



ACIBADEM
ÜNİVERSİTESİ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOMALARIN OLUŞMASINDAKİ GENETİK
FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ**

BÜŞRA ŞENKUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN
Yrd.Doç.Dr.Yavuz OKTAY

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()
Anabilim Dalı :Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı
Tez Sahibi :Büşra Şenkun
Tez Başlığı : Gliomaların Oluşmasındaki Genetik Faktörlerin İncelenmesi
Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi, Kerem Aydınlar Kampüsü
Sınav Tarihi : 05.12.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı) Kurumu İmza

Yrd.Doç.Dr.Yavuz OKTAY Acıbadem Üniversitesi



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Ergün Pınarbaşı Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Yrd.Doç.Dr.Yavuz Oktay Acıbadem üniversitesi
Yrd.Doç.Dr.Deniz Ağırbaşı Acıbadem Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

05.12.2014

Büşra Şenkun

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2011–2014 yılları arasında Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Tüm hasta örneklerinin sağlanması ve analizindeki katkılarından dolayı Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Necmettin Pamir ve DoçDr.Koray Özduman'a, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Aydın Sav'a, Acıbadem LABGEN/GENETİKA laboratuvarlarının imkanlarını sunarak bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan Prof.Dr.Cengiz Yakıcıer'e, ve Yüksek Lisans arkadaşım Yiğit Erdemgil başta olmak üzere, emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan ve bilgi birikimiyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Yrd.Doç.Dr.Yavuz Oktay'a ,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü yardımı yapan başta program koordinatörümüz Prof.Dr.Aysel Özpınar olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı'nda görev alan tüm öğretim üyelerine,

Yüksek lisans eğitimim sırasında beni motive eden değerli arkadaşlarım Yazgı Özger'e, eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan aileme, ve müstakbel eşim Halil Bozan'a en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Büşra ŞENKUN

Aralık, 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR VE SİMGE LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	8
2.1.1. Karsinogeneizde Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler	9
2.1.2. DNA Tamir Genleri	9
2.1.3. Tümör Baskılayıcı Genler	10
2.1.4. Onkogenler	10
2.2. Beyin Tümörleri	12
2.2.1. Epidemiyoloji	12
2.2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	12
2.2.2.1. WHO Derecelendirmesi	13
2.2.3 Patogenez	14
2.3. Gliomalarda Görülen Genetik Değişiklikler	15
2.4. IDH Gen Murtasyonları	17
2.5. Diğer Genetik Değişiklikler	19
2.6. Hastalığa Yatkınlık Genlerinin Lokalizasyon Tespiti	20
2.6.1. Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP)	20
2.7. Asosiyasyon Çalışmaları	21
2.7.1. Genom Boyu Asosiyasyon Çalışması	22
2.7.2. Gliomaların Oluşmasındaki Risk Alelleri	22
2.8. CCDC26 Geni (8q24/rs4295627 polimorfizmi)	23

3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Gereçler	26
3.1.1. Çalışma Grubu	26
3.1.2. Cihazlar	26
3.1.3. Kimyasal Malzeme ve Kitler	26
3.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	27
3.1.4. Kullanılan Enzim ve Primerler	27
3.1.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri	27
3.1.4.2. Restriksiyon Enzim ve Tamponları	28
3.1.5. Oligonükleotit Primerler	28
3.1.6. DNA Büyüklük Markörleri	28
3.1.7. Plastik Malzemeler	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu	29
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
3.2.3. Restriksiyon Enzimi ile Kesim	31
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	32
3.2.5. DNA Dizi Analizi	33
3.2.6. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. DNA izolasyonu	35
4.2. rs4295627 ve Çevresinin PCR ile Çoğaltılması	35
4.3. rs4295627 Genotipinin RFLP ile Belirlenmesi	35
4.4. RFLP Sonuçlarının Sanger Yöntemi ile Değerlendirilmesi	36
4.5. Verilerin İstatistiksel Analizi	37
4.6. rs4295627 Risk Aleli ile Gliomalarda Yaygın Görülen Genetik Bozuklukların İlişkisi	44
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
6. KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	64

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

- μg : Mikrogram
 μl : Mikrolitre
 μM : Mikrometre
bç : Baz çifti
 CHCl_3 : Kloroform
dNTP : Deoksiribonükleotid
EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit
EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EtBr : Etidyum bromid
EtOH : Etanol
GBM: Glioblastoma Multiforme
HW : Hardy-Weinberg
HIF1- α : Hypoxia-inducible factor- α
IDH: İzositrat Dehidrogenaz
IDH1: izositrat Dehidrogenaz 1
L : Litre
M : Molar
 MgCl_2 : Magnezyum Klorür
ml : Mililitre
mM : Milimolar
NaCl : Sodyum klorür
MDM2 :The murine double minute 2
NADP :Nikotinamid adenin dinukleotid Fosfat
NaI : Sodyum iyodür
NaOH : Sodyum hidroksit
nm : Nanometre
PDGF-A: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü A
PDGFR :Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol : Pikomol
RFLP : Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi

rpm : Dakikadaki devir sayısı
SDS : Sodyum dodesil sülfat
SNP : Tek nükleotid polimorfizmi
TBE : Tris-Borik asit-EDTA
TE : Tris-EDTA
Tm:Erime Sıcaklığı
U:Unit
UV : Ultraviyole
V : Volt
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
 χ^2 : Ki-kare

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil-1: DNA Hasarı, Tamiri ve Etkileri	10
Şekil-2: Gliomaların oluşmasındaki genetik yolakar	16
Şekil-3: IDH mutasyonlarının hücreye etkileri	19
Şekil-4: GWAS ile belirlenen Glioma risk alelleri	23
Şekil-5: CCDC26 geninin kromozomdaki lokasyonu	24
Şekil-6: CCDC26 geninin izoformlarının ve SNP'lerin kromozomdaki lokasyonları	25
Şekil-7: Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi	35
Şekil-8: Rs4295627 PCR ürünlerinin % 3'lük agaroz jelde görüntülenmesi	35
Şekil-9: NcoI kesim ürünlerinin %3'lük agaroz jelde görüntülenmesi	36
Şekil-10: rs4295627 RFLP sonuçlarının dizi analizi ile konfirmasyonu	36
Şekil-11: rs4295627 Genotip Frekans Dağılımları	38
Şekil-12: rs4295627 G ve T alellerinin gliomlar ve kontrollerde frekansı	39
Şekil-13: rs4295627'nin oligodendrogliomlarda genotip frekans dağılımı	40
Şekil-14: Hasta grubunun glioma alt tiplerine göre dağılımı	52
Şekil-15: Rs4295627 risk alelinin farklı popülasyonlarda görülme sıklığı	53

TABLolar LİSTESİ

Tablo-1: Onkogenlerin görevleri	11
Tablo-2: Gliomaların WHO 2007 Sınıflandırması	14
Tablo-3: Gliomalar için Kullanılan Biyomarkerlar ve Görevleri	17
Tablo-4: rs4295627 çevresinin PCR ile çoğaltılması için kullanılan primerler	28
Tablo-5: rs4295627 (CCDC26) için PCR koşulları	31
Tablo-6: Restriksiyon Enzimi ile Kesim Şartları	32
Tablo-7: Rs4295627 için RFLP bilgileri	36
Tablo-8: Bireylerin cinsiyetlerine göre dağılımı	37
Tablo-9: Rs4295627-Glioma hasta grubu genotip/alel frekansları	37
Tablo-10: Rs4295627-Kontrol grubu genotip/alel frekansı	38
Tablo-11: Oligodendrogliom hasta ve kontrol grubu genotip frekansları	39
Tablo-12: Oligodendrogliom ve oligoastrocitom hasta ve kontrol grubu genotip frekansları	40
Tablo-13: GBM hasta ve kontrol grubu genotip frekansları	41
Tablo-14: IDH mutant difüz gliom hastalarının genotip frekansları	41
Tablo-15: Oligodendrogliomlar hariç difüz gliomların IDH mutant hastaların genotip frekansı	41
Tablo-16: Gliom hasta ve kontrol bireyleri için Hardy Weinberg hesaplaması	42
Tablo-17: Farklı modellere göre rs4295627 ile ilişkili gliom yatkınlığı	42
Tablo-18: Rs4295627 SNP'inin oligodendrogliomlar ile ilişkisi	43
Tablo-19: rs 4295627 ile IDH-mut difüz gliom ilişkisi	43
Tablo-20: rs4295627 ile IDH-mut oligodendrogliom hariç difüz oligodendrogliom ilişkisi	44
Tablo-21: rs4295627 ile ilişkisi incelenen genetik değişiklikler ve tanımlayıcı istatistikleri	44
Tablo-22: rs4295627 ve rs55705857 risk genotip dağılım tablosu	45
Tablo-23: rs4295627'nin rs55705857 risk aleli ile ilişkisi	45
Tablo-24 : rs4295627'nin IDH1 durumu	45
Tablo-25: rs4295627 ve IDH durumu risk karşılaştırması	46
Tablo-26: rs4295627 risk alelinin 1p19q ko-delesyonu dağılımı	46
Tablo-27 rs4295627 risk alelleri ile hTERT promotor mutasyonu dağılımı	46
Tablo-28: rs4295627 hTERT promotor mutasyonları risk karşılaştırması	47

Tablo-29: rs4295627 hTERT C228T mutasyonları dağılımı	47
Tablo-30: rs4295627 hTERT C228T ve risk karşılaştırması	47
Tablo-31 : rs4295627 risk alelleri ve p16 durumu	48
Tablo-32: rs4295627 ve p16 durumu risk karşılaştırması	48
Tablo-33: rs4295627 ve p53 ifadesi	48
Tablo-34: rs4295627 ve p53 durumu risk karşılaştırması	49
Tablo-35: rs4295627 ve pTEN durumu	49
Tablo-36: rs4295627 ve p53 durumu risk karşılaştırması	49
Tablo-37: rs4295627 risk alelinin tümör derecesine göre dağılımı	50
Tablo-38: rs4295627 genotipinin dominant modele göre diğer genetik değişiklikler ile ilişkisinin “Fisher’s exact test” ile incelenmesi	50

ÖZET

Beyin dokusundan kaynaklanan en sık görülen kanser tipi “gliomalardır”. Glioma tedavisi konusunda cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi modern tedavi yöntemleri ancak kısıtlı bir fayda sağlayabilmekte; hastalığın ilerleyici ve yıkıcı gidişini durduramamaktadır. Tüm bu tedavi yöntemleri uygulandığında bile ileri derece gliomalar için ortalama sağ kalım 1 sene civarındadır. Daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için hastalığın oluşum mekanizmalarının anlaşılması çok önemlidir.

Son 5 yıl içinde yapılan çalışmalar, glial tümörlerin gelişiminde “izositrat dehidrogenaz” (IDH) enzim mutasyonlarının kanserleşmenin erken safhalarında rol oynadığını göstermiştir. Hem mitokondrideki Krebs siklusunda (TCA siklusu) hem de sitoplazmadaki metabolik yollarda rol alan IDH'deki bozuklukların kanser oluşumu ile nedensellik ilişkisi halen tüm detayları ile ortaya konamamıştır.

Diğer taraftan, IDH mutasyonu taşıyan gliomalara ve oligodendrogliomalara genetik yatkınlık ile rs4295627 ve rs55705857 (8q24.21) ve rs498872 (11q23.3) numaralı tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP ya da TNP) ilişkisi son yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu tezin konusu olan araştırmanın amacı, bu SNP'lerin gliomalar ile ilişkisini ilk defa Türkiye kaynaklı bir hasta popülasyonunda analiz etmek ve diğer onkogenik değişimler ile olası ilişkisini ortaya çıkarmaktır.

Bu yüzden, glioma hastalarından elde edilen periferik kan ve tümör örnekleri ile kontrol popülasyonunda periferik kandan elde edilen DNA'larda rs4295627 genotipleme yapılmıştır. Daha sonra, risk alelinin gliomalarda sık görülen onkogenik bozukluklarla ve yine 8q24.21 yerleşimli SNP rs55705857 ile ilişkisi analiz edilmiştir. Çalışmada glioma histopatolojik tanısı ile opere edilen 135 hasta ve 164 sağlıklı kontrole ait örnekler kullanılmıştır.

Bu 135 tümör dokusu kanserleşmenin farklı evrelerindeki (grade-II, grade-III, grade-IV) ve farklı alt tipteki (oligodendroglioma, astrositom, oligoastrositom, glioblastoma multiform ve gliomatoz serebri) glioma örneklerinden seçilmiştir.

Analize tabi tuttuğumuz Türkiye kaynaklı hasta popülasyonunda elde ettiğimiz sonuçlar, 8q24.21 yerleşimli rs4295627 numaralı SNP ile gliom yatkınlığı arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Bu ilişki özellikle grade-2 ve grade-3 tümörlerde ve oligodendrogliomalarda daha güçlü bimde gözlenmiştir; IDH mutasyonu taşıyan gliomalarda ise daha zayıf bir ilişki görülmüştür. Diğer taraftan, rs4295627 genotipi ile tümör örneklerinde belirlenmiş olan yaygın onkogenik bozukluklar (1p19q kaybı, p53 ifadesi, p16 ifade kaybı, PTEN ifade kaybı, hTERT promotor mutasyonları, hTERT-C228T mutasyonu) ya da rs4295627'in yatkınlık etkisinden sorumlu olduğu iddia edilen rs55705857 numaralı SNP ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Son olarak, rs4295627'nin etkisinin artan tümör derecesi (grade) ile ters korelasyon gsterdiği grlmştr.

Anahtar Kelimeler: Glioma – karsinogenez – yatkınlık – nroonkoloji – IDH1-8q24 - CCDC26 - rs4295627

SUMMARY

Gliomas are the most frequent type of cancer arising from the brain tissue. Modern treatment modalities such as surgery, radiotherapy and chemotherapy only have a modest effect on the progressive and devastating course of the disease. Using all these modalities the median survival is still around one year. A better understanding of the disease mechanisms is fundamental to come up with novel treatment modalities.

Research in the last 5 years has indicated that “isocitrate dehydrogenase (IDH)” plays an important role in the development of gliomas. IDH primarily takes part in intracellular metabolism, in the Krebs (TCA) cycle. The causality of these mutations with glioma development has not been solidly established.

On the other hand, certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at 8q24.21 (rs4295627 and rs55705857) and 11q23.3 (rs498872) was recently linked to increased risk of oligodendroglioma and IDH-mutated glioma. The aim of the research that has been the subject of this thesis is to analyze these SNPs in Turkish population for the first time and to investigate a possible relation with common oncogenic changes seen in gliomas..

Thus, rs4295627 has been genotyped in genomic DNA from blood/tumor samples of glioma patients and from blood samples of healthy donors. Next, the relation between rs4295627 genotype and rs55705857 genotype and common oncogenic mutations in gliomas was analyzed statistically. A total of 135 patients and 164 healthy controls were included in the study.

These 135 patients included those with different subtypes of gliomas (oligodendroglioma, astrocytoma, oligoastrocytoma, glioblastoma multiforme and gliomatosis cerebri) at various grades (grade-II, grade-III, grade-IV)

Our results show that a strong relation exists between 8q24.21-localized rs4295627 genotype and increased glioma risk. The association was particularly strong for grade-2 and grade-3 gliomas and oligodendrogliomas, while the previously reported association with IDH-mutation was relatively weaker.

On the other hand, analysis of the relation between rs4295627 genotype and oncogenic changes common to gliomas (1p19q codeletion, p53 expression by immunohistochemistry, p16 expression loss, PTEN expression loss, hTERT

promotor mutations and particularly C228T mutation) did not reveal any statistically significant association by chi-square test. The same was true for the relation between rs4295627 and the more recently identified SNP rs55705857, which was claimed to be the causal change that is responsible for rs4295627's association with glioma.

Besides molecular changes, the relation between rs4295627 genotype and tumor grade was analyzed and a very strong association with lower grade (II and III) was observed.

Keywords: Glioma – carcinogenesis– predisposition – neurooncology – IDH1 - 8q24 - CCDC26 - rs4295627

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Beyin dokusundan kaynaklanan tümörlerin en sık görülen tipi gliomalardır. Bu grup tümörler farklı derecelerde malign özellikler gösterirler fakat ortak özellikleri tümünün tedavilerinin son derece zor olmasıdır. Bunun en önemli nedeni beyin dokusundan kaynaklanan bu tümörlerin normal işlevsel dokunun içine yayılarak büyümeleri ve hiçbir tedavi yöntemi ile tam olarak ortadan kaldırılamamalarıdır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) dört dereceli ("grade") sınıflamasına göre erişkinlerde görülen gliomalar (giderek artan maligniteyi gösterecek şekilde), derece I, II, III ve IV olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırmaya göre derece-I ve II gliomalar "düşük dereceli glioma"; derece-III ve IV gliomalar ise "yüksek dereceli glioma" olarak isimlendirilir; çünkü derece-II olarak tanımlanan tümörler klinik davranış, görüntüleme özellikleri, tedaviye cevapları, hayatta kalım süreleri açısından derece-III ve IV tümörlerden farklılık gösterirler; daha iyi seyirlidirler. Sağ kalım süresi tümörün derecesi ile ters korelasyon gösterir: derece-II tümörler için 10 yılı bulan ortalama sağ kalım, derece-IV GBM'ler için sadece 12 ay kadardır.

Yeni tanı almış beyin tümörlerinin yaklaşık % 50'si glial orijinli primer beyin tümörleri olup yüksek dereceli astrositomlar bu tümörlerin % 50-60'nı, düşük dereceli astrositomlar % 25-30'unu, oligodendrogliomlar ise % 5-15'lik kısmını oluşturmaktadır (1-5).

Glial tümörler konusunda bugüne kadar yapılmış çalışmalar hem düşük hem de yüksek dereceli tümörlerde izlenen temel genetik değişiklikleri tanımlamıştır (5). Bu değişiklikler arasında p53 tümör supresör yolağında olabilecek değişiklikler (TP53 mutasyonları, TP53 protein ekspresyonunu etkileyecek diğer genetik ve epigenetik değişiklikler, MDM2/4 mutasyonları, P14ARF mutasyonları), 1p ve 19q kromozom bölgelerini etkileyen ko-delesyon ya da translokasyonlar, izositrat dehidrogenaz (IDH1) gen mutasyonları (en sık IDH1-R132H), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)-alfa reseptör kopya sayısı artışı, epitelyal büyüme faktörü (EGFR) mutasyonları, ifade ve/veya kopya sayısı artışı, p16^{INK4a} delesyon ve mutasyonları, PTEN susturulması/delesyon ve mutasyonları, yakın zaman önce ortaya çıkarılan TERT promotör mutasyonları (C228T ve C250T) ile ATRX kaybı/mutasyonları sayılabilir (5).

IDH enzim mutasyonları ilk olarak 2008 yılında GBM'lerin yaklaşık % 10 kadarında belirlenmiş, daha sonra ise derece-II ve III gliomaların % 70-85'inde bulunduğu gösterilmiştir (6, 23). Hem derece-II hem derece-III tümörlerde benzer biçimde çok yüksek oranlarda görülmesi ve TP53 mutasyonları, 1p19q ko-delesyonu ya da genel genom metilasyonu-CIMP gibi bozukluklardan önce geliştiğinin gösterilmesi nedeniyle glioma gelişiminin en erken ve temel bir değişikliği olduğu düşünülmektedir. IDH mutasyonunun gliomalardaki kritik rolü tümörün klinik davranışına da yansır: IDH1/2 mutasyonu taşıyan gliomaların, dereceden bağımsız olarak, mutasyon taşımayan gliomalardan daha ılımlı bir klinik seyir sergilediği gösterilmiştir (7).

Glioma oluşumunda ailesel yatkınlığın payı olabileceği çok uzun zamandır bilinmektedir. Glioma hastalarının ailelerinde glioma riskinin 2 kat kadar arttığı bilinmektedir ancak bu ilişkinin altında yatan genetik faktörler net olarak ortaya konamamıştır. Son 10 yılda yaygınlaşan tüm genom asosiasyon çalışmalarında (GWAS) insan genomunda gliom oluşumu ile ilişkilendirilebilen belirteçler gösterilmiştir. Bu belirteçler içinde CCDC26, RTEL1, TERT, EGFR, CDKN2A/B, PHLDB1 genleri içi ya da yakınlarında yerleşimli tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) bağımsız çalışmalarda birden çok çalışmada glioma yatkınlığı ile ilişkilendirilmiştir.

RTEL1, TERT, EGFR ve CDKN2A/B gibi onkogenik yollarda yer alan ve farklı kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerden farklı olarak, CCDC26 ve PHLDB1 daha önce kanserle ilişkilendirilmemiş genlerdir. Ayrıca, CCDC26 yerleşimli SNP'ler (rs4295627 ve rs55705857) düşük dereceli ve IDH mutasyonu taşıyan glial tümörler ile ilişkili olmalarına rağmen etki mekanizmaları henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı öncelikli olarak, daha önce Avrupa ve ABD popülasyonlarında yapılan GWAS çalışmaları ile gliomalara yatkınlık sağladığı gösterilmiş olan rs4295627 (CCDC26) numaralı SNP-glioma asosiasyonunu Türkiye kaynaklı bir hasta popülasyonunda vaka-kontrol tipi bir çalışma ile analiz etmektir; ikinci amaç ise rs4295627'nin gliomalarda yaygın görülen genetik bozukluklar ve rs55705857 numaralı SNP ile olası ilişkisinin incelenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

Hücreler vücudumuzun en küçük yapıtaşlarıdır. Doku ve organ homeostazisinin sağlanması, ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla hücreler bölünürler. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölüneceğini kontrol eden hücresel mekanizmalar bulunmaktadır. Buna karşın kanser hücreleri, bu kontrol mekanizmalarındaki bozukluklar nedeni ile kontrolsüz bölünür ve çoğalırlar.

Kanser hücreleri birikerek tümörleri oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir.

Kanserin somatik mutasyon teorisi ilk olarak 1920'lerde ortaya atılmış olsa da 1960'lardan sonra kanser araştırmalarında kendini göstermeye başlamıştır.

Son yıllarda epigenetik alanındaki yeni bilgiler kanser araştırmalarına farklı bir boyut kazandırmıştır. Artık araştırmacılar kanserin tek başına mutasyonlardan kaynaklanmayan, DNA ve RNA düzeyindeki farklı mekanizmaların da devreye girdiği ve bunların çecresel faktörler ile etkileşerek hücre fenotipinin belirlendiği kompleks bir hastalık olduğunu kabul etmektedirler.

Normal bir hücrenin proliferasyonu,

- 1) DNA replikasyonu
- 2) hücresel farklılaşma
- 3) yaşlanma
- 4) ölüm yolları

aracılığıyla gerçekleşir ve düzenlenir.

Bu yollarıda görev alan enzimlerin hepsi birer gen ürünüdürler dolayısıyla genlerde meydana gelen fonksiyon kaybı ya da fonksiyon kazancına neden olan değişimler ile gen ürünlerinin aktif veya inaktif hale getirilmeleri, hücrelerdeki

normal süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır ve yaşama potansiyeli olan bu hücrelerin çoğalması ile kanserleşme ortaya çıkmaktadır (8, 9, 10).

2.1.Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

Kanser, normal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve bu hücrelerin kontrolsüz birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Kanser gelişimi ise birbirini izleyen genetik/epigenetik değişiklikler sonucu giderek tümör hücrelerine dönüşen çok aşamalı bir süreçtir (9,10).

Normal hücrelerin özellikleri ile karşılaştırıldığında kanser hücresinde pek çok özelliğin yitirildiği ve yeni hücresel özelliklerin kazanıldığı gözlenmektedir. Hanahan ve Weinberg tarafından ortaya atılan kanserli hücrelerin sahip olması gereken 6 temel değişiklik şunlardır (12):

- 1) Büyüme sinyallerinde kendine olan yeterlilik (onkogenler),
- 2) Büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık (tümör baskılayıcı genlerin=TBG inaktivasyonu),
- 3) Sınırsız bölünme yeteneği (telomer uzatımı – replikatif immortalite),
- 4) Hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma,
- 5) Anjiyogenez başarısına bağlı olarak tümörün pasif besin difüzyonunun olduğu yerlerde de gelişmesi,
- 6) Uzak bölgelerde metastaz yeteneği ki bu normal hücrelerde olmayıp sadece malign tümörlerde olan bir özelliktir.

Yukarıdaki çok aşamalı süreç, genetik değişikliklerin düzeltilmemesi sonucu oluşur. Bu da mutasyon oranının artmasına ve diğer mutasyonların oluşmasına, dolayısıyla düzen bozukluğuna yatkınlığın artmasına neden olur.

Normal bir hücre, hasara uğradıktan sonra kanserleşme sürecine girer ve klonal orjin oluşturur. Mutasyon içeren hücrenin bölünmesi sonucu ortaya çıkan yeni hücrelerde de aynı moleküler hatalar ve mutasyonlar bulunmaktadır. Böylece kanserleşen hücreler klonal yapı gösterirler.

Kanserleşen hücrelerde sık görülen DNA tamir mekanizma bozuklukları ve genomik instabiliteye bağlı olarak kanserleşme sürecinde yeni mutasyonlar ortaya çıkabilir ki bu da monoklonal orijinin ilerleyen süreçlerde poliklonal hale gelmesine neden olmaktadır (8,9,10).

2.1.1.Karsinogenezde Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler

Karsinogenez çok aşamalı ve kompleks bir süreçtir. Karsinogenezdeki temel mekanizmaların özünde, hücredeki 'öldürücü olmayan genetik değişiklik' bulunur.

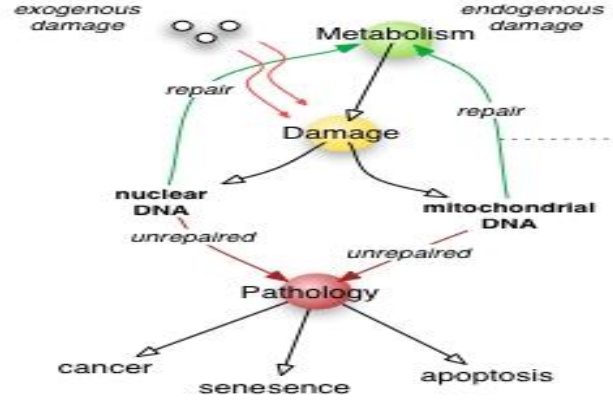
Kanserin moleküler patogenezinde rol oynayan, başkalaşım/epigenetik mekanizmalar ile fonksiyonlarının bozulduğu/kaybolduğu gen grupları fonksiyonları açısından aşağıdaki gibi gruplandırılabilir (9,10):

- 1) DNA tamir genleri,
- 2) Tümör baskılayıcı genler,
- 3) Onkogenler.

2.1.2.DNA Tamir Genleri

Bu genlerdeki mutasyonlar ve epigenetik olaylar kanser gelişimine neden olmaktadır. Ayrıca DNA tamirindeki azalmadan kaynaklanan artan mutasyon oranı onkogenlerin aktivasyonuna ve diğer TBG'lerin inaktivasyonuna neden olur.

Hem endojen hem de ekzojen DNA hasarı oluşturabilecek ajanlar hücre siklusunda yavaşlamaya neden olmaktadır. Normal koşullarda bu yavaşlama sürecindeki hücreler, DNA hasarını tamir etme fırsatı bulmaktadırlar. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse hücre apoptoza uğrar. Hasarlı DNA'yı içeren hücre bölünmeye devam eder ise bu durum zaman içinde mutasyon birikimine neden olur ve hücre karsinogenez yoluna girer (Şekil-1) (8,9).



Şekil-1: DNA Hasarı, Tamiri ve Etkileri (3)

2.1.3. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı gen (TBG) ürünlerinin temelde iki görevi vardır: Hücre siklusunu kontrol eder ve hasarlı DNA'nın tamir edilmesi için DNA tamir mekanizmalarını devreye sokarlar veya hasarlı hücreleri apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu inhibe ederler, bu yüzden bu genler de tümör ve metastaz gelişimini engellemektedirler (8,9,10).

2.1.4. Onkogenler

Normal hücrelerde hücre büyümesi, farklılaşması ve proliferasyonu kontrol altındadır. Hücre içi gereksinimlerin ve hücre dışı ortamdaki gelen sinyallerin hücre içerisinde nükleusa ulaştırılması çok sayıda proteinin rol oynadığı "hücre sinyal ileti sistemi" yolları sayesinde olur. Bu yollar aracılığı ile hücre bölünme ve büyümesini tetikleyen proteinleri kodlayan genlere "proto-onkogen" denir.

Proto-onkogenlerin görevi normal hücrelerde sinyal iletimi ve mitotik sinyallerin düzenlenmesidir. Bu genlerin mutasyona uğramış formlarına da "onkogen" denir. Proto-onkogenin, onkogene dönüşmesinde farklı mekanizmalar rol oynar:

- 1) Proto-onkogenin duplikasyonu veya amplifikasyonu sonucu protein miktarında artış meydana gelmesi,
- 2) Proto-onkogende oluşan nokta mutasyonu sonucu protein aktivitesinde artış ve regülasyon kaybı meydana gelmesi,
- 3) Proto-onkogen mRNAsının, uzun süre degrade olmadan stabil halde kalması ve normalden fazla proteinin üretilmesiyle,
- 4) Proto-onkogenin bulunduğu kromozom bölgesinde kromozom translokasyonu ile kırılmaya bağlı onkogenik özellik kazanılması ya da her

iki kromozom lokusunun translokasyona bağlı füzyon gen-füzyon protein oluşmasıyla.

Bir protoonkogenin onkogenik hale gelmesinde rol oynayan mutasyon veya epigenetik mekanizma dominant niteliktedir. Yani tek allel mutasyonu onkogenik özellik için yeterli olmaktadır (9,10). Protoonkogenlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması aşağıda Tablo-1’de verilmiştir.

Tablo-1:Onkogenlerin görevleri

Protoonkogen	Örnek	Açıklama
Büyüme faktörleri	SIS INT2 KGF	Hücresinin kendisi, ya da uzak özelleşmiş hücre tarafından hücre proliferasyonunu uyarmak için salgılanan ligandlardır. Onkogen, gereksinim olmamasına rağmen hücrenin büyüme faktörlerini salgılamasını uyarabilir ki hücre otokrin döngü aracılığıyla ürettiği faktörleri ligand olarak kontrolsüz proliferasyonuna neden olur.
Reseptör-tirozin Kinazlar (RTK)	EGFR PDGFR VEGFR	Kinazlar diğer proteinlere fosfat grubunu bağlayarak onların aktif veya inaktif olmalarını sağlarlar. Reseptör kinazlar, hücre yüzeyinde reseptör proteinlere fosfat grubu bağlarlar. Tirozin kinazlar hedef proteinin tirozin amino asidine fosfat grubunu bağlarlar. Reseptörün, ekstraselüler ortamdan gelen ligand olmamasına rağmen devamlı aktif halde kalmasına neden olurlar
Sitoplazmik serin / treonin kinazlar	RAF kinaz, CDK	RAF, RAS tarafından aktive edilir ve ERK/MAP kinazın aktivasyonunu sağlar . CDK’lar hücre döngüsünü denetleyen, mitozun ana regülatörü olan siklin bağımlı protein kinazlardır.
Düzenleyici GTPazlar	RAS (K-RAS, N-RAS H-RAS)	RAS küçük bir GTP’azdır, GTP’yi GDP’ye ve fosfata hidroliz eder ve büyüme faktörü sinyal iletimi ile aktifleşir (EGFR gibi) .büyüme sinyal yollarında ikili kontrol anahtarı gibi işlev gösterir (aktif/inaktif). RAS aktifliği sonrası hücre proliferasyonunu kontrol eden sitoplazmik proteinler ise RAF, MEK, ERK, MAPK’dır
Transkripsiyon Faktörleri	MYC	Hücre proliferasyonunu uyaran genleri transkripsiyonlarını düzenler.

2.2.Beyin Tümörleri

2.2.1.Epidemiyolojisi

Beyin tümörleri, tüm kanserlerin % 1,5'ünü oluşturur ve kansere bağlı ölümlerin % 2'sinden sorumludur (11). 20 yaşından 70 yaşına kadar giderek artan bir sıklıkta izlenir ve tüm yaş gruplarında erkeklerde, kadınlardan daha fazla görülmektedirler (12). Beyin tümörleri primer veya sekonder olmak üzere sınıflandırılır.

Primer olanlar; glial dokudan, nöronlardan, damarlardan veya endokrin hücrelerden kaynaklanır. Primer beyin tümörleri tüm hastalıklar içinde en dramatik türlerden birini oluşturmaktadır. Çocukluk çağının en sık rastlanan ikinci malignitesi olup erişkinlerde en sık görülen 6. malignite olarak karşımıza çıkmaktadır (1).

Amerika Beyin Tümörü Kayıt Merkezi'nde (Central Brain Tumor Registry of The United States-CBTRUS) yayınlanan rapora göre, 2007-2011 arasında primer beyin ve santral sinir sistemi tümörü (benign ve malign) insidansı 100,000'de 21.4 olarak bildirilmiştir. Buna göre, 2015 yılında sadece ABD'de 68,470 yeni vakanın teşhisinin konması beklenmektedir. ABD'de yılda 13,800'e yakın insan primer beyin tümöründen ölmekte ve malign beyin tümörleri ABD'de kanserle ilişkili ölümlerde ilk 10'un içinde yer almaktadır (2).

Türkiye Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma şube Müdürlüğü'nün 2004-2006 verilerine göre kanserle ilişkili ölümlerde erkeklerde görülen kanserler arasında 8. sırada, kadınlarda görülen kanserler arasında ise 10. sırada yer aldığı bildirilmiştir (3).

2.2.2.Sınıflandırma

Primer intrakraniyal tümörlerin sınıflandırılması çoğunlukla histopatolojik olarak yapılmaktadır ve en son 2007 yılında güncellenen WHO sınıflandırması sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre sinir sisteminin başlıca tümörleri: Metastatik, nöroepitelyal, germ hücreli tümörler, kraniyal ve paraspinal sinirlerin tümörleri, meninksin tümörleri, sellar bölgenin tümörleri, lenfomalar ve hematopoietik tümörlerden oluşur (13).

2.2.2.1.WHO Derecelendirmesi

Dünya Sağlık Örgütü'nün tümör sınıflandırmasında yapılan derecelendirme, tümörün hücresel ve mitotik özellikleri, hücresel atipi, endotelial proliferasyon ve nekroz gibi çok çeşitli histopatolojik özelliğe sahip tümörlerin malignansi ölçütü olarak değerlendirilmektedir. Buna göre; I. ve II. derece tümörler düşük dereceli, III. ve IV. derece tümörler yüksek dereceli tümör olarak adlandırılmaktadır.

I. derece tümörler, biyolojik olarak benign, düşük proliferasyon (çoğalma) potansiyeline sahip ve cerrahiyi takiben tedavi şansı bulunan tümörlerdir.

II. derece tümörler, uzun sağ kalım süresi gösteren, düşük proliferatif aktivitesine rağmen sıklıkla tekrarlayan tümörlerdir. Bazıları daha malign derecelere dönüşme eğilimindedirler.

III. derece tümörler, genellikle histolojik olarak malignansi bulguları gösteren lezyonlar için kullanılmaktadır ve 3 yıldan daha az sağ kalım süresi vardır. Çoğunlukla III. derece tümörlü hastalar adjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi almaktadırlar.

IV. derece tümörler, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz gibi sitolojik olarak malign özellikler sergileyen tümörler olup radyoterapi ve kemoterapiye direnç geliştiren ve ölümcül seyir gösteren tümörler olarak belirlenmektedir (5, 12).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2007 yılında yayımladığı sınıflandırma sistemine göre gliomaların alt tipleri Tablo 2'de gösterilmiştir. (5). Derece-II,III ve IV astrositomlar, oligodendrogliomlar ve karma gliomalar ortak olarak "diffüz gliomalar" olarak ta adlandırılır ve bu tezi oluşturan araştırmaların konusudur.

Tablo 2. Gliomaların WHO 2007 Sınıflandırması

GLİOMALAR	GRADE
ASTROSİTOMLAR Pilositik Astrositom Anaplastik Glioblastoma Multiform	WHO DERECE I WHO DERECE II WHO DERECE III WHO DERECE IV
OLİGODENDROGLİOMALAR Oligodendroglioma Anaplastik Oligodendroglioma	WHO DERECE II WHO DERECE III
EPENDİMOMALAR Subependimoma Ependimoma Anaplastik Ependimoma KARMA GLİOMALAR Oligoastrozitoma Anaplastik Oligoastrozitoma Glioblastoma Multiform	WHO DERECE I WHO DERECE II WHO DERECE III WHO DERECE II WHO DERECE III WHO DERECE IV

2.2.3.Patogenez

En yaygın görülen primer beyin tümörleri, beynin destek hücreleri olan glialardan (astrozit, oligodensrosit ve ependimal hücreler) köken almaktadır. Tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin % 40'ından fazlasını oluşturan "glioma" olarak bilinen bu tümörler köken aldıkları hücrelere göre farklı adlandırılır. Astrosit benzeri hücrelerden köken aldığında astrozitoma, oligodendrosit benzeri hücrelerden köken aldığında oligodendroglioma ve ependim benzeri hücrelerden köken aldığında ependimoma olarak adlandırılmaktadır (11,14).

Düşük dereceli glial tümörlerin çoğu sporadiktir ve genellikle sistemik neoplazm aile öyküsü olmayan kişilerde görülür. Ancak bazı kalıtsal ve somatik genetik faktörlerin tümör oluşumuna ve/veya mevcut tümörün progresyonuna neden olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, DNA tamirinde veya apoptozda görevli genlerdeki mutasyonlar veya bu genlerdeki polimorfizmler, hücre siklusunda düzenleyici görevdeki genlerde somatik mutasyonlar, anjiyogenezde görevli genlerde meydana gelen mutasyonlar, glial öncül hücrelerin, önce düşük sonra da yüksek dereceli glial tümör hücrelerine dönüşmelerini sağlayabilirler (15). Li-Fraumeni sendromu, Turcot sendromu, Nörofibromatozis Tip I ve II gibi kalıtsal bozuklukların da aralarında bulunduğu bazı özel durumlarda glioma ve diğer santral sinir sistemi tümörleri görülme riski artmıştır. Örnek olarak, Li-Fraumeni sendromu

nadir görülen, otozomal dominant geçişlidir ve p53 gen mutasyonları ile karakterizedir.

Gliyal tümörlerin oluşumunda çevresel faktörlerin rolü ise henüz çok az anlaşılabilmiştir. Çevresel risk faktörlerinden en iyi bilineni tedavi amacı ile uygulanan kranial radyasyondur. Cep telefonu kullanımı veya yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalara maruz kalma gibi olası risk faktörlerine dair şüpheler bulunsa da bugüne kadar kesin bir sonuca varılamamıştır (11, 37).

2.3.Gliomalarda Görülen Genetik Değişiklikler

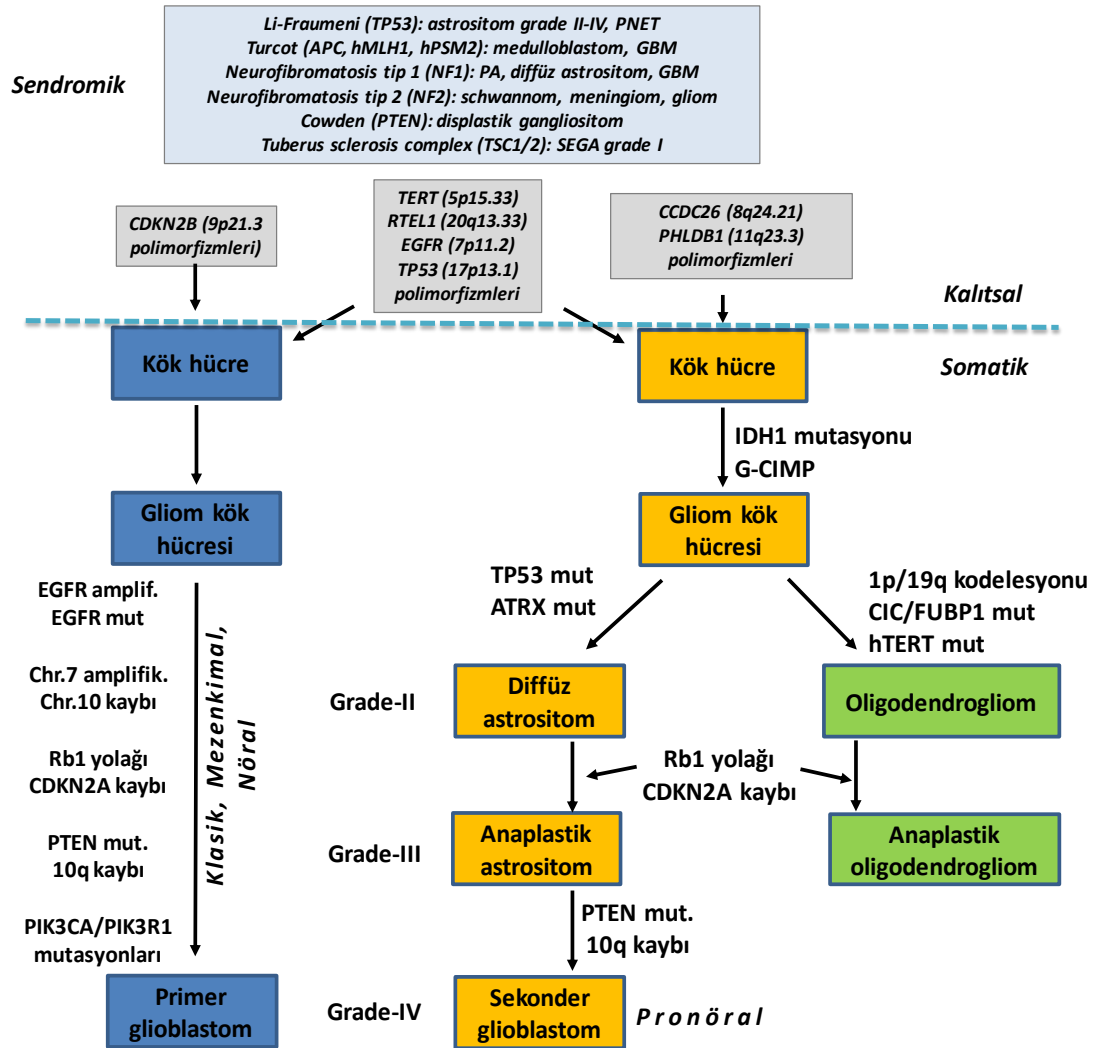
WHO klasifikasyonu ağırlıklı olarak morfolojik özelliklere göre yapılmaktadır. Ancak artık bilmekteyiz ki diffüz gliomların alt tipleri farklı genetik bozukluklar biriktirerek gelişmektedirler. Örneğin oligodendrogliomalar 1p/19q kodelesyonları ile karakterize iken, astrositomlar P53 ve ATRX mutasyonlarının bir arada görüldüğü tümörlerdir. Gliomaların ve diğer sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırmasında sadece histopatolojik özelliklerin yetersiz kaldığı artık yaygın kabul görmektedir; bu nedenle WHO'nun 2015 yılında yayımlaması beklenen yeni sınıflandırma sisteminin çok daha moleküler/mutasyon ağırlıklı olması beklenmektedir. Yeni sınıflandırma sisteminin ana hatları 2014 Eylül ayında yayımlanan "ISN-Haarlem" kılavuzunda belirginleşmiştir (16).

Son 10 yıldır erişkin malign gliomaların yönetiminde ve değerlendirilmesinde moleküler belirteçlerin kullanılması popülerlik kazanmıştır. Bu belirteçlerin bazıları, tümörlerin sınıflandırılmasında patoloğlara yardımcı olacak şekilde tanısal amaçlı olarak kullanılırken, bazıları da hastaların prognozlarını değerlendirmek için kullanılır. Daha da önemlisi bu belirteçlerin bazıları tedavi tiplerine cevabı tahmin etmede de kullanılırlar ve böylece klinisyeni potansiyel toksik ve gereksiz tedavilerden uzaklaştırarak belirli tedavi modalitelerine yönlendirmede işe yararlar.

Gliomalarda klinik davranışı belirlemede kullanılan bu belirteçlerden bazıları 1p/19q kodelesyonu, MGMT metilasyonu (O-6 methylguanin-DNA methyltransferaz) ve IDH-1/2 mutasyonlarıdır (17).

Bu belirteçler dışında, gliomalarda görülen yaygın genetik bozukluklar Şekil-2'de gösterilmiştir.

En yaygın görülen bozukluklar arasında p53 tümör supresör yolağı değişiklikleri (TP53 mutasyonları, TP53 protein ekspresyonunu etkileyecek diğer genetik ve epigenetik değişiklikler, MDM2/4 amplifikasyonları, P14^{ARF} mutasyonları), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)-alfa reseptör kopya sayısı artışı, epitelyal büyüme faktörü (EGFR) mutasyonları, ifade ve/veya kopya sayısı artışı, p16^{INK4a} delesyon ve mutasyonları, PTEN susturulması/delesyon ve mutasyonları, yakın zaman önce ortaya çıkarılan TERT promotor mutasyonları (C228T ve C250T) ile ATRX kaybı/mutasyonları sayılabilir (5).



Şekil-2: Gliomaların oluşumundaki genetik yollar (17).

Gliyal tümörler konusunda yapılmış çalışmalarda hem düşük dereceli hem de yüksek dereceli tümörlerde izlenen temel genetik değişiklikler önemli ölçüde

tanımlanmıştır (5). Sık rastlanan bu genetik değişikliklerin bazılarının düşük dereceli tümörler ve sekonder glioblastomlara özgü oldukları, bazılarının primer glioblastom oluşum basamaklarına özgü oldukları, üçüncü bir grubun ise her iki grup tümör oluşumunda da rol oynadıkları düşünülmektedir (18).

Glioblastomların tanı yöntemlerinde kullanılabilecek yeni belirteçlerin bulunmasına yönelik araştırmalar tüm hızı ile devam etmektedir. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar, başlıca immünohistokimya ile tanımlanan protein seviyelerine ve tümör dokusundaki moleküler genetik anormalliklere dayalıdır. Günümüzde ise tümör belirteçlerine, plazma, serum ve BOS'ta bakılmaktadır (19). En önemli belirteçler ve biyolojik rolleri Tablo-3'de gösterilmiştir.

Tablo-3. Gliomalar İçin Kullanılan Biomarkerlar ve Biyolojik Roller (19)

Biomarker	Biyolojik Fonksiyonu	Glioblastom'da Önemi
<i>Tümör Doku Markerları</i>		
p53	Hücre siklusu kontrol noktası ve DNA tamiri	Mutasyon sekonder glioblastomda primere oranla daha yaygındır
EGFR	Proliferasyon, invazyon	Yaşlı ve primer glioblastomda amplifikasyonu ya da over ekspresyonu daha yaygındır
1p/19q	Biyolojik rolü bilinmiyor, oligodendroglial morfolojiye bağımlı kodelesyon ve olumlu sonuç	Kodelasyon seyrek ve önemi kesin değil
MGMT	DNA tamiri	Promoter metilasyonu sonucu alkilleyici ajanlara karşı artan sensitivite
IDH1	Biyolojik rolü bilinmiyor, muhtemelen proanjiojenik yollara bağımlı	Sekonder Glioblastoma bağlı mutasyonlar ve pozitif G-CIMP
CD133	Fonksiyon bilinmiyor, marker glioma-bağlatıcı hücrelerle ilişkili	CD133+ hücrelerin miktarı ya da daha kötü sonuçla ilişkili ekspresyon
<i>Serum Markerları</i>		
Metile MGMT promoter	DNA tamiri	Doku testi için vekil marker
VEGF(R)	Anjiogenez	Anjiogenik aktivite indikatörü
Kollajen IV	Kan damarlarının bazal membranı	Vasküler normalizasyonun indikatörü
miRNA	Gen ekspresyonunun regülasyonu	Bilinmiyor

2.4.IDH Gen Mutasyonları

Son yıllarda yapılan çalışmalar genel olarak gliomaların genetik alt yapısını anlama üzerine yoğunlaşmıştır. 2008'de yapılan glioblastomlar ile yapılan genom çaplı dizilime analizi sonucunda bu tümörlerin % 12'sinde daha önce hiçbir kanserde tanımlanmamış olan ve metabolik bir enzim kodlayan IDH1 geninde rekürren R132H mutasyonu tanımlanmıştır (23).

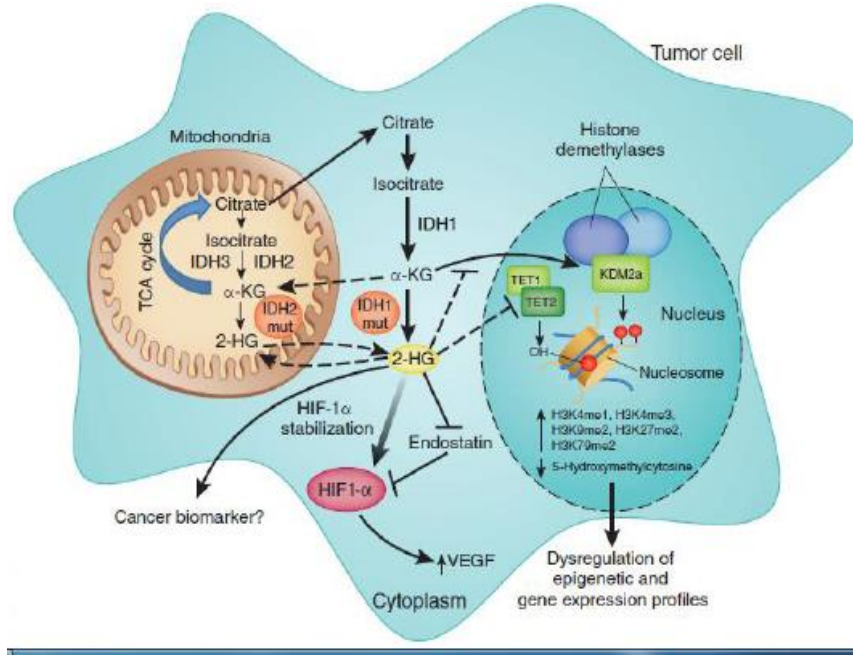
Takip eden çalışmalarda IDH1 ve daha az sıklıkla görülen IDH2 mutasyonlarının derece-II ve II gliomalarda % 70'den fazla sıklıkla görüldüğü ortaya çıkarılmıştır (20).

İnsan genomunda 5 farklı IDH geni 3 farklı IDH proteini kodlar: IDH1 sitoplazmik, IDH2 ise mitokondriyel olup her ikisi de NADP⁺ kofaktörü kullanır. IDH3 ise mitokondrideki Krebs siklusunda görev alır ve NAD⁺ kofaktörü bağımlıdır ve IDH3A, IDH3B ve IDH3G genleri tarafından kodlanır.

IDH 1 enzimi, kromozom 2q33.3'de lokalize 10 ekzonlu *IDH1* geni tarafından kodlanan ve iki altbirimden oluşan bir homodimerdir (20,21).

IDH1 mutasyonları, heterozigot, somatik, missense mutasyonlar olup izositratın bağlanma bölgesi olan evrimsel olarak korunmuş R132 (kodon 132, arginin) amino asidini etkilemektedir (22,23). IDH1 mutasyonu taşımayan tümörlerde de sıklıkla IDH1 ile analog aminoasit kodlayan IDH2 mutasyonları saptanmıştır. Gliomada IDH2'nin R172K mutasyonu (G515A) arjinin lizine dönüşümü, IDH1'de ise en sık R132H mutasyonu (G395A) ile arjinin aminoasitinin histidine dönüşümü görülmektedir (25,26). Bu nokta mutasyonları, hem IDH'ın enzimatik aktivitesinde azalmaya yol açarlar (27,28) hemde yeni bir enzimatik aktivitenin ortaya çıkmasına neden olurlar ve genom metilasyon dengesinin değişmesine yol açarlar (29,30,31) (Şekil-3).

IDH1 mutasyon varlığında IDH1, NADPH'ı üretmekten ziyade çok daha fazla tüketmektedir. Mutasyona bağlı olarak reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi, detoksifikasyon ve biyosentetik süreçlerde rol oynayan, kemoterapi ve radyoterapi gibi strese karşı koruyucu bileşik olan NADPH seviyesinin azalması ve oksidatif strese karşı hücre direncinin azalmasına neden olmaktadır (24). Diğer taraftan, yapılan birçok çalışmada fonksiyon kaybından ziyade fonksiyon kazanımı olan IDH1 mutasyonunun enzime yeni bir özellik kazandırarak α -KG'ın R-2-Hidroksiglutarat' a (R-2-HG ya da D-2-HG) indirgenmesine neden olduğu gösterilmiştir (25).



Şekil-3. IDH mutasyonlarının hücreye etkileri (36).

IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının glioma vakalarında klinik yaklaşımdaki önemi her geçen gün artmaktadır. IDH1/2 mutasyonuna sahip glioma hastalarının bu mutasyonu taşımayanlara göre daha iyi klinik seyire sahip olduğu, IDH mutasyonlarının sekonder GBM'ler için ayrılcı bir moleküler belirteç olduğu artık tartışmasız kabul edilmektedir (32,33).

2.5. Diğer Genetik Değişiklikler

Hücre siklusunu düzenleyen TP53 tümör süpresör gen mutasyonları, astrositomaların gelişiminde erken gözlenen değişikliklerden olup II. ve III. derece astrositomalarda ve sekonder GBM' lerde yaygındır.

Gliomaların malignleşme sürecinde kazandıkları en önemli genetik bozukluklardan biri de 10q kromozom bacağına heterozigosite kaybıdır (LOH, "loss-of-heterozygosity") (20,33). 10. kromozomun tamamının kaybı ve IDH1 mutasyonlarının yokluğu arasında güçlü ilişki olduğu öne sürülmüş olup, IDH1 mutasyonunun 10. kromozom kaybı görülmeyen olgularda, kromozom 10 delesyonlu olgulara göre daha sıklıkla görüldüğü tespit edilmiştir (34).

Ayrıca IDH mutasyonu taşıyan gliomaların, derecelerinden bağımsız olarak, diğer gliomalardan daha ılımlı bir klinik süreç geçirdiği gösterilmiştir (35). Bu kanser tipinin farklı bir hücre kökeninden gelen ve farklı şekilde evrilen bir tümör olduğu düşünülmektedir.

2.6.Hastalığa Yatkınlık Genlerinin Lokalizasyon Tespiti

Kanserlerin bir kısmının kalıtsal özellik göstermesi, bu grup kanserlere neden olan genlerin tanımlanmasında genetik haritalama çalışmalarına başvurulmasına neden olmuştur. Genlerin lokalizasyonlarının bulunmasında sitogenetik analiz ve genetik haritalama metodları kullanılmaktadır.

Genetik haritalama özellikle kalıtsal hastalıklara yol açan genlerin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Lokalizasyonu aranan gen ile lokalizasyonu bilinen bir genetik, moleküler belirtecin kuşaklar arasında birlikte kalıtılmasının test edilmesi esasına dayanan genetik haritalamada moleküler biyolojik yöntemler ve istatistiksel analizler kullanılmaktadır.

Organizmaların genetik haritalarının oluşturulmasında ve filogenetik çalışmalarda kullanılmakta olan moleküler belirteçler, özellikle bir ailenin nesiller boyunca kalıtılan özelliklerin izleme olanağı verirken ayrıca bir hastalıkla ilgili bu hastalığın genetik nedeni arasındaki ilişkiyi açıklamada da kullanılmaktadır.

Kromozom üzerinde birbirine yakın olan DNA dizileri beraber kalıtıldıklarından dolayı moleküler belirteçler, asosiyasyon çalışmalarında, hastalıkla daha önce ilişkilendirilmemiş bir geni lokalize etmek için kullanılabilir potansiyeline sahiptir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda araştırmacılar hedef genleri aramak için genellikle ilgili genlere yakın olan ve birlikte kalıtılan genetik belirteçleri tanımlamaktadırlar (37).

2.6.1.Tek Nükleotit Polimorfizmleri (SNP)

DNA dizisini oluşturan adenin, guanin, sitozin, timin baz çiftinden birinin diğer baz çifti ile değişmesi tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak adlandırılır. SNP'ler insan genomunda en sık bulunan genetik varyasyonlardır, sayılarının 10 milyonu

aştığı düşünölmektedir. İnsan genomunda SNP'ler ortalama her 1000 baz çiftinde bir bulunurlar ve birçok SNP protein yapısında ve fonksiyonunda değışikliğe neden olmaz (39). Bir genetik varyasyonun polimorfizm olarak tanımlanabilmesi için bir popülasyondaki sıklığının en az % 1 olması gerekmektedir.

SNP'ler benzer koşullarda bazı bireylerin daha sağlıklı iken, diğerlerinin hastalığa yatkın olmasına, aynı hastalığın farklı bireyler arasında neden farklı şekillerde seyrettiğine ve bazı bireylerin tedaviye olumlu yanıt verirken, diğerlerinin vermemesine büyük oranda açıklık getirmede kullanılır (38).

İnsan genomunda genler tüm DNA dizisinin çok az bir kısmını kapsamaktadır ve genler arasındaki DNA dizisinin % 90'dan fazlası belirli bir ürün kodlamamaktadır.

İnsan Genom Projesi ve takip eden büyük çaplı genom projeleri ile tanımlanmış olmaları, genomda sık bulunmaları ve kararlı bir şekilde dağılım göstermeleri nedenleri ile SNP'ler tercih edilen moleküler belirteçler olmuşlardır. Yüksek işlem hacimli genotipleme yöntemlerinin (örn. mikroarray teknolojileri) gelişmesi ile günümüzde bir defada bir bireye ait milyonun üzerinde SNP kolaylıkla genotiplendirilebilmek mümkündür. Yukarıda belirtilen nedenler de göz önünde bulundurulunca, SNP'lerin son dönemlerde yapılan asosiyasyon analizi çalışmalarında neden yaygın olarak kullanıldıkları anlaşılabilir (40).

2.7.Asosiyasyon Çalışmaları

Nörojenetik çalışmaların asıl hedefi nörolojik hastalıklara neden olan gen ve risk faktörlerinin tanımlanması, moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve bunların sonucunda erken tanı ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlanmasıdır.

İnsan genom sekansının taslağının 2001 yılında çıkarılması ve 2003 yılında tam olarak netleştirilmesinden sonra hastalıkların genetik öğelerini inceleyen araştırmalarda patlama olmuştur.

İnsan genomunun netleşmesini takiben insan genomik varyasyonlarının tanımlanması amacıyla yapılan projelerden biri HapMap projesidir. HapMap, 4 farklı popülasyonda yaklaşık 3 milyon yaygın SNP'in frekanslarını ve bu SNP'lerin arasındaki asosiyasyon paternlerini belirlemek üzere dizayn edilmiş bir projedir (41).

2.7.1.Genom boyu asosiyasyon alışması

Hastalığa yatkınlığın genetik temelini açığa çıkarılması için kullanılan güncel strateji genom boyu asosiyasyon çalışmalarıdır (42).

Yapılan asosiyasyon çalışmalarında genomda en yaygın olarak bulunan genomik varyantlar olan SNP'ler kullanılmaktadır. SNP'ler binlerce jenerasyon önce oluşan ve doğal seleksiyon veya şansla yayılan mutasyonlardır. Daha önce varolan SNP'e çok yakın ikinci bir SNP oluştuğunda (aralarında onbinlerce baz çiftinden de fazla mesafe olabilmektedir) bu iki varyant alel her zaman bir sonraki jenerasyondaki aynı oğula aktarılabilmektedir. İki allelin tesadüfi olmayan bu birlikteliği bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium, LD) olarak tanımlanmaktadır (43).

Linkage analizi, yani aile düzeyinde uygulanan bağlantı analizi, sadece etkisi güçlü olan mutasyonların neden olduğu tek gene bağlı olan hastalıkları tanımlar. Dolayısıyla etkileri zayıf olan birçok genin neden olduğu kompleks hastalıklar için yetersiz kalır. İnsan genetiği devrimi olarak nitelendirilen GWAS, yüksek sayıda (>1000) hasta/kontrol rneği kullanılarak, çok sayıda SNP'yi eř zamanlı olarak test eder, böylece etkisi küçük olan genleride tanımlayabilir. GWAS yöntemi ile son 7 yılda 2000'den fazla genetik lokusun poligenik hastalıklarla ilişkisi tanımlanmıştır ki bunların 200'den fazlası farklı kanserler ile ilişkilendirilmiş SNP'lerdir (42).

Asosiyasyon alışmaları, kohort veya olgu-kontrol olarak yapılabilir. Kohort çalışmalarının çok fazla zaman alıcı olması ve seyrek görülen hastalıklarda kullanılmaya elverişsiz olması gibi sorunları varken olgu-kontrol dizaynı ise seçimle çok daha fazla kullanılan bir yöntem olarak araştırmacılar tarafından kullanılır (43).

Kalıtım modeli bilinmeyen, genetik etkenlerin işe karıştığı kompleks ve yaygın hastalıkların araştırılmasına ve bu gibi hastalıklarda rol oynayan genlerin tanımlanması için kullanılan asosiyasyon çalışmaları, olgular (belirli bir hastalığı olan kişiler veya belli bir özelliğe sahip bireyler) ve kontroller arasındaki allel frekansı farkını değerlendirmektedir (44).

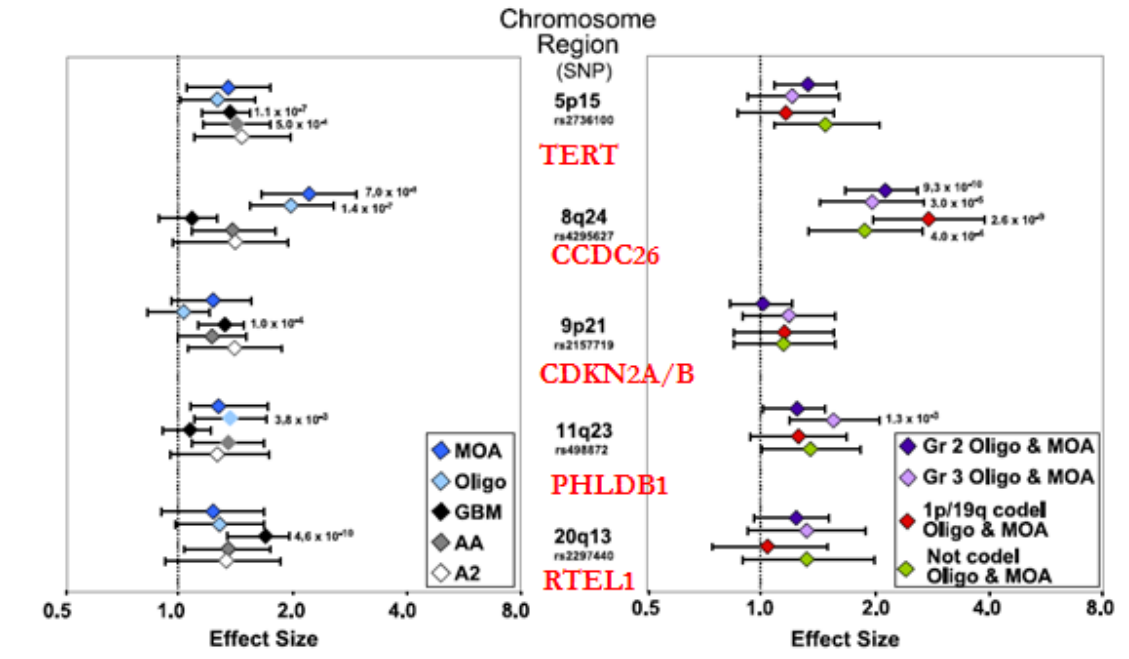
Asosiyasyon alışmaları alelleri incelemektedir ve belirteç lokustaki belirli bir allelin (moleküler marker), hastalığa yüksek risk oluşturan yatkınlık alleli ile nasıl birlikte kalıtıldığı hakkında bilgi vermektedir.

2.7.2. Gliomaların oluşmasındaki risk alelleri

Gliomaların oluşması üzerinde etkili olan genlerin bulunması için günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların içinde en kapsamlı olanı GWAS (genome-wide association study) yani genom boyu assosiasyon çalışmasıdır.

GWAS'ta tüm genom boyunca gliomaların alt gruplarında hangi risk alellerinin daha etkili olduğuna bakılmış ve bugüne kadar yapılan çalışmalarda beş farklı risk lokusu ve ilgili aleller tespit edilmiştir (Şekil-4) (11,40,45).

5p15.33(TERT), 9p21.3(CDKN2B) ve 20q13.33(RTEL1) yerleşimli SNP'lerin daha çok glioblastoma ile ilişkili olduğu, 8q24.21(CCDC26) yerleşimli SNP'lerin daha çok oligodendrogliomalarla ve IDH-mutant tümörler ile ilişkili olduğu, 11q23.3(PHLDB1) yerleşimli SNP'lerin ise özellikle düşük dereceli ve IDH-mutant gliomalarla ilişkili olduğu saptanmıştır (37).



Şekil-4. GWAS ile belirlenen Glioma risk alelleri (45).

2.8. CCDC26 Geni (8q24/rs4295627 polimorfizmi)

İnsan 8q24 kromozom bölgesi, göğüs, prostat, mesane, kolon, akciğer, yumurtalık, pankreas, beyin kanserleri de dahil olmak üzere pek çok kanser türü ile ilişkilendirilmiştir (46).

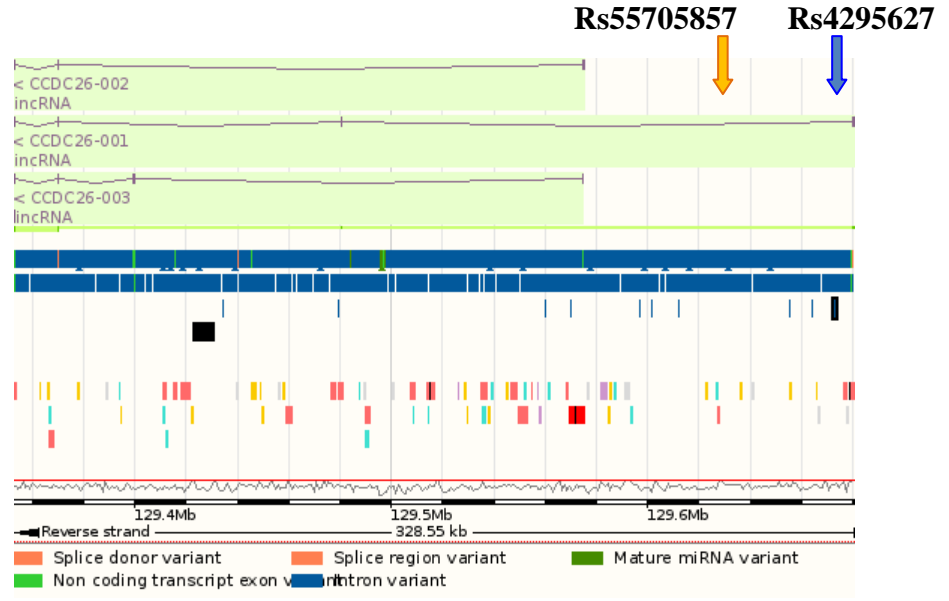
8q24 bölgesi c-myc proto onkogeni de dahil olmak üzere kanserle ilişkili birçok gen içermektedir (47).

GWAS sonuçlarına göre oligodendrogliomalarla ve IDH-mutant gliomalarla ilişkili olduğu gösterilen CCDC26 geni 8q24 kromozom bölgesinde 129,351,691-129,680,239 Mb (GRCh38) arasında yerleşik olup yaklaşık 329 kb uzunluğundadır ve 3 farklı alternatif splays izoformu ile 4 ekzon bölgesine sahiptir. CCDC26 bir lincRNA (long non-coding RNA) geni olup protein kodlamaz. Organ ve dokulardaki ifade dağılımları farklıdır ve birçok dokuda eksprese edilmez. En belirgin ekspresyon lösemi hücrelerinde görülmektedir. CCDC26, myeloid hücrelerin retinoik aside cevabını regüle ettiği öne sürüldüğü için “retinoic acid modulator” ya da RAM olarak ta bilinmektedir. Rs4295627 ise CCDC26’nın uzun izoformunun (CCDC26-001) birinci intronunda 8:129,673,211 yerleşimlidir. Rs55705857 de tıpkı rs4295627 gibi birinci intronda yer alır ve 8:129,633,446 pozisyonundadır; iki SNP arası uzaklık 39,765 nükleotiddir.

CCDC26 geninin kromozomdaki lokalizasyonu Şekil-5’de, üç izoformun kromozom üzerindeki lokalizasyonları ise Şekil-6’da gösterilmiştir.



Şekil-5.CCDC26 geninin kromozomdaki lokalizasyonu (61).



Şekil-6. CCDC26 izoformlarının ve SNP'lerin kromozom lokalizasyonları (61)

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Çalışma grubu

Çalışmamızda, Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı tarafından opere edilen ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek “Glioma” tanısı konan 135 olguya ilişkin kan/tümör örnekleri ve 164 kontrole ait kan örnekleri çalışmaya alınmıştır.

Bu çalışmalarda kullanılan olan ve Acıbadem Üniversitesi Kerem Aydınlar Kampüsü araştırma laboratuvarlarında bulunan teçhizat listesi aşağıda listelenmiştir.

3.1.2.Cihazlar

Buzdolapları	: +4 °C, Arçelik 3061 Plus
Derin Dondurucular	: -20, GSD26410NE Bosch
Otoklav	: Dik Tip Otoklav BES
Hassas terazi	: XB 220 Presica
Yatay Elektroforez Sistemleri	: Sub-CellGT BIO-RAD
Elektroforez tankı	: BIO-RAD
Güç Kaynakları	: PowerPac Basic BIO-RAD
Thermo-Cycler	: BIO-RAD
Vorteks	: Heidolph REAX
Su Arıtma Sistemi	: Millipore Milli Q SynthesisA10
Jel görüntüleme sistemi	: BIO-RAD Chemi-Doc
Mikropipet seti	: (P10,P20,P200,P1000)-Thermo

3.1.3.Kimyasal malzeme ve kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar aşağıda belirtilen üretici firmalar tarafından temin edilmiş olup hepsi moleküler biyoloji kalitesindedir.

Agaroz	: Sigma-Aldrich
Tris-base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	: Sigma-Aldrich

Ethylene-diamine-tetra-acetic acide (EDTA)	: Sigma-Aldrich
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2.H ₂ O)	: AppliChem, A2937.0500
Etidium bromide (C ₁₂ H ₂ 0N ₃ Br)	: Sigma, E-7637
Borik asit	: Sigma – Aldrich
Steril distile su	: Mustafa Nevzat
Sodyum klorür	: Sigma – Aldrich
Sodyum fosfat anhidrus	: Sigma – Aldrich
Potasyum klorür	: Sigma – Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat anhidrus	: Sigma – Aldrich

3.1.3.1. Agaroz jel elektroforezi solüsyonları

10X TBE (Tris-Borat-EDTA)	: 890 mM Tris-Base 890 mM Borik Asit 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, (pH 8.3)
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	: 2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromür (EtBr)	: 10 mg/ml
% 3'lük Agaroz Jel	: 1 X TAE Tamponunda % 3 (w/v) agaroz

1X çalışma solüsyonu hazırlanışı:

20 ml 50X TAE tamponuna 980 ml deiyonize su eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Etidium Bromür Solüsyonu:

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan korunarak muhafaza edildi.

3.1.4. Kullanılan enzim ve primerler

3.1.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu malzemeleri

10X MgCl ₂ 'süz Tampon	: 750 mM Tris-HCl, (pH 8.8) 200 mM (NH ₄) ₂ SO 0.1 Tween20 (Fermentas)
MgCl ₂	: dH ₂ O'da 20 mM (Fermentas)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas)
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz

3.1.4.2. Restriksiyon enzimleri ve reaksiyon tamponları:

NcoI	: 10 U/μl (New England Biolabs)
NcoI Reaksiyon Tamponu	: 10X NEB BUffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 100μg/ml BSA
NcoI Tanıma Dizisi	: 5'...C [^] CATGG ... 3' 3'...GGTAC [^] C ... 5'

3.1.5.Oligonükleotit Primerler

Liyofilize halde bulunan (dondurularak kurutulmuş) primer tüpleri 13,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 100 μM'lık konsantrasyon elde etmek için uygun miktarda Tris-EDTA (TE) eklenerek çözülmüştür. Primerler 10 μl hacimlere bölünerek -20 °C de saklanmıştır.

Dizi analizi ve PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere PCR grade H₂O ile dilüsyon yapılarak 10 μM primerler elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan olan primerlere ait bilgiler Tablo-4'de verilmiştir.

Tablo-4: rs4295627 ve çevresinin PCR ile çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Primer dizisi	T _m (°C)	Ürün boyu (bp)
CCDC26-F1	TGGAAGGAAAAGTGTCTCACCTC	60.18	217
CCDC-26-R1	AGAGCCTGGCAGACAACAAC	60.54	

3.1.6. DNA Büyüklük Markörleri:

GeneRuler 100 bp DNA markörü: 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas).

3.1.7. Plastik Malzemeler:

Pipet uçları (10,20,100,200,1000 mikrolitre için)	:Axygene
Eppendorf tüpler (0.2,0.6 ve 1.5mL)	:Axygene
Plastik plaklar (PCR ve Megabace için)	:Axygene
Falkon Tüpler (50 ml)	:Greiner Bio-One

3.2.Yöntem

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Çalışmamızda -80°C 'de saklanan kan örneklerinden “MagNA Pure LC DNA Isolation kit” kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun bir şekilde genomik DNA elde edilmiştir.

-80°C 'den çıkartılan kan örnekleri oda sıcaklığında bekletilip çözüldükten sonra her örnekten 200 µl olacak şekilde “MagNA Pure LC” otomatize izolasyon sistemine yerleştirildi ve (MagNA Pure LC Total DNA Isolation Kit, Roche Diagnostics, Germany) kit içinde bulunan ve sistemin gereksinimlerini içeren reaktifler ilgili pozisyonlara yerleştirildi ve otomatik işlem başlatıldı.

“MagNA Pure LC” cihazı içerisinde ilk olarak, lizis tamponu içinde bulunan proteinaz K'nın etkisiyle proteinler parçalanarak nükleik asitler açığa çıkarıldı; sonraki işlemde, yine lizis tamponu içinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonunun etkisiyle nükleik asitlerin, karışıma eklenen manyetik boncuklara bağlanması sağlandı. Birkaç yıkama işlemiyle, manyetik boncuklara bağlanmamış olan maddeler ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra yüksek ısı etkisi ve tuz konsantrasyonunun düşürülmesiyle birlikte nükleik asitler manyetik boncuklardan ayrılarak saf olarak elde edildi.

Tüm bu işlemler cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Cihazın içerisinde, örneklerden otomatik olarak nükleik asit izolasyonu yapan bir kısım ile işlemler sonunda örneklerin bekletildiği bir soğutma bloğu mevcuttu. İzolasyon işlemi sona erdiğinde (yaklaşık 2-2.5 saat) bu kısımda bekletilen kartuşlar alındı ve elde edilmiş olan DNA'lar PCR için kullanıldı.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA'nın daha önceden belirlenmiş ve çoğaltılması istenen bir bölgesinin laboratuvar koşullarında enzimatik olarak çoğaltılması işlemine denir. Genel olarak üç temel basamaktan oluşmaktadır:

- 1) Denatürasyon
- 2) Primerlerin bağlanması
- 3) DNA sentezi

İlk olarak çift zincirli DNA molekülünün yüksek ısı yardımıyla tek zincirli hale getirilmesi sağlanır; bu işlem 94-96 °C'de gerçekleştirilir.

Denatürasyon basamağından sonra primerlerin daha düşük ısılarda kendilerine komplementer tek zincirli DNA ile hibridize olmaları sağlanır. Bu aşamadaki sıcaklığın, kullanılan primerlerin G/C oranına ve uzunluğuna göre farklılık gösteren erime sıcaklıklarına uygun şekilde ayarlanması gerekir.

Son basamakta, genellikle 72 °C'de Taq polimeraz aracılığı ile DNA zincirinde uzama sağlanır. Uzama aşamasının süresi çoğaltılacak DNA bölgesinin uzunluğuna ve kullanılan "taq" polimerazın cinsine göre değişiklik göstermektedir.

Bu üç basamağın her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkmaktadır. Oluşan ürün miktarı başlangıçtaki DNA konsantrasyonu ve döngü sayısına bağlı olarak değişmektedir.

CCDC26 geni birinci intronunda yer alan rs4295627'yi içine alan bölge, toplam 50 µl hacimde 100 ng genomik DNA kullanılarak son konsantrasyonları 1X Fermantas Taq Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 0.2 µM ileri ve geri primerler (Tablo-4) ve 1.25U Fermantas Taq DNA polimeraz olacak şekilde PCR yapılarak çoğaltılmıştır. PCR koşulları Tablo-5'deki gibidir ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları Tablo-4'deki primerlerin T_m değerlerine göre ayarlanmıştır. Her primer çifti için en uygun PCR koşulu, farklı bağlanma sıcaklıklarında PCR yapılarak optimize edilmiştir. Bütün PCR ürünleri % 3'lük agaroz jelde kontrol edilmiştir.

Tablo-5: rs4295627 (CCDC26) için PCR koşulları

Derece/basamak	Süre	Döngü
95°C ilk denatürasyon	2 dakika	1
94°C denatürasyon	30 saniye	
61°C bağlanma	1 dakika	
72°C uzama	30saniye	37
72°C son uzama	5 dakika	1
4°C	Sonsuz	1

3.2.3. Restriksiyon enzimleri ile kesim

Restriksiyon enzim tanıma dizileri üzerinde bulunan SNP ve mutasyonların genotiplenmesi bu enzimler yardımı ile göreceli olarak kolaylıkla, sofistike teçhizata gerek duyulmadan yapılabilmektedir. DNA'nın SNP/mutasyon varlığı ve yokluğunda restriksiyon enzimleri tarafından farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması ve bunun (agaroz) jel elektroforezi yardımı ile görüntülenmesine dayalı yöntem RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır.

Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar ve DNA'yı istenilen bölgelerden keser. PCR ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi çeşitli restriksiyon enzimleri ile in vitro reaksiyona sokularak oluşan fragment uzunlukları incelenir (PCR-RFLP) ve gen üzerindeki polimorfizmler hakkında yorum yapılabilir. RFLP yöntemi 4 basamaktan oluşmaktadır:

- 1) DNA izolasyonu
- 2) Örneklerin PCR ile çoğaltılması
- 3) Elde edilen PCR ürünlerinin Restriksiyon enzimleri ile kesilmesi
- 4) Elektroforez ile kesilen fragmanların görüntülenmesi

Rs4295627 genotipinin belirlenmesi için Tablo 6'belirtilen enzimler ve restriksiyon şartları kullanılmıştır.

Tablo-6. Restriksiyon Enzimi ile Kesim Şartları

Polimorfik bölge	Nükleotid Değişimi	Kesim Enzimi	Kesim Bölgesi	Sıcaklık	Süre
Rs4295627 (CCDC26)	G/T	NcoI	5'CATGG 3' 3'GGTAC 5'	37°C	5-15 dk

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Jel elektroforezi DNA fragmanlarını tespit etmek ve ayırmak için standart bir metottür. DNA fragmanları uygun bir tamponun içine bir jele yüklenmiş olarak negatif elektrottan (katot) pozitif elektrota (anot) yürütülerek ayrılır.

DNA'da bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının varlığı nedeniyle DNA molekülleri anoda doğru yürür. DNA bantları etidyum bromür (EtBr) veya "SYBR Gold" gibi boyalar ile görünür hale getirilir.

Agaroz jel elektroforezi, DNA fragmanlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırır; agaroz konsantrasyonlarına göre de değişik ayırım kapasitesi sağlar. Yüksek konsantrasyonlar kısa fragmanları ayırmada daha spesifiktir. Agaroz jel, agarozun 1X TBE ya da 1X TAE tamponu içinde çözünmesi ve mikrodalgada homojen bir görüntü elde edilinceye kadar kaynatılması ile hazırlanır. Jelin çeker ocak altında biraz soğuması bekletildikten sonra içine EtBr (son konsantrasyonu 30-50 ng/ml olacak şekilde) eklenir. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için beklenir. Alternatif olarak, EtBr jel içine eklenmez ancak DNA ayırımı gerçekleştirildikten sonra EtBr içeren bir solüsyon kullanılarak jel/DNA boyanır.

Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından jel, içinde 1X TBE tamponu bulunan yatay jel elektroforez aparatına konur, taraklar jelden nazikçe çıkarılır ve böylece örnekleri yüklemek için kuyucuklar oluşturulmuş olur.

Bu çalışmamızda PCR ürünleri ve restriksiyon enzimi kesim ürünleri, standart tampon çözeltiler kullanılarak yatay elektroforez yardımı ile görüntülenmiştir. Örnekler % 3'lük agaroz jele, ticari olarak temin edilen Orange G veya BMB içeren yükleme tampon çözeltisi (örneklerin 1/5 hacminde) kullanılarak yüklenmiş ve 120 V'da 40 dakika yürütülmüştür. Ürün boylarının belirlenebilmesi için örneklerle birlikte 100 bp DNA ladder yürütülmüştür ve Chemi-Doc (BIO-RAD) cihazında UV ışığı altında analiz edilmiştir.

3.2.5.DNA dizi analizi

DNA dizi analizi, belirli bir DNA fragmanının nükleotit sıralamasının saptanması işlemine denir. Günümüzde Frederic Sanger tarafından geliştirilmiş olan zincir sonlandırma yöntemi, ilk dizi analizi yöntemi olan Maxam-Gilbert kimyasal kırılma tekniğine göre hem daha verimli hemde daha az toksik madde içermesi nedeniyle tercih edilmektedir.

Sanger yönteminin temel ilkesi DNA zincir uzamasının sonlandırıcı olarak dideoksinükleotit trifosfatların (ddNTP) kullanılmasıdır. 2',3'-dideoksinükleotit trifosfat molekülleri, dNTP'lerden 3' karbonuna OH grubu yerine H atomu bulunması nedeniyle farklıdır. Bu moleküller bir sonraki deoksinükleotit ile fosfodiester bağı oluşturmazlarından DNA zincir uzamasını sonlandırırlar.

Araştırma toplam 164 sağlıklı ve 135 glioma tanısı konulmuş bireyden elde edilen DNA örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. CCDC26 gen bölgesinde bulunan rs4295627'nin genotiplenmesi için CCDC26F1 ve CCDC26R1 primerleri kullanılarak 217 bp'lik bölge PCR ile çoğaltılmıştır.

PCR ürünleri % 3'lük agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Daha sonra PCR ürünleri NcoI restriksiyon kesim enzimi ile 37 °C'de 2-16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kesilmiş ve kesilmemiş DNA agaroz jelde görüntülenmiştir, böylelikle hasta ve kontrol bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla 24 örneğe ait PCR örnekleri Roche pürifikasyon kiti yardımı ile pürifiye edilmiş ve ürünler dizi analizine gönderilmiş ve genotipler belirlenmiştir.

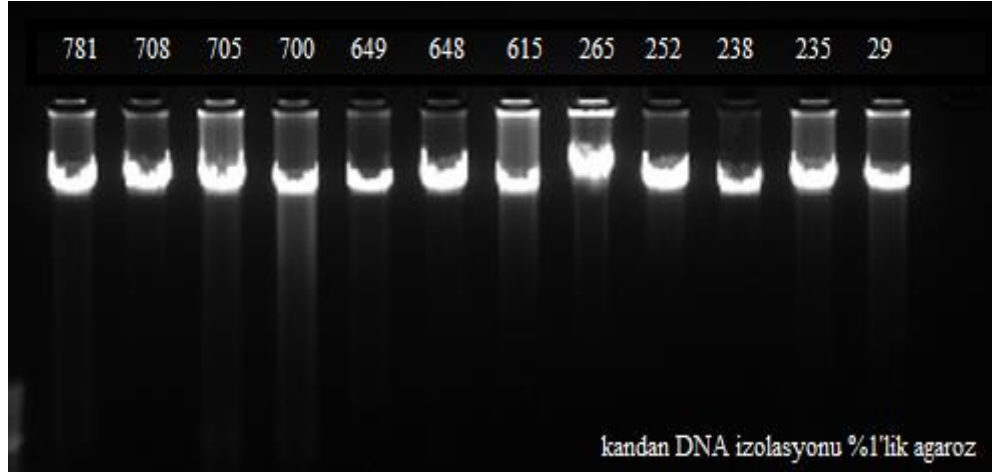
3.2.6.İstatiksel analiz

Hasta ve kontrol gruplarına ait genotip verileri SPSS 21.0 (IBM) ve MedCalc programları ile istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarının “Hardy Weinberg Equilibrium” (HWE) $p^2+2pq+q^2$ dağılımına uygunluğu ki-kare testi ile doğrulanmıştır. Gliomlarla ilişkisi araştırılan polimorfizmler aditif, dominant, resesif, overdominant ve alel-bazlı genotipik modeller ile incelenmiştir. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1.DNA izolasyonu

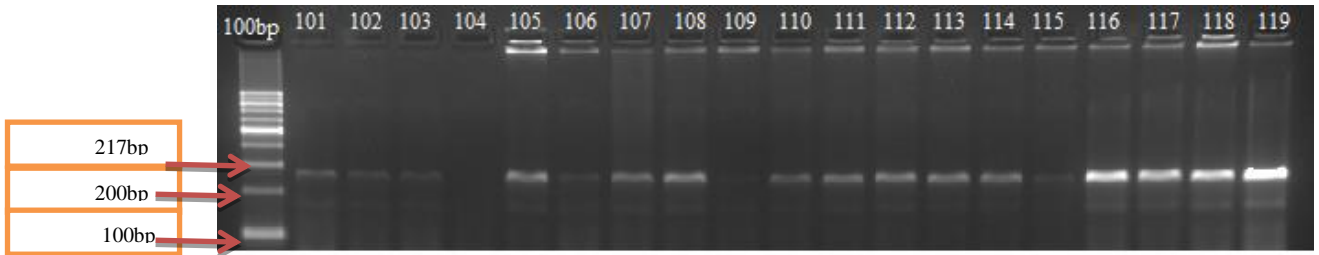
Kandan elde edilen DNA örnekleri (7 µl) alınarak %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın kırılmadan elde edildiği doğrulanmıştır (Şekil-7) .



Şekil-7. Genomik DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

4.2. rs4295627 ve çevresinin PCR ile çoğaltılması

217 bp'lik CCDC26 PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ve EtBr boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil-8).



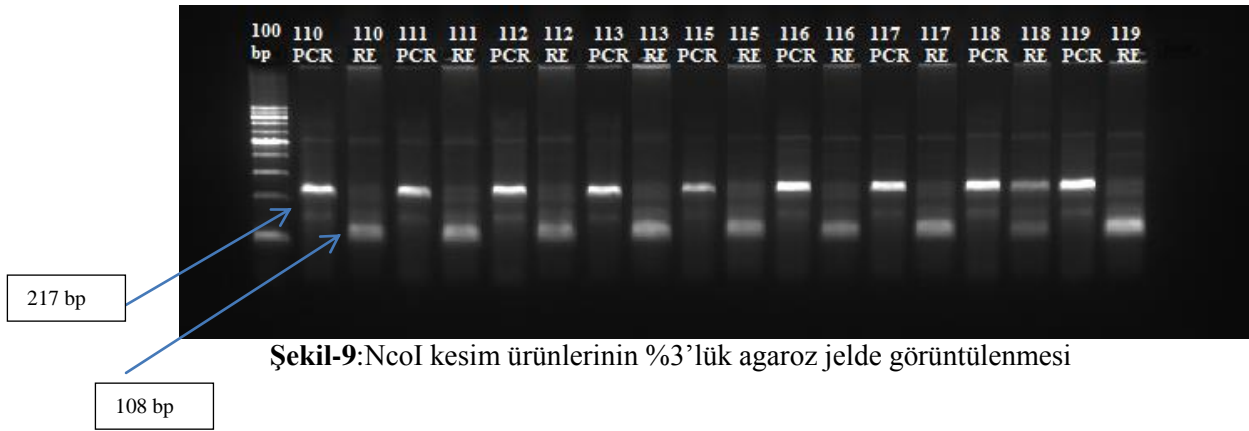
Şekil-8. Rs4295627 PCR ürünlerinin % 3'lük agaroz jelde görüntülenmesi

4.3. rs4295627 genotipinin RFLP ile belirlenmesi

217 bp'lik rs4295627 (CCDC26) amplifikasyon ürünleri NcoI restriksiyon enzimi ile kesilerek % 3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir. Kesimlerden beklenen fragman uzunlukları Tablo-7'de agaroz jel analizleri ise Şekil-9'da gösterilmiştir.

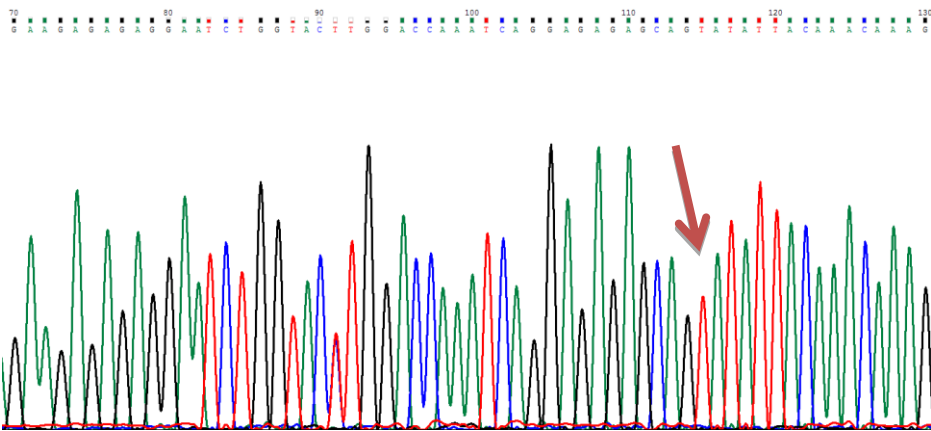
Tablo-7. Rs4295627 için RFLP bilgileri

Polimorfik Bölge	SNP Tanımlayıcı	Nükleotid Değişimi	PCR (bp)	Fragmanlar (bp)
CCDC26	rs4295627	T/G	F1-R1:217	108+109



4.4. RFLP sonuçlarının Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulanması

Hasta ve kontrol bireyler RFLP yöntemi ile genotipleri tayin edilmiştir. Örnekler her aşamada konfirme edilip sonuçların doğruluğu gösterilmiştir. Polimorfizmi taşıyan ve taşımayan 24 örnek dizi analizi ile doğrulanmıştır; NcoI ile kesilen 113 no'lu bireyin dizi analizi görüntüsü Şekil 10'da gösterilmiştir.



4.5. Verilerin İstatiksel Analizi

Araştırma toplam 164 sağlıklı ve 135 glioma tanılı bireyden elde edilen DNA örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan örneklerin yaş aralığı 20-80 yaş olup, yaş ortalaması 53,5 yaştır. Hasta grubu örneklerinin yaş aralığı ise 18-75 yaş arasındadır ve yaş ortalaması 42,8 yaştır. Her iki grubun cinsiyet oranları Tablo-8’de gösterilmiştir.

Tablo-8. Bireylerin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Hasta grubu n, (%)	Kontrol grubu n, (%)
Kadın	55 (40,75)	77 (46,95)
Erkek	80 (59,25)	87 (53,05)
Toplam	135 (100)	164 (100)

Glioma hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin genotip dağılımları incelenmiş ve hasta grubu genotip frekansları Tablo-9 ve Şekil-11’de, kontrol grubu genotip ve alel frekansları Tablo-10 ve Şekil-11’de gösterilmiştir. T ve G alellerinin frekans dağılımları ise Şekil-12’de verilmiştir.

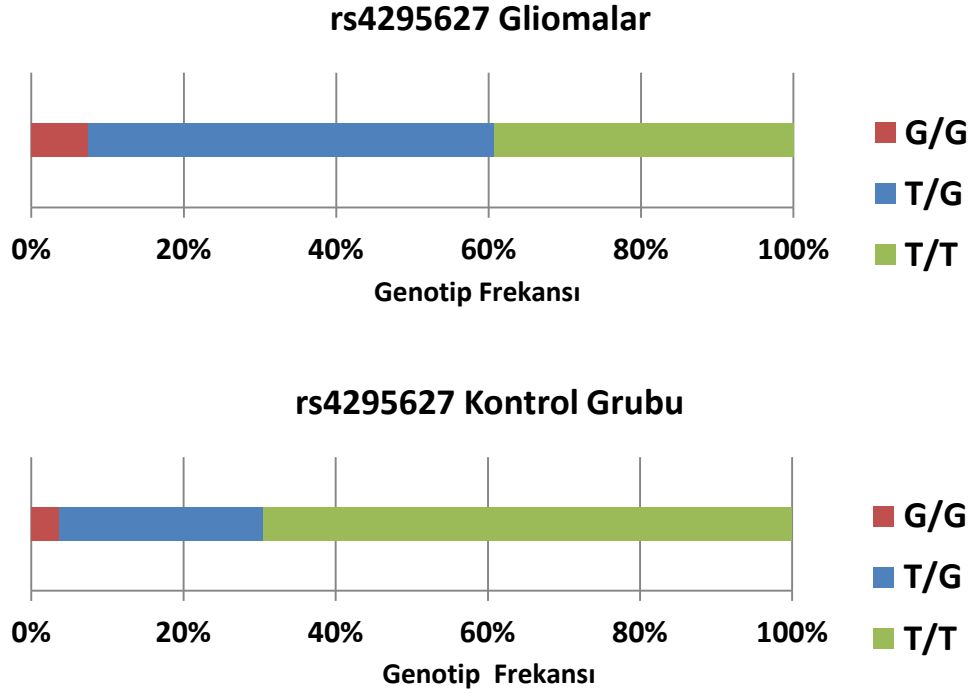
Rs429567’nin gliomlardaki alel frekansının Şekil 11’de genotip frekansı şekil 12’de gösterilmiştir Rs4295627’nin kontrol grubunda ki alel frekansı Şekil 13’de rs4295627’nin kontrol grubunda ki genotip frekansı Şekil 14’de gösterilmiştir.

Tablo-9. Rs4295627-Glioma hasta grubu genotip/alel frekansları

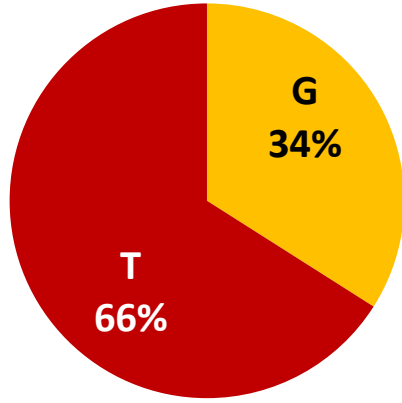
Genotip	Hasta			MAF (%)
	Kadın	Erkek	Toplam	
TG	28 (50,9)	43 (53,75)	72 (53,33)	G (34,07)
GG	4 (7,28)	6 (7,50)	10 (7,40)	
TT	23 (41,82)	30 (38,75)	53 (39,26)	T (65,93)
Toplam	55 (100)	80 (100)	135(100)	

Tablo-10. Rs4295627- Kontrol grubu genotip/alel frekansları

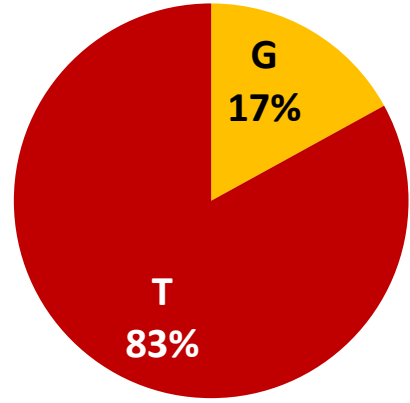
Genotip	Kontrol			MAF (%)
	Kadın	Erkek	Toplam	
TG	15 (19,48)	29 (33,33)	44 (26,82)	G (17,07) T (82,93)
GG	3 (3,89)	3 (3,44)	6 (3,65)	
TT	59 (76,62)	55 (63,22)	114 (69,52)	
Toplam	77 (100)	87 (100)	164 (100)	



Şekil-11: rs4295627 Genotip Frekans Dağılımları



Glioma



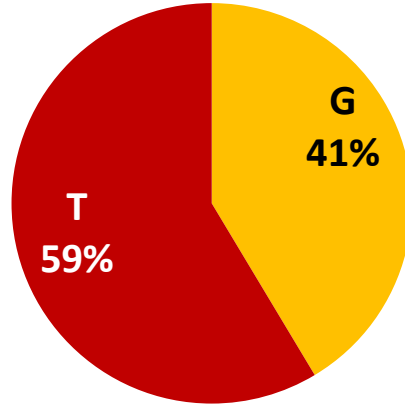
Kontrol

Şekil-12: rs4295627 G ve T alellerinin glioma ve kontrollerde frekans dağılımları

Daha sonra ise, sadece oligodendrogliom hastalar için, hasta ve kontrol grubu genotip dağılımları incelenmiş ve Tablo-11’de gösterilmiştir. Bu hastalar için alel frekans dağılımları ise Şeki-13’de gösterilmiştir.

Tablo-11. Oligodendrogliom hasta ve kontrol grubu genotip frekansları

Genotip	Hasta			Kontrol		
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam
TG	16(55,17)	25(71,42)	41(64,06)	15(19,48)	29(33,33)	44(26,82)
GG	3(10,34)	3(8,57)	6(9,37)	3(3,89)	3(3,44)	6(3,65)
TT	10(34,49)	7(20,01)	17(26,57)	59(76,62)	55(63,22)	114(69,52)
Toplam	29(100)	35(100)	64(100)	77(100)	87(100)	164(100)



Şekil-13: rs4295627'nin oligodendrogliomlarda genotip frekans dağılımı

Üçüncü olarak, glioma hastaları içinden sadece oligodendrogliom ve oligoastrocitom hastaları ve kontrol grubu bireylerin genotip dağılımları incelenmiş ve Tablo-12'de gösterilmiştir.

Tablo-12. Oligodendrogliom ve oligoastrocitom hasta ve kontrol grubu genotip frekansları

Genotip	Hasta			Kontrol		
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam
TG	29(67,44)	29(69,04)	58(63,15)	15(19,48)	29(33,33)	44(26,82)
GG	4(9,30)	4(9,52)	8(10,52)	3(3,89)	3(3,44)	6(3,66)
TT	10(23,26)	9(21,44)	19(26,33)	59(76,63)	55(63,23)	114(69,52)
Toplam	43(100)	42(100)	85(100)	77(100)	87(100)	164(100)

Dördüncü olarak ise, sadece GBM hastaları ve kontrol grubu bireylerin genotip dağılımları incelenmiş ve Tablo-13'de gösterilmiştir.

Tablo-13. GBM hasta ve kontrol grubu genotip frekansları

Genotipi	Hasta			Kontrol		
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam
TG	0	7(36,84)	7(25)	15(19,48)	29(33,33)	44(26,82)
GG	0	0	0	3(3,89)	3(3,44)	6(3,66)
TT	9(100)	12(63,16)	21(75)	59(76,63)	55(63,23)	114(69,52)
Toplam	9 (100)	19(100)	28(100)	77(100)	87(100)	164(100)

Beşinci grup olarak, sadece IDH mutasyonu taşıyan difüz gliomlar incelenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırması Tablo-14’de gösterilmiştir.

Tablo-14. IDH mutant difüz gliom hastalarının genotip frekansları

Genotip	Hasta			Kontrol		
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam
TG	19(55,9)	30(62,5)	49(59,8)	15(19,48)	29(33,33)	44(26,82)
GG	2(5,9)	4(8,33)	6(7,3)	3(3,89)	3(3,44)	6(3,66)
TT	13(38,22)	14(29,12)	27(32,9)	59(76,63)	55(63,23)	114(69,52)
Toplam	34(100)	48(100)	82(100)	77(100)	87(100)	164(100)

Altıncı grup olarak, difüz gliomlar içinden IDH mutasyonu taşıyan ancak oligodendroglioma olmayan hastalarda genotip frekansları hesaplanmış ve Tablo-15’de gösterilmiştir.

Tablo-15. Oligodendrogliomlar hariç IDH mutant difüz gliomlarda genotip frekansları

Genotip	Hasta			Kontrol		
	Kadın	Erkek	Toplam	Kadın	Erkek	Toplam
TG	6 (50)	10 (55,5)	16 (53,3)	15(19,48)	29(33,33)	44(26,82)
GG	0	0	0	3(3,89)	3(3,44)	6(3,66)
TT	6 (50)	8 (44,5)	14(46,7)	59(76,63)	55(63,23)	114(69,52)
Toplam	12(100)	18(100)	30 (100)	77(100)	87(100)	164(100)

Veriler, incelenen parametreler açısından istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. analizler "Statistical Package for the Social Services" (SPSS) yazılım programına taşınarak ve MedCalc yazılımı yardımı ile yapılmıştır.

Araştırılan rs4295627 numaralı SNP'in gliomalar ile ilişkisi alel bazlı ve genotip bazlı; aditif, dominant, resesif ve over-dominant modeller üzerinde incelenmiştir. Analizler öncelikle tüm hasta ve kontrol grubunu dahil ederek yapılmış, daha sonra oligodendrogliomalar, IDH mutasyonu taşıyan tüm gliomalar, IDH mutasyonu taşıyan ve oligodendroglioma olmayan tüm gliomalar şeklinde alt gruplarda yapılmıştır.

rs4295627 numaralı SNP için hasta ve kontrol grubu Hardy-Weinberg (HW) dengesine yakın bulunmuş ve ki-kare testi ile anlamlı bir sapma gözlenmemiştir (Tablo-16).

HW dengesi gerektirmeyen aditif genotipik model, over dominant genotipik model, resesif genotipik model ve alel bazlı model uygulanarak varyantların gliomlarla ilişkisi hesaplanmış ve Tablo-17'de gösterilmiştir.

rs4295627 numaralı SNP ile gliomalar arasında –resesif model hariç- bütün istatistiksel modellemelerde ilişki olduğu gözlenmiştir ($p < 0,0001$) (Tablo-17).

Tablo-16. Gliom hasta ve kontrol bireyleri için Hardy-Weinberg denge hesaplaması

Hardy-Weinberg	Beklenen	Gözlenen	Ki-kare	p-değeri
q² (frekans)	2,91	3,66	0,4523	0,5
2pq (frekans)	28,32	26,83		
p² (frekans)	68,72	69,51		
q² (sayı)	4,8	6		
2pq (sayı)	46,4	44		
p² (sayı)	112,8	114		

Tablo-17. Farklı modellere göre rs4295627 ile ilişkili glioma yatkınlığı

Model	OR	%95 CI	p	RR	%95CI	p
Alel bazlı	2,51	1,71-3,68	<0,0001	1,57	1,33-1,86	<0,0001
Dominant	3,53	2,18-5,70	<0,0001	1,96	1,51-2,54	<0,0001
Resesif	2,11	0,75-5,95	0,1598	1,42	0,95-2,11	0,0902
Aditif	3,53	2,22-5,63	<0,0001	1,96	1,52-2,53	<0,0001
Over-dominant	3,12	1,92-5,05	<0,0001	1,8	1,41-2,30	<0,0001

Sadece oligodendrogliomalı hastalar değerlendirmeye alındığında, rs4295627 polimorfizmi hastalıkla kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmiş ve G alelinin 3-6 kat kadar artmış oligodendroglioma riski ile asosiye olduğu görülmüştür ($p<0,0001$, OR=3,43) (Tablo-18).

Tablo-18. Rs429562'nin oligodendrogliomlar ile ilişkisi

Model	OR	%95 CI	p	RR	%95CI	P
Alel bazlı	3,43	2,18-5,41	<0,0001	2,25	1,71-2,97	<0,0001
Dominant	6,3	2,18-5,70	<0,0001	3,74	2,29-6,09	<0,0001
Resesif	2,72	0,84-8,79	0,0934	1,86	1,01-3,42	0,0447
Aditif	6,35	3,37-11,95	<0,0001	3,75	2,31-6,08	<0,0001
Over-dominant	4,86	2,62-9,01	<0,0001	3	1,94-4,63	<0,0001

Tüm hasta grubu içinden sadece IDH-mutant difüz gliomlar ve rs4295627 polimorfizmi arasındaki ilişki muhtemel bütün modeller kullanılarak incelenmiş ve IDH mutant difüz gliomlar ile arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir –resesif model hariç. ($p<0,0001$ ve OR=2,88) (Tablo-19).

Tablo-19. Rs 4295627 ile IDH-mutant difüz gliom ilişkisi

Model	OR	%95 CI	P	RR	%95CI	P
Alel bazlı	2,88	1,88-4,41	<0,0001	1,9	1,49-2,41	<0,0001
Dominant	4,64	2,63-8,20	<0,0001	2,74	1,86-4,02	<0,0001
resesif	2,11	0,66-6,74	0,21	1,55	0,86-2,81	0,1475
Aditif	4,6	2,64-8,01	<0,0001	2,72	1,86-3,99	<0,0001
Over-dominant	4,05	2,31-7,09	<0,0001	2,44	1,70-3,50	<0,0001

Tüm hasta grubu içinden oligodendrogliomlar hariç IDH-mutant difüz gliomlar ile, rs4295627 polimorfizmi arasındaki ilişki muhtemel bütün modeller kullanılarak incelenmiş ve alel-bazlı modelde anlamlı bir ilişki görülememesine rağmen,

(p=0,073 ve OR=1,77), diğer 3 modelde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (2,61<OR<4,6) .(Tablo-20).

Tablo-20. Rs4295627 ile IDH-mut oligodendrogliom hariç difüz gliom ilişkisi

Model	OR	%95 CI	P	RR	%95CI	P
Alel bazlı	1,77	0,93-0,0817	0,0817	1,6	0,96-2,66	0,0734
Dominant	2,61	1,18-5,74	0,0176	2,22	1,15-4,26	0,0169
resesif	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aditif	4,6	2,64-8,01	<0,0001	2,03	1,05-3,92	0,0343
Over-dominant	4,05	2,31-7,09	<0,0001	2,44	1,70-3,50	<0,0001

4.6 Rs4295627 Risk Aleli ile Gliomalarda Yaygın Görülen Genetik Bozuklukların İlişkisi

rs4295627 polimorfizminin diğer genetik değişiklikler ilişkisine sadece dominant genotip model ile bakılmıştır. Bu genetik değişiklikler Tablo-21’de gösterilmiştir.

Tablo-21. rs4295627 ile ilişkisi incelenen genetik değişiklikler ve tanımlayıcı istatistikleri

	Hasta					
	Geçerli		Kayıp		Toplam	
	N	Yüzde	N	Yüzde	N	Yüzde
rs4295627dominant * rs55705857 durumu	110	42,0%	152	58,0%	262	100,0%
rs4295627dominant * IDH1 Durumu	109	41,6%	153	58,4%	262	100,0%
rs4295627dominant * 1p19q ko delesyonu	63	24,0%	199	76,0%	262	100,0%
rs4295627dominant * hTERT promotor mutasyonu	110	42,0%	152	58,0%	262	100,0%
rs4295627dominant * hTERT C228T mutasyonu	110	42,0%	152	58,0%	262	100,0%
rs4295627dominant * p16 kaybı	79	30,2%	183	69,8%	262	100,0%
rs4295627dominant * p53 IHC ifadesi	100	38,2%	162	61,8%	262	100,0%
rs4295627dominant * PTEN kaybı	67	25,6%	195	74,4%	262	100,0%

rs4295627 ile rs55705857 dominant modelle karşılaştırılmış ve Tablo-22’de gösterilmiştir.

Tablo-22. rs4295627 ve rs55705857 risk alelleri genotip dağılım tablosu

		rs55705857 durumu		Total
		A/A	A/G	
rs4295627dominat	T/G, G/G	49	14	63
	T/T	38	9	47
Toplam		87	23	110

rs4295627 ve rs55705857 risk alelleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo-23’de gösterilmiştir.

Tablo-23. rs4295627- rs55705857 ilişkisi

	p-değeri	95% CI	
		Alt sınır	Üst sınır
Odds Ratio for rs4295627dominant (GG,TG / TT)	,829	,324	2,119
For cohort rs55705857 durumu = A/A	,962	,794	1,165
For cohort rs55705857 durumu = A/G	1,160	,550	2,450
Toplam	110		

Dominant genotip model kullanılarak rs4295627 risk alelinin IDH mutasyonlarına göre dağılım durumu Tablo 26’da gösterilmiştir.

Tablo-24. rs4295627 ve IDH1 mutasyon dağılımı

		IDH1 Durumu		Total
		MUT	WT	
rs4295627dominant	T/G, G/G	43	20	63
	T/T	25	21	46
Total		68	41	109

rs4295627 durumu ve IDH mutasyon durumu risk analizi Tablo-25’de gösterilmiştir.

Tablo-25. rs4295627 ve IDH durumu risk karşılaştırması

	p-değeri	95% CI	
		Alt sınır	Üst sınır
Odds Ratio for rs4295627dominant (GG,TG / TT)	1,806	,823	3,964
For cohort IDH1 Durumu = MUT	1,256	,918	1,719
For cohort IDH1 Durumu = WT	,695	,430	1,124
Toplam	109		

Rs4295627 nin 1q19q ko-delesyonu ve sadece 19q delesyonu ile ilişkisi incelenmiş ve Tablo-26’da gösterilmiştir.

Tablo-26. rs4295627 risk alelinin 1p19q ko delesyonu dağılımı

		1p19q kodelesyonu			Toplam
		WT	1p19q kodel	19q del	
rs4295627 dominant	T/G, G/G	15	24	4	43
	T/T	4	15	1	20
Toplam		19	39	5	63

Rs4295627 risk alelinin hTERT promotor mutasyonları ile ilişkisi dominant genotip model incelenmiş ve Tablo29’da gösterilmiştir.7

Tablo-27. rs4295627 risk alelleri ile hTERT promotor mutasyonu dağılımı

		hTERT promotor		Toplam
		MUT	WT	
rs4295627 dominant	G/G,T/G	38	25	63
	T/T	31	16	47
Toplam		69	41	110

rs4295627 genotipi ile hTERT promotor mutasyonu risk karşılaştırması yapılmış ve Tablo-28’de gösterilmiştir.

Tablo-28. rs4295627 hTERT promotor mutasyonları risk karşılaştırması

	Value	95% CI	
		Alt sınır	Üst sınır
Odds Ratio for rs4295627 dominant (GG,TG / TT)	,785	,357	1,723
For cohort hTERT promoter = MUT	,914	,686	1,218
For cohort hTERT promoter = WT	1,166	,706	1,924
TOPLAM	110		

Rs4295627 risk alelinin hTERT C228T ile ilişkisi incelenmiş ve dominant genotip modellemeye göre durumları Tablo-29’da gösterilmiştir.

Tablo-29. rs4295627 genotipi ve hTERT-C228T mutasyon dağılımı

		hTERT C228T		Toplam
		C	CT	
rs4295627	G/G,T/G	38	25	63
dominant	T/T	26	21	47
Total		64	46	110

Rs4295627 risk alelinin hTERT-C228T için risk analizi yapılmış ve Tablo-30’da gösterilmiştir.

Tablo-30. rs4295627 ve hTERT-C228T risk karşılaştırması

	p-değeri	95% CI	
		Alt sınır	Üst sınır
Odds Ratio for rs4295627 dominant (GG,TG / TT)	1,228	,571	2,639
For cohort hTERT C228T = C	1,090	,787	1,510
For cohort hTERT C228T = CT	,888	,572	1,379
TOPLAM	110		

Rs4295627 genotipinin p16 ifadesine göre dağılımı incelenmiş ve Tablo-31’de gösterilmiştir.

Tablo-31.rs4295627 genotipi ve p16 durumu

		p16 ifadesi		Toplam
		Yok	Var	
rs4295627 dominant	G/G,T/G	16	26	42
	T/T	15	22	37
Toplam		31	48	79

Rs4295627 genotipi ve p16 ifadesi için dominant modele göre risk analizi yapılmış ve Tablo-32’de gösterilmiştir.

Tablo-32. rs4295627 ve p16 durumu risk karşılaştırması

	Value	95% CI	
		Alt sınır	Üst sınır
Odds Ratio for rs4295627dominant (GG,TG / TT)	,903	,365	2,230
For cohort p16 = yok	,940	,543	1,626
For cohort p16 = var	1,041	,729	1,487
TOPLAM	79		

Rs4295627 genotipinin p53 ifadesine göre durumları incelenmiş ve Tablo 35’de gösterilmiştir. P53 normal hücrelerde çok çabuk yıkıldığı için, immunohistokimya boyama ile pozitif sinyal veren örneklerde p53 geninin kendisinde ya da p53’ü regüler eden genlerde mutasyon olduğu varsayılmaktadır.

Tablo-33. rs4295627 ve p53 ifadesi

		p53 ifadesi		Total
		Yok	Var	
rs4295627 dominant	G/G, T/G	31	25	56
	T/T	21	23	44
Total		52	48	100

Rs4295627 risk genotipleri ve p53ifadesi ile risk analizi yapılmış ve Tablo-34’de gösterilmiştir.

Tablo-34. rs4295627 ve p53 durumu risk karşılaştırması

	Value	95% CI	
		Alt sınır	Üst sınır
Odds Ratio for rs4295627dominant (GG, TG / TT)	1,358	,615	2,999
For cohort p53= yok	1,160	,786	1,711
For cohort p53= var	,854	,569	1,282
TOPLAM	100		

Rs4295627 risk genotiplerinin PTEN ifade durumuna göre dağılımı dominant genotip model ile incelenmiş ve Tablo-35’de gösterilmiştir.

Tablo-35. rs4295627 ve PTEN durumu

		PTEN_ifadesi		Toplam
		var	Yok	
rs4295627	G/G, T/G	30	5	35
dominant	T/T	28	4	32
Total		58	9	67

Rs4295627 risk genotipi ve PTEN ifadesi ile risk analizi yapılmış ve Tablo-36’da gösterilmiştir.

Tablo-36. rs4295627 ve PTEN durumu risk karşılaştırması

	Value	95% CI	
		Lower	Upper
Odds Ratio for rs4295627dominant (GG, TG / TT)	,857	,209	3,518
For cohort PTEN= var	,980	,811	1,183
For cohort PTEN= yok	1,143	,336	3,888
TOPLAM	67		

Moleküler belirteçlerin yanı sıra rs4295627'nin tümör derecesi (grade) ile ilişkisi de analiz edilmiştir (Tablo-37).

Tablo-37. rs4295627 risk alelinin tümör derecesine göre dağılımı

		Tümör derecesi (grade)			Toplam
		2	3	4	
rs4295627 dominant	T/G, G/G	44	18	7	69
	T/T	21	6	20	47
Toplam		65	24	20	116

Rs4295627'nin dominant modele göre diğer genetik değişikliklerle ilişkisi istatistiksel olarak "Fisher's Exact Test" ile incelenmiş ve Tablo-38'de gösterilmiştir. Sonuç olarak, Rs4295627 ile gliomlarda sık görülen genetik bozukluklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ancak rs4295627 ile tümör derecesi ve oligodendroglioma histolojisi arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır.

Tablo-38. rs4295627 genotipinin dominant modele göre diğer genetik değişiklikler ile ilişkisinin "Fisher's exact test" ile incelenmesi

rs4295627	n	Pearson χ^2 değeri	Df	Fisher's Exact Test 2-taraflı p-değeri
rs55705857	110	0,154	1	0,814
IDH1 mutasyonu	109	2,191	1	0,164
1p19q kodelesyonu	63	2,133	2	0,344
hTERT promotor mutasyonları	110	1,366	1	0,558
hTERT C228T mutasyonu	110	0,276	1	0,697
p16 ifade kaybı	79	,049	1	1,000
p53 IHC ifadesi	100	,575	1	0,546
PTEN ifade kaybı	67	0,046	1	1,000
Tümör derecesi (grade)	116	29,999	2	<0,0001

5.SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Gliomalar histolojik olarak astrositoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, ependymoma ve koroid pleksus tümörlerinden oluşurlar. Histopatolojik olarak astrositomalar; ince hücre uzantıları, yaygın sitoplazmaları, fibrilden zengin glial tümör matrisleri ile, oligodendrogliomalar; yuvarlak hiperkromatik çekirdeklerini çevreleyen net sitoplazmaları, kümes teli görünümlü kılcal damar yapıları ile, Oligoastrocitomalar ise; bahsedilen tümör hücrelerini birarada ya da ayrı ayrı bölgelerde bulundurmaları ile tanımlanırlar. Tümörün derecesi örnekleme yapılan tümör dokusunun tümü içinde en yüksek dereceye işaret eden bölgenin derecesine göre yapılmaktadır(46-48).

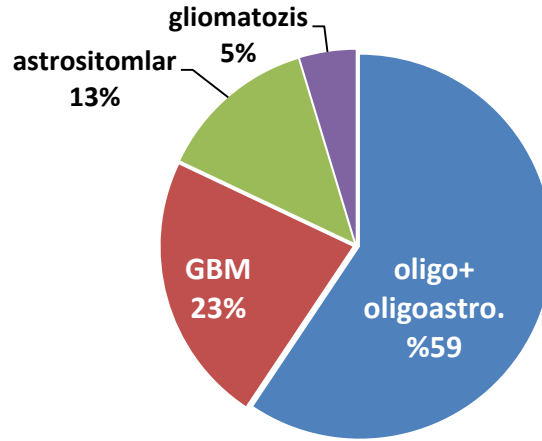
Primer beyin tümörleri tüm kanserlerin sadece % 1-2'sini oluşturuyor olmasına rağmen ortalama kayıp yaşam yılları (YLL ya da "years of life lost") bakımından 20.1 yıl ile kanser türleri arasında 1. sıradadır. Gliomaların moleküler epidemiyolojisine ve moleküler patolojisine dair bilgimiz son yıllarda büyük ilerleme kaydetmiştir. IDH1 ve IDH2 mutasyon durumu, MGMT metilasyonu, 1p19q kodelesyon statüsü gibi moleküler bozukluklar prognostik faktörler olarak her geçen gün kliniğe daha çok girmektedir. 2007'den bu yana yürütülen genom çapında asosiyasyon çalışmalarında (GWAS) ise gliomalara genetik yakınlıkla ilişkili tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) belirlenmiştir. Farklı GWAS çalışmalarının sonuçları istikrarlı biçimde 5 genomik bölgenin gliomlara genetik yakınlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir: GWAS sonuçlarının dikkat çeken yönlerinden birisi, CCDC26 ve PHLDB1 gen bölgelerindeki SNP'lerin (rs4295627 ve rs498872, sırası ile) sadece oligodendrogliomlar ve IDH mutasyonu taşıyan gliomalara yakınlık ile ilişkili olması, CDKN2B gen bölgesindeki SNP'lerin primer glioblastomlara yakınlıkla ilişkili olması, telomeraz alt üniteleri olan TERT ve RTEL1 ile EGFR ve TP53 yerleşimli SNP'lerin ise tüm gliomlara yakınlık ile ilişkili olmasıdır (49-52).

Buradan çıkarılabilecek sonuçlardan biri, alt tiplere özgü yakınlık sağlayan SNP'lerin gliomagenез sırasında spesifik moleküller/yolaklar ile etkileşerek etkilerini gösteriyor olabileceğidir. Genel glioma yakınlığı ile ilişkili SNP'lerin ise TERT, RTEL1, TP53 ve EGFR gibi onkogenезdeki temel rolleri iyi bilinen genler üzerinden etki göstermesi şaşırtıcı değildir. Bu nedenler ile, oligodendrogliom ve IDH mutant tümörlere yakınlık ile ilişkili CCDC26 ve PHLDB1 yerleşimli

SNP'lerin spesifik bozukluklar ile etkileşerek bu tümörlere yatkınlık sağlıyor olması olasıdır. Üstelik bu iki genin hücre içi süreçleri hangi yollar üzerinden, hangi moleküller ile etkileşerek etkilediği bilinmemekte olduğundan, gliomalara nasıl yatkınlık sağladıkları sorusu son derece önemli ve ilgi çekicidir. Bu tezde sunulan araştırmaların bir hedefi de bu soruya açıklık getirebilmektir.

Bizim yaptığımız çalışmada; 135 hasta grunda ki gliom alt tiplerinin dağılımı oligodendrogliom, oligoastrocitom, astrocitom, GBM ve gliomatozistir. Çalışmanın amacına uygun olarak hasta grubunun önemli bir kısmını düşük dereceli oligodendrogliom ve oligoastrocitom örnekleri oluşturmaktadır.

Örneklerin dağılımı Şekil-14'te pasta grafiği ile gösterilmiştir.

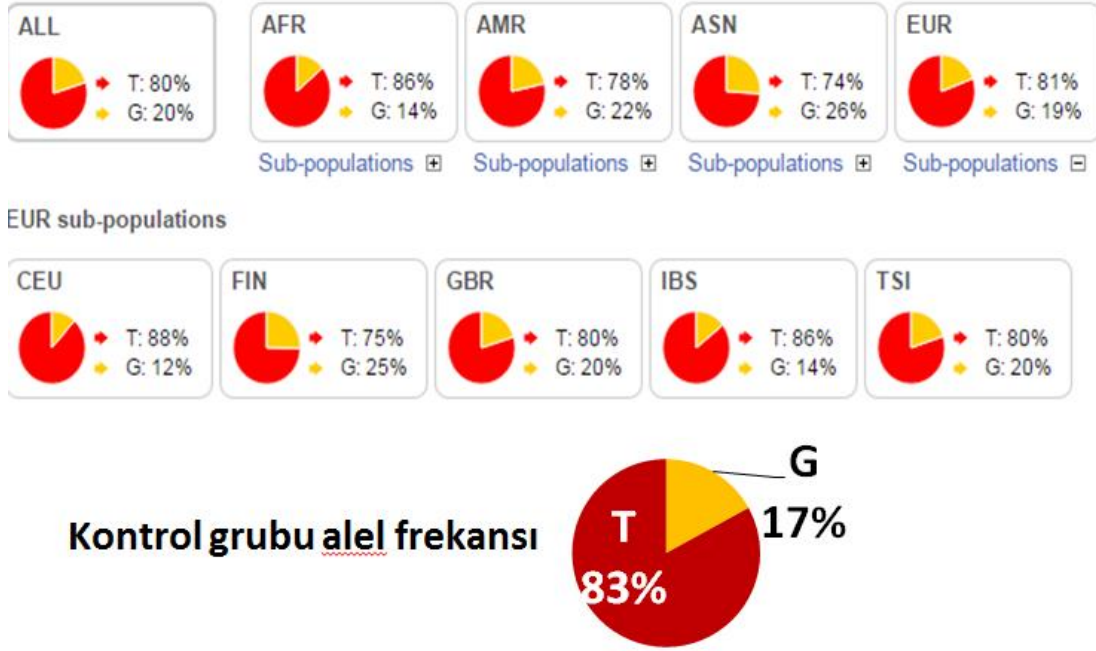


Şekil-14. Hasta grubunun glioma alt tiplerine göre dağılımı

Glioma insidansı ülkeler arasında farklılık gösterir ve Avrupa'ya kıyasla Afrika/Asya'da daha düşük insidans gösterir. Bu farklılıklar genetik yatkınlıklar arasındaki farklılıkları yansıtır olabilir.

Bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz rs4295627 alel frekansları, dünya üzerindeki farklı popülasyonlar ile kıyaslanmıştır (Şekil-15). Buna göre çalışmamıza katılan 164 kişilik kontrol grubunda rs4295627 risk alelinin görülme sıklığı tüm dünyadaki görülme sıklığı ve Avrupa'da görülme sıklığıyla yakın bulunmuştur. Rs4295627 risk alel frekansının Asya'da en yüksek oranda görülmesi, bu SNP'in

tüm glioma riskini değil de sadece spesifik alt tiplere yatkınlık ile ilişkili olması ile açıklanabilir.



Şekil-15. Rs4295627 risk alelinin farklı popülasyonlarda görülme sıklığı (61).

Egan ve arkadaşlarının yapmış oldukları 704 kontrol ve 699 glioma tanısı almış hastanın yer aldığı bir çalışmada GWAS ile belirlenen risk allelerini, gliomların histopatolojik gruplarına göre incelenmiş, CCDC26 rs4295627 SNP'inin düşük dereceli astrositik tümörlerde ve oligodendrogliomlarla bağlantılı olduğunu, göstermiştir (53). Bizim yaptığımız çalışmada da CCDC26/rs4295627 G alelinin en fazla oligodendrogliomlarla, düşük derece (grade) ile ve IDH mutasyonları ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

ODG'lerde en sık rastlanılan moleküler genetik değişiklikler 1p ve 19 delesyonlarıdır. Kromozom 1p/19q kombine delesyonu, WHO grade II oligodendrogliomlarda %80- 90 arası bir oranda izlenirken, WHO grade III anaplastik oligodendrogliomlarda bu oran%50-70'lere düşmektedir (54).

Bizim yaptığımız çalışmada ise oligodendrogliomlarda çok sık gözlenen 1p19q ko-delesyonunu rs4295627 risk alelleri ile ilişkisine bakıldı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülemedi ($p=0,33$).

Kromozom 2q33.3'e lokalize izositrat dehidrogenaz-1 (IDH1) insanlarda sitozolik NADP(+) bağımlı izositrat dehidrogenaz enzimini kodlayan genidir. izositrat dehidrogenaz sitrik asit siklusunda yer alan bir enzimdir ve sitratın α -ketoglutarata dönüşümünü katalize eder (55). IDH1 hücrelerdeki temel antioksidan olarak görev alan sitozolik redükte glutasyonun rejenerasyonu için gerekli NADPH'nin ana kaynağıdır (34). Yapılan çalışmalarda, gliomlara spesifik IDH1 mutasyonlarının, daima izositratın bağlanma bölgesini kodlayan 132. kodondaki arginin aminoasidini etkilediği bildirilmiştir (23).

Bizim yaptığımız çalışmada ise ortak değerlendirilebilen 109 hastanın 69'unda 132. kodonda yer alan histidini arjinine çeviren IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir.

IDH1 mutasyonları somatik orijinlidir, heterozigottur ve IDH1 enzim aktivitesini inaktive eder (52). Bu gendeki mutasyon sonucunda, 2-hidroksiglutarat isimli onkometabolit birikir. Biriken aşırı miktardaki 2-hidroksiglutarat, gliom patogenezi ve progresyonunda rol oynar (25).

Bizim yaptığımız çalışmada oligodendrogliomlarda görülen IDH1 mutasyonunun rs4295627 risk alelleri ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p=0,164$). Ancak çalışmamızın vaka-kontrol bölümünde ise rs4295627 G aleli ile IDH mutasyonu taşıyan gliomalar arasında hemen tüm modellerde anlamlı bir ilişki saptadık. Bunun nedeni, ki-kare testinin istatistiksel ilişkiyi ortaya çıkarmada yetersiz kalması olabilir.

Bizim yaptığımız çalışmada özellikle yüksek dereceli gliomlarda görülen hTERT C228T ve C250T mutasyonları ile rs4295627 risk alelleri arasındaki ilişkiye çapraz tablo yöntemi ile bakıldığında anlamlı bir ilişki gözlenmedi ($p=0,70$).

CCDC26 geni içinde bir çok SNP bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de rs55705857 SNP'i olup, evrimsel olarak korunmuş ve metile olmayan CpG kümeleri içinde lokalize bir SNP'tir. Rs55705857'nin özellikle derece-II oligodendrogliom ve IDH-mutant derece-II astrositomlar/ oligoastrositom ile güçlü asosiyasyon yaptığı görülmüştür (59).

Biz de çalışmamızda rs55705857 genotipi ile rs4295627 arasındaki ilişkiyi inceledik ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlenmedi ($p=0,81$).

Moleküler değişikliklerin yanı sıra tümörlerin WHO 2007'ye göre yapılan derecelendirmesi (grade) ile rs4295627 arasındaki ilişkiyi de inceledik ve daha

önceki çalışmalarla uyumlu olarak artan tümör derecesi ile rs4295627 ile ilişkili riskin azaldığını gözlemledik ($p < 0,0001$).

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan ve benzeri Türkiye Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü'nce yapılmış bir çalışmaya göre gliomaların erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (3).

Bizim çalışmamıza dahil olan hasta ve kontrol gruplarının demografik yapılarını kıyaslandığında 135 hastanın % 59,25'i erkek, % 40,75'inin de kadın olduğu belirtilmiştir. Bu durum gliomların erkeklerde kadınlarda oranla daha sık gözlemlendiğini doğrulamaktadır.

Son olarak, glioma hasta grubunun oldukça heterojen olması ve kontrol grubundaki örnek sayısının çok fazla olmaması sebebiyle rs4295627 risk alelinin/genotipinin diğer parametreler ile ilişkisinde istatistiksel anlam yakalanmadığı durumlarda, bu sonucun "ilişki yok" şeklinde yorumlanmaktan kaçınılmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz. Kontrol ve hasta grubundaki örnek sayısının artması ile daha kesin sonuçlara ulaşmak mümkün olabilecektir.

6.KAYNAKLAR

1. Bailey P and Cushing H (1926). A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. J.B. Lippincott Company. Philadelphia ; London.
2. CBTRUS Central Brain Tumor Registry of the United States (2007-2011). Report on Primary Brain Tumors in the United States, Chicago.
3. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Bakanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü (2004-2006). 2004-2006 Yılları Türkiye Kanser insidansı.
4. Loiseau H, Huchet A, Rue M, Cowppli-Bony A and Baldi I (2009). [Epidemiology of primary brain tumor]. Rev Neurol (Paris) 165(8-9): 650-670.
5. Louis D, Ohgaki H, Wiestler, OD., Cavenee WK. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. 114: 97-109.
6. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P and Ohgaki H (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res 15(19): 6002-6007.
7. Reitman ZJ and Yan H (2010). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. J Natl Cancer Inst 102(13): 932-941.
8. Walter, P., Roberts, K., Raff, M., Lewis, J., Johnson, A., Alberts, B., 2002, Moleculer Biology Of The Cell, Garland Science, USA
9. William, S.K., Cummings, M.R., Genetik Kavramlar, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636.
10. Willard, F.H., McInnes, R.R., Nussbaum, R.L., Boerkoel III, C.F., 2005, Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi; 311-332.

11. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014 Jul;16(7):896-913..
12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
13. Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System.* IARC Press Lyon, France. 2000; 40-45.
14. Ali-Osman F (2005). *Brain tumors.* Humana Press. Totowa, N.J.
15. Kim, YH, Nobusawa, S, Mittelbronn, M, Paulus, W, Brokinkel, B, Keyvani, K, Sure, U, Wrede, K, Nakazato, Y, Tanaka, Y, Vital, A, Mariani, L, Stawski, R, Watanabe, T, De Girolami, U, Kleihues, P, Ohgaki, H (2010) Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol*, 177:2708–2714.
16. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleihues P, Korshunov A, Kros JM, Beatriz Lopes M, Ng HK, Ohgaki H, Paulus W, Pietsch T, Rosenblum M, Rushing E, Soylemezoglu F, Wiestler O, Wesseling P. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014 Sep;24(5):429-35.
17. Oktay Y, Akyerli Boylu C, Yakıcıer MC, Özduman K, Sav A. Gliomların Patolojisi ve Moleküler Biyolojik Özellikleri. *Kanser Gündemi: Beyin Tümörleri, Gliomlar.* (Eds. S Ergüney, MN Pamir, Özduman K). Vol. 2/3, Aralık 2014: 17-22. ISSN: 0094-0143.
18. Bourne, TD, Schiff, D (2010) Update on molecular findings, management and outcome in low-grade gliomas. *Nat Rev Neurol*, 6:695–701.

19. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A and Holland E (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4(11): e7752.
20. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73.
21. Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E and Ding J (2004). Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem* 279(32): 33946-33957.
22. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW and Velculescu VE (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314(5797): 268-274.
23. 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 and Kinzler KW (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321(5897): 1807-1812.
24. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, Tigchelaar W, Troost D, Vandertop WP, Bardelli A and Van Noorden CJ (2010). The prognostic *IDH1*(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol* 119(4): 487-494.

25. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG and Su SM (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462(7274): 739-744.
26. Sonoda, Y., Kumabe, T., Nakamura, T., 2009, Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients *Cancer Sci*; 100: 1996–1998.
27. Hartmann, C, Meyer, J, Bals, J, Capper, D, Mueller, W, Christians, A, Felsberg, J, Wolter, M, Mawrin, C, Wick, W, Weller, M, Herold-Mende, C, Unterberg, A, Jeuken, JW, Wesseling, P, Reifenberger, G, von Deimling, A (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*, 118:469–474.
28. Zhao, S, Lin, Y, Xu, W, Jiang, W, Zha, Z, Wang, P, Yu, W, Li, Z, Gong, L, Peng, Y, Ding, J, Lei, Q, Guan, KL, Xiong, Y (2009) Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*, 324:261–265.
29. Jin, G, Reitman, ZJ, Spasojevic, I, Batinic-Haberle, I, Yang, J, Schmidt-Kittler, O, Bigner, DD, Yan, H (2011) 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS One*, 6:e16812.
30. Lu, C, Ward, PS, Kapoor, GS, Rohle, D, Turcan, S, Abdel-Wahab, O, Edwards, CR, Khanin, R, Figueroa, ME, Melnick, A, Wellen, KE, O'Rourke, DM, Berger, SL, Chan, TA, Levine, RL, Mellinghoff, IK, Thompson, CB (2012) IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 483:474–478.
31. Turcan, S, Rohle, D, Goenka, A, Walsh, LA, Fang, F, Yilmaz, E, Campos, C, Fabius, AW, Lu, C, Ward, PS, Thompson, CB, Kaufman, A, Guryanova, O, Levine, R, Heguy, A, Viale, A, Morris, LG, Huse, JT, Mellinghoff, IK, Chan,

- TA (2012) IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483:479–483.
32. Ichimura, K., Pearson, D.M., 2009, IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas *Neuro-Oncology* 11, 341–347.
 33. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P and Ohgaki H (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res* 15(19): 6002-6007.
 34. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K and Delattre JY (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 27(25): 4150-4154.
 35. Bailey P, Bucy P. Oligodendrogliomas of the brain. *J Pathol Bacteriol.* 1929: 32: 735–754.
 36. Watanabe, T, Nobusawa, S, Kleihues, P, Ohgaki, H (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*, 174:1149–1153.
 37. Bondy, M.L. et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113, 1953–1968 (2008).
 38. Hardy J, Singleton A. Genomewide Association Studies and Human Disease. *N Eng J Med.* 2009; 360(17): 1759-1768.
 39. Miller, R.D., Kwok, P.Y. 2001. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Hum Mol Genet*, 10(20):2195-8.
 40. Sanjay S, Hosking : Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat. Genet.* 41,899-907(2009).

41. Manolio, T.A. Brooks, L.D., Collins, F.S. 2008. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest.*,118(5):1590-605.
42. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet.* 2012 Jan 13;90(1):7-24.
43. Cichon, S., Craddock, N., Daly, M., Faraone, S.V., Gejman, P.V., Kelsoe, J., Lehner, T., Levinson, D.F, Moran, A., Sklar, P., Sullivan, P.F. 2009. Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry*, 166(5): 540-56.
44. Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 9(4): 314-8. 2008.
45. Jenkins R.,Wrensch M., Johnson D., Fridley B., Decker P., Xiaoe Y.:Distiinct germline polymorphisms underlie glioma morphologic heterogeneity.NIH Public Access.Cancer Genet.2011 January;204(1):13-18.
46. Claus EB., Black PM.: Survival rates and patterns of care for patients diagnosed with supratentorial low-grade gliomas: data from the SEER program, 1973-2001. *Cancer. Abstr.* 15:106(6);1358-63, 2006.
47. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Nakazato Y, Inoue T, Kanamori M, Tominaga T. Longterm survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 2009; 151(11):1349-58.
48. Felsberg J., Reifenberger G.: Neuropathology and Molecular Genetics of Diffusely Infiltrating Cerebral Gliomas. *Med. Laser Appl.*,17: 133-146, 2002.
49. Dubrow, R. and Darefsky, A.S. (2011) Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992–2007. *BMC Cancer*, 11, 325.
50. Hemminki, K., Tretli, S., Sundquist, J., Johannesen, T.B. and Granstrom, C. (2009) Familial risks in nervous-system tumours: a histology-specific analysis from Sweden and Norway. *Lancet Oncol.*, 10, 481–488.

51. Simon, M., Hosking, F.J., Marie, Y., Gousias, K., Boisselier, B., Carpentier, C., Schramm, J., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Idbaih, A. et al. (2010) Genetic risk profiles identify different molecular etiologies for glioma. *Clin. Cancer Res.*, 16, 5252–5259.
52. Kiemeneys LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KK, Stacey SN, et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet.* 2008; 40(11):1307–12.
53. Egan K, Thompson R, Nabors L, Olson J, Brat D. Cancer susceptibility variants and the variants and the risk of adult glioma in a US case-control study. *J Neurooncol.* 2011 September; 104(2):535-542.
54. Cairncross G, Jenkins R. Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J.* 2008; 14: 352–357.
55. Narahara K, Kimura S, Kikkawa K, Takahashi Y, Wakita Y, Kasai R, Nagai S, Nishibayashi Y, Kimoto H. Probable assignment of soluble isocitrate dehydrogenase (IDH1) to 2q33.3. *Hum Genet.* 1985; 71: 37-40.
56. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB. IDH1 mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012; 483: 474-478.
57. Arbes SJ Jr, Gergen PJ, Vaughn B, Zeldin DC. Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(5): 1139–1145.
58. Wigertz A, Lonn S, Schwartzbaum J, et al. Allergic conditions and brain tumor risk. *Am J Epidemiol.* 2007; 166(8):941–950.
59. Jenkins RB, Xiao Y, Sicotte H, Decker PA, Kollmeyer TM, Hansen HM, Kosel ML, Zheng S, Walsh KM, Rice T, Bracci P, McCoy LS, Smirnov I, Patoka JS,

Hsuang G, Wiemels JL, Tihan T, Pico AR, Prados MD, Chang SM, Berger MS, Caron AA, Fink SR, Halder C, Rynearson AL, Fridley BL, Buckner JC, O'Neill BP, Giannini C, Lachance DH, Wiencke JK, Eckel-Passow JE, Wrensch MR. A low-frequency variant at 8q24.21 is strongly associated with risk of oligodendroglial tumors and astrocytomas with IDH1 or IDH2 mutation. *Nat Genet.* 2012 Oct;44(10):1122-5.

60. Safaeian M.,Rajaraman P.,Hartge P.,Yeager M.,Linet M.,Buder A.,Purdue M.,Hsing A.,Freeman L.,Hoppin J.,Albanes D.,Weinstein S. Joint effects between five identified risk variants, allergy and autoimmune conditions on glioma risk. *Cancer Causes Control.* 2013 Oct;24(10):1885-91.

61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/137196> erişim tarihi:16.12.2014

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	BÜŞRA	Soyadı	ŞENKUN
Doğum Yeri	AKŞEHİR	Doğum Tarihi	20.03.1990
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	42904627396
E-mail	Busra.senkongmail.com	Tel	5388186943

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Acıbadem Üniversitesi	2014
Lisans	Haliç Üniversitesi	2011
Lise	Akşehir Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Medikal Delege	Servier İlaç ve Araştırma A.Ş	1,5 yıl

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	68		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Micorsoft Office	Çok iyi