

Glioblastomlar moleküler temelde sekonder ve primer olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. GBM'lerin %90'ı primer GBM, %10'u ise sekonder GBM olarak tanımlanır. Primer GBM'ler glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler. Primer GBM'lerin öncesinde düşük dereceli gliomlardan sekonder olarak gelişir. Bu nedenle primer GBM'ler (60 yaş) sekondere göre (30-40 yaş) yaşlı insanlarda daha fazla görülmektedir (Durmaz 2007).

Düşük dereceli astrositomların glioblastoma dönüşmesi için geçmesi gereken süre ortalama 4-5 yıldır (Kraakstad and Chekenya 2010). Primer ve sekonder GBM, morfolojik olarak ayırt edilemez, her ikisi de hasta yaşı dikkat alınmadığında kötü prognoza sahiptir (Sarkar *et al.* 2009).

GBM, başlıca serebral hemisferde yerleşim gösteren infiltran tümörlerdir (DeAngelis 2001, Kleihues *et al.* 2007). En sık tuttuğu lokalizasyon frontal, en az tuttuğu lokalizasyon ise oksipital lob'dur. Glioblastomalar makroskopik incelemede çevre normal dokudan iyi sınırlarla ayrılmasına rağmen mikroskopik olarak incelendiğinde kitleden uzakta normal doku içine infiltrasyon göstermektedir (Louis *et al.* 2007). Yüksek derecede inzaziv tümör olduklarından tümörün çevresindeki normal beyin dokusunda ödeme ve ekspansiyona neden olurlar (Rossel *et al.* 2008).

Glioblastoma multiforme'nin neden olduğu semptom ve belirtilerin çoğu hızlı büyüme olan tümöre, çevresinde yaptığı ödeme, obstrüksiyona ve artmış kafa içi basınca bağlıdır. En yaygın belirtileri baş ağrısı, bulantı, kusma, epileptik nöbetler, nöromotor fonksiyon kaybı ve mental değişikliklerdir.

Tutulan tümör lokalizasyonuna bağlı olarak fokal bulgular da oluşabilir (Kraakstad and Chekenya 2010). GBM, tedavisi güç kanserlerden biridir, yüksek morbidite ve mortalite özelliklerine sahiptir.

GBM'in küratif tedavisi yoktur (Rossel *et al.* 2008). Hastaların yaşam süresi, en gelişmiş tedavi uygulamalarına rağmen ortalama 14.6 aydır (Kraakstad and Chekenya 2010). Hastaların %10'luk bir kısmının 2 yıllık yaşam süresine ulaşabildiği bilinmektedir. Bugün uygulanan standart tedavi biçimleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bu tedavi biçimleri tek başına yeterli değildir. Bu nedenle üç tedavi yaklaşımının da uygulanması tercih edilmektedir.

GBM güncel tedavi modeli,mümkün olan en geniş cerrahi rezeksiyon sonrasında adjuvant radyoterapi ve uygun olan hastalarda kemoterapi uygulamasıdır (Rossel *et al.* 2008).

2.2.1. Glioblastoma multiformenin genetik özellikleri

Canlının gelişimi, doku rejenerasyonu ve tamiri sırasında fizyolojik proliferasyondan sorumlu büyüme faktörlerini kodlayan genlere proto-onkogen denir. Fizyolojik koşullarda doku büyümesi protoonkogen ve tümör baskılayıcı genlerin kontrolü altında gerçekleşir. Onkogenler; proto-onkogenlerin delesyonu, amplifikasyonu, mutasyonu ve yeniden düzenlenmesi (rearrangement) sonucu oluşur. Şimdiye kadar 100'ün üzerinde onkogen saptanmıştır. Belli başlı onkogenler; büyüme faktörleri, hücre zarı reseptörleri, sinyal molekülleri, transkripsiyonel faktörler ve hücre içi iletim yolunda yer alan molekülleri kodlayan onkogenlerdir. Onkogenlerin kodladığı proteinler ise hücreye yeni fonksiyonlar kazandırır. Tümör baskılayıcı genler fizyolojik şartlarda proliferasyonu frenleyen veya durduran proteinlerin transkripsiyonundan sorumludurlar. Ancak tümör baskılayıcı genlerin delesyonu, amplifikasyonu, mutasyonu ve yeniden düzenlenmesi sonucunda fonksiyonlarını kaybetmesi büyümeyi baskılayıcı etkilerinin ortadan kalkması ile sonuçlanır.

Bütün kanser türlerinde olduğu gibi GBM dokusuna ait tümör hücrelerinde de yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, anjiyogenez, kontrolsüz çoğalma, doku invazyonu yapabilme ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir. GBM'in genetik yapısı heterojendir.

Aynı tümör dokusunda ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının değiştiği ve bu yüzden hastalığın “multiform” olarak isimlendirildiği bilinmektedir (Adamson *et al.* 2009, Krakstad and Chekenya 2010).

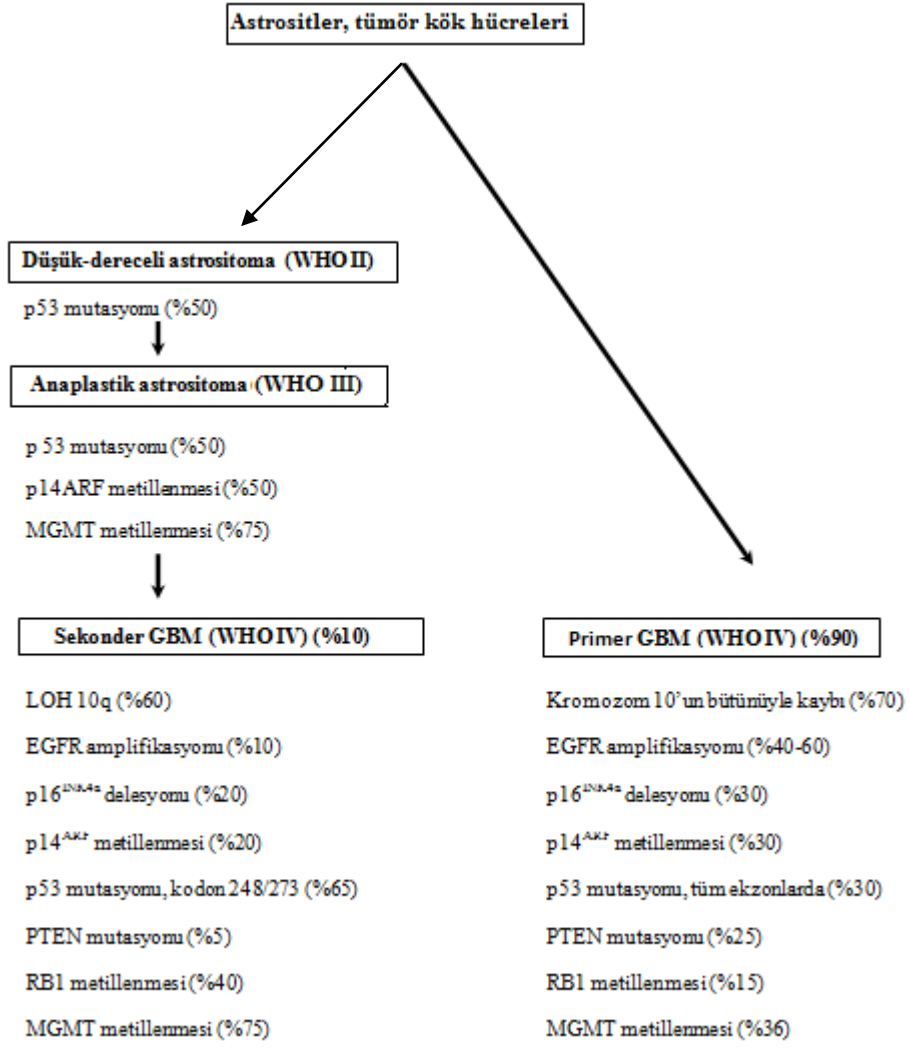
Primer ve sekonder GBM dokuları arasında klinik ve sitogenetik farklılıklar vardır (Sathornsumetee and Rich 2008). Sekonder GBM'de platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA), PDGFRA ligandı ve tümör baskılayıcı protein 53 (p53) genlerinde çeşitli genetik değişiklikler saptanmıştır. Ayrıca, p16^{INK4A}, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (pRB1) genlerinde mutasyonlar, siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK) ve insan double minute 2 (HDM2) genlerinin amplifikasyonu, kromozom 10 delesyonlar sekonder GBM'de saptanmış genetik değişikliklerdir (Sathornsumetee and Rich 2008, Sarkar *et al.* 2009).

Primer GBM'de ise epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), siklin bağımlı kinaz inhibitörü2 (CDKN2A) genlerindeki mutasyonlar ve kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı en çok görülen genetik değişikliklerdir. Kromozom 10q23'te meydana gelen heterozigosite kaybı (LOH) olguların %60-80'inde meydana gelmektedir ve bu bölgede bir tümör baskılayıcı gen olan fosfat ve tensin homolog (PTEN) geni bulunmaktadır (Krakstad and Chekenya 2010).

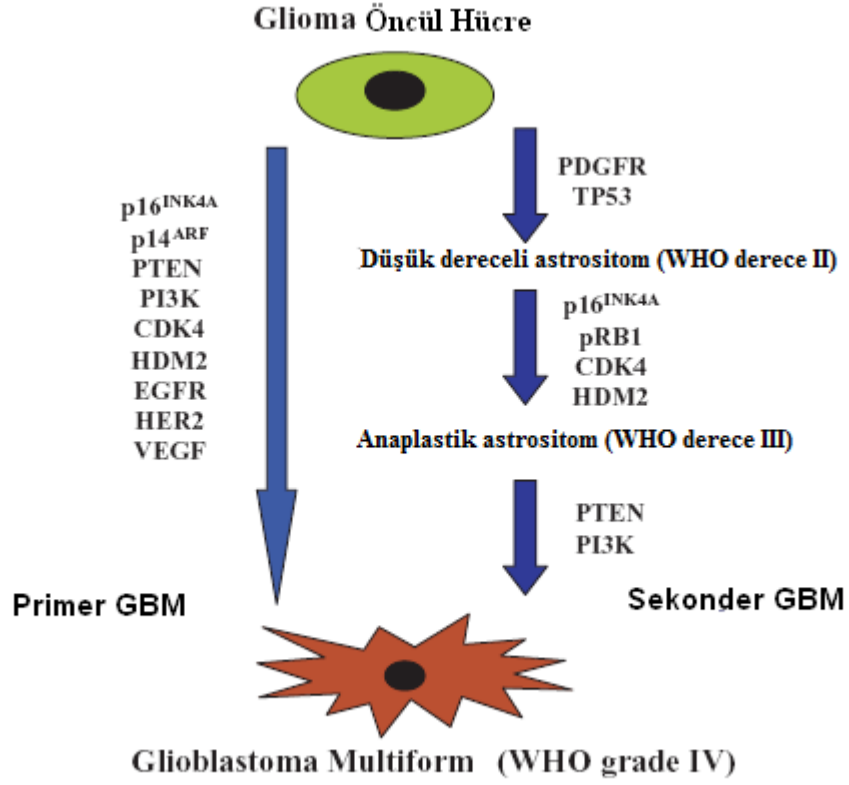
Primer GBM için EGFR amplifikasyonu, sekonder GBM için ise p53 mutasyonu karakteristik genetik değişikliklerdir (Sathornsumetee and Rich 2008). Parsons ve arkadaşları (2008), GBM olgularında yaptıkları genom analizinde en sık değişen genlerin p53 (%40),EGFR (%37) ve PTEN (%30) olduğunu bildirmiştir (Şekil 2.8.).

Ancak bu genetik değişikliklerin GBM tedavisinde prognostik değerinin olmadığı bilinmektedir. Primer ve sekonder GBM'lerde ortak genetik değişiklikler de vardır. Kromozom 10 kaybı, tümör baskılayıcı PTEN (Fosfat ve Tensin homoloğu) gen delesyonu, p16^{INK4A} gen mutasyonu veya delesyonu, HDM2 (human double minute 2), INK4 ve EGFR (Epidermal Growth Faktör Reseptörü) amplifikasyonu ortak genetik değişikliklerdir. Düşük evre beyin tümörlerinden GBM'e kadar olan genetik değişiklikler Şekil 2.9.'da özetlenmiştir (Sathornsumetee and Rich 2007).

GBM'de morbidite ve mortalite oranı yüksektir. Tedavisinde cerrahi işlemleri takiben radyoterapi (RT) ve kemoterapi uygulanmaktadır. Ortalama yaşam süresi, tedavi biçimine ve yaşa bağlı olarak 4 ay ile 18 ay arasında değişkenlik gösterir (Clarke *et al.* 2008). Populasyon çalışmalarında GBM hastalarının çok az bir kısmının 36 ay yaşadığı bildirilmiştir (Krex *et al.* 2007).



Şekil 2.8. Primer ve Sekonder GBM'deki önde gelen genetik değişimler (Ohgaki *et al.* 2004)



Şekil 2.9. Glioblastoma Multiforme, düşük grade astrositom ve anaplastik astrositomda saptanan majör genetik değişiklikler (Sathornsumetee and Rich 2007)

P53 mutasyonu ve “Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörleri” (PDGFR)’nin aşırı ekspresyonunun astrositom gelişiminde ilk genetik değişiklikler olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklere retinoblastom geninde mutasyonun veya delesyonun, bax genini içeren 19q’da olan kayıpların ve özellikle 10. kromozomun q kolunda olan delesyonların eklenmesi ile anaplastik astrositom ve sekonder glioblastom gelişmektedir. Yedinci kromozomda yerleşmiş “Epidermal growth factor receptors” (EGFR)’lerinin aktivasyonu, 9. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olan p16’nın homozigot delesyonları, hücre döngüsünde “Murine Double Minutes” (MDM2) proteinlerinin p53 bağımlı frenleyici etkiyi azaltması, kromozom 10’un hem p hem de q kolunda olan kayıpları yanında PTEN mutasyonu gibi genetik değişiklikler astrositik öncü hücreden *de novo* olarak direkt primer glioblastom gelişmesine neden olmaktadır.

GBM hücrelerinde saptanan ve canlılığı tetikleyen en önemli yolak fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağıdır. Çeşitli tirozin kinaz reseptörlerinin (EGFR, PDGFR vb.) büyüme faktörleri ile aktive edilmesi sonucu PI3K/Protein Kinaz B (PKB, AKT) yolağı aktifleşir ve nükleer faktör κ B (NF κ B) aracılığı ile yaşamı ve prolifersayonu düzenleyen genlerin aktive edilmesi sağlanır. PTEN mutasyonunun bu yolağı inaktive etmediğı belirtilmektedir.

Tirozin kinazların aktivasyonu sonucu tetiklenen diğeri bir yol ise Ras onkogeni aracılığı ile mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu yolağın aktivasyonu da, glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikler. GBM’de bu sinyallerin aktivasyonuna neden olan tirozin kinaz reseptörlerinde mutasyon meydana gelmesi sinyal yolaklarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu yolağın başında yer alan kinazları inhibe etmek için inhibitörlerin ve monoklonal antikorların kullanılması GBM’de alternatif bir tedavi yöntemi olmuştur. Bu yüzden, EGFR inhibitörleri (erlotinib, gefitinib) ve Akt inhibitörleri (perifosine) ile ilgili çalışmalar ile yaşam sinyallerinin diğeri üyeleri için inhibitör kullanımını geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Krakstad and Chekenya 2010).

Glioblastomlarda, gerek cerrahi, gerekse diğeri tedavi yaklaşımlarıyla tatminkar sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur (Durmaz 2007).

2.2.2. Epidemiyoloji

Glioblastoma multiforme (GBM) erişkin yaş grubundaki en sık primer beyin tümörüdür. Primer beyin tümörlerinin dağılımı büyük oranda yaşla ilintilidir. Glioblastomanın insidensi 14 yaş altında 100,000’de 0,2 - 0,5 iken, 45 yaş üzerinde ise 100,000’de 4 - 5’e çıkmaktadır. GBM’in tüm primer beyin tümörleri içindeki oranı değişik yayınlarda %20’den %50’e kadar değişmektedir. Erişkin yaş grubu ele alındığında primer beyin tümörlerinin yarısından fazlasını GBM oluşturur. ABD’de GBM için ortalama yaş 60 dolayındadır.

GBM primer olarak gelişebilmekle birlikte daha düşük evre glial tümörlerden de progresyon ile gelişebilmektedir. Bu iki tip GBM, primer ve sekonder GBM olarak anılmaktadır. Primer GBM daha yaşlılarda ve daha kısa klinik tablo şikayetlerle karşımıza çıkarken, sekonder GBM, daha gençlerde ve genellikle aylar veya yıllar süren klinik şikayetler ile ortaya çıkmaktadır.

Yıllar içinde de GBM sıklığı artmıştır. Özellikle gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarda ABD ve Kanada'da yetmişli yıllardan seksenli yılları ortalarına kadar tespit edilen glioblastom olguları yaklaşık 2 kat kadar artış göstermiştir. Bunun nedeninin ise teknolojik gelişmeler ile tespit edilme oranının artması olarak ortaya konmuştur. Yüksek evre glial tümörlerde buna benzer bir artış, son 7 yıl içinde %5'lik bir artış ile Fransa'da tespit edilmiştir.

GBM erkeklerde kadınlara göre, beyaz ırkda da siyah ırka göre bir miktar daha sıktır. GBM genellikle herhangi bir ailevi yatkınlık ya da tanımlanabilir bir çevresel etken olmaksızın sporadik olarak ortaya çıkar. Son zamanda yapılan çalışmalarda ortaya atılan hipotezlere göre düşük derece astrositomlardan basamak basamak GBM'e ilerleyiş kromozom 10 ve 17'de yerleşim gösteren supresör genlerin kademeli kayıplarından ileri gelmektedir. Bu kayıplar tümör büyümesini ve heterojenitesini artıran dominant onkojenlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Gliomalı hastalarda kromozom 10 ve 17'de kayıplar sıklıkla saptanmaktadır. Yine son zamanlarda primer ve sekonder GBM'lerde genetik profiller de farklılık göstermektedir. Primer GBM'lerde PTEN mutasyon veya delesyonları saptanırken sekonder GBM'lerde ise sıklıkla p53 mutasyonları gözlenmektedir. Tüm bu bulgular glial tümörlerde bir genetik köken olduğunu göstermektedir (Adilay 2006).

2.2.3. Glioblastoma multiforme'nin yerleşim bölgeleri

GBM'ler genellikle serebral hemisferlerin derin beyaz maddesinde yerleşir. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu hemisferlerde geniş dağılım göstermekle birlikte en sık olarak frontal lob ve oksipital lob parietal lob sınırlarında gözlenirler. Genellikle dağınık yerleşim gösterme özellikleri ve derin yerleşimleri nedenleri ile birden fazla fonksiyonel beyin bölgesini işgal ederler ki bu da cerrahilerini zorlaştıran ana etkenlerdendir. Serebral hemisferler dışında da yerleşim gösterebilirler.

Ayrıca GBM'lerin yaklaşık %10'u derin yerleşimli olmayıp, beyaz-gri cevher sınırında yerleşerek serebral metastazları taklit edebilirler (Burger *et al.* 1985, Burger *et al.* 1987).

2.2.4. GBM tedavisi

Glioblastoma multiforme tedavisinde son yıllarda gen tedavisi, antiangiogenez tedavi, lokal polimer ilaç uygulaması gibi başka bazı deneysel ve klinik çalışmalar yürütülmüş, çok ümit verici olmasa da az sayıdaki bazı serilerde tüm hastaların bir yıllık, %30 kadarının da 2 yıllık yaşam süresine ulaşabildiği bildirilmiştir (Adilay 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Kullanılan GBM hücre serileri

Çalışmamızda hastaların tümör ve kontrol örneklerinin yanı sıra 4 adet GBM hücre dizisi kullanılmıştır. Hasta tümör ve kontrol örneklerine uygulanan analizler ve metodlar hücre serileri için de kullanılmıştır. Kullanılan hücre serileri U-118 MG, U-138 MG, T98G ve U-87 MG'dir. Bu hücrelere ait genel özellikler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan hücre serilerinin genel özellikleri

	U-118 MG	U-138 MG	T98G	U-87MG
Organizma	İnsan	İnsan	İnsan	İnsan
Cinsiyet, yaş	Erkek, 50	Erkek, 41	Erkek, 61	Bayan, 44
Doku	Beyin	Beyin	Beyin	Beyin
Morfoloji	Karışık	Poligonal	Fibroblast	Epitel
Yüzey Tutunumu	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
Tümörijenik	Evet	Hayır	Hayır	-
Karyotip	Pentabloide yakın, kr.X 2 kopya, kr.Y yok, kr.10 tek kopya	Hiperdiploid	Hiperpentaploid	Hipodiploid

3.1.2. Hücreleri çoğaltmak için hazırlanan besiyeri

U-118 ve T98G için; RPMI-1640 %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-glutamin

U-138 MG için; 500ml DMEM (düşük glikoz, L-glutaminli) besiyeri, %20 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin

U-87 MG için; 500 ml DMEM (düşük glikoz, L-glutaminli) besiyeri, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin

Transfer Pipeti	: Citotest marka, 155 mm, Lot no: 090036
Serolojik Pipet	: Greiner bio-one, 5 ve 10 ml'lik
Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%75'lik)	: Riedel-de Haen, No: 64-17-5
15 ve 50 ml'lik steril tüpler	: Sarstedt marka, No: 62.554.502 (15 ml) Sarstedt marka, No: 62.547.254 (50ml)

Hücre kültür işlemlerinde steril kabin olarak Holten S-20100 1.8, CO₂'li etüv olarak Sanyo MCO-20 AIC ve inverted mikroskop olarak Nikon TS 100 kullanılmıştır.

3.1.3. RNA İzolasyonu

Tri-reagent RT	: Molecular Research Center marka, No: RT 111.
BAM (4-bromoanisole)	: Molecular Research Center marka, No: BN 191
İzopropanol	: Merck marka, No: K37727334
Etil Alkol (%75'lik, soğuk)	: Riedel-de Haen marka, No: 64-17-5
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	: Applichem marka, No: 1609-47-8
DEPC'li su	: %0,1 konsantrasyonda. 100 ml steril distile su'ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletilip 15 dk 100°C de otoklavlanıp soğutularak kullanıldı.

RNA izolasyonunda Eppendorf 5415R marka soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

3.1.3.1. RNA ölçümü

RNA miktarlarının ölçümü ve kalite tayini Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.1.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Finnzymes F-470L marka cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Hasta tümör ve kontrol RNA'ları ve hücre serilerinden elde edilen RNA'lardan 1 µg total RNA kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Kit ile birlikte gelen veri föyünden yararlanılarak çalışma protokolü hazırlanıp uygulanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için kullanılan, nükleostemine özgü mRNA (erişim no: ENST0000354540.4) dizisinden tasarlanan primer dizileri aşağıdaki gibidir:

5'-TATCCATGGGGCTTACAAGG-3' (forward)

5'-CTGGACTTCGCAGAGCAAG-3' (reverse)

PZR için kullanılan, P53 genine özgü mRNA dizisinden tasarlanan primer dizisi aşağıdaki gibidir:

5'-CTTCCACCGACGGTGACA-3' (forward)

5'-TCCTCCATGGCAGTGACC-3' (reverse)

PZR için kullanılan, G6PDH kontrol genine özgü mRNA dizisinden tasarlanan primer dizisi aşağıdaki gibidir:

5'-TCCGGAGGAGAAGTCTGAGTCC-3' (forward)

5'-ATCGCCCTGGAAAAGCTC-3' (reverse)

Bu primerler için uygulanan polimeraz zincir reaksiyon protokolü 65°C'de 10 dakika denatürasyonu sonrasında 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 60 dakika, 85°C'de 5 dakika şeklinde uygulanmıştır.

3.1.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

RT-PZR için Roche marka Light Cycler 480 cihazında Roche marka SYBR Green kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon 96'lık plate'lerde gerçekleştirilmiştir. Deneyin iç kontrolü olarak Universal probeLibrary (UPL) insan G6PDH (glikoz-6-fosfat dehidrogenaz) gen probu (Roche Diagnostics, 05046246001, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır. Hasta tümör ve kontrol örneklerinden ve hücre serilerinden elde edilen cDNA sentez ürünlerinden 2 µl kullanılarak RT-PZR yapılmıştır. SYBR Green veri füyünden yararlanılarak RT-PZR protokolü uygulanmış, nükleostemin ve p53 ekspresyonu kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca RT-PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

SYBR Green kullanarak PZR sırasında PZR ürünün saptanması, logaritmik siklus döneminde PZR ürününün miktarının analizine olanak sağlar. Analiz rölatif kantitasyona dayandığından deney kontrol örneği de içermektedir. Bu çalışmada normalizasyon için analiz edilecek nükleostemin geni ile birlikte housekeeping bir gen olan G6PDH de amplifiye edilmiştir.

3.2 Yöntemler

3.2.1. Hücre serilerinin hücre kültürü

Başka bir çalışma için önceden flasklara ekilmiş hücre serilerinden gereken miktarda hücre alınmış ve canlılığın devamı için yeni flasklara ekimi yapılmıştır.

Hücre serilerinin daha önceden ekimi yapılmış flaskın içindeki hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak steril PBS (Fosfat Tuz Tamponu) (Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen) ile hücreler yıkanmıştır.

PBS yıkamasından sonra PBS alınarak 25 cm'lik flasklara 0,4 ml Tripsin/EDTA eklenmiş ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında birbirlerinden ve tutundukları flask yüzeyinden kopan hücrelerin üzerine Tripsin/EDTA miktarı kadar besiyeri eklenmiştir. Hücreler steril serolojik pipet yardımı ile 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır.

Hücreler +4 °C, 1200 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılmıştır. Hücrelerin üzerine serolojik pipet yardımı ile pasaj yapılacak flask sayısına göre kültür besiyeri eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra hücreler flasklara homojen olarak dağıtılmıştır.

3.2.1.1. Hücre serilerinin kültür işleminden sonra hücrelerin toplanması

Hücre kültüründe, 25 cm'lik flasklarda bulunan hücreler gerekli sayıya ulaştıklarında üzerlerindeki besiyeri alınıp atılmıştır. Flasklar PBS ile yıkanmış ve her bir hücre serisine 0,4 ml tripsin/EDTA eklenmiş flasklar 5 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin birbirinden ve flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Tripsin sonrasında flaskın yüzeyinden alınan ayrılan hücrelere tripsin miktarı kadar besiyeri eklenerek tripsinasyon işlemi durdurulmuştur. Bu hücre-besiyeri karışımı 15 ml'lik tüplere alınıp +4 °C'de 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin dibine çöken hücreler fazla bekletilmeden RNA izolasyonu için buz üzerine alınmıştır.

3.2.2. RNA İzolasyonu

GBM ön tanısı ile ameliyat edilmesi kararlaştırılan hastalara ameliyat öncesi çalışmaya katılabilmeleri konusunda bilgi verilmiştir. Hastalara ameliyat sırasında beyinden çıkarılan doku örneklerinin bir kısmının araştırma amaçlı kullanılabilmesi için etik kurallar çerçevesinde izinlerinin alınması gerektiği anlatılmıştır.

Çalışmaya katılmak isteyen hastalar etik kurul tarafından onayı alınmış bilgilendirilmiş hasta onam formlarını imzalamışlardır.

RNA izolasyonu steril ortamı sağlamak amacı ile hücre kültürü odasında gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sırasında kullanılan ortamın oldukça steril olmasının yanı sıra kullanılan tüpler ve pipet uçları da RNase açısından sterildir. Ameliyat sırasında çıkarılan tümör parçalarının tümörjenik hücre popülasyonu içerebileceği bir patalog tarafından belirlendikten sonra tümör dokusu içinde serum fizyolojik bulunan steril enjektöre konularak en fazla 30 dakika içerisinde hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir.

Hastaların tümör dokusu dışında ameliyat sırasında tümöre ulaşmak için tümör çevresinden çıkarılan normal dokularından da bir miktar örnek alınmıştır. Bu durum hakkında hastalara ameliyat öncesinde bilgilendirme yapılmış ve izinleri alınmıştır.

Hücre kültür laboratuvarına getirilen doku parçaları laminar akış kabini içerisinde steril petri kabına aktarılmıştır. Doku üzerine 2-3 ml yüksek glikoz miktarına sahip besiyeri (%10 FBS) eklenmiştir ve bu besiyeri içerisinde ortalama 1 mm³ hacme kadar kesilerek parçalanmıştır. Bu işlem sırasında damar kalıntıları ve nekrotik bölgeler temizlenmiştir. Mümkün olan en küçük hacme kadar parçalanan dokular 2ml'lik steril ependorf tüplerine konulmuştur. Bu işlemden sonra gelen ve kitin içinden çıkan protokole uygun olarak devam eden işlemler buz üzerinde yapılmıştır. Ependorfa alınan dokular üzerine ticari olarak alınan "Tri-Reagent" isimli solüsyondan 1 ml eklenmiş ve mikropipet yardımı ile karışması sağlanmıştır. Bu karışım buz içine gömülü durumda 10 dakika bekletilmiştir.

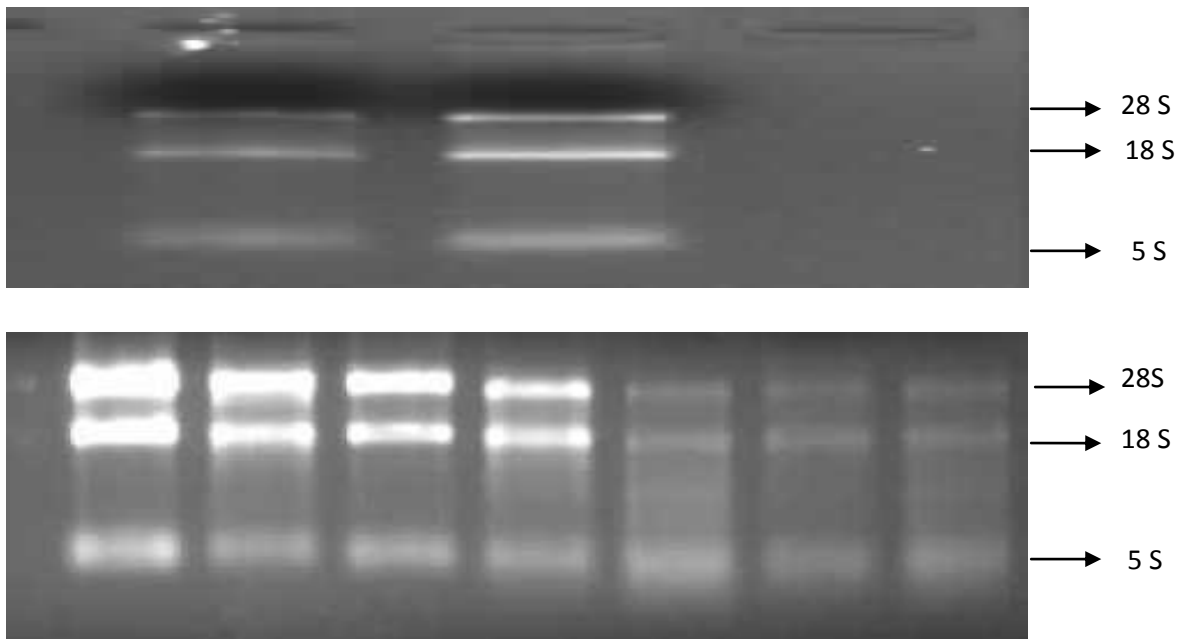
Bu süre sonunda tüpün üzerine ticari olarak satın alınan 4-bromoanisoole solüsyonundan 50 µl eklenmiş ve hızlı ve sert bir şekilde 15 saniye boyunca el yardımı ile çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi sonunda +4 °C'de 12000 rölatif santrifüj gücü (rcf)'nde 15 dakika santrifüj edilmiş ve sonunda tüplerde 3 faz oluşmuştur. En üstte kalan berrak fazda RNA, ortada kalan köpük rengindeki kısımda DNA ve en altta kalan pembe renkli kısımda ise protein bulunmaktadır. En üstteki berrak kısımdan 500 µl alınıp yeni,steril bir 2 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem sırasında DNA kontaminasyonunu önlemek için DNA olduğu bilinen köpük rengindeki 2. faza yaklaşılmamasından kaçınılmıştır.

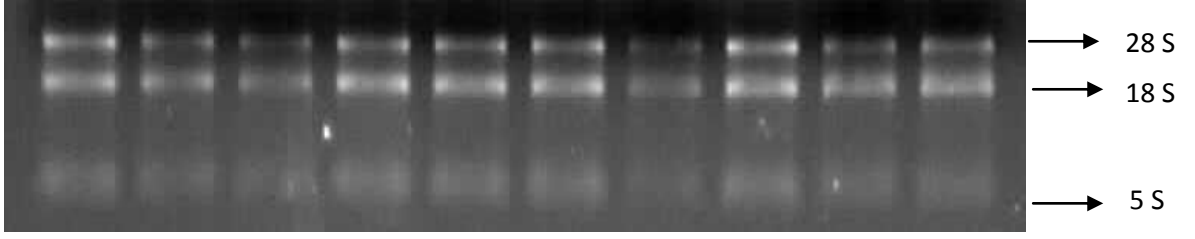
RNA'nın yer aldığı yeni ependorf tüpüne 500 µl soğuk izopropanol eklenmiş ve tüp hafifçe alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım 5-10 dakika kadar oda ısısında bekletilmiş ve ortalama 2 dakikada bir tüp alt üst edilerek solüsyonun homojen olarak karışması sağlanmıştır. Bekleme sonunda tüp +4 °C'de 12000 rcf'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda tüpün üst kısmı (dibe yaklaşımadan) yavaşça dökülmüştür.

Tüpün üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklenip alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu aşamada RNA çıplak gözle görülebilmektedir. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmı dip kısmına yaklaşılmadan yavaşça mikropipet yardımı ile atılmış ve tüp yan çevrilerek laminar kabin içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Yaklaşık 10 dakika sonunda 50 µl steril, DEPC ile muamele edilmiş distile su eklenerek RNA'nın çözülmesi sağlanmıştır. Elde edilen 50 µl hacmindeki RNA'nın 5 µl kadarı yani steril 200µl'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem ana stoğun sürekli dondurma ve çözme süreçlerine maruz kalmasını önlemek için yapılmıştır. Ayrılan bu RNA miktarları agaroz jelde RNA kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Geri kalan RNA bekletilmeden -80°C 'ye kaldırılmıştır. Tri-Reagent protokolü dokularda olduğu gibi aynen hücre serilerinden elde edilen hücrelere de uygulanmış ve bu sayede hücre serilerinden de RNA elde edilmiştir.

3.2.2.1. RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi

Elde edilen RNA'dan ayrılan 5 µl'lik RNA etidyum bromür eklenmiş %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütme sonunda 28S, 18S ve 5S RNA görüntüsü net bir biçimde gözlenmiştir. Görüntüde herhangi bir RNA parçalanması gözlenmediğinden elde edilen RNA'nın kalitesinin iyi olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.1).





Şekil 3.1. Farklı zamanlarda tümör dokularından elde edilen RNA örneklerinin agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntüleri

3.2.2.2. RNA'nın kantitasyonu

RNA miktarının ölçümü Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) marka spektrofotometre ile yapılmıştır.

3.2.3. cDNA İzolasyonu

RNA elde edilen dokulardan gerçek zamanlı PZR'de ekspresyon analizi için kullanılmak amacı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Finnzymes marka F-470L cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak ortalama 100 nanogram (ng) RNA'dan cDNA elde edilmiştir.

200 µl'lik ependorf tüp içerisine sırasıyla steril dH₂O, hekzamer ve RNA konmuştur. Bu karışım öncü denatürasyon süreci için ısıtıcı blokta 65 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Burada sekonder yapılanma gösterebilen RNA'ların açılması kolaylatılmıştır. Bu süre sonunda hemen buza konan tüp içerisine tampon solüsyon (2X) ve M-MuLV RNase H⁺ ters transkriptaz enzimi eklenmiştir. Toplam hacim 20 µl olacak biçimde hesaplama yapılmıştır. Enzimi ekledikten sonra örneğin bulunduğu tüp kuru ısıtıcı blokta sırası ile 25 °C'de 10 dakika, 42 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Bu süreç sonunda cDNA'ların elde edilip edilmediği kontrol (house-keeping) primerleri ile kontrol edilmiştir.

Burada yapılan klasik PZR'de gerçek zamanlı PZR'de kullanılacak GAPDH (G6PD, Glikoz 6 Fosfat Dehidrogenaz) kontrol primeri kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PZR'de ekspresyon analizi için kullanılmıştır.

3.2.4. RT-PZR

RNA ve cDNA sentezi yapılan dokulardan elde edilen hücrelerdeki Nükleostemin geninin ekspresyon düzeyini analiz etmek amacı ile RT_PZR yöntemi kullanılmıştır. Ekspresyon analizleri Syber green yöntemi kullanılarak Light Cycler 480 (Roche) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

RT-PZR, nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. LightCycler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir.

Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü, çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber gren ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir.

Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime sıcaklığı (melting temperature, T_m, çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır.

Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

Ekspresyon analizinde referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. RT-PZR reaksiyon şartları çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. (a) Nükleostemin için RT-PZR'da kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Kimyasal	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklene Miktar
Syber green reaksiyon karışımı	2X	2X	5µl
Primer F	100pm	10pm	0,1µl
Primer R	100pm	10pm	0,1µl
cDNA			2µl
Distile su			2,8µl (Toplam hacim 10 µl olacak kadar)

Çizelge 3.2. (b) P53 için RT-PZR’da kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Kimyasal	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklene Miktar
Syber green reaksiyon karışımı	2X	2X	5µl
Primer F	100pm	10pm	0,1µl
Primer R	100pm	10pm	0,1µl
cDNA			2µl
Distile su			2,8µl (Toplam hacim 10 µl olacak kadar)

Tabloda belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler, 96 kuyucuklu plakların içinde 95 °C’de 10 dakika (ilk denatürasyon), 95 °C’de 10 saniye (denatürasyon), 60 °C’de 30 saniye (primer bağlanması), 72 °C’de 1 saniye olmak üzere 50 döngü reaksiyona tabi tutulmuştur.

RT-PZR sonunda elde edilen Cp değerleri kullanılarak E (Ekspresyon oranı) değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ekspresyon Oranı (E)} = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta C_{p_{\text{hedef}}}} \text{ (kontrol-örnek)}}{(E_{\text{Referans}})^{\Delta C_{p_{\text{referans}}}} \text{ (kontrol-örnek)}}$$

3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak çalışma popülasyonuna ait medyan (ortanca), minimum ve maksimum değerler ele alınmıştır.

Frekans dağılımı sonucunda elde edilen verilerden bar grafiği çizilerek nükleostemin ve P53 genlerinin Glioblastoma Multiforme hastalarının tümör dokularındaki ekspresyon farkları gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Dokuların Elde Edilmesi

Tez çalışmamız, Ankara 1 no'lu Etik Kurulu'ndan 12.08.2009 tarihinde GBM hastalarının dokuları ile yapılacak başka bir çalışma için alınmış kurul onayından (karar no:2009/08-3) sonra aynı örneklerden kalan dokular ve yeni gelecek diğer örneklerin yeni yapılacak olan bu çalışma için de kullanılmasına ilişkin Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu'ndan 04.10.2010 tarihinde alınan kurul kararından (karar no: 16-367) sonra başlamıştır. Bu tez çalışmasının hasta grubunu klinik ön değerlendirme sonucu GBM şüphesi taşıyan ve bu nedenle ameliyat edilen bireyler oluşturmaktadır. Ameliyat öncesinde, hastalığının ön tanısı hakkında bilgisi olan bireylere çalışma hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastalardan ameliyat sırasında doku örneği alınmıştır. Bu kapsamda diğer çalışma için gelen örneklerden sağlanan 20 hastadan doku örneği elde edilmiştir. Ameliyat sonrasında bu hastaların GBM hastası olduğu Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından rapor edilip kesinleştirilmiştir. Hastalarımızın ortalama yaşı 52,4'dür. Hastalarımızın 12'si kadın, 8'i erkektir. Hastalarımıza ait bilgiler çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çalışmaya hasta örneklerinin yanı sıra 4 adet GBM hücre serisi de kıyaslama yapmak amacı ile eklenmiştir. Bu hücre serilerinden 1'i bayan, 3'ü erkek kökenli hücrelerden oluşmuşlardır.

Çizelge 4.1. Doku örneği alınan hastalara ait genel bilgiler

Hasta adı	Tanı tarihi	Yaş	Cinsiyet	Boy/Kilo	Cerrahi Tipi	Derece	Yaşam Evet/Hayır	Hayatta kalma süresi
HK	05.11.09	37	K	1.67/54	Total	IV	Evet	-
AT	06.11.09	35	E	1.70/68	Total	IV	Evet	-
ST	09.05.09	35	E	1.70/68	Total	IV	Hayır	14 ay
SÇ	30.07.09	62	E	1.73/70	Total	IV	Evet	-
Hİ	05.10.09	60	K	1.65/57	Total	IV	Evet	-
ZP	17.11.09	36	K	1.62/56	Total	IV	Hayır	10 ay
HA	27.04.09	60	K	1.65/62	Subtotal	IV	Hayır	0 ay
HK	31.08.09	37	K	1.60/64	Total	IV	Evet	-
EY	15.05.09	36	K	1.54/75	Subtotal	IV	Hayır	7 ay
FS	23.06.09	59	K	1.57/61	Total	IV	Evet	-
KÇ	14.05.09	60	E	1.72/80	Total	IV	Hayır	14 ay
NB	02.07.09	53	K	1.57/60	Total	IV	Evet	-
NU	20.03.09	57	K	1.58/62	Total	IV	Evet	-
KP	15.10.09	43	E	1.65/60	Total	IV	Hayır	12 ay
HÖ	19.10.09	39	E	1.60/60	Subtotal	IV	Hayır	8 ay
ÜA	04.06.10	59	E	1.76/85	Total	IV	Evet	-
EK	12.03.09	57	K	1.55/83	Total	IV	Hayır	14 ay
KA	30.07.09	45	E	1.73/70	Total	IV	Hayır	12 ay
AK	03.07.09	60	K	1.52/65	Total	IV	Hayır	4 ay
FD	19.02.09	61	E	170/68	Total	IV	Hayır	14 ay

4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları

Çalışmada kullanılmış hastalara ait tümör doku örnekleri içinde serum fizyolojik bulunan steril enjektöre konularak en fazla 30 dakika içerisinde hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Hastaların tümör dokusu dışında ameliyat sırasında tümöre ulaşmak için tümör çevresinden çıkarılan normal dokularından da bir miktar örnek alınmıştır. Bu durum hakkında hastalara ameliyat öncesinde bilgilendirme yapılmış ve izinleri alınmıştır. Tüm örneklerden dokudan RNA izolasyonu protokolü kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu RNA'ların A260/A280 değerlerine sonraki aşamalarda yapılacak nicel ölçümler sebebiyle özellikle dikkat edilmiş, izole edilen RNA örneklerinde herhangi bir safsızlığın olmamasına özen gösterilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılmış olan Nanodrop ölçümleri Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Hasta örnekleri ve hücre serilerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Hasta Numarası	ng/µl	A260/A280
	(Normal doku/Tümör doku)	(Normal doku/Tümör doku)
U 138 MG Hücre serisi	23,02	1,91
U 118 MG Hücre serisi	24,46	2,26
T 98 MG Hücre serisi	41,31	1,92
U 87 MG Hücre serisi	33,80	1,94
1	264,88 / 220,88	1,89 / 1,88
2	137,64 / 141,86	1,89 / 1,87
3	26,02 / 46,48	1,98 / 1,98
4	427,46 / 608,48	1,96 / 1,91
5	201,87 / 325,15	1,93 / 1,88
6	42,96 / 51,68	1,86 / 1,81
7	116,85 / 515,33	1,84 / 1,81
8	148,95 / 115,32	2,08 / 1,99
9	65,0 / 50,36	1,82 / 1,87
10	22,68 / 316,35	1,95 / 1,83
11	558,69 / 332,05	1,82 / 1,89
12	70,45 / 476,15	1,83 / 1,88
13	34,56 / 58,88	2,09 / 2,12
14	105,37 / 91,98	1,82 / 1,85
15	98,06 / 564,07	1,89 / 2,87
16	90,46 / 39,82	1,82 / 1,85
17	269,97 / 280,61	2,16 / 1,87
18	22,87 / 231,80	1,88 / 1,81
19	312,02 / 251,98	1,89 / 1,81
20	227,5 / 75,29	1,82 / 1,87

4.3. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları

Çalışmanın asıl hedefi hasta örneklerindeki nükleostemin hedef geninin ifade değişikliklerinin tespit edilmesi olduğu için, başlangıçtaki transkript sayısının eşit olmasının büyük önemi vardır. Bu nedenle birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, başlangıç RNA miktarı 300 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten izolasyon sonucu elde edilen RNA ana stoğundan cDNA sentezi için ne kadar alınması gerektiği izelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 1 µg RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Hasta Numarası	Stok RNA konsantrasyonu ng/C (Normal doku/Tümör doku)	Alınması gereken RNA miktarı (µl) (Normal doku/Tümör doku)
U 138 MG Hücre serisi	23,02	6,5
U 118 MG Hücre serisi	24,46	6,1
T 98 MG Hücre serisi	41,31	3,6
U 87 MG Hücre serisi	33,80	4,4
1	264,88 / 220,88	0,6 / 0,7
2	137,64 / 141,86	1,1 / 0,9
3	26,02 / 46,48	5,8 / 3,2
4	427,46 / 608,48	6,0 / 0,3
5	201,87 / 325,15	0,7 / 0,5
6	42,96 / 51,68	3,5 / 3,0
7	116,85 / 515,33	1,3 / 0,3
8	148,95 / 115,32	1,0 / 1,3
9	65,0 / 50,36	2,3 / 3,0
10	22,68 / 316,35	6,6 / 0,5
11	558,69 / 332,05	0,3 / 0,5
12	70,45 / 476,15	2,1 / 0,3
13	34,56 / 58,88	4,3 / 2,5
14	105,37 / 91,98	1,4 / 1,6
15	98,06 / 564,07	1,5 / 0,3
16	90,46 / 39,82	1,7 / 3,8
17	269,97 / 280,61	0,6 / 0,5
18	22,87 / 231,80	6,6 / 0,7
19	312,02 / 251,98	0,5 / 0,6
20	227,5 / 75,29	0,7 / 2,0

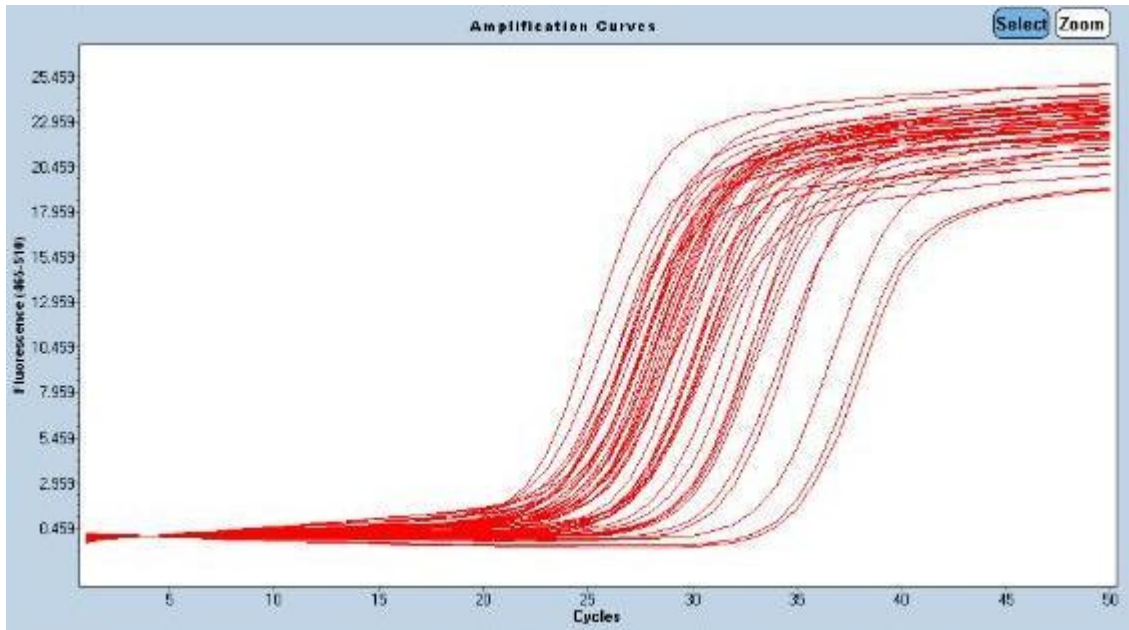
4.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Analiz Sonuçları

Nükleostemin geni için tasarlanmış primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının saptanması amacıyla yapılan optimizasyon PZR'larının ardından elde edilen örnek cDNA'ları ile RT-PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

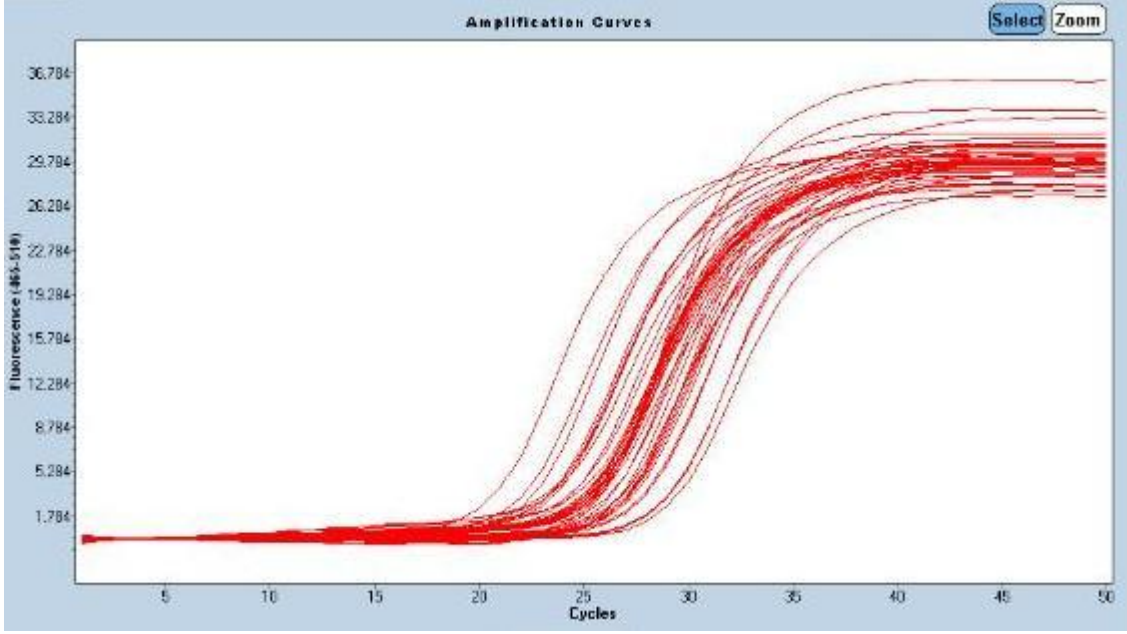
4.4.1. Amplifikasyon eğrileri ve ortalama Cp değerleri

Gerçekleştirilmiş olan her RT-PZR deneyinin sonunda, hedef gene özgü primerlerin örnek cDNA'sı üzerinde uygun bölgelere bağlanması ve bu transkriptin logaritmik olarak artışı gösteren amplifikasyon eğrisi grafikleri oluşmaktadır. Oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Bu floresan ışımaların eşik değerini geçtiği döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Şekil 4.1.'de Nükleostemin genine ve G6PDH housekeeping gene ait amplifikasyon eğrisi grafiği görülmektedir.

(a)



(b)



Şekil 4.1. (a).Nükleostemin amplifikasyon eğrisi grafiği, (b). G6PDH amplifikasyon eğrisi grafiği (Bağlanma sıcaklığı 60°C)

Nükleostemin geni için, 20 hasta örneğinin hem normal hem tümör dokuları ile 4 hücre serisi kontrol olarak G6PDH kullanılarak çalışılmıştır. 20 hastadan gelen normal doku örneklerinin RNA'ları karıştırılarak sağlıklı bir havuz elde edilmiştir. Muhtemel teknik hataları önlemek amacı ile örnekler üçlü tekrar (her örnek için 3 ayrı reaksiyon) olarak çalışılmıştır.

RT-PCR reaksiyonları sonuçlarının analiz edilmesiyle her örnek için üç adet Cp değeri oluşmuştur. Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplandığı analizlerde, bu üç Cp değerinin ortalaması kullanılmıştır. Çizelge 4.4.'de hem NS hem de p53 genine ait her bir örnek için hesaplanmış ortalama Cp değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. (a) Nükleostemin İçin Tümör Doku Örnekleri ve Sağlıklı Doku Havuzu ortalama Cp değerleri

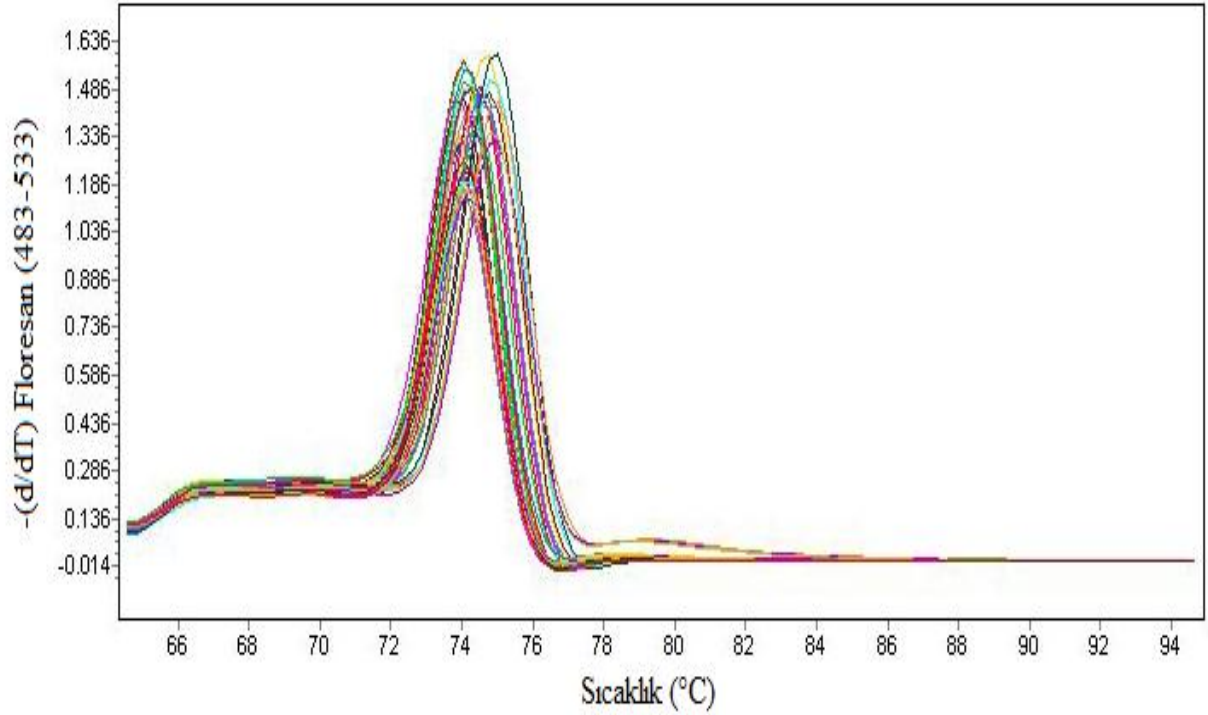
Hasta Numarası	Ortalama Cp Değerleri (Tümör Dokuları)
U 138 mg	26,95
U 118 mg	22,03
T 98 g	25,25
U 87 mg	23,60
1	24,89
2	24,38
3	27,48
4	23,52
5	29,26
6	23,69
7	24,13
8	24,96
9	28,86
10	24,55
11	26,37
12	23,46
13	26,99
14	24,93
15	22,66
16	29,63
17	26,56
18	24,75
19	26,82
20	25,80
Sağlıklı doku havuzu ortalama Cp değeri	24,86

Çizelge 4.4. (b) P53 İçin Tümör Doku Örnekleri ve Sağlıklı Doku Havuzu ortalama Cp değerleri

Hasta Numarası	Ortalama Cp Değerleri (Tümör Dokuları)
U 138 mg	30,28
U 118 mg	25,39
T 98 g	26,55
U 87 mg	27,34
1	22,58
2	28,26
3	30,30
4	28,38
5	31,92
6	27,42
7	30,06
8	29,03
9	32,46
10	30,35
11	28,95
12	25,52
13	29,06
14	26,90
15	26,40
16	33,84
17	30,98
18	28,85
19	29,29
20	28,18
Sağlıklı doku havuzu ortalama Cp değeri	30,72

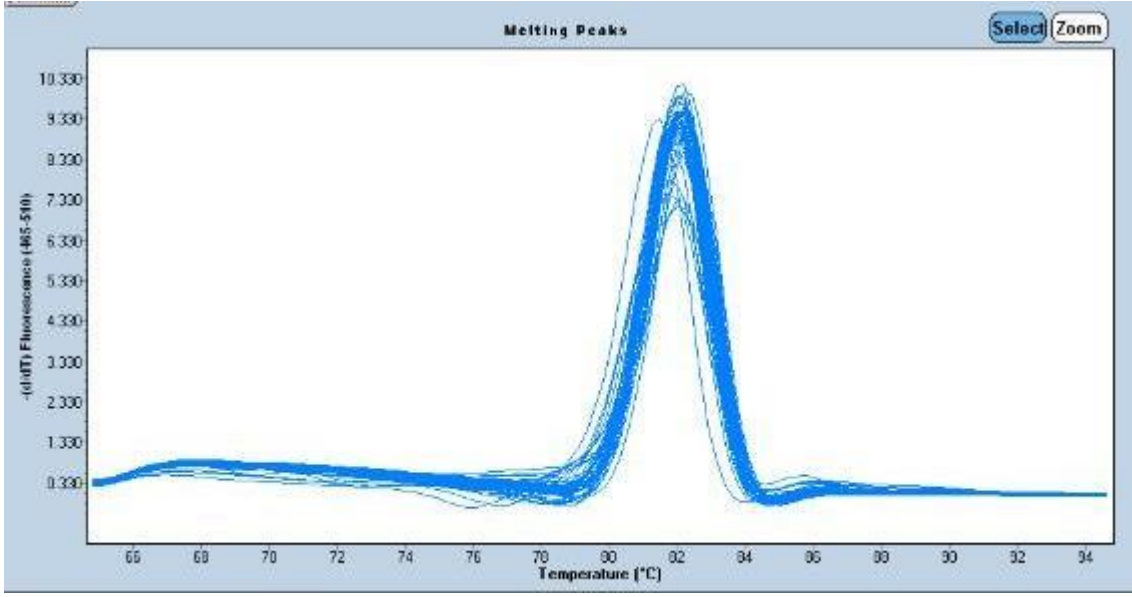
4.4.2. Erime eğrisi (melting curve) analizi ve sonuçları

RT-PZR reaksiyonlarında kullanılan SYBR Green I DNA çift sarmalına bağlandığı için erime eğrisi analizi RT-PZR'ın özgünlüğü için büyük önem taşımaktadır. Tipik bir erime eğrisi grafiğinde, her örnek için sadece bir tane peak görülmesi beklenmektedir. Ekstra peakler özgün olmayan PZR ürünlerinin veya primer dimerin habercisidir. Her RT-PZR reaksiyonunun ardından, reaksiyonun özgünlüğünü değerlendirebilmek açısından erime eğrisi analizi yapılmıştır. Şekil 3.2.'de, tipik, olması beklenen bir erime eğrisi grafiği, Şekil 3.3.'de ise Nükleostemin'e ve G6PDH' genine ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir.

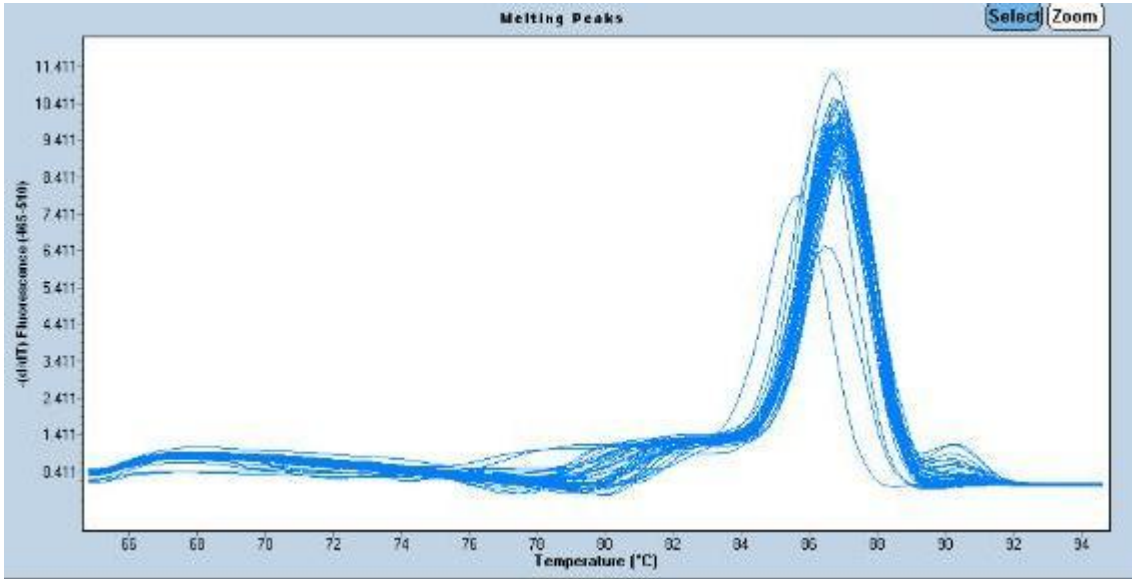


Şekil.4.2. Tipik bir erime eğrisi grafiği

(a)



(b)



Şekil.4.3. (a) Nükleostemin erime eğrisi grafiği (b) G6PDH erime eğrisi grafiği (Bağlanma sıcaklığı 60⁰C)

4.4.3. Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanması ve sonuçları

Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Bu formül amplifikasyon etkinliği değeri olan E değerini 2 olarak reaksiyon etkinliğinin %100 olduğunu kabul eder. Formülün açık hali aşağıdaki gibidir:

$$\text{Ekspresyon Oranı (E)} = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta C_{p_{\text{hedef}}}} \text{ (kontrol-örnek)}}{(E_{\text{Referans}})^{\Delta C_{p_{\text{referans}}}} \text{ (kontrol-örnek)}}$$

Bu formül doğrultusunda hesaplanan gen ifadesi değişim oranları, daha sonra \log_2 tabanına çevrilmiştir. Bunun yapılmasının sebebi, bu değişimlerinin ifade ediliş biçimlerini kolaylaştırmaktır. Her bir hedef gen için örneklere ait gen ifade değişikliği oranlarının \log_2 tabanındaki karşılıkları Çizelge 4.5.'de mevcuttur.

Çizelge 4.5. (a) Örneklerin NS gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log₂ tabanındaki karşılıkları

Hasta Numarası	Formül Doğrultusunda Hesaplanan Gen İfade Değişikliği Oranları	Formül Doğrultusunda Hesaplanan Gen İfade Değişikliği Oranlarının log ₂ Tabanındaki Karşılıkları
U 138 mg	0,36	-1,47
U 118 mg	0,20	-2,32
T 98 g	0,07	-3,84
U87 mg	0,56	-0,84
1	1,33	0,41
2	0,96	-0,06
3	0,28	-1,84
4	0,62	-0,69
5	0,48	-1,06
6	1,68	0,75
7	0,44	-1,18
8	0,99	-0,014
9	0,53	-0,92
10	0,86	-0,22
11	1,00	0
12	0,88	-0,18
13	0,42	-1,25
14	0,76	-0,40
15	0,71	-0,49
16	1,29	0,37
17	0,78	-0,36
18	0,52	-0,94
19	0,55	-0,86
20	0,39	-1,36

Çizelge 4.5. (b) Örneklerin p53 gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log₂ tabanındaki karşılıkları

Hasta Numarası	Formül Doğrultusunda Hesaplanan Gen İfade Değişikliği Oranları	Formül Doğrultusunda Hesaplanan Gen İfade Değişikliği Oranlarının log ₂ Tabanındaki Karşılıkları
U 138 mg	0,44	-1,18
U 118 mg	0,28	-1,84
T 98 g	0,23	-2,12
U87 mg	0,18	-2,47
1	9,19	3,2
2	0,63	-0,67
3	1,21	0,28
4	0,83	-0,27
5	3,14	1,65
6	1,27	0,34
7	0,81	-0,31
8	3,05	1,61
9	1,88	0,91
10	0,91	1,81
11	1,88	-1,25
12	3,51	1,81
13	0,42	-1,25
14	1,40	0,49
15	3,61	1,85
16	0,97	-0,04
17	0,078	-3,68
18	0,87	-0,20
19	1,66	0,73
20	0,39	-1,36

Gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanına göre karşılığı olan değerlerin negatif olması, ilgili örnekte hedef gen ifadesinin azaldığını; değerin pozitif olması ise, hedef gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir.

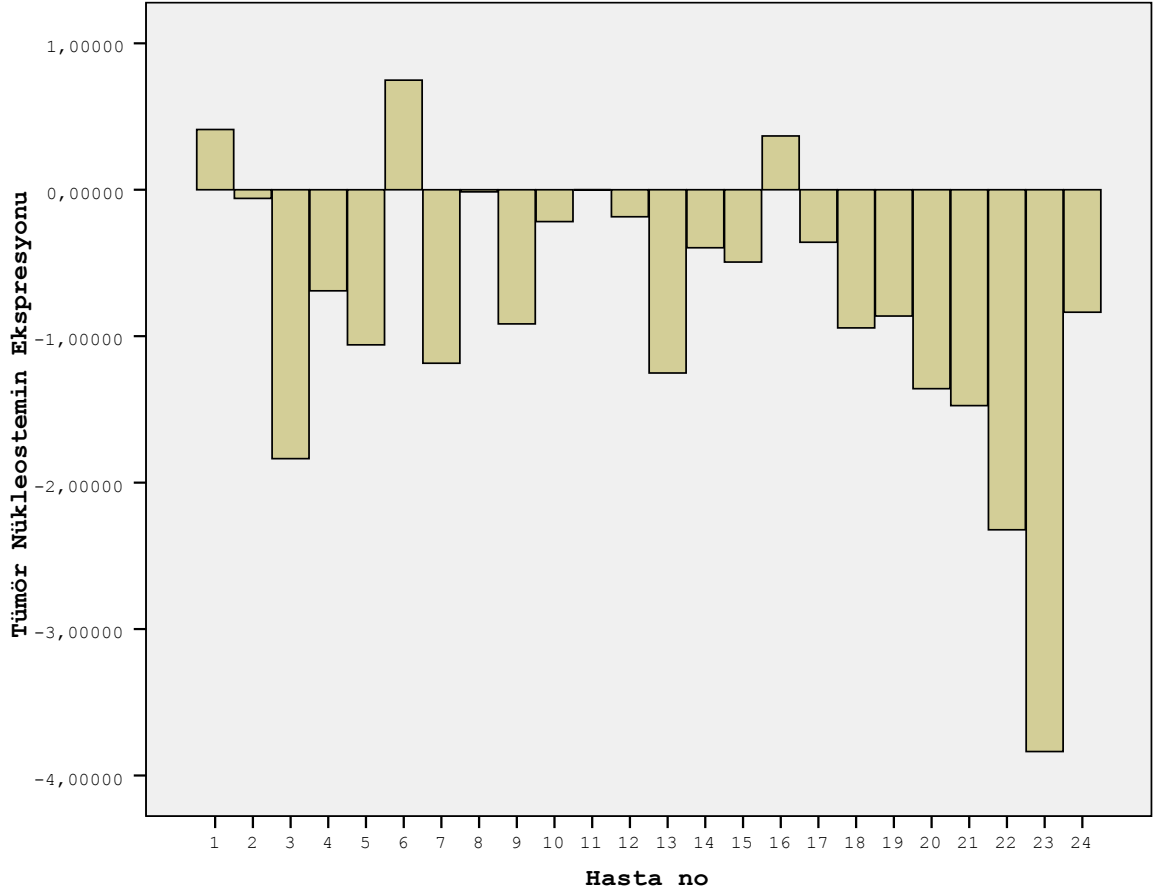
İstatiksel analizler için SPSS 15.0 programı kullanılmıştır. Çalışma populasyonuna ait tanımlayıcı istatistikler medyan (ortanca), minimum ve maksimum değerler olarak özetlenmiştir.

Ayrıca Frekans dağılımını sonucunda elde edilen verilerden bir bar grafiği çizilmiştir.

Glioblastoma Multiforme tanısı almış hastalardan elde edilmiş normal doku havuzu ve her bir hastaya ait tümör doku örneklerinde yapılan analizler sonucunda her bir hastanın tümör dokusu için nükleostemin geninin ifade değişiklikleri Şekil 4.4'de, tümör dokularındaki p53 geninin ifade değişimleri Şekil 4.5.'de, p53 geninin ifade değişimleri ile NS geninin ifade değişimlerinin karşılaştırılması ise Şekil 4.6'da özetlenmiştir.

Çalışma populasyonuna ait NS geni için medyan (ortanca) değeri -0,76, minimum değer -3,85, maksimum değer ise 0,75 olarak hesaplanmıştır.

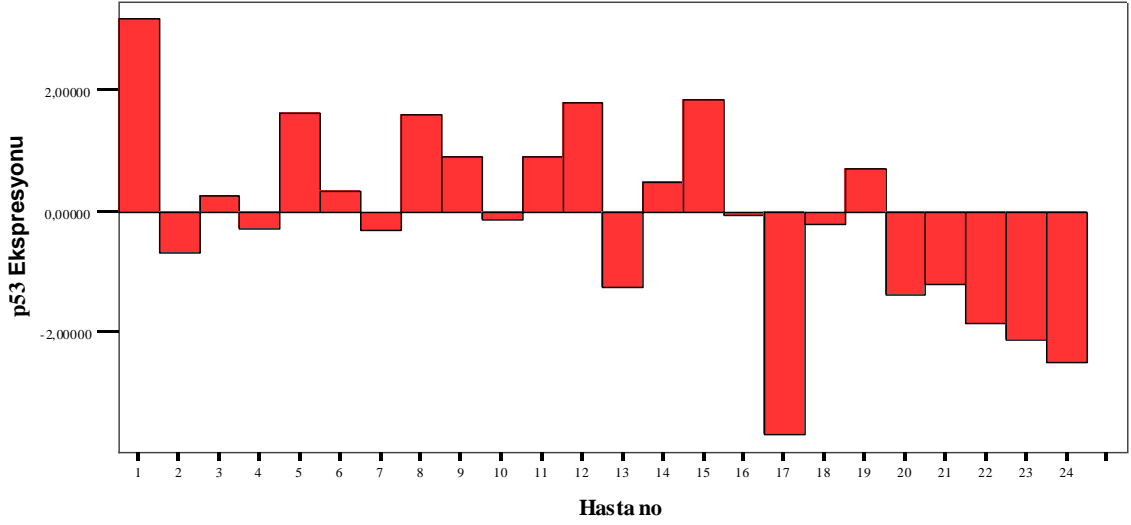
Çalışma populasyonuna ait p53 geni için medyan (ortanca) değeri -0,09, minimum değer -3,68, maksimum değer 3,2 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. Nükleostemin genine göre hastaların tümör dokularındaki gen ifade değişimleri. 21 numaralı örnek U138 mg, 22 numaralı örnek U118 mg, 23 numaralı örnek T98g ve 24 numaralı örnek de U87 mg hücre serilerini ifade etmektedir

Glioblastoma Multiforme hastaları tümör örneklerinden 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21 (U138 mg), 22 (U118 mg), 23 (T98 g), 24 (U 87 mg) numaralı hastaların ve hücre serilerinin nükleostemin geni ifade değişikliklerine bakıldığında (Şekil 4.4) benzer bir eğilim gösterdikleri belirlenmiş ve bu hastalarda nükleostemin gen ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu on altı hasta ve dört hücre serisindeki ifade profillerinin aksine, 1, 6 ve 16 numaralı hastada ise NS gen ifadelerinde artış görülmüştür.

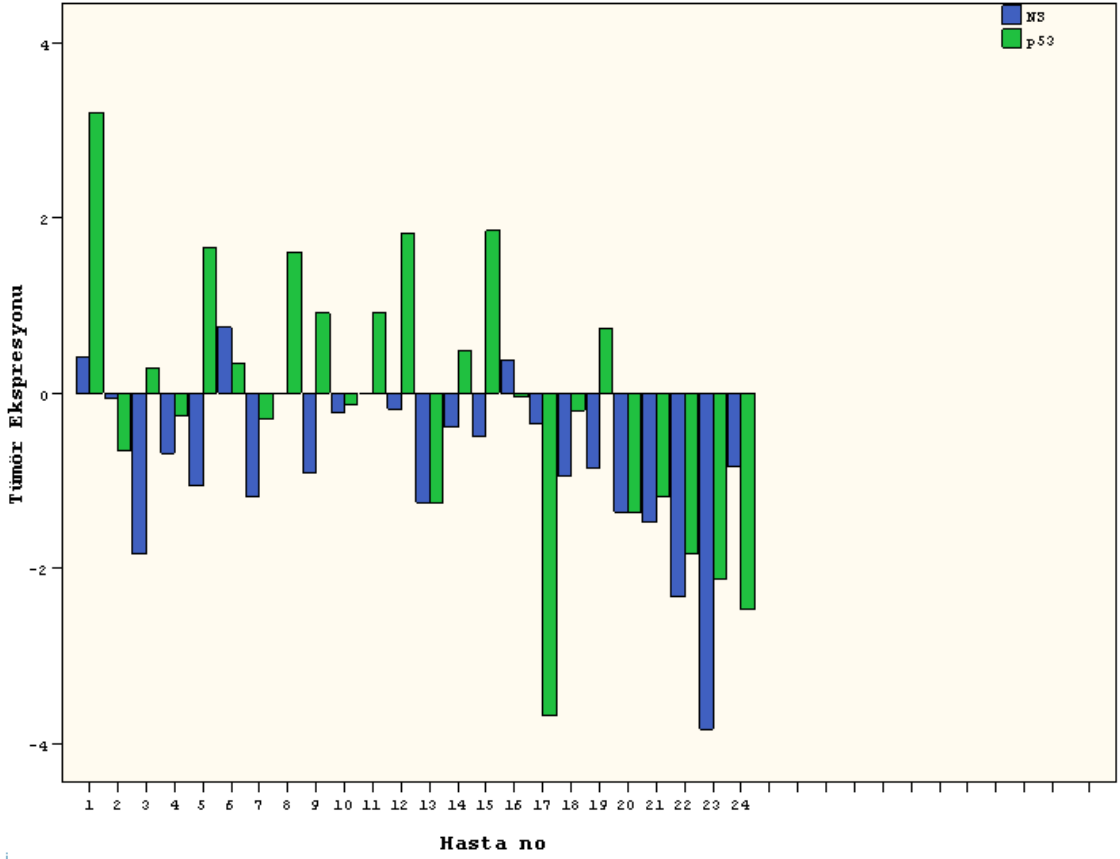
Ayrıca, 11 numaralı hastanın ise ifade profili tam sınır düzeydedir ve nükleostemin geninin ifadesinde ne artış ne de azalış görülmüştür.



Şekil 4.5. p53 genine göre hastaların tümör dokularındaki gen ifade değişimleri. 21 numaralı örnek U138 mg, 22 numaralı örnek U118 mg, 23 numaralı örnek T98g ve 24 numaralı örnek de U87 mg hücre serilerini ifade etmektedir

Glioblastoma Multiforme hastaları tümör örneklerinden 2, 4, 7, 10, 13, 16, 17, 18, 20, 21 (U138 mg), 22 (U118 mg), 23 (T98 g), 24 (U 87 mg) numaralı hastaların ve hücre serilerinin p53 geni ifade değişikliklerine bakıldığında (Şekil 4.5) bu hastalarda p53 gen ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu on üç hasta ve dört hücre serisindeki ifade profillerinin aksine, 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15 ve 19 numaralı hastada ise p53 gen ifadelerinde artış görülmüştür.

Ancak p53 gen ifadeleri ile yapılan istatistiksel analizler sonucunda $p = 0,115$ değeri bulunduğundan hastaların tümör dokularındaki p53 artış ve azalışları anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.6. Hastaların tümör dokularındaki P53 ile Nükleostemin genleri arasındaki gen ifade değişimlerinin karşılaştırılması. 21 numaralı örnek U138 mg, 22 numaralı örnek U118 mg, 23 numaralı örnek T98g ve 24 numaralı örnek de U87 mg hücre serilerini ifade etmektedir

NS ile p53 genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında $r=0,491$ 'lik bir korelasyon hesaplanmıştır. Spearman korelasyonu ile elde edilen bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,015$). Korelasyon katsayısının pozitif olması ilişki yönünden p53 ile NS ekspresyon seviyeleri arasında doğrusal bir ilişki olduğunu, genlerden birinin ekspresyonu arttığında diğerinin de arttığını göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser günümüzün en ölümcül ve görülme sıklığı en fazla artış gösteren hastalıklarından biridir. Bu artışın nedenleri arasında çevresel kanserojen moleküllerin artması, modern teknolojinin yan etkileri, stres ve zorlu yaşam koşulları gelmektedir (Blumenthal and Schulman, 2005; Krex *et al.*, 2007). Bu kadar büyük artışa ve ölümcül etkiye sahip olması nedeniyle bilimsel çalışmalar için çok önemli bir konu başlığı teşkil etmektedir.

Tsai ve McKay (2002) Nükleostemin (NS) genini, özellikle kök hücreler ve kök hücre bakımından zengin dokularda bulunan bir p-53 bağlama proteini olarak tanımlamışlardır. İlginç olarak, NS mRNA'sı ve proteininin her ikisinin de erişkin farklılaşmış hücre ve dokularda bulunmadığı, buna rağmen farklı insan kanser hücre serilerinde yüksek derecede eksprese edildiği saptanmıştır. NS tarafından kodlanan proteinin, erken multipotent evrede hücreler çoğalırken eksprese edildiği hücre farklılaşmasının başlaması ile beraber aniden ve tamamen ortadan kaybolduğu bildirilmiştir. NS'nin kök hücre ve kanser hücre serilerinde ifadelenirken erişkin dokuların farklılaşmış hücrelerinde görülmemesi durumu NS'nin kök hücre ve kanser hücrelerinin kendini yenilemesinde önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (Tsai and McKay, 2002).

Yoshida ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada oral yassı hücre karsinomu hücrelerinin patogeneğinde NS'nin etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Dil kanserinin gelişiminde NS'nin önemini anlamak amacı ile normal epitelyum hücreleri, premalignant lezyonlar (displazi) ve dil kanseri tümör hücreleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda neoplastik dokularda normal kontrollerine göre oldukça yüksek seviyede NS ekspresyonuna rastlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar NS'nin sadece ribozom biyosentezinde değil farklılaşmış hücrelerdeki protein sentezi için de gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Romanova *et al.*, 2009). Bu nedenle Yoshida ve arkadaşlarının çalışmasında dil dokularında kök hücreler, kanser hücreleri veya farklılaşmış normal hücrelerin hepsinin proliferasyon durumundayken NS ekspresyonuna sahip olabileceği öne sürülmektedir. NS'nin susuturulmasının dil kanseri hücrelerinde hücre replikasyona ve indüklenmiş apoptoza neden olduğu görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda NS'nin proliferasyonu destekleyici fonksiyonunun p-53'e bağlanıp onu inaktif hale getirmesi sayesinde olduğu belirtilmiştir (Bernardi and Pandolfi, 2003). Ama yine de şimdiye kadar bu hipotezi destekleyecek bilimsel bir kanıt sunulmamıştır. NS ile p53'ün birbirine bağlanıp beraber çalışmalarına dair bilgiler fikrin ötesinde bir hipotez olarak kalmıştır (Tsai and McKay, 2002). Yoshida ve arkadaşlarının p53 dışında p21 ve p27 genlerinin ekspresyonuna bakmaları bu yolda atılmış iyi bir adım olmuştur. p21, p53'ün en öne çıkan efektörlerinden biri olup p53'ün hücre döngüsünü düzenleme fonksiyonunda görevli iken p27 de başka bir hücre döngüsü düzenleme molekülüdür. NS ekspresyonunun baskılanmasının, p21'in ekspresyonunda etkileyici bir artışa sebep olmadığı görülmüştür. Buna rağmen NS'nin, p27 ekspresyonunu düzenleyebileceği ve p27 aracılığı ile hücre döngüsünde duraklamaya neden olabileceği öne sürülmüştür. Yakın tarihte yapılan çalışmalar NS'nin hücre döngüsü kontrolünü p53 bağımsız bir yoldan düzenleyebileceği fikrini ortaya atmıştır. Yoshida ve arkadaşları, NS'nin daha önce sadece kök hücrelere spesifik olduğunu öne süren çalışmalardan farklı olarak normal hücreler, neoplazik oral epitelyum hücrelerinde ve de oral yassı sarkoma hücrelerinde sürekli olarak ifadelendiğini göstermişlerdir. Son günlerde CD44, CD133 gibi yüzey belirteçleri ve çoklu tarama proteinlerinin oral yassı hücre karsinomu hücreleri için bir belirteç olduğu rapor edilmiştir (Yoshida *et al.*, 2011).

Nükleosteminin kök hücre ve kanser hücrelerinin çoğalmasındaki olası rolü dikkate alınarak birçok tümör dokusunda ve kanser türünde bu genin ifadenme profillerine bakılmıştır. Literatürde şimdiye dek özefajiyal yassı hücre karsinomu, prostat kanseri, meme kanseri, mide ve karaciğer kanseri, renal karsinom ve akciğer kanser hücrelerinde nükleostemin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

Sunulan bu tez çalışmasının amacı Glioblastoma Multiforme tümör dokuları ve normal beyin dokuları arasındaki nükleostemin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasıdır. Glioblastoma Multiforme tümör dokularında nükleostemin ifadesine bakılması nedeni ile bu çalışma literatürde bir ilktir. Bu çalışma planlanırken literatürde var olan pek çok farklı kanser türüne ait solid tümör örnekleri üzerinden elde edilen bulgulardan yararlanılmıştır.

Çalışmamız son yıllarda en çok rastlanan ve beyin kanserinin en ölümcül tümör türü olan Glioblastoma Multiforme’li hastalardan alınan hem normal beyin dokusu hem de malign GBM dokularındaki NS ekspresyonuna ve bu ekspresyon seviyesi ile GBM hücreleri arasında olabilecek potansiyel bir ilişki üzerinde kurulan hipoteze dayanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda 20 hastadan toplanan GBM tümör dokuları ve yine aynı hastalara ait olan normal beyin dokularının yanı sıra 3 adet GBM hücre serisi kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında Glioblastoma Multiforme tümör dokuları ve normal beyin dokuları arasındaki nükleostemin ekspresyon düzeyleri eş zamanlı PZR yöntemi ile saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 20 hastanın 16’sında (hastaların %80’inde) tümör dokusundaki NS ekspresyon seviyesinin beklediğimizin aksine normal beyin dokularına göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0.001$).

Hasta örneklerine paralel olarak GBM hücre serilerinde de NS ekspresyonunun beklenenin aksine oldukça düşük olduğu saptanmıştır. 20 hastanın sadece 3 tanesinin tümör dokusunda NS’nin yüksek miktarda ifadelendiği ortaya çıkmıştır. Sadece 1 hastada ise tümör dokusu ile normal doku arasındaki ekspresyon düzeylerinin eşit olduğu bulunmuştur.

Bulgular hasta bilgileri ile karşılaştırıldığında hastaların yaşı, cinsiyeti, boy-kilo gibi fiziksel özellikleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır. GBM tümör dokularındaki bu ekspresyon profili daha önce hiçbir çalışmada gösterilmemiş olup bu tez çalışmasının özgünlüğünü destekleyen temel bir bulgudur.

Elde edilen sonuçlar, Fan ve arkadaşlarının 2006 yılında normal ve malign böbrek dokularındaki nükleostemin ekspresyonunu araştırdıkları çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Fan ve arkadaşları çalışmalarında normal ve malign böbrek hücrelerinin yanı sıra böbrek tümör hücre serileri de kullanılmıştır. Bu araştırmacıların yaptıkları çalışmanın sonucunda tümör doku örneklerinin hemen hemen yarısında NS mRNA ekspresyonuna rastlanmıştır. Bunun yanı sıra 3 hastadan aldıkları örneklerin analizi sonucunda normal dokuda NS ekspresyonu saptanırken tümör dokularında saptanamamıştır.

4 hastada ise normal doku ile tümör doku arasındaki ekspresyon seviyesinde bir fark bulunamamıştır. Sunulan bu tez çalışmasında da 20 hastanın 1'inde tümör doku ile normal doku arasındaki ekspresyon seviyesinde bir farka rastlanmazken 16'sında normal dokuda NS'nin daha fazla ifadelendiği bulgusu ortaya konmuştur.

Fan ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak bu tez çalışması NS'nin GBM tümör dokularına nazaran yakın komşu normal beyin dokularında oldukça yüksek seviyede eksprese edildiğini, dolayısı ile Tsai ve McKay'in 2002'de öne sürdüğü NS'nin sadece kök hücre ve kanser hücrelerinde ifadelendiği hipotezine zıt olarak farklılaşmış erişkin dokularda da ifadelenbildiği gösterilmiştir. NS'nin kök hücreler, kanser hücreleri veya normal farklılaşmış hücrelerdeki varlığı, hücreler aktif çoğalma dönemindeyken NS ifadesinin kazanılmış olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Dolayısı ile bu sonuçlardan yola çıkılarak NS'nin, sadece kök ve kanser hücrelerinin hücre döngü kontrolünde rol alan bir molekülden ziyade daha çok bir proliferasyon belirteci olarak adlandırılabilirdiği öne sürülebilir. NS ekspresyonunun normal beyin dokularında görülmesine, bu hücrelerde saptanan NS transkriptinin aslında proliferatif bazı farklılaşmış hücreler veya başka hücre tipleri tarafından da eksprese edilebildiği şeklinde bir açıklama getirilebilir.

Bu bulguların ışığı altında sadece kanser hücresi ve kök hücrelerde ifade edildiği ancak farklılaşmış hücrelerde ifadelenmediği Tsai ve McKay tarafından 2002 yılında öne sürülmesine rağmen nükleostemin geninin, farklılaşmış normal beyin dokusunda yüksek oranda ifadelendiği ilk kez bu tez çalışması ile belirlenmiştir. Bu durum NS'nin tümöral olmayan normal beyin dokusunda yüksek oranda ifadelenen bir protein olabileceği görüşünü destekler niteliktedir. Nükleosteminin normal dokuda tümör ile aynı miktarda ya da normal dokuda tümör dokusundan daha fazla ifadelenmesi NS'nin kök ve kanser hücrelerinin çoğalmasında spesifik bir rolü olduğu düşüncesinin sorgulanmasına sebep olmaktadır. Buna ek olarak bu sonuçlara, tümöre komşu yakın çevredeki normal beyin dokularındaki tümör hücre kontaminasyonunun da sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu düşüncüyü GBM'in yayılma özelliğinin çok yüksek olması da desteklemektedir. Bu kontaminasyon sonucu normal dokuda NS mRNA seviyesinin yüksek çıkmış olabileceği ihtimal dahilindedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sayesinde kan, meme, beyin, dalak, baş ve boyun, kolon, deri, ve yumurtalık kanserlerinde kanser kök hücrelerinin (KKH'lerin) olduğu bildirilmektedir (Singh *et al.* 2004, Li *et al.* 2007, Prince *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda da KKH'lerin GBM tümör dokularında da bulunma ihtimali düşünülmektedir. Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlarda 3 hastanın GBM tümör dokusunda NS ekspresyonunun oldukça fazla olduğu bilgisine varılmıştır. Diğer örneklerde tümör dokuda NS ekspresyonu düşük iken sadece 3 hastada yüksek olması bu duruma kanser kök hücrelerinin sebep olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Tümör dokusunda normal dokusuna göre NS ekspresyonu fazla çıkan hastalarda kanser kök hücre miktarının fazla olabileceği düşünülmektedir.

Özellikle KKH'lerde NS ekspresyonunun düşük ve yüksek olması hücre siklusunda bir blokaja neden olabilmektedir (Fan *et al.*, 2006, Yoshida *et al.*, 2011). Bu durum, bizim çalışmamızda NS ekspresyonunun 3 hastada yüksek olarak belirlenmesinin nedeni olarak bu hasta örneklerinde CD133⁺ kanser kök hücrelerinin fazla miktarda bulunma olasılığını akla getirmektedir. Ancak tam net bir sonuca ulaşmak amacı ile tümör dokusu ile KKH'ler arasındaki NS ekspresyon farkının ayrıca irdelenmesi gerekmektedir.

Bizim çalışma bulgularımız ile uyumlu olan Fan ve arkadaşlarının çalışmasından da ulaşılan sonuçlardan farklı olarak; literatürde bazı kanser türlerine ait tümör dokularında NS ekspresyonunun tümör dokuda normal dokuya göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda genellikle tümör dokusu aynı hastanın normal dokusu ile karşılaştırılmamış, sadece tümörler kendi aralarında kıyaslanmıştır. Bizim çalışmamızda ise aynı hastanın hem tümör hem de normal dokularındaki ekspresyon seviyeleri kıyaslanmıştır.

NS ribozom biyogenezinde rol alan ana proteinlerden biridir. Bu nedenle erişkin bölünmeyen hücrelerde de bazal seviyede bir NS ekspresyonunun beklenmesi olasıdır. Yüksek oranda protein sentezi olan dokularda NS'nin ribozom biyogenezindeki rolünden dolayı bazal seviyede NS ekspresyonu olabileceği yorumu yapılabilir.

Bu tez çalışmasında; NS geninin normal beyin dokusunda da transkripsiyon aktivasyonunun olup olmadığını anlamak için GBM tümörü komşuluğunda olan normal beyin dokusu örnekleri cerrahi yolla alınarak bu dokularda NS mRNA düzeyi incelenmiştir. Enteresan olarak tümör dokularında NS ekspresyonu normal beyin dokusuna göre oldukça düşük bulunmuştur. NS'nin, normal ve malign beyin dokularında tek bir hücre proliferasyon regülatörü veya kök hücre ve kanser hücrelerinde yaşamın devamlılığında sorumlu bir protein olarak tanımlanmasından ziyade hem normal hem malign beyin dokularında ifadelendiği saptanmıştır.

Ran-lu Liu ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı çalışmada NS'nin prostat kanserindeki ekspresyonuna ve bu ekspresyonun PC-3 isimli prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasına olan etkisi araştırılmıştır. NS geni ile prostat kanseri patogenezi arasındaki herhangi bir ilişkiyi saptamak amacı ile hücrelerin çoğalma kapasitesi ve NS gen ekspresyonunun değişimi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda prostat kanseri hastalarından toplanan tümör dokularının tamamında NS mRNA'sına rastlanmıştır. Sonuç olarak NS geninin prostat kanseri tümörlerinde ve 3 adet genel prostat kanseri hücre serisinde tıpkı başka çalışmalarda da görüldüğü üzere yüksek miktarda eksprese edildiği ortaya konulmuştur. Tüm bu çalışmalar sonucunda NS'nin prostat kanserinde tedavi edici gen hedefi olarak kullanabileceği kanısına varılmıştır. Ancak bu çalışmada kontrol grubu olarak, tümör dokusu olan hastalardan normal doku örneği alınmamıştır. O nedenle prostat kanseri hastalarının normal prostat dokularındaki ekspresyon seviyesi bilinmemektedir.

Bizim çalışmamızdan farklı olarak prostat kanseri hücrelerinde NS ekspresyonunun yüksek seviyede olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Prostat kanseri tümör dokularında yüksek NS ekspresyonuna rastlanırken GBM tümör dokularında rastlanmaması normal beyin dokusunda zaten yüksek oranda ifadelendiğini düşündürmektedir.

Si-Jin Liu ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları başka bir çalışmada NS'nin mide kanseri, karaciğer kanseri ve başka malignansilerde tümör büyüme düzenlenmesi üzerindeki rolü araştırılmıştır. Bu dokuların tümünde NS'nin eksprese edildiği anlaşılmıştır.

RT- PZR sonuçlarına göre malign ve benign tümör dokuları ve benign hiperplazi gösteren dokularda yüksek oranda NS ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bizim sonuçlarımızla kıyaslandığında bakılan tümör türlerinin aksine GBM tümörlerinde NS ekspresyonunun düşük bulunduğu görülmektedir.

Zhang ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı bir diğer çalışmada insan özefagal yassı hücre karsinoması (ESCC) dokularındaki NS ekspresyonuna bakılmıştır. Bu çalışmada ise normal olmayan NS ekspresyonunun bazı kanserlerde karsinogenez ile bağlantılı olabileceği hipotezine çıkarım yapılmıştır. Çalışma için hastaların hem normal hem de tümörlü dokularından örnek alınmıştır. Yapılan genetik analizler sonucunda hastaların yarısından fazlasında tümör dokuda normal dokuya göre daha yüksek derecede NS ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Normal dokularda yapılan analiz sonuçlarına göre normal dokuların bir kısmında da NS ekspresyonuna rastlanmıştır. Özetle NS ekspresyonunun özefagal tümör dokularında sıklıkla bulunduğu, buna ek olarak NS ekspresyonunun normal dokularda da saptanabileceği bilgisine ulaşılabilmektedir. Tıpkı bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar gibi normal beyin dokularında da normal özefagal dokularda olduğu gibi NS ekspresyonuna rastlanabilmektedir.

Mide kanseri (Yang *et al.*, 2005), karaciğer kanseri (Si-Jin Liu *et al.*, 2004), özefajiyal yassı hücre karsinoması (Zhang *et al.*, 2009), prostat kanseri (Ran-Lu Liu *et al.*, 2008) gibi solid tümör örneklerinde yapılan çalışmalarda nükleosteminin tümör dokusu ve tümör hücre serilerinde yüksek oranda ifadelendiği belirtilirken, bu tez çalışmasında GBM tümör hücresi ve hücre serilerinde nükleosteminin düşük oranda ifadelendiği ortaya konulmuştur. Bu farklılığa sebep olabilecek birçok düşünce aklımıza gelmektedir.

NS ekspresyonu azaldığında bunun yerine nükleostemin ailesinden olan GNL3L'nin ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir. GNL3L miktarı arttığında TRF1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak G2-M blokajı (hücre döngü blokajı) ortadan kalkmaktadır (Meng *et al.*, 2011). GNL3L'nin baskılanması, hücre döngüsünde G2-M arestine ve p53 aracılı p21 upregülasyonuna ve apoptoza yol açmaktadır.

NS aktivitesi ile karşılaştırıldığında GNL3L, MDM2'nin bazal regülatörüdür. NS ve GNL3L, MDM2'nin stabilizasyonundan sorumlu, p53 aktivasyonunu baskılayan birer nükleolar proteindir. Her iki proteinin de tümör formasyonunun ortaya çıkmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. GNL3L ve NS birlikte NS ailesi proteini olarak MDM2'yi ve P53'ü kontrol eden tümör promoting (ilerletici) genler olarak tanımlanmıştır (Meng *et al.*, 2011). Dolayısı ile bu tez çalışmasında GBM tümör dokularında NS ekspresyonunun düşük olması GNL3L miktarında bir artışa neden olarak TRF1 üzerinden telomer sentezine ve sonuç olarak hücre proliferasyonuna neden olmuş olabilir.

NS ile ilgili bilgilerin dışında bu tez çalışmasında p53 geninin ifade düzeylerinin GBM hastalarında belirlenmesi konusunda yapılan istatistiksel analizler doğrultusunda bu gen ifadesi ile GBM hastalarının tümör dokuları arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0.115). Bu sonucu destekler nitelikteki literatür çalışmaları da GBM ile p53 ekspresyonu arasında bir korelasyon olmadığını, GBM'de genellikle p53 mutasyonlarının görüldüğünü bildirmektedir (Facoetti, 2008, Hiroyuki, 2010).

Bu tez çalışmasında GBM tümör dokularında NS ekspresyonlarının normal beyin dokusuna göre düşük olmasına rağmen NS ve P53 ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel düzeyde güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (p=0.015). Bu sonuç, literatür ile uyumlu olarak NS'nin MDM2 üzerinden ve p53'e direkt bağlanarak p53'ü regüle ettiğini destekleyen bir bulgudur (Ma and Pederson 2008, Meng *et al.* 2011).

Tüm bu tartışılan bilgilerin ışığı altında NS'nin aslında bazı dokularda erişkin hücrelerde de ifadelenebildiği, bu özelliğin sadece kök hücre ve kanser hücrelerine has olmadığı düşüncesi önemli ölçüde öne çıkmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, NS'nin kök hücre ve kanser hücrelerinde yaşamın devamından sorumlu bir belirteç ve hücre proliferasyonunun yegane regülatörü olarak literatürde anılmasının aksine bölünmeyen diferansiye erişkin hücrelerde de ifadelenebileceğini göstermiş ve şimdiki dek sunulan görüşlerin aksine karşıt bir bulgu olarak ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasında GBM tümör hücrelerinde NS'nin tanı ve tedavide hedef olarak kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Temel Çıkarımlar ve Yapılması Gerektiği Düşünülen Çalışmalar

Bu tez çalışmasından çıkan sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

- Normal beyin dokusunda NS ekspresyonunun yüksek çıkması nedeni ile normal diferansiye beyin dokusunda bazal seviyede NS ekspresyonu gözlenebileceği ilk kez belirlenmiştir. Bu sonuç NS'nin farklı normal dokularda farklı düzeyde ifadelenebileceği görüşünü desteklemektedir.
- NS ekspresyonundaki azalma NS ailesinden GNL3L ekspresyonunda artışa ve hücre proliferasyonuna neden olduğundan NS ekspresyonunun düşük olduğu gözlenen tümör hücrelerinde bir NS ailesi proteini olan GNL3L'nin de ekspresyon profilinin incelenmesi çok önem kazanmıştır. Dolayısı ile bu tez çalışması, 2002 yılından itibaren NS'nin tanımında yer alan kanser ve kök hücrelerde yüksek ifade edildiği görüşünün aksine GBM tümör hücrelerinde NS ifadesinde azalma olduğunu gösteren ilk verileri ortaya koymuştur.
- GBM tümörlerinde p53 ekspresyonundan bağımsız olarak genellikle mutasyonel fonksiyon eksikliği söz konusudur. Bu tez çalışmasında GBM'li hastaların tümör dokularında p53 mRNA düzeylerinde normal beyin dokusuna göre fark saptanmazken, p53 ekspresyonu ile NS ifadesi arasında istatistiksel olarak güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir. Yani NS ekspresyonunun artması / azalmasının p53'e bağımlı olarak gerçekleştiği saptanmıştır. Bu da NS'nin p53'e direkt bağlanarak ve MDM2 üzerinden p53'ü regüle ettiğini destekleyen bir bulgudur.

- 3/20 GBM'li hastanın örneklerinde normal beyin dokularına göre NS ekspresyonunun yüksek düzeyde gözlenmesi kanser kök hücresi miktarının bu tümörlerde artmış olabileceği fikrini akla getirmiştir ve NS düzeylerinin CD133+ ve CD44+ kök hücrelerde yeniden değerlendirilmesi planlanmıştır.
- NS'nin sadece kök hücre ve kanser hücrelerinde yüksek miktarda ifade edildiği ve bir proliferasyon belirteci olması görüşünün aksine 2011 literatürleri ile uyumlu olarak NS'nin düşük ifadesinin de karsinogenez ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.
- GBM tümör hücrelerinin çevre dokuya kolayca invazyon yapabilmesi durumu göz önüne alınarak sonuçları karşılaştırmak için otopsi serilerinden elde edilen örneklerde de Nükleostemin geninin ifade düzeylerine bakılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adamson, C., Kanu, OO., Mehta, AI., Di, C., Lin, N., Mattox, AA., Bigner, DD. 2009. Glioblastoma Multiforme: A review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 18; 1061-1083.

Adilay, HU. 2006. Glioblastoma multiforme ve benign menenjiom olgularında tümör dokusunda ölçülen çinko, demir ve kadmiyum düzeylerinin karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, 10-12.

Al-Hajj, M., Clarke, MF. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 23; 7274-82.

Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G.C., Phinney, D.G. 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*, 89; 1235-1249.

Beekman, C., Nichane, M., De Clercq, S., Maetens, M., Floss, T., Wurst, W., Bellefroid, E., Marine, J.C. 2006. Evolutionarily conserved role of nucleostemin: controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development. *Mol Cell Biol*, 26; 9291-9301.

Bernardi, R., Pandolfi, PP. 2003. The nucleolus: at the stem of immortality. *Nat Med*, 9; 24-25.

Blumenthal, DT., Schulman, SF. 2005. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother*, 5; 683-690.

Burger, PC., Green, SB. 1987. Patient age, histologic features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*, 59; 1617-1625.

Burger, PC., Vogel, F. 1985. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma: pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*, 56; 1106-1111.

Clarke, JW, Chang, EL. 2008. Optimizing radiotherapy schedules for elderly glioblastoma multiforme patients. *Expert Rev. Anticancer Ther*, 8; 733-741.

Dai, MS., Sun, XX., Lu, H. 2008. Aberrant expression of nucleostemin activates p53 and induces cell cycle arrest via inhibition of mdm2. *Mol Cell Biol*, 28; 4365-4376.

Deangelis, LM. 2001. Brain Tumors. *The New England Journal of Medicine*, 334; 114-123.

Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Govoni, M., Sirri, V., Chieco, P. 2000. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol*, 191; 181-186.

Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Montanaro, L., Sirri, V., Ochs, RL. 1998. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol*, 152; 1291-1297.

Du, X., Rao, MR., Chen, XQ., Wu, W., Mahalingam, S., Balasundaram, D. 2006. The homologous putative GTPases grn 1 p from fission yeast and the human gnl3l are required for growth and play a role in processing of nucleolar pre-rRNA. *Mol Biol Cell*, 17; 460-474.

Durmaz, R., Vural, M. 2007. Primer ve sekonder glioblastoma multiforme genetiği. *Türk Nöroşirurji Dergisi*, 17; 80-90.

Facoetti, A., Ranza, E., Nano, R. 2008. Proliferation and programmed cell death: role of p53 protein in high and low grade astrocytoma. *Anticancer Research*, 28; 15-20.

Fu, D., Collins, K. 2007. Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Mol Cell*, 28; 773-785.

Genecards. 2009. Gnl3 Gene in genomic location: bands according to ensembl, locations according to (and/or entrez gene and/or ensembl if different).
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GNL3>

Hiroyuki, M., Yoshitaka, N., Yuko, M., Yasuji, M., Soichiro, S. 2010. p53 abnormality and tumor invasion in patients with malignant astrocytoma. *Brain Tumor Pathol*, 27; 95-101.

- Horn, HF., Vousden, KH. 2004. Guarding the Guardian? *Nature*, 427; 110-111.
- Huang, M., Whang, P., Chodaparambil, J., Pollyea, D., Kusler, B., Xu, L. 2011. Reactive oxygen species regulate nucleostemin oligomerization and protein degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286; 11035-11046.
- Kafienah, W., Mistry, S., Williams, C., Hollander, AP. 2006. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem Cells*, 24; 1113-1120.
- Kanu, O., Hughes, B., Di, C., Lin, N., Fu, J., Bigner, D., Yan, H., Adamson, C. 2009. Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clinical Medicine Oncology*, 3; 39-52.
- Kaplan, DD., Zimmermann, G., Suyama, K., Meyer, T., Scott, MP. 2008. A nucleostemin family gtpase, ns3, acts in serotonergic neurons to regulate insulin signaling and control body size. *Genes Dev*, 22; 1877-1893.
- Kleihues, P., Louis, DN., Wiestler, OD., Burger, PC., Scheithauer, BW. 2007. WHO Classification of tumors of the central nervous system (4th Ed.). International Agency for *Research on Cancer (IARC) Lyon*, p:10-11.
- Krakstad, C., Chekenya, M. 2010. Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: oppurtunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*, 9; 135.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C. 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130; 2596-2606.
- Kudron, MM., Reinke, V. 2008. C. Elegans nucleostemin is required for larval growth and germline stem cell division. *PLoS Genet*, 4; 100-181.
- Leipe, DD., Wolf, YI., Koonin, EV., Aravind, L. 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, 317; 41-72.

Li, C., Heidt, DG., Dalerba, P., Burant, CF., Zhang, L., Adsay, V. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67; 1030-1037.

Liu, RL., Zhang, ZH, Zhao, WM., Wang, M., Qi, SY., Li, J., Zhang, Y., Li, SZ., Xu, Y. 2008. Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of Pc-3 Cells. *Chin Med J (Engl)*, 121; 229-304.

Liu, S., Cai, Z., Liu, Y., Dong, M., Sun, L.. 2004. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. *World J Gastroenterol*, 10; 1246-1249.

Louis, DN., Ohgaki, H., Wiestler, OD., Cavenee, WK., Burger, PC., Jouvet, A., Scheithauer, BW., Kleihues, P. 2007. The 2007 WHO classification of Tumors of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114; 97-109.

Ma, H., Pederson, T. 2007. Depletion of the nucleolar protein nucleostemin causes G1 cell cycle arrest via the p53 pathway. *Mol Biol Cell*, 18; 2630-2635.

Mahsihid, M., Seyed, JM., Hooshang, S., Malek, HA., Yaser, A. 2010. Differential expression of nucleostemin, a stem cell marker, and its variants in different types of brain tumors. *Molecular Carcinogenesis*, 4; 818–825.

Maki, N., Takechi, K., Sano, S., Tauri, H., Sasai, Y., Agata, K. 2007. Rapid accumulation of nucleostemin in nucleolus during newt regeneration. *Dev Dyn*, 236; 941-950.

Meng, L., Yasumoto, H., Tsai, RY. 2006. Multiple controls regulate nucleostemin partitioning between nucleolus and nucleoplasm. *J Cell Sci*, 119; 5124-5136.

Meng, L., Lin, T., Tsai, RY. 2008. Nucleoplasmic mobilization of nucleostemin stabilizes mdm2 and promotes G2-M progression and cell survival . *J Cell Sci*, 121; 4037-4046.

Meng, L., Hsu, J. K., Tsai, R. Y. 2011. GNL^L depletion destabilizes MDM2 and induces p53-dependent G2/M arrest. *Oncogene*, 30; 1716-1726.

Mimeault, M., Hauke, R., Mehta, PP., Batra, SK. 2007. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med*, 11; 981-1011.

Misteli, T. 2005. Going in Gtp Cycles in the Nucleolus. *J Cell Biol*, 168; 177-178.

Mu-Shui, Dai, Xiao-Xin, Sun, Hua, Lu. 2008. Aberrant expression of nucleostemin activates p53 and induces cell cycle arrest via inhibition of MDM2. *Mol and Cell Bio*, 28; 4365-4376.

NCBI. 2009. Gnl3l guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar). National Center for Biotechnology Information.

Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre PL., Burkhard C., Lutof U., Kleihues P., Yasargil M. G. 2004. Genetic pathways to Glioblastoma: a population based study. *Cancer Res*, 64; 6892-6899.

Ohmura, M., Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Shugo, H., Tamase, A., Uema, N., Ooshio, T., Arai, F., Tabuko, K., Nagamatsu, G., Hamaguchi, I., Takagi, M., Ishihara, M., Sakurada, K., Miyaji, H., Suda, T., Hirao, A. 2008. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells*, 26; 3237-3246.

Parsons, DW., Jones, S., Zhang, X., Lin, JC., Leary, RJ., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, IM., Gallia, GL., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, BA., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, DA., Tekleab, H., Diaz LA, JR., Hartigan, J., Smith, DR., Strausberg, RL., Marie, SK., Shinjo, SM., Yan, H., Riggins, GJ., Bigner, DD., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, VE., Kinzler, KW. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, 321; 1807-1812.

Politz, JCR., Polena, I., Trask, I., Bazett-Jones, DP., Pederson, T. 2005. A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. *Mol Biol*, 16;401-3410.

Prince, ME., Siyanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, GT., Kaplan, MJ., Dalerba, P. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*, 104; 973-978.

Raksa, I., Shaw, PJ., Cmarko, D. 2006. New Insights into nucleolar architecture and activity. *Intl. Rev. Cytol*, 255; 177-235.

Reya, T., Morrison, SJ., Clarke, MF., Weissman, IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414; 105-111.

Romanova, L., Grand, A., Liying, Z., Rayner, S., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S., Kikyo, N. 2009. Critical role of nucleostemin in Pre-rRNA processing. *The journal of Biological Chemistry*, 284; 4968-4977.

Rossel, R., De Las Penas, R., Balana, C., Santarpia, M., Salazar, F., De Aguirre, I., Reguart, N., Villa, J., Wei, J., Ramirez, JL., Molina, MA., Ycajal, SR., Jablons, D., Taron, M. 2008. Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *Future Oncology (London, England)*, 4; 219-228.

Rubbi, CP., Milner, J. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to dna damage and other stresses. *EMBO J.* , 22; 6068-6077.

Sarkar, C., Jain, A., Suri, V. 2009. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*, 46; 108-119.

Sathornsumetee, S., Rich, JN. 2007. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 1142; 108-132.

Sathornsumetee, S., Rich, JN. 2008. Designer therapies for glioblastoma multiforme . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1142; 108-132.

Siddiqi, S., Gude, N., Hosoda, T., Muraski, J., Rubio, M., Emmanuel, G., Fransioli, J., Vitale, S., Parolin, C., D'amario, D., Schaefer, E., Kjstura, J., Leri, A., Anversa, P., Sussman, MA. 2008. Myocardial induction of nucleostemin in response to postnatal growth and pathological challenge. *Circ Res*, 103; 89-97.

Singh, SK., Clarke, ID., Hide, T., Dirks, PB. 2004. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23;7267-73.

Singh, SK., Hawkins, C., Clarke, ID., Squire, JA., Bayani, J., Hide, T. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432; 396-401.

Tsai, RY., McKay, RD. 2005. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol*, 168; 179-184.

Tsai, RY., Meng, L. 2009. Nucleostemin: A latecomer with new tricks. *Int J Biochem Cell Biol*, 41; 2122-2124.

Tsai, RY., McKay, RD. 2002. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev*, 16; 2991-3003.

Vogelstein, B., Lane, D., Levine, AJ. 2000. Surfing the p53 Network. *Nature*, 408; 307-310.

Vousden, KH. 2006. Outcomes of p53 activation-spoilt for choice. *J Cell Sci*, 199; 5015-5020.

Yaghoobi, MM, Mowla, SJ., Tiraihi, T. 2005. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neurosci Lett*, 390; 81-86.

Yang, HX., Jin, GL., Meng, L., Zhang, JZ., Liu, WB., Shou, CC. 2005. Screening and identification of proteins interacting with nucleostemin. *World J Gastroenterol*, 11;4812-4814.

Yasumoto, H., Meng, L., Lin, T., Zhu, Q., Tsai, RY. 2007. GNL3L inhibits activity of estrogen related receptor {gamma} by competing for coactivator binding. *J Cell Sci*, 120; 2532-2543.

Yoshida, R., Fujimoto, T., Kudoh, S., Nagata, M., Nakayama, H., Shinohara, M. 2011. Nucleostemin affects the proliferation but not differentiation of oral squamous cell carcinoma cells. *JCA*, doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01935.x.

Zhang, G., Zhang Q, Zhang QI., Yin, L., Li, S., Kuisheng, C. 2009. Expression of nucleostemin, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol*, 29; 129-135.

Zhu, Q., Meng, L., Hsu, JK., Lin, T., Teishima, J., Tsai, RY. 2009. GNL3L stabilizes the TRF1 complex and promotes mitotic transition. *J Cell Biol*, 185; 827-839.

Zhu, Q., Yasumoto, H., Tsai, R.Y. 2006. Nucleostemin delays cellular senescence and negatively regulates Trf1 protein stability. *Mol Cell Biol*, 26; 9279-9290.

Zhu, Q., Yasumoto, H., Tsai, RY. 2006. Nucleostemin delays cellular senescence and negatively regulates TRF1 protein stability. *Mol. Cell. Biol*, 26; 9279-9290.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ezgi ÇALIŞKAN

Doğum Yeri: Adapazarı

Doğum Tarihi: 10/02/1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Karasu Şehit Üsteğmen İbrahim Abanoz Süper Lisesi (1998-2002)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2003-2008)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Danone-Tikveşli Gıda ve İçecek San. Tic. Ltd. Şti. (2010-2011)