



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA MULTİFORME
GENETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceren SÜMER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA MULTİFORME
GENETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceren SÜMER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2013

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ceren SÜMER’ in hazırladığı “GLİOBLASTOMA MULTİFORME GENETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL _____

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU _____

Prof. Dr. Havvanur TURGUTALP _____

Tarih: .../.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../...

Ceren SÜMER

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince yardımlarını, en zor ve stresli zamanlarımda motive edici desteği ve hoşgörüsünü esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yol göstericim olan çok değerli tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL' e, çalışmadaki örneklerin temininde ve seçilmesinde, büyük bir sabır göstererek tüm samimiyetiyle yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Havvanur TURGUTALP' e, dizi analizi çalışmalarımı kapısını her çaldığımda sabırla bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Ersan KALAY' a, araştırma süresince ve yazım aşamasında destek gördüğüm, büyük bir sabırla yardımlarını esirgemeyen sayın Öğr. Gör. Dr. Bayram TORAMAN' a, ayrıca Tıbbi Biyoloji ABD öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Fahri UÇAR' a, sayın Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER' e tüm samimiyetimle teşekkürlerimi sunarım.

Destek ve yardımlarından dolayı değerli arkadaşım Arş. Gör. Burcu YÜCEL' e, bu zorlu süreci birlikte paylaştığım değerli arkadaşım Sibel MOLLAMEHMETOĞLU' na, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Figen SEYMEN' e, bu günlerimi tebessümle hatırlamamı sağlayacak değerli arkadaşım Arş. Gör. Pelin KÜÇÜK' e, çalışmalarım ve tezin yazım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Adem YILDIRIM' a, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU' na, Arş. Gör. Orhan SEZGİN' e, diğer bölüm arkadaşlarıma ve bizden bilgi ve şefkatlerini esirgemeyen Biyolog Tülay KÖSEAHMET' e ve Kimyager Fatmagül YENİSEY' e çalışmam boyunca örneklerin toplanmasında imkanlarını ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı personeline en samimi teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere ulaşmam için sahip oldukları bütün imkanları seferber eden, hayatımdaki tüm olumsuzlukları sonsuz destekleri ile güzelliklere çeviren, sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmayı 2010.114.001.11 kodlu proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederim.

Arş. Gör. Ceren SÜMER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç kapak sayfası	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Beyin Tümörleri	5
4.1.1. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	5
4.1.2. WHO Derecelendirmesi	7
4.2. Glioblastoma Multiforme (GBM)	8
4.2.1. Epidemiyoloji	8
4.2.2. Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme	9
4.2.3. GBM' de Genetik Değişiklikler	10
4.2.3.1. Primer GBM' de Genetik Değişiklikler	11
4.2.3.2. Sekonder GBM' de Genetik Değişiklikler	13
4.2.4. 10q23/ <i>PTEN</i>	15
4.2.4.1. Yaş ve Prognoz ile İlişkisi	17
4.2.5. <i>IDH1</i>	18
4.2.5.1. <i>IDH1</i> Gen Mutasyonlarının Fonksiyonel Özellikleri	18
4.2.5.2. Mutasyon Sıklığı	20
4.2.5.3. Diğer Genetik Değişiklikler ile İlişkisi	21
4.2.5.4. Yaş ve Prognoz ile İlişkisi	22
4.3. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	22

4.3.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri	25
4.4. DNA Dizi Analizi	25
4.4.1. Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5. 1. Gereç	26
5.1.1. Çalışma Grubu	26
5.1.2. Kimyasallar	27
5.1.3. Kitler	27
5.1.4. Problar	28
5.1.5. Cihazlar	28
5.1.6. Sarf Malzemeleri	29
5.1.7. Solüsyonlar	29
5.1.7.1. DNA İzolasyon Solüsyonları	30
5.1.7.2. Agaroze Jel Elektroforezi Solüsyonları	32
5.1.7.3. Yükleme Tamponları	32
5.1.7.4. FISH Solüsyonları	32
5.2. Yöntem	33
5.2.1. QIAmp DNA FFPE Tissue Kit ile DNA İzolasyonu	34
5.2.2. Genomik DNA' nın Spektrofotometre İle Konsantrasyonunun Tespiti	36
5.2.3. <i>IDH1</i> Geni Mutasyon Taraması	36
5.2.3.1. <i>IDH1</i> Geninin PCR ile Amplifikasyonu	36
5.2.3.2. <i>IDH1</i> Geni Ekzonları PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforezi ile Yürütülmesi	37
5.2.3.3. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi	37
5.2.3.4. Döngü Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)	38
5.2.3.5. PCR Ürünlerinin Sephadex ile Temizlenmesi	39
5.2.3.6. DNA Dizi Analizi	39
5.2.4. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH)	40
5.2.4.1. Probların Seçilmesi	40
5.2.4.2. ZymoLight FISH-Tissue Implementation Kit ile FISH prosedürü	40
5.2.5. Biyoinformatik Analizler ve Verilerin Değerlendirilmesi	41
6. BULGULAR	43

6.1.Klinik Bulgular	44
6.1.1. Çalışma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri	44
6.2. <i>IDH1</i> Geninde Dizi Analizi ile Mutasyon Taraması	45
6.2.1. <i>IDH1</i> Geninin PCR ile Amplifikasyonu	45
6.2.2. DNA Dizi Analizi	45
6.3. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) Analizi	49
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
8. SONUÇLAR	61
9. KAYNAKLAR	63
10. ETİK KURUL ONAYI	71
11. ÖZGEÇMİŞ	73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması	6
Tablo 2. <i>IDH1</i> geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve PCR ürünü uzunlukları	36
Tablo 3. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları	44
Tablo 4. <i>IDH1</i> geni 4. ekzonu üzerinde görülen değişimler	46
Tablo 5. <i>IDH1</i> c.395G>A mutasyonunu taşıyan ve taşımayan olguların yaş ilişkileri	48
Tablo 6. . Normal beyin dokusundan elde edilen Cut off değerleri	49
Tablo 7. 10q23/ <i>PTEN</i> lokusunda görülen değişimler	50
Tablo 8. GBM tümör örneklerindeki 10q23/ <i>PTEN</i> lokus kaybı oranları ve sağ kalım süreleri ile ortalama yaşları	53
Tablo 9. Çalışmamızdaki <i>IDH1</i> mutasyonlarının literatür ile karşılaştırılması	57
Tablo 10. Çalışmamızdaki 10q23/ <i>PTEN</i> değişimlerinin literatür ile karşılaştırılması	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Primer ve sekonder GBM genetik yolağının şematik gösterimi	10
Şekil 2. PTEN yolağı	16
Şekil 3. Hücresel metabolizmada IDH1' in rolü	20
Şekil 4. <i>IDH1</i> geni hotspot bölgeleri	21
Şekil 5. FISH tekniğinde uygulanan basamaklar	24
Şekil 6. FISH tekniğinin şematik ifadesi	24
Şekil 7. <i>IDH1</i> c.395G>A mutasyonu taşıyan ve taşımayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım grafiği	48
Şekil 8. 10q23/ <i>PTEN</i> kaybı taşıyan taşıyan ve taşımayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım grafiği	53

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1. GBM' li olguların biyopsi kesitilerinden hematoksilen-eosin boyama ile hazırlanan histopatolojik görünümüleri	43
Resim 2. <i>IDH1</i> geni ekzonlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü	45
Resim 3. <i>IDH1</i> geninde tanımlanan c.395G>A mutasyonlu bir olguya ait kromatogram	47
Resim 4. Olgulara ait FISH görüntüleri	51
Resim 5. Olgulara ait FISH görüntüleri	52

KISALTMALAR SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ

ABI	Applied Biosystems
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
CEN	Sentromer
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
GBM	Glioblastoma Multiforme
HIF1-α	Hypoxia-inducible factor- α
IDH1	İzositrat Dehidrogenaz 1
ISH	<i>in situ</i> Hibridizasyon
LOH	Heterozigosite Kaybı
MDM2	The murine double minute 2
MMAC1	Mutated in Multiple Advanced Cancers
NADP	Nikotinamid adenin dinukleotid Fosfat
PDGF-A	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü A
PDGFR	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
PHD	Prolil Hidroksilaz
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PTEN	Fosfat ve Tensin Homolog
PTPRD	Reseptör Protein Tirozin Fosfataz Delta
Rb	Retinoblastoma
TEP1	TGF- β regulated and epithelial cell enriched phosphatase
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

ÖZET

Glioblastoma Multiforme Genetiğinin Araştırılması

Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından IV. derece (greyd) olarak sınıflandırılan Glioblastoma multiforme (GBM), glial kökenli, en sık ve malign tümörlerden biri olup tüm primer beyin tümörlerinin dörtte birini oluşturur. Görülme sıklığı 45-70 yaşları arasında ve hastaların sağ kalım süresi 12-15 aydır.

Çalışmamız, GBM olgularında sıklıkla rastlanan *IDH1* geninin 4. ekzon mutasyonlarının DNA dizi analizi ile taranması ve 10q23/*PTEN* lokus kayıplarının FISH analizi ile belirlenmesi ve olguların yaş/sağ kalım ilişkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda GBM tanısı almış 54 olguya ait parafine gömülü arşiv materyallerinden elde edilen DNA'lara dizi analizi yapıldı. Ayrıca *IDH1* geninde mutasyon taşıyan 5 olgu ve taşımayan 15 olgu olmak üzere toplam 20 GBM olgusu ve kontrol amacıyla 10 normal beyin dokusu FISH analizinde incelenmek üzere çalışmaya alındı.

Literatürde GBM'lerde *IDH1* mutasyonları genellikle p.R132H şeklinde olup mutasyon oranının %6-30 arasında olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda olguların primer ve sekonder ayrımları yapılmamış olup *IDH1* p.R132H mutasyon frekansı %9.3 olarak bulundu. *IDH1* p.R132H mutasyonu taşıyan olguların yaş ortalaması 46, mutasyon taşımayanların ortalaması ise; 56 olarak saptandı. *IDH1* p.R132H mutasyonu ile olguların yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Mutasyon taşıyanların ortalama sağ kalım süresi 12 ay iken taşımayanların sağ kalım süresi 8 ay olarak saptanmış olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Doğu Karadeniz bölgesinde daha önce GBM genetiği konusunda araştırmalar yapılmamış olduğundan bu araştırma bölgemize has ilk çalışma olması yönünden önemlidir. Çalışmamızın bu açıdan yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler:, DNA Dizi Analizi, FISH analizi, *IDH1* geni, p.R132H mutasyonu, 10q23/*PTEN* lokusu

SUMMARY

Genetic Analysis of Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma Multiforme (GBM) derived from glial cells is one of the most frequent and malignant brain tumors classified as grade IV by WHO (World Health Organization) accounts for one in four of all primary brain tumors. Incidence is between 45 and 70 years and overall survival time of patients is 12-15 months.

In our study, screening of exon 4 of *IDH1* gene by sequencing which is frequently encountered in GBMs, detection of deletion of 10q23/*PTEN* locus by FISH analysis and evaluation of the correlation between age of patients and survival were aimed. For this purpose, DNAs obtained from paraffin embedded archival materials belong to 54 cases diagnosed as GBM in of Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology were sequenced. Additionally overall 20 cases; (5 of them which harbored a *IDH1* mutation) and 10 non-neoplastic brain tissues that were used as controls included in FISH analysis study.

The most detected *IDH1* mutation is p.R132H in GBMs which frequency reported as 6-30% in GBMs in the literature. In this study, the classification of the GBM cases was not done and the *IDH1* p.R132H mutation frequency was detected as 9.3%. The average age of the cases harboring the p.R132H mutation was calculated 46 while the average age of patients without this mutation was 56. There is not statistical significance between average age of the cases and *IDH1* p.R132H mutation. The survival rate of the patients with this mutation was calculated 12 months while it was 8 months for the patients with no mutation; however, this finding was not statistically significant.

As there is not any conducted study on genetic of the GBM in the Black Sea Region, this study is important and it is very unique to our region. It is believed that this study will shed light on this issue for future studies.

Key Words: DNA sequencing, FISH analysis, gene *IDH1*, p.R132H mutation, 10q23/*PTEN* locus

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Primer beyin tümörleri tüm kanserlerin yaklaşık %1.4' ünü ve kanserle ilişkili ölümlerin ise %2.3' ünü oluşturmaktadır. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi 2004-2006 verilerine göre beyin ve sinir sistemi tümörlerinin erkeklerde görülen kanserler arasında 8. sırada, kadınlarda ise 10. sırada yer aldığı bildirilmiştir (1, 2).

En yaygın primer beyin tümörleri olan gliomalar, santral sinir sisteminde bulunan glia adı verilen destek hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Glioblastoma multiforme (GBM), dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından IV. derece (greys) olarak sınıflandırılmış olup en malign glioma tipidir ve yetişkinlerdeki tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %25' ini, tüm gliomaların ise %50' sinden fazlasını oluşturmaktadır (3-5). GBM' ler klinik ve genetik açıdan glial hücrelerden *de novo* olarak gelişen primer glioblastom ve düşük derece astrositom (II. derece) ya da anaplastik astrositomların (III. derece) yavaş progresyonla daha malign hale geçmesiyle gelişen sekonder glioblastom olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır (6, 7).

GBM' nin genetik etiyoloji çalışmalarında tümörle ilişkili olarak pek çok gen ve LOH (Heterozigosite kaybı) tanımlanmıştır. Primer GBM' li hastalarda, sıklıkla LOH 10q, *EGFR* (epidermal growth factor receptor) amplifikasyonu/overekspresyonu, MDM2 (The murine double minute 2) overekspresyonu, homozigot *p16INK4a* delesyonu gibi genetik değişiklikler gözlenirken, sekonder glioblastomlu hastalarda, en erken dönemde ve sıklıkla *TP53* gen (tümör baskılayıcı protein 53) mutasyonları, Rb (retinoblastoma) mutasyonları, *PDGFR* (platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü) amplifikasyonu/ overekspresyonu ve *IDH1* (izositrat dehidrogenaz) gen mutasyonları görülmektedir (2, 6-9). *IDH1* R132 mutasyonlarının dokuya spesifik olduğu ve yüksek derece gliomların gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak *IDH1* mutasyonlarının biyolojik fonksiyonu hala tam olarak aydınlatılamamıştır (10-12). Yapılan çalışmalarda, *IDH1* mutasyonlarının sekonder GBM' nin moleküler işaretçisi olduğu gösterilmektedir. Bununla birlikte klinik olarak primer GBM tanılı *IDH1* mutasyonu taşıyan vakaların (%3-10); genç yaşta olmaları, sağ kalım sürelerinin uzun olması, bununla birlikte *TP53* mutasyonunun varlığı ile sekonder GBM' lere benzer klinik ve genetik profil göstermektedirler. Bir gendeki mutasyonun sıklığı ve tipi

hastalığıdaki rolünü belirleme bakımından bilgi sağlamaktadır. Dolayısıyla *IDH1* mutasyonlarının tespiti bu moleküler markırı rutin tanı, prognoz, terapötik stratejiler ve glioma tümörigenezindeki rolü açısından kullanışlı yapabileceğini düşündürmektedir (10, 11, 13, 14).

GBM' lerde sıklıkla gözlenen bir başka değişim ise 10. kromozomun uzun kolunun (10q) kaybıdır. Kromozomun 10q23 lokusunda, apoptoz, hücre proliferasyonu, DNA hasarına cevap gibi pek çok hücre fonksiyonunda görev alan ve bir tümör süpresör gen olan *PTEN* (fosfat ve tensin homolog gen) bulunmaktadır. 10. kromozomun uzun kolundaki anomaliler GBM dışında meme, prostat, endometrium, akciğer, tiroid karsinomları ve malign melanomlarda da gösterilmiştir. GBM' lerde sıklıkla görülmesi 10q delesyonlarını, en yaygın moleküler markırlardan biri haline getirmektedir (15, 16).

Tümör genetiği çalışmalarında, arşiv materyallerinin kullanımı, çok sayıda hasta materyaline kısa sürede ulaşmayı sağlaması yönünden tercih edilmektedir. Parafine gömülü arşiv dokularından izole edilen DNA' nın çeşitli faktörlere bağlı olarak (fiksasyon süresi, türü ve dokunun tipi gibi) düşük kalitede olması, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) amplifikasyonunu olumsuz etkilemekle birlikte yapılan optimizasyonlarla PCR' ın kalitesi artırılabilen ve DNA dizi analizi ile mutasyon tespitine imkan sağlayabilmektedir. Ayrıca solid tümörlerde parafine gömülü arşiv materyallerinden elde edilen tek hücre süspansiyonlarında Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi ile interfaz nükleuslarının incelenebiliyor olması da bu yöntemi kullanışlı tekniklerden biri haline getirmiştir.

Bu çalışmada; GBM hasta popülasyonunda *IDH1* geninin 4. ekzonundaki mutasyon sıklığının DNA dizi analizi yöntemiyle belirlenmesi, 10q23/*PTEN* lokus kaybının ise FISH yöntemiyle tespit edilmesi ve bu değişimlerin olgu yaşları ve ortalama sağ kalım süreleri ile ilişkilendirilerek, GBM' nin genetik etiolojisinin aydınlatılması sürecine katkı sağlaması ve sonraki çalışmalara ışık tutması amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beyin Tümörleri

Primer beyin tümörleri tüm hastalıklar içinde en dramatik türlerden birini oluşturmaktadır. Çocukluk çağıının en sık rastlanan ikinci malignitesi olup erişkinlerde en sık görülen 6. malignite olarak karşımıza çıkmaktadır (17).

Amerika Beyin Tümörü Kayıt Merkezi' nin (Central Brain Tumor Registry of The United States-CBTRUS) yayınladığı rapora göre primer beyin tümörü (benign ve malign) insidansı yüzbinde 11.4 ve 23.5 arasında değişmektedir. ABD' de yılda 13 000' e yakın insan primer beyin tümöründen ölmekte ve bu malign beyin tümörlerini ABD' de kanserle ilişkili ölümlerde ilk 10' un içinde yapmaktadır (18).

Türkiye Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü' nün 2004-2006 verilerine göre toplamda 901 erkek ve 714 kadın olguda beyin ve sinir sistemi tümörü rapor edilmiş olup, bu tümörlerin erkeklerde görülen kanserler arasında 8. sırada ve kadınlarda görülen kanserler arasında ise 10. sırada yer aldığı bildirilmiştir (1).

Beyin tümörlerinin genel insidansı yıllar içinde bir artış göstermekle birlikte, bunun sebebi olarak tümör oluşumuna neden olabilecek çevresel faktörlerin yanında Manyetik rezonans (MRI), bilgisayarlı tomografi gibi tanıyı kolaylaştırıcı görüntüleme tekniklerinin yaygınlaşması görülmektedir (19, 20).

4.1.1. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Beyin tümörleri ilk olarak 1829' da Cruveilhier tarafından makroskobik olarak tanımlanmış, 1836' da Bressler tarafından makroskobik olarak sınıflandırılmışlardır. Beyin tümörlerinin bugünkü sınıflandırılmasının temelini 1860' da, beynin hücrelerarası matriksi olarak nörogliaı tanımlayan ve ilk kez “glioma” tarifini yapan Virchow atmıştır. Bailey ve Cushing 1926 yılında gliomaların bir sınıflamasını yapmış, ardından 1949' da Kernohan (5 glial tümör kategorisi içeren), 1950' de Ringertz (3 derece' li bir sistem) ve 1980' lerde Dumas ve Duport şimdi St Anne-Mayo diye anılan hücre morfolojisi özelliklerine dayanan 4 basamaklı bir derece sistemini ileri sürmüştür. 1993' de Dünya sağlık örgütü (WHO), tümörlerin histopatolojik özellikler kadar yaşam süresi

verilerine de dayanan bir sınıflandırmasını yayınlamış ve tümörler I-IV arasında değişen derecelendirme ile benign' den malign' e doğru sınıflandırılmıştır (5, 17, 21-23)

WHO tarafından yeniden gözden geçirilerek 2007 yılında histolojik kriterlere dayanılarak yapılan sınıflandırmada, sinir sistemi tümörleri 7 ana gruba ayrılmıştır (Tablo 1) (5).

En yaygın primer beyin tümörleri beyin destek hücreleri olan glialardan (astrosit, oligodendrosit ve ependimal hücreler) köken almaktadır. Tüm merkezi sinir sistemi neoplazmalarının %40' ından fazlasını oluşturan "glioma" olarak bilinen bu tümörler astrositlerden köken aldığı anda astrositoma, oligodendrositlerden köken aldığı anda oligodendroglioma ve ependimal hücrelerden köken aldığı anda ependimoma olarak adlandırılmaktadır (2, 24).

Tablo 1. WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması (Louis' den, 5)

1. Nöroepitelial doku tümörleri

Astrositik Tümörler

Pilositik astrositom
Pilomiksoid astrositom
Subependimal dev hücreli astrositom
Pleomorfik ksantoastrositom
Diffüz astrositom
 Fibriler astrositom
 Gemistositik astrositom
 Protoplasmik astrositom
Anaplastik astrositom
Glioblastoma
 Dev hücreli glioblastom
 Gliosarkom
 Gliomatosis serebri

Oligodendrogliyal tümörler

Oligodendroglioma
Anaplastik oligodendrogliom

Oligoastrositik tümörler

Oligoastrositom
Anaplastik oligoastrositom

Ependimal tümörler

Subependimoma
Miksopapiller ependimom
Ependimoma
 Sellüler
 Papiller
 Clear cell
 Tanisitik
Anaplastik ependimom

Ganglioglioma

Anaplastik gangliogliom
Santral nörositom
Ekstraventriküler nörositom
Serebellar liponörositom
Papiller glionöronal tümör
Paragangliom
4. ventrikülün glionöral tümörü

Pineal bölge tümörleri

Pineositoma
Pineoblastoma
İntermediyer farklılık gösteren pineal tm
Pineal bölge papiller tümörü

Embriyonal tümörler

Medulloblastom
Primitif nöroektodermal tümör
Atipik teratoid/rabdoid tümör

2. Kranial ve paraspinal sinir tümörleri

Scwannom
Nörofibrom
Perinörom
Malign periferik sinir kılıfı tümörleri

3. Meninkslerin tümörleri

Meningoepitelial hücre tümörleri
Mezenkimal tümörler
Primer melanositik lezyonlar
Histogenezi bilinmeyen tümörler

4. Lenfoma ve hematopoetik tümörler

5. Germ hücreli tümörler

Tablo 1' in devamı

Koroid pleksus tümörleri	Germinom
Koroid pleksus papillomu	Embriyonal karsinom
Atipik koroid pleksus papillomu	Yolk sak tümörü
Koroid pleksus karsinomu	Koryokarsinom
Diğer nöroepitelial tümörler	Teratom
Astroblastom	Mikst germ hücre tümörleri
3.ventrikülün kordoid glioması	6. Sellar bölge tümörleri
Angiosentrik glioma	Kraniofarengiom
Nörönal ve miks nörönal-gliyal tümörler	Granüler hücreli tümör
Serebellum displastik gangliositoması	Pituisitoma
Desmoplastik infantil astrositom	Adenohipofiz onkositoması
Gangliositom	7. Metastatik tümörler

4.1.2. WHO Derecelendirmesi

Dünya Sağlık Örgütü' nün tümör sınıflandırmasında yapılan derecelendirme, hücresel atipi, tümörün hücresel ve mitotik özellikleri, endotelial proliferasyon ve nekroz gibi çok çeşitli histopatolojik özelliğe sahip tümörlerin malignansi ölçütü olarak değerlendirilmektedir. I. ve II. derece tümörler düşük dereceli, III. ve IV. derece tümörler yüksek dereceli tümör olarak adlandırılmaktadır (5).

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

II. derece neoplaziler, uzun sağ kalım süresi gösteren, düşük proliferatif aktivitesine rağmen sıklıkla tekrarlayan tümörlerdir. Bazıları daha malign derecelere dönüşme eğilimindedirler. Örneğin düşük dereceli difüz astrositom, daha yüksek derece olan anaplastik astrositoma ve GBM' ye dönüşebilmektedir.

III. derece, genellikle histolojik olarak malignansi bulguları gösteren lezyonlar için kullanılmaktadır (nükleer atipi, mitotik aktivite, hücre proliferasyonu) ve 3 yıldan daha az sağ kalım süresi vardır. Çoğunlukla III. derece tümörlü hastalar adjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi almaktadırlar.

IV. derece, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz gibi sitolojik olarak malign özellikler sergileyen neoplaziler olup radyoterapi ve kemoterapiye direnç geliştiren ve ölümcül seyir gösteren tümörler olarak belirlenmektedir. Örnek olarak GBM, çoğu embriyonal neoplaziler ve pek çok sarkoma verilebilir (5, 25).

4.2. Glioblastoma Multiforme (GBM)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre IV. derece olarak sınıflandırılmış olan Glioblastomalar, fibrilar ve gemistositik asrosit hücreleri, fusiform hücreler, küçük anaplastik hücreler ve pleomorfik multinükleer dev hücreler gibi çeşitli morfoloji gösteren hücrelerden oluşabilmektedir. Bu çeşitli histolojik görünüm aynı tümörde birlikte bulunabilmektedir. GBM' deki 'multiform' terimi tümörün bu histopatolojik çeşitliliğini ifade etmektedir. Nükleer atipi, vasküler endotelial proliferasyon, yüksek mitotik aktivite ve nekroz önemli özelliklerindendir. Doku örneklerinde, tümör merkezinde büyük nekrotik alanlar, periferde ise canlı tümör kümeleri görülmektedir. Nekroz çevresinde tümör hücrelerinin sıra sıra dizilmesiyle oluşan palizatlanma GBM' nin ayırıcı özelliklerindendir (5, 25-27).

GBM 1863 yılında Virchow tarafından glial kökenli tümör olarak belirlenmiştir. 1914 yılında Mallory tarafından spongioblastoma multiforme olarak kullanılan bu terim 1926 yılında Bailey ve Cushing tarafından GBM olarak değiştirilmiştir. Daha ayrıntılı tanım Zülch, Russell ve Rubinstein tarafından verilmiştir. Günümüzde glioblastom terimi, GBM' nin eş anlamı olarak kullanılmaktadır (28, 29).

4.2.1. Epidemiyoloji

GBM yetişkinlerde görülen beyin tümörlerinin en sık ve en ölümcül tipidir. GBM hızlı ilerleme (progresyon) göstermesi, normal dokuya infiltre olması, radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençli olması nedeniyle en kötü prognozlu kanserlerden biridir (3). Cerrahi girişimler, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemlerine rağmen ortalama sağkalım süresi 12-15 ay olmakla birlikte, rekürens vakalarda 3-5 aydır. Nadiren bazı hastalarda yaşam süresi uzun olabilmektedir (>5 yıl) (3, 25).

Avrupa ve Kuzey Amerika' daki insidansı, 100 000 kişide 2-5 olgudur. GBM yetişkinlerdeki primer beyin tümörlerinin yaklaşık %25' ini, tüm malign gliomaların %50' sinden fazlasını ve astrositik tümörlerin %50-60' ını oluşturmaktadır (3, 4, 28, 30).

Olgular her yaşta görülebilmekle birlikte yetişkinlerde sıklıkla görülür. Görülme sıklığı (insidans) 45-70 yaş arasındadır. Merkezi sinir sistemi tümörlü çocukların

yalnızca %8.8' i GBM' dir. Konjenital vakalar son derece nadirdir. Erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazla görülmekle birlikte erkek kadın oranı: 1.5:1 dir (28).

GBM genellikle sporadik olarak ortaya çıkmakla birlikte çok nadir olarak ailesel GBM vakaları bildirilmiştir (31). Ailesel geçiş gösteren hastalıkların (Nörofibromatozis, Tuberoz skleroz, Turkot sendromu, Li-Fraumeni sendromu) GBM ile birliktelik gösterdiği belirtilmiştir (11). Glioblastoma ve iyonize radyasyona maruziyet arasında kanıtlanmış bir ilişki varken, sigara, beslenme, elektromanyetik dalgalar ve cep telefonları arasında bir ilişki gösterilmemiştir (32).

4.2.2. Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme

Glioblastomalar, klinik ve genetik özelliklerine göre primer ve sekonder olmak üzere, farklı yaş grubu hastalarında gelişen ve farklı genetik değişimleri içeren iki alt gruba ayrılmaktadır (Şekil 1) (33, 34).

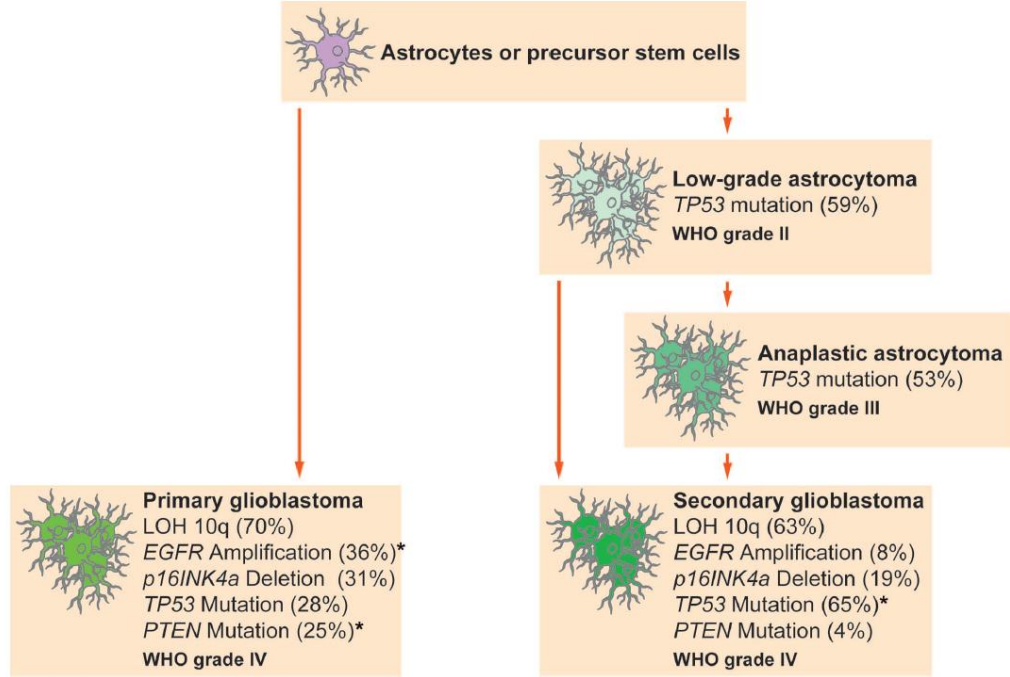
Primer ve sekonder glioblastoma ayrımı ilk kez 1940 yılında Alman nöropatolog Hans-Joachim Scherer tarafından yapılmıştır. Scherer, "Biyolojik ve klinik açıdan, astrositomlardan gelişen sekonder glioblastomları, primer glioblastomdan ayırt etmek gerekir. Bunlar muhtemelen uzun klinik süre ile uyumlu glioblastomlardır" ifadesi ile glioblastomları iki alt gruba ayıran ilk kişidir (7).

Primer ve sekonder GBM, morfolojik olarak ayırt edilemez, her ikisi de hasta yaşı dikkate alınmadığında kötü prognoza sahiptir ve moleküler düzeyde her iki tipte de farklı genetik anomaliler görülmektedir (27).

GBM vakalarının büyük çoğunluğunu (>90) oluşturan primer glioblastomlar, daha az malign olan prekürsör bir lezyonun klinik, histolojik ya da radyolojik kanıtı olmaksızın ilk biyopside glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Genellikle daha yaşlı hastalarda (ortalama 55-60 yaş) gözlenen primer glioblastomlar hızlı ve *de novo* gelişmekte ve 3 aydan daha kısa sürede kendini göstermektedir ve ortalama sağ kalım süresi 4.7 aydır (6, 8, 35).

GBM vakalarının %5' ini oluşturan sekonder glioblastomlar ise düşük dereceli difüz astrositom (II. derece) ya da anaplastic astrositomdan (III. derece) yavaş progresyonla gelişmektedir. Anaplastik astrositomların GBM' ye dönüşmesi için geçen

ortalama süre yaklaşık iki yıl olmakla birlikte daha düşük derece astrositomların GBM'ye gelişmesi yaklaşık 5 yıldır. Sekonder GBM 45 yaşından daha genç olgularda görülmektedir ve olguların sağ kalım süresi 7.8 aydır. Sekonder glioblastoma tanısı için klinik veya histolojik bulgu gerekmektedir (6, 8, 35).



Şekil 1. Primer ve sekonder GBM genetik yolağının şematik gösterimi (Ohgaki' den, 6)

4.2.3. GBM' de Genetik Değişiklikler

Bugüne kadar GBM' ler ile ilişkili pek çok gen ve LOH tanımlanmıştır. Heterozigosite kaybı (LOH); Tümör süpresör genler tek allelinde meydana gelen mutasyonlardan etkilenmedikleri için heterozigot durumda iken normal fonksiyonlarını yerine getirmektedirler. Fakat normal allelin delesyonu, normal alleli içeren kromozom kolunun delesyonu veya normal alleli içeren tüm kromozomun kaybı (monozomisi) ile beraber; normal allelin delesyonunu takiben mutant allelin duplikasyonu ya da somatik rekombinasyon gibi çeşitli mekanizmalarla normal olan allel de kaybedildiğinde bu olay heterozigosite kaybı (LOH) olarak sonuçlanmaktadır (36).

GBM' nin gelişimiyle ilişkili onkogen (*EGFR*, *PDGF* ve reseptörleri) ve tümör süpresör genler ($p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$, *PTEN*, *RB1* ve *TP53*) tanımlanmıştır (6)

4.2.3.1. Primer GBM' de Genetik Değişiklikler

Primer GBM' de kromozom LOH 10q, *EGFR* amplifikasyonu, *p16^{INK4a}* delesyonu ve *PTEN* ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (*CDKN2A*) genlerindeki mutasyonlar, MDM2 proteininin aşırı ekspresyonu en sık saptanan genetik değişikliklerdir.

LOH 10q, primer ve sekonder GBM olgularında benzer sıklıkta (%60-80) gözlenirken, LOH 10p primer GBM' lerde görülmektedir. LOH çalışmaları sonucu en yaygın üç lokus kaybının 10p14-15, 10q23-24 ve 10q25-qter önemli olduğu gösterilmiştir. Kromozom 10q23' de lokalize tümör süpresör olan *PTEN* genindeki mutasyonlar, primer GBM olgularının %15-40' ında görülmektedir (6-8, 37).

10. kromozomun tamamının kaybı (monozomisi) primer ve sekonder GBM' lerde benzer sıklıkta görülmektedir (38).

10. kromozomun uzun kolunda; 10q24' de *LGI1*, 10q24-26' da *BUB3*, 10q25.1' de *MXI1*, *h-neu*, *abLIM*, *LIMAB1* ve 10q26.1' de *DMBT1* gibi pek çok tümör süpresör gen bulunmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar GBM' lerde çok nadir olduğu için GBM gelişimindeki rolleri henüz aydınlatılamamıştır (6).

MDM2 proteininin overekspresyonu primer GBM' lerin % 50' sinden fazlasında görülürken, *MDM2* amplifikasyonu primer GBM' lerin yaklaşık %10' unda görülmektedir. *TP53* mutasyonları ise primer GBM' lerde düşük sıklıkta görülmektedir (<% 30) (2, 6, 8).

EGFR, epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi ligandları bağlayan, hücre göçü, proliferasyonu ve farklılaşmanın kontrolünde rol oynayan bir transmembran reseptörüdür. *EGFR* yolağı, primer GBM gelişiminde anahtar bir sinyal ileti yolağıdır ve gliomagenезде önemli role sahip olduğu bilinmektedir (3, 6, 35). *EGFR* gen amplifikasyonu primer GBM' lerde yaklaşık % 40 oranında gözlenirken sekonder GBM' lerde nadirdir. *EGFR* amplifikasyonu taşıyan tüm primer GBM' ler aynı zamanda *EGFR* overekspresyonu da gösterirken, *EGFR* overekspresyonu taşıyan olguların yalnızca %70-90' ı genin amplifikasyonuna da sahiptir. *EGFR* amplifikasyonu genin yapısal değişikliğiyle ilişkilidir; *EGFR*' nin ekstrasellüler ligand bağlama domainini etkileyen ekzon 2-7' deki delesyon sonucu mutant bir reseptör olan *EGFR* varyant 3 (*EGFRvIII*)

oluşmaktadır. Oluşan bu mutant EGFRvIII reseptörü proliferasyonu artırıp apoptozisi azaltarak, tümörjeniteyi hızlandırmaktadır (3, 7).

EGFR ve PDGFR gibi tirozin kinaz reseptörlerinin hücre dışı domainlerinin büyüme faktörleriyle etkileşimi sonucu aktive olan fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağı, çoğalmayı, farklılaşmayı, göçü ve glukoz homeostazını kontrol etmektedir. PI3K tarafından fosfatidilinositol-4,5-bifosfat' ın (PIP2), fosforillenmesiyle oluşan fosfatidilinositol-3-fosfat (PIP3) yolaktaki AKT (protein kinaz B) ve mTOR (the mammalian target of rapamycin) gibi efektör molekülleri aktive ederek, apoptozun baskılanması, artmış hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. *PIK3CA* mutasyonları ve amplifikasyonları hem primer (% 5) hem de sekonder (% 13) GBM' lerde nadirdir. TCGA (The cancer genome atlas) pilot projesinde *PIK3R1* mutasyonları %10 sıklıkta gösterilmiştir (7, 39, 40).

p16^{INK4a}/CDK4/RB1 yolağı primer ve sekonder GBM' nin her ikisinde de önemlidir (6). RB1 proteini hücre döngüsünde G1/S geçişini kontrol ederken, *p16^{INK4a}* G1/S geçişini inhibe etmektedir (7). *p16^{INK4a}* daki değişim homozigot delesyon ve promotor metilasyonu şeklinde olmaktadır (35). *p16^{INK4a}* nın homozigot delesyonu primer GBM' de (% 31) sekonder GBM' ye göre (%19) daha sıklıkla görülmektedir (8). Ancak promotor metilasyonu sekonder GBM' de (% 43) primer GBM' den (% 14) anlamlı olarak daha yüksek sıklıkta bulunmuştur (2). TCGA (The cancer genome atlas) pilot projesinde (olguların büyük çoğunluğu primer GBM) RB1 sinyal yolağındaki genetik değişimlerin sıklığının % 78 olduğu, bunların; *p16^{INK4a}* homozigot delesyonu veya mutasyonu (%52), *p15^{INK4b}* homozigot delesyonu (%47), *p18^{INK4c}* homozigot delesyonu (%2), *CDK4* amplifikasyonu (%18), siklin D₂ (CCND2) amplifikasyonu (%2), *CDK6* amplifikasyonu (%1), *RB1* mutasyonu veya homozigot delesyonu (%11) olduğu gösterilmiştir (39).

p16 proteinini kodlayan *CDKN2A* gen delesyonları primer GBM' lerde (%36) sekonder GBM'lerden (%4) daha yüksek sıklıkta görülmüştür (9).

4.2.3.2. Sekonder GBM' de Genetik Değişiklikler

Sekonder GBM' lerde; *TP53* geninde mutasyonlar, *PDGFR-α*, siklin bağımlı kinaz 4/6 (*CDK*) ve *MDM2* gen amplifikasyonları, *p16^{INK4A}*, *RB1*, *P14^{ARF}* genlerinde promotor metilasyonları saptanmış genetik değişikliklerdendir (2, 6, 9, 35).

TP53 yolağı (*TP53/MDM2/p14^{ARF}*) sekonder GBM' lerin gelişiminde kritik rol oynamakta ve *TP53* mutasyonları yüksek sıklıkta (>%65) görülmektedir (8). *TP53* tümör süpresör geni 17p13.1' de lokalize, hücre döngüsünün G₁/S geçişinde, apoptoz, hücre farklılaşması, neovaskülarizasyon ve DNA tamir mekanizmasında anahtar regülatör olan 53 kd' luk proteini (*TP53*) kodlamaktadır. *TP53* mutasyonları, *MDM2* amplifikasyonları veya *P14^{ARF}* ekspresyonunun kaybı, *TP53* yolağının inaktivasyonuna sebep olmaktadır (2, 6, 35). *MDM2* proteini overekspresyonu sekonder GBM' lerin %10' undan azında gösterilmiştir. *P14^{ARF}* ekspresyon kaybı GBM' lerin büyük çoğunluğunda (%76) gösterilmiş olup bu, *P14^{ARF}* geninin homozigot delesyonu veya promotor metilasyonu ile korelasyon göstermektedir (2, 8). *TP53* proteini birikimi, mutasyonlarından daha sık görülmekle birlikte sekonder GBM' de (>%90) primer GBM' ye (<%35) göre daha fazla bulunmaktadır (2). Sekonder GBM' lerde *TP53* nokta mutasyonlarının %57' si iki hotspot kodonda (248 ve 273) lokalize iken, primer GBM' lerde mutasyonlar tüm ekzonlara eşit oranda dağılmış, yalnızca %17' si bu hotspot kodonlarda bulunmuştur. CpG adacıklarındaki G:C→A:T mutasyonları sekonder GBM' lerde (%56) primer GBM' lere nazaran (%30) daha sıklıktadır (6, 8).

Kromozom 7p22' de lokalize, A ve B zincirlerinin kombinasyonundan oluşan bir dimer olan PDGF (Platelet kökenli büyüme faktörü) bağ dokusu hücreleri ve glialar için majör mitojendir. Bu ligand *PDGFR-α* ve *PDGFR-β* olmak üzere tirozin kinaz reseptör ailesinden iki hücre yüzey reseptörü tarafından tanınmaktadır. *PDGFR-α* gen amplifikasyonu GBM' lerin bir kısmında (%16) gösterilmiştir. Hem düşük hem yüksek derece astrositomlarda görülen *PDGFR-α* overekspresyonu, düşük dereceli astrositomların daha malign formlara geçişinde erken olaylardan biri olarak kabul edilmekte ve *PDGFR-α*' nın sekonder GBM' lerin gelişiminde rol aldığını desteklemektedir (9).

Primer ve sekonder GBM ayrımı yapılmamış GBM' lerde görülen bir başka gen mutasyonu *NF1* (neurofibromatosis-1)' dedir. Mutasyon sıklığı yaklaşık %15 olup,

nonsense (anlamsız), splice, missense (yanlış anlamlı), frameshift (çerçeve kayması) mutasyonlarını, insersiyon (parça eklenmesi) ve delesyonlarını içerir (41).

LOH 1p hem primer (%12) hem sekonder GBM' lerde (%15) nadirdir (7). LOH 1p son yapılan haritalama çalışmasında 1p36.3 ve 1p34-35 bölgelerine daraltılmış ancak bu lokusta henüz tümör süpresör gen bulunamamıştır (2).

GBM' lerde sıklıkla delesyonlu bulununan bölge 9p23-24.1, tümör süpresör fonksiyonu olan *PTPRD* (reseptör protein tirozin fosfataz delta) genini kodlar. GBM' lerin az bir kısmında (%6) *PTPRD* geni mutasyonu, %37' sinde promotor metilasyonu görülmüştür (7).

RB1 lokusunu içeren LOH 13q primer ve sekonder ayrımı yapılmamış GBM' lerde %25-45, primer GBM' lerde %12 ve sekonder GBM' lerde %38 oranında görülmüştür. *RB1* geninin promotor metilasyonu sekonder GBM' lerde (%40) primer GBM' lere (%15) göre daha sıklıkta görülmüştür (2).

LOH 19q sekonder GBM' lerde (%54) primer GBM' lere göre (%6) daha sık görülmektedir. En yaygın delesyon 19q13.3' dendir (34). Anaplastik astrositomaların %40' ında, primer ve sekonder ayrımı yapılmamış GBM' lerin yaklaşık %20' sinde görülmüştür. Bu sonuçlar 19q' da lokalize tümör süpresör genlerin düşük dereceli astrositomların sekonder GBM' ye dönüşümüyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (2). 1p/19q birlikte delesyonu primer ve sekonder ayrımı yapılmamış GBM' lerin %20' sinde saptanmıştır (42).

LOH 22q sekonder GBM' lerde (%82) primer GBM' lere (%41) göre daha sıklıktadır (6). 23 sekonder GBM' nin 22' sinde 957 kb' lık bir delesyon saptanmış olup bu bölgede TIMP-3 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-3) lokalizedir. Primer GBM' de 22q delesyonu, 22q12.3-13.2 ve 22q1.31 olmak üzere iki delesyonlu bölge ile karakterizedir (35).

Hem primer hem sekonder GBM' lerin büyük çoğunluğunda (%70-85) trizomi 7 veya monozomi 10, her iki alt tipin yaklaşık %70' inde ise her iki değişim aynı anda görülmüştür. Y kromozomunun kaybı primer GBM' de %71, sekonder GBM'de %63, X kromozomunun monozomisi primer GBM' de %66, sekonder GBM' de %55 oranında

görülmüştür (38). 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q ve Y kromozomunda da kayıplar görülmüştür (43).

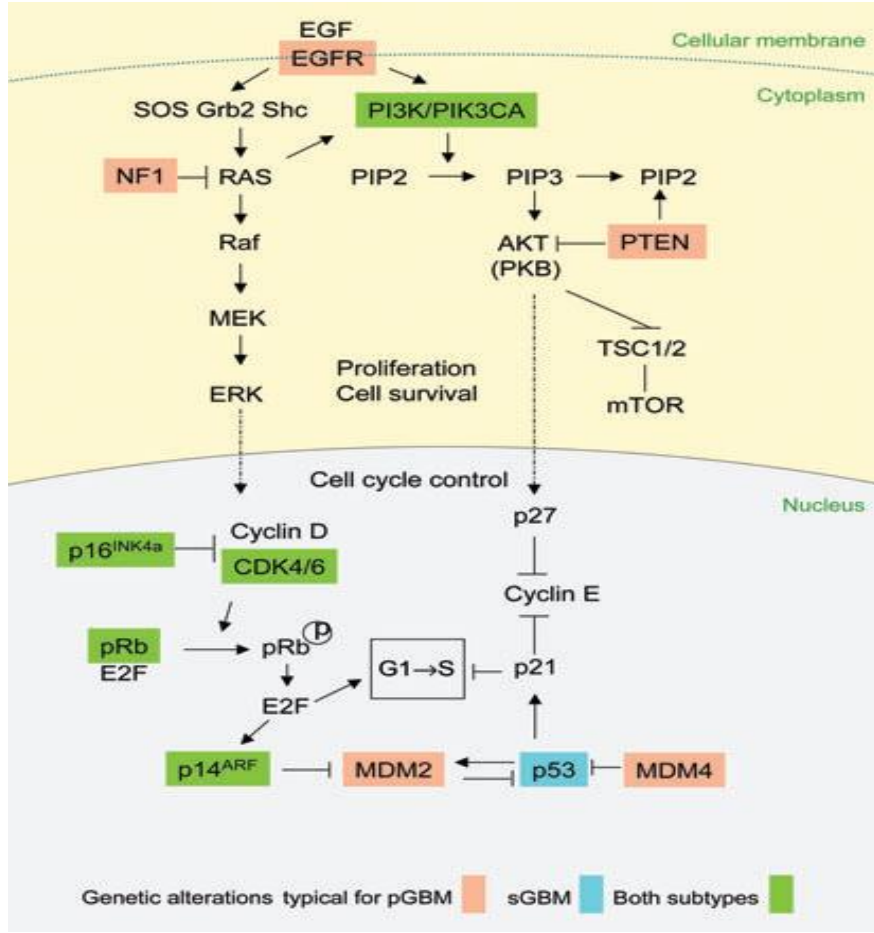
Primer ve sekonder ayrımı yapılmamış GBM' lerde yapılan sitogenetik çalışmada; der(18)t(2;4;12;18), der(X)t(X;10)(q27.1;p12.1), der(10)t(10;15)(p11.23;q11.2) ve der(1)t(1p31.3→1q44::7q11.3→7qter) translokasyonları gösterilmiştir (44).

2008 yılında Parsons ve arkadaşları tarafından yapılan yeni nesil sekanslama çalışmasında, GBM' lerde ilk kez metabolik yolda önemli bir enzimi kodlayan *IDH1* geninde mutasyonlar tanımlanmıştır (41). Bundan sonra yapılan pek çok çalışmada *IDH1* geninin özellikle sekonder glioblastomaların gelişiminde önemli bir markır olduğu gösterilmiştir (10, 11, 13).

4.2.4. 10q23/PTEN

10. kromozomun 10q23.3 bölgesinde lokalize olan *PTEN* (fosfat ve tensin homolog gen) geni 9 ekzonlu olup, 403 amino asitlik, 47 kD, hem lipid hemde protein fosfataz aktivitesine sahip bir dual fosfatazı kodlamaktadır. 1997' de tanımlanan ve *MMAC1* (mutated in multiple advanced cancers) veya *TEP1* (TGF- β regulated and epithelial cell enriched phosphatase) olarak da bilinen *PTEN* geninin 1-6 ekzonları proteinin önemli fosfataz domainini içeren ilk 185 amino asitlik N-terminali kodlamaktadır. Kalan aminositlerden oluşan (186-403) C-terminal domaini, fosfolipidleri bağlayan, protein stabilitesinden sorumlu ve fosfataz domaini ile etkileşim kuran altbirimlerden oluşmaktadır (15, 35).

PTEN, hücre yaşlanması, apoptoz, hücre döngüsünün devamı, hücre proliferasyonu, hücre göçü, DNA hasarına cevap gibi pek çok hücre fonksiyonunda rol oynamaktadır. PI3K sinyal yolağını negatif olarak kontrol eden PTEN, tümör süpresör olma özelliğini aldığı lipid fosfataz aktivitesi ile PIP3' ü defosforilleyerek PIP2' ye dönüştürmekte ve PIP3 tarafından Akt aktivasyonunu engelleyerek hücre içi proliferatif sinyallerin iletimini ve hücre döngüsünün ilerlemesini önlemektedir (Şekil 2) (15, 16, 35).



Şekil 2. PTEN yolağı (Ohgaki' den, 6)

Hücre iskelet proteinlerinden tensin ve auxilin ile homoloji gösteren PTEN' in amino ucu, protein fosfataz aktivitesi ile hücreler arası etkileşimde görevli fokal adhezyon kinazları defosforile ederek hücre göçü ve invazyonun kontrolünde rol almaktadır. Fokal adhezyonda integrin aracılı hücre sinyalleşmesini inhibe ederek hücre ekstrasellüler matriks ilişkilerini bozmaktadır (6, 45).

PTEN, çevresel sinir sisteminde yüksek seviyelerde eksprese olmaktadır. Embriyonik ve fetal gelişim boyunca yüksek seviyelerde eksprese olurken yetişkinlerde düşük seviyelerde saptanmaktadır. PTEN çoğunlukla sitoplazmada lokalizedir (15).

10q23/*PTEN* homozigot lokus kaybı primer ve sekonder ayrımı yapılmamış GBM' lerin %30-42' sinde görülmüştür (16, 43). Hemizigot 10q23/*PTEN* lokus kaybı olguların %59' unda, 10. kromozomun monozomisi yaklaşık %30' unda gösterilmiştir (46, 47).

LOH 10q glioblastomaların gelişim yolağında görülen en sık değişimlerden olduğu (%60-80) çalışmalarla kanıtlanmış olup hastaların sağ kalım süresini azalttığı gösterilmiştir (6, 8, 48).

PTEN geninde görülen mutasyonlar, primer GBM' lerde %15-40 oranında görülürken (35), sekonder GBM' lerde (%4) nadirdir (8). GBM' lerde *PTEN* genindeki değişimler, insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonlarını kapsamaktadır. Yapılan bir çalışmada rapor edilen 150 mutasyonun 94' ü (%63) tek nokta mutasyonu olup, 61' i missense, 21' i nonsense 12' si splice mutasyonudur. Mutasyonların %37' si frameshift olup bunların çoğu 1-4 bp uzunluğundadır (49). Bir başka çalışmada vakaların %60' ında *PTEN* in her iki allelinde mutasyon görülmüş, mutasyonlar ekzon 4-9' da bulunmuş, ekzon 1-3' de mutasyona rastlanmamıştır. Mutasyonlara en sık fosfataz domainini kodlayan ekzon 5' de ve ekzon 8' de rastlanmıştır. Vakaların %74' ünde LOH gösterilmiş ve LOH olan vakaların %60' ında *PTEN* in ikinci kopyasında somatik mutasyon tespit edilmiştir (50).

10q23/*PTEN* değişimleri glioblastomalar dışında, diğer malign glial tümörlerde, endometriumda, meme, prostat, akciğer, ve kolon kanserinde de gösterilmiştir (16, 49).

4.2.4.1. Yaş ve Prognoz ile İlişkisi

10q23/*PTEN* lokus delesyonlarının (Homozigot, hemizigot veya monozomi) 40 yaşın üstündeki vakalarda daha sıklıkta görüldüğü tespit edilmiştir. GBM' lerde sağkalım süresi ile ilgili veriler karışık olmakla birlikte bir kısım çalışma 10q' daki allelik kayıpların sağkalım süresinin kısalığı ile ilişkili olduğunu gösterirken başka farklı çalışmalar, 10q23/*PTEN* değişimleri ve sağkalım arasında ilişki bulamamıştır. Ayrıca 10q' daki allelik kayıplar ile kötü prognoz ilişkilendirilmiştir (15, 43).

4.2.5. *IDH1*

4.2.5.1. *IDH1* Gen Mutasyonlarının Fonksiyonel Özellikleri

İnsan genomu üç farklı izositrat dehidrogenazı (*IDH1*, *IDH2* ve *IDH3*) kodlayan 5 *IDH* genine sahiptir; *IDH1*, *IDH2*, *IDH3A*, *IDH3B* ve *IDH3G* (51). İzositrat dehidrogenazlar (*IDH*), izositratın α -ketoglutarata (α -KG) dekarboksilasyonunu katalizlemekte ve $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ yi (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) NADPH ' a indirgemektedir. Bu süreç, NADH/NADPH ' ın elektron alıcı olarak kullanılıp izositratın oksalosüksinata oksidasyonunu ve bunu takiben oksalosüksinatın α -KG' a dekarboksilasyonunu içermektedir (52). İnsanlar ve diğer ökaryotlar hem NAD^+ -bağımlı hem de NADP^+ -bağımlı *IDH*' lara sahiptir. NAD^+ -bağımlı izositrat dehidrogenaz olan *IDH3*, iki aktif bölge içeren iki α ve regülatör altbirim olan bir β ve bir γ ' dan oluşan heterotetramerik bir enzimdir. *IDH3*, mitokondride lokalize olup trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde aerobik enerji üretiminde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (51-53).

IDH1 ve *IDH2*, NADP^+ -bağımlı izositratlar olup insanlarda %70 benzer homodimerlerdir. *IDH1*' i *IDH2*' den ayıran temel özellik, *IDH1*' in sitoplazma ve peroksizomlarda, *IDH2*' nin ise mitokondride bulunmasıdır. *IDH1* memeli karaciğerinde fazla, beyinde dahil diğer dokularda orta seviyede eksprese olmaktadır (52, 53). *IDH2* oksidatif solunumun regülasyonunda rol alırken *IDH1* çeşitli hücrel metabolik fonksiyonlarda anahtar rol oynamaktadır. *IDH1* lipid metabolizması, glukoz toleransı ve ürettiği NADPH ' ı kullanarak peroksizomlarda yağ asitlerinin oksidasyonunda görevlidir. *IDH1*' in NADP^+ yi indirgemesiyle oluşan NADPH ; oksidatif hasara karşı savunma mekanizmasında kritik bir bileşen olan glutatyonun rejenerasyonunda önemli bir kofaktördür. Tüm *IDH*' lar oksidatif hasarın hücrel kontrolünde rol oynamaktadırlar (25, 54).

Kromozom 2q33.3' de lokalize 10 ekzonlu *IDH1* geni tarafından kodlanan izositrat dehidrogenaz 1 enzimi iki altbirimden oluşan bir homodimerdir. Her bir homolog, β -sheet tarafından bir arada tutulan büyük (1-103 ve 286-414 amino asit residüsü) ve küçük domaini (104-136 ve 186-285 amino asit) ve iki altbirimi bir arada tutmakla görevli clasp domaininden (137-185 amino asit) oluşmaktadır (52, 55, 56).

IDH1 homodimeri, her biri, bir altbirimin büyük ve küçük domaini ve diğer komşu altbirimin küçük domaininden oluşan asimetrik iki aktif bölgeyi içermektedir. Aktif bölge NADP ve izositrat-metal iyon bağlama bölgesine sahiptir (55). İnsan IDH1 enzimi, açık inaktif, yarı-açık inaktif ve kapalı aktif konformasyonlar arası dönüşüm içerisinde. Küçük domainde yerleşmiş, enzimin substratını bağlama bölgesi olan kodon R132 açık ve kapalı konformasyonlar arasında bir kapıcı olarak görev yapmaktadır. R132 residüsü enzimin substratı olan izositrat ile üç hidrojen bağı yaparken diğer residüer iki hidrojen bağından daha fazlasını yapamamaktadır (52, 54).

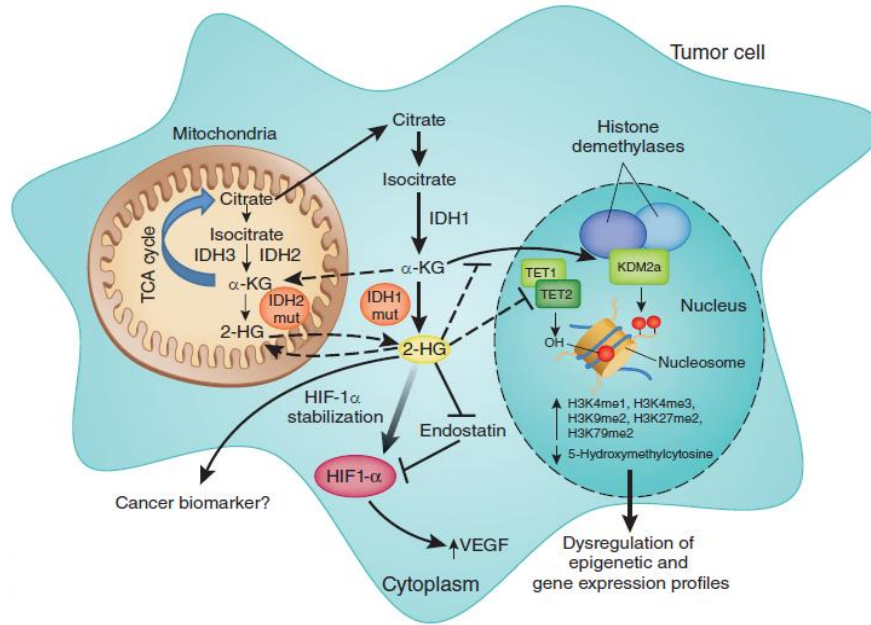
IDH1 gen mutasyonu, ilk olarak 2006 yılında kolorektal kanserde tanımlanmıştır. Daha sonra 2008 yılında Parsons ve arkadaşlarının yeni nesil sekanslama ile 20 661 gende yaptıkları analiz sonucu glioblastomalarda tanımlanmıştır (41, 57). *IDH1* gen mutasyonu ayrıca AML (Akut miyeloid lösemi), B-akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), prostat kanserinde, MDS (myelodisplastik sendrom) ve MPN' de (Myeloproliferatif neoplazm) (11, 53) ve bir çalışmada tiroid kanserinde homozigot *IDH1* mutasyonu tanımlanmıştır (58).

IDH1 mutasyonları, heterozigot, somatik, missense mutasyonlar olup izositratın bağlanma bölgesi olan evrimsel olarak korunmuş R132 (kodon 132, arginin) residüsünü etkilemektedir. Heterozigot *IDH1* R132 mutasyonu enzimin substratına olan afinitesini bozarak, katalitik olarak inaktif heterodimerler oluşumuna neden olmaktadır. Ancak yabancı tip NADP⁺-bağımlı IDH1' in aktivitesinin tamamıyla (izositratın α -KG'a indirgenmesi) inhibe olmadığı ve azalmış şekilde aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (59, 60). 132. kodonu etkileyen mutasyon varlığında IDH1, NADPH' ı üretmekten ziyade daha çok tüketmektedir. Buna bağlı olarak O₂ radikallerini temizleme ve detoksifikasyon gibi biyosentetik süreçlerde rol oynayan ve radyo- ve kemoterapi gibi strese karşı koruyucu bileşik olan NADPH' in seviyesinin azalması oksidatif stresi artırmakta ve ona karşı direncin azalmasına neden olmaktadır (59).

Birçok çalışmada fonksiyon kaybından ziyade kazanımı olan *IDH1* R132 mutasyonunun enzime yeni bir özellik kazandırarak α -KG' ın R-2-Hidroksiglutarat' a (R-2-HG ya da D-2-HG olarak bilinir) indirgenmesine neden olduğu gösterilmiştir

(Şekil 3) (61). Bu reaksiyonda NADP yerine NADPH kullanılır. Pek çok çalışmada 2-HG seviyesinin GBM' li hastalarda yüksek olduğu gösterilmiştir (11, 52, 60).

2-HG, α -KG' ın yarışmalı inhibitörü olup O_2 ve α -KG varlığında HIF1- α ' yı (Hypoxia-inducible factor- α) parçalayan prolil hidroksilaz (PHD) gibi α -KG bağımlı enzimlerin inaktivasyonuna sebep olmaktadır. HIF1- α düşük oksijen seviyesinde tümör gelişimini kolaylaştırmakla birlikte apoptoz, hücrenin devamlılığı, anjiyogenez ve enerji metabolizmasını kontrol eden genleri regüle eden bir transkripsiyon faktörüdür. PHD' nin inhibisyonuna sebep olan 2-HG, HIF1- α ' nın antagonisti olan endostatin' in seviyesini azaltarak HIF1- α seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak artmış VEGF (Vasküler endotel büyüme faktörü) sinyalleşmesi, glikoliz ve anjiyogenez yoluyla tümörigenez uyarılmaktadır (Şekil 3) (11, 25, 52, 54, 60, 62).

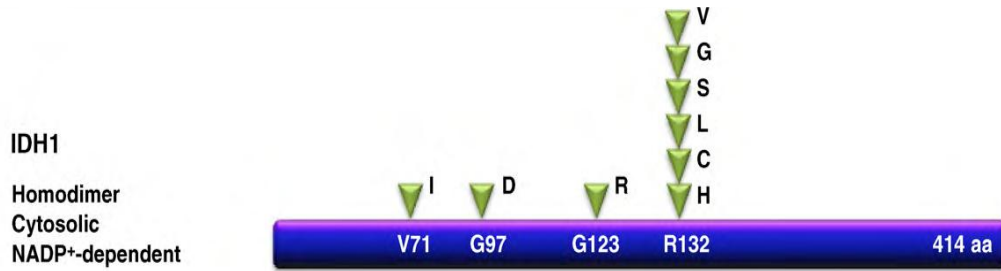


Şekil 3. Hücresel metabolizmada IDH1' in rolü (Prensner' den, 62).

4.2.5.2. Mutasyon Sıklığı

IDH1 gen mutasyonları gliomalardan; WHO II. ve III. derece astrositomlarda ve oligodendrogliomlarda ve sekonder GBM'lerde %70' in üzerinde, WHO I. derece astrositomlarda (%0-2) nadir gözlenmektedir (12, 63, 64).

Gliomalarda yapılan çalışmalarda tanımlanmış *IDH1* mutasyonları genellikle 4. ekzonda; en sık arginin amino asitinin histidine dönüştüğü p.R132H (%90'dan fazla) pozisyonundadır. Bununla birlikte, argininin sisteine (p.R132C, %3,4-4,6), serine (p.R132S, %0,8-2,5), glisine (p.R132G, %0,6-3,9), löisine (p.R132L, %0-4,5) ve valine (p.R132V, bir vakada) dönüştüğü pozisyonlarda da mutasyonlar tanımlanmıştır (Şekil 4). Yapılan pek çok çalışmaya göre GBM'lerdeki tüm *IDH1* mutasyonları genellikle heterozigot c.395G>A (p.R132H) şeklinde olup p.R132S, p.R132G, p.R132C ve p.R132L mutasyonlarına nadir olarak rastlanmıştır (10-13, 41, 54, 63-67). *IDH1* p.R132H mutasyonu oranı; sekonder GBM'lerde %50-88, primer GBM'lerde %3-11 arasında, primer ve sekonder ayrımı yapılmamış GBM'lerde ise oran %6-30 arasında değişmektedir (10, 12-14, 63-65, 68). Ayrıca tiroid kanserinde G123R ve V71I, kolorektal kanserinde G97D mutasyonları gösterilmiştir (53).



Şekil 4. *IDH1* geni hotspot bölgeleri (Dang' dan, 53)

4.2.5.3. Diğer Genetik Değişiklikler ile İlişkisi

Astrositomaların gelişiminde erken gözlenen değişikliklerden olan hücre siklusunu düzenleyen *TP53* tümör süpresör gen mutasyonları II. ve III. derece astrositomalarda ve sekonder GBM'lerde yaygındır. Yapılan bazı çalışmalarda, *IDH1* mutasyonları ile *TP53* mutasyonları ve LOH 19q arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Ancak *TP53* ile *IDH1* arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak anlamlı bulmayan çalışmalarda mevcuttur. *IDH1* mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastalarda yaklaşık sıklıkta LOH 10q görülmüştür (13, 54). Bir çalışmada, 10. kromozomun tamamının kaybı ve *IDH1* mutasyonlarının yokluğu arasında güçlü ilişki olduğu gösterilmiş olup, *IDH1* mutasyonunun, 10. kromozomun tamamını içeren olgularda, kromozom 10 delesyonlu olgulara göre daha sıklıkta görüldüğü tespit edilmiştir (14).

4.2.5.4. Yaş ve Prognoz ile İlişkisi

IDH1 mutasyonları pediatrik hastalarda nadir olmakla birlikte genç GBM hastalarında görülmektedir. *IDH1* mutasyonu taşıyan olgular (ortalama 30-50 yaş) mutasyonu taşımayanlara (ortalama 55+ yaş) göre daha genç yaşta olma eğilimi göstermektedirler. Pek çok çalışmada *IDH1* mutasyonunun genç yaş ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (12, 25, 41, 54).

Bir çalışmada, *IDH1* mutasyonu taşıyan GBM hastaları (3.7 yıl), yabanıl tip *IDH1* hastalarına göre (1.1 yıl) daha fazla yaşamıştır (41). Farklı çalışmalarda da mutasyon taşıyan hastaların, taşımayanlara nazaran sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğu gösterilmiştir (12, 14, 64).

4.3.Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Moleküler biyoloji hastalıkların genetik etiyolojisinin anlaşılmasına yardımcı birçok yeni tekniklerin gelişimine yol açmıştır. Bunlardan biri olan FISH sitogenetik ve gen haritalaması çalışmalarında yaygın geleneksel tekniklerden biri haline gelmiştir. Bu yöntem genellikle moleküler sitogenetik olarak adlandırılmaktadır (69).

Karyotip analizleri veya konvansiyonel metafaz sitogenetiğiyle karşılaştırıldığında, FISH analizleri büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu teknik ile komplementer DNA fragmentleriyle spesifik nükleik asit dizileri hibridize edilmekte, böylece kromozom kopya sayıları ve genlerin lokalizasyonları belirlenebilmektedir. Kromozomların interfazda da bir alan oluşturdıkları ve spesifik problemlerle bu alanların yapı ve kısmen miktarı konusunda bilgi alınabileceği görülmüş ve böylece "interfaz sitogenetiği" analizi adı verilen alt bir dal doğmuştur. FISH doku kültürüne ihtiyaç duyulmadan solid tümörlere hatta fikse edilmiş, parafin bloklu dokulara dahi uygulanabilmektedir (69).

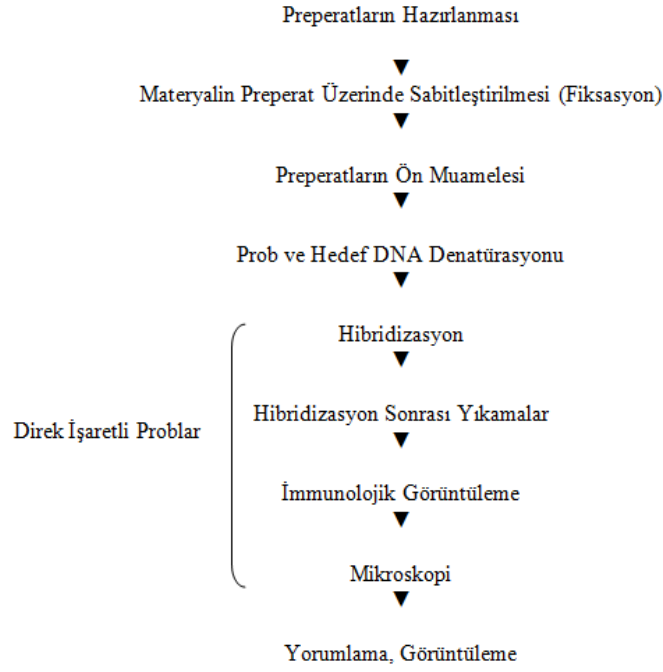
FISH tekniğinin tanı ve araştırma amaçlı kullanım alanlarını şöyle sıralayabiliriz:

A.) Tanısal amaçlı kullanılan FISH; Klinik Sitogenetik, (prenatal tanı, interfaz sitogenetiği, mikrodelsiyon sendromlarının tanısı, kanser sitogenetiği), dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı, dokuda mRNA düzeyinde onkogenlerin değerlendirilmesi

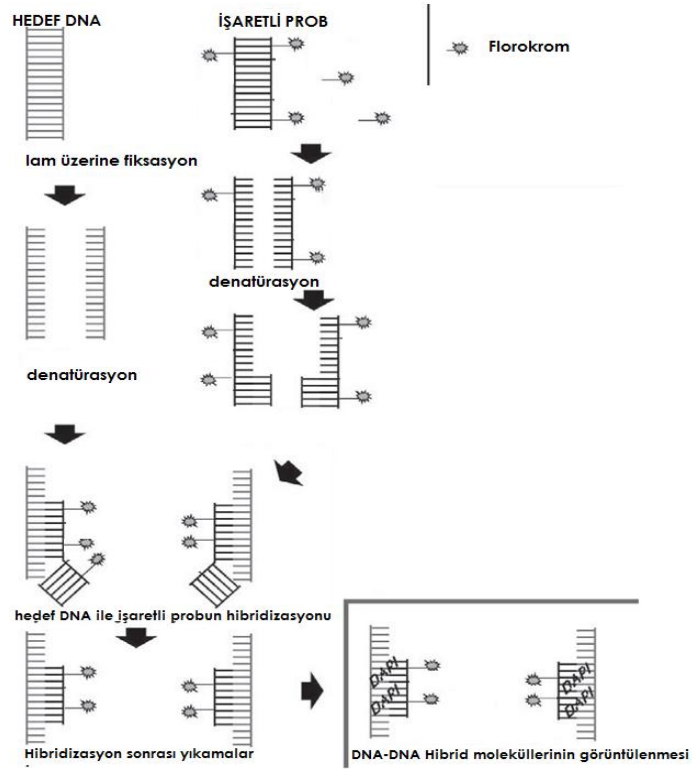
B.) Araştırma amaçlı kullanılan FISH; Gen haritalaması, tümör biyolojisi, mikrobiyoloji/viroloji, gen ekspresyon analizi, somatik hücre hibrit analizleri, mayoz/mitoz analizleri

FISH yönteminde temel prensip şöyledir; işaretli DNA molekülü yani prob ile lam üzerine fikse edilmiş metafaz ve/veya interfazdaki hedef DNA' lar denatürasyon ile tek zincir haline getirilmekte ve spesifik eşleşmenin olacağı uygun koşullarda genomik DNA ile prob hibridize edilmektedir (Şekil 5 ve 6). Hibridizasyonda; Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları, proba hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması ve hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesi önemlidir (69).

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilmektedir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan proplar stabil hibridler oluşturmaktadırlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece %70-90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilmektedir. Bu spesifik olmayan sinyallerin oluşumu, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı+ düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla engellenebilmektedir. Daha sonra oluşan hibrit spesifik görüntüleme sistemleri ile belirgin hale getirilmektedir (69).



Şekil 5. FISH tekniğinde uygulanan basamaklar (Celep' den, 69)



Şekil 6 FISH tekniğinin şematik ifadesi (Liehr' den, 70)

4.3.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. FISH tekniğinde sitogenetik alanında kullanılan başlıca problar şunlardır; lokusa özgü problar, tekrarlayan dizi probları (satellit probları), translokasyon veya kırık noktası yeniden düzenlenme probları, tüm kromozomu boyayan problar (library probları), telomer bölgesine özgü problardır (69).

4.4. DNA Dizi Analizi

4.4.1. Sanger (Dideoksinükleotid) Yöntemi

Bir deoksiribonükleotidin (dATP,dGTP,dCTP,dTTP) şeker alt birimi 3 nolu karbonunda hidroksil grubu taşımaktadır. Buna karşılık her biri ayrı fluorezan molekülle işaretlenmiş, ayrı renkler veren dideoksinükleotidler (ddATP,ddGTP,ddCTP,ddTTP), şeker alt biriminin 2. karbon atomuna ek olarak 3. karbonunda da deoksi halde (OH grubu taşımayan) olan modifiye nükleotidlerdir (71).

DNA replikasyonu sırasında, replikasyona katılacak olan nükleotid kalıp DNA tarafından belirlenmektedir. Kalıp DNA zinciri ile baz eşleşmesi yapabilen her yeni nükleotid bir önceki nükleotidin 3' OH ucuna fosfodiester bağı ile bağlanmaktadır. Deoksiribonukleotidler bağlandıkça zincir uzamaya devam etmektedir. Büyüyen zincirin sonuna raslantısal olarak dideoksiribonukleotid bağlandığında sonra gelecek olan nükleotid, serbest bir OH grubu bulamayacağından fosfodiester bağı kuramamakta ve zincir uzaması durmaktadır. Sonuç olarak, Sanger yöntemi; dideoksinükleotidin DNA sentezini durdurması prensibi üzerine kurulmuştur (71).

Sekans reaksiyonları yeni teknolojiler sayesinde otomatize edilmiştir ve floresans boyalar ile görüntülenmektedirler. Bununla birlikte manuel yöntemler halen daha kullanılmaktadır. Başlangıçta radyoizotoplar ile görüntüleme sağlanırken artık gümüş boyama ile de kaliteli sonuçlar alınmaktadır (72).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5. 1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grubu

04.07.2011-03.12.2012 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen olan bu çalışmada, WHO' ya göre sınıflandırılması ve immunohistokimyasal değerlendirmesi Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından yapılarak "Glioblastoma Multiforme" tanısı almış 54 olgu araştırma grubunu oluşturdu. Bu örnekler Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı' nda 2004-2012 yılları arasında gelen biyopsi materyallerinden elde edilen parafine gömülü arşiv materyalleri olarak temin edildi.

Araştırma grubumuzda dizi analizi grubunu oluşturan olgular 31-82 yaş aralığında olup, kadınların yaş ortalaması 54, erkeklerin yaş ortalaması 55 idi, grubun 36' sı kadın, 18' i erkek bireyden oluşmaktaydı.

FISH analizi yapılan 20 olgunun yaşları 33-82 yaş aralığında olup, kadınların yaş ortalaması 58, erkeklerin yaş ortalaması 63 idi, grubun 5' i kadın, 15' i erkek bireyden oluşmaktaydı.

Olgular KTÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan 06.07.2011 tarih ve 2011/80 nolu belge ile alınan izin doğrultusunda çalışmaya dahil edildi. Bu şekilde alınan parafin bloklardan elde edilen 54 DNA örneğinin tamamına, *IDH1* geninin tüm ekzonlarını sekanslamak için DNA dizi analizi uygulanması amaçlandı. Ancak parafin bloktan elde edilen DNA' nın az miktarda, kırık halde, düşük kalitede ve kısa ampikon veren primerler ile çoğaltılabiliyor olması gibi nedenlerden ötürü tüm ekzonlar sekanslanamadı ve enzimin fonksiyonel bölgesini kodlayan genin 4. ekzonu değerlendirmeye alındı. Ayrıca *IDH1* geninin 4. ekzonunda mutasyon tespit edilen tüm olgular ve bu mutasyonu taşımayan olgular arasından seçilen 15 olgu olmak üzere toplam 20 örneğe ve kontrol için 10 normal beyin dokusuna da 10q23/*PTEN* lokus kayıplarını incelemek amacıyla bu lokusa özgü prob ile FISH analizi uygulandı.

Bu çalışma, 2010.114.001.11 numaralı proje kapsamında KTÜ BAP tarafından desteklendi.

5.1.2. Kimyasallar

SeaKem® LE Agaroza	Lonza, 50004L
Amonyum klorür (NH ₄ Cl)	Merck, 1.01145.1000
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO ₃)	AppliChem, A2375.1000
Tris-base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	AppliChem, A2264.1000
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ N ₃ O ₃)	Merck, 1.01547.0.100
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Proteinaz K	Promega, V3021
Proteinaz K, Recombinant PCR grade	Roche, 03 115 852 001
Sodyum dodesil sulfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Glacial asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
Methanol (p.a)	Merck 1.0600
Etilene-diaminetetra-acetic acide (EDTA)	Sigma, E-5134
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA ₂ .H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etidium bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Orange G	Sigma, O-1625
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Saf etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma, 32221
Ksilol	Merck, UN 1307
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Promega, U1420
GoTaq®Flexi DNA polimeraz	Promega, M8305
Oligonucleotide primer	IDT
100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G

5.1.3. Kitler

QIAmp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, 56404
NucleoSpin® Extract II	Macharey-Nagel, 740609250
ABI PRISM®BigDye® Terminator v3.1	
Cycle Sequencing Kit	AppliedBiosystems, 4336917

3130 POP-7™ Polymer
ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit

AppliedBiosystems,4352759
Zytovision, Z-2028-20

5.1.4. Problar

SPEC *PTEN*/CEN 10 Dul Color Probe

ZytoLight, Z-2078-200

5.1.5. Cihazlar

Yatay elektroforez düzeneği
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt) (2 adet)
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (1 adet)
Yüksek devirli santrifüj (2 adet)
Mikrosantrifüj
Vorteks
UV translüminatör
Jel görüntüleme sistemi

HU13, İngiltere
CONSORT E833, Belçika
Eppendorf 5804, Almanya
Eppendorf 5810, Almanya
Thermo I EC, ABD
Nüve NM110, Türkiye
Vilbert Lourmat, Fransa
Gel Logic 2000, KODAK,
ABD

Otomatik pipet seti
Dijital otomatik pipet
Hassas terazi
pH metre
Spektrofotometre
Manyetik karıştırıcı
Buz makinesi
Mikrodalga fırın
Distile su cihazı
Pastör fırını
Derin dondurucu (-25)
Derin dondurucu (-25)
Derin dondurucu (-85)
Buzdolabı
Etüv (2 adet)
Sıcak su banyosu (çalkalayıcı)

Rainin, ABD
Socorex, İsveç
OAHaus, ABD
Hanna, Portekiz
Eppendorf, Almanya
IKA, ABD
Scotmann, İngiltere
Arçelik MD 554, Türkiye
GFL 2004, Almanya
Nüve, Türkiye
Bosh, Türkiye
Arçelik, Türkiye
Thermo, ABD
Arçelik, Türkiye
Memmert, Almanya
Memmert,Almanya

Termocycler	GeneAmp PCRSystem 9700,
AB, ABD	
Termocycler	Techne Genius, İngiltere
Genetik analiz cihazı	3130 Genetic Analyzer, AB,
	ABD
Termomikser (ısıtıcı blok)	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Floresan ataçmanlı mikroskop	Nikon E800,
FISH Fluorescence Imaging Sistem	Isis, Metasystems

5.1.6. Sarf Malzemeleri

Çeşitli boyutlarda pipet uçları	Muhtelif
Mikrosantrifüj tüpler	Axygene, ABD
K3EDTA'lı tüpler (mor kapaklı)	Vacutainer
Falkon Tüpler (50 ml)	Greiner Bio-One, Almanya
Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD
Enjeksiyonluk su	
Pastör pipet	

5.1.7. Solüsyonlar

5.1.7.1. DNA İzolasyon Solüsyonları

1. Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH 8.0)

0.05 M	Tris-HCl
1 mM	CaCl ₂

Hazırlanışı:

0.788 g	Tris-HCl
---------	----------

0.011 g CaCl₂ 80 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.0' a ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml' ye tamamlandı. 121 °C' de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlandı.

2. Proteinaz K Çözeltisi (20 mg/ml)

Hazırlanışı:

Proteinaz K çözeltisi buz üzerinde, 12.5 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda 250 mg Proteinaz K çözülerek hazırlandı. Proteinaz K çözeltisi her tüpte 50 µl olacak şekilde 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplere bölündükten sonra -20 °C' de saklandı.

3. %10' luk (w/v) Sodyum Dododesil Sülfat (SDS) Solüsyonu

Hazırlanışı:

10gr SDS tartıldıktan sonra son hacim deiyonize su ile 100 ml' ye tamamlanarak 68 °C' de ısıtılarak çözüldü. 0.22 µm' lik mikrofiltre ile steril edildi.

4. Sodyum Klorür (NaCl) (1 M)

Hazırlanışı:

5.84 g NaCl 30 ml deiyonize su içinde çözüldükten sonra son hacim 100 ml' ye tamamlandı.

5. 0.2 M Na₂EDTA (pH 8.0)

Hazırlanışı:

18.612 g Na₂EDTA 100 ml deiyonize su içinde çözüldü, 10M' lık NaOH ile pH 8.0' a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 250 ml' ye tamamlandı. 121 °C' de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlandı.

6. 1M Tris-HCl (pH 8.0)

Hazırlanışı:

15.76 g Tris-HCl 50 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.0' a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 100 ml' ye tamamlandı. 121 °C' de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlandı.

7. TE Tamponu (pH 7.5)

10 mM	Tris HCl
1mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

0.394 g Tris-HCl
0.093 g Na₂EDTA 100 ml deiyonize suda çözüldü. pH 7.5' ye ayarlandıktan sonra son hacim deiyonize su ile 250 ml' ye tamamlandı. 121 °C' de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlandı.

8. Lizis Tamponu

1 M Tris-HCl pH 8.0
1 M NaCl
0.2 M EDTA pH 8.0
% 10 SDS
20 mg/ml proteinaz K (Kullanmadan hemen önce eklenmelidir.)

Hazırlanışı:

50 µl Tris-HCl
250 µl NaCl
2.5 ml EDTA
250 µl SDS
50 µl proteinaz K, 1.9 ml steril dH₂O ile son hacim 5 ml' ye tamamlandı.

9. Etanol serileri

%100, %90, %70, %50

5.1.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

1. TAE Elektroforez Tamponu (pH; 8.5):

50X stok solüsyon hazırlanışı:

242 g Tris base

37.2 g Na₂EDTA2H₂O

57.1 ml Glasial (saf) asetik asit deiyonize su kullanılarak 800 ml' de çözüldü, NaOH ile pH 8.5' e ayarlandı, son hacim deiyonize su ile 1000 ml' ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

1X çalışma solüsyonu hazırlanışı:

100 ml 50X TAE tamponuna 4900 ml deiyonize su eklenerek son hacim 5 L' ye tamamlandı.

2. Etidium Bromid Solüsyonu:

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

5.1.7.3. Yükleme Tamponları

1. 10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

20 gr. Sukroz 40 ml dH₂O içinde çözüldü.

100 mg (0.1 g) Orange G yukarıdaki solüsyon içerisinde çözüldükten sonra son hacim dH₂O ile 50 ml' ye tamamlandı.

5.1.7.4. FISH solüsyonları

1. Fiksatif (Carnoy) Solüsyonu

Hazırlanışı:

3 hacim Methanol: 1 hacim glacial asetic asid karıştırılarak kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2. %0.5 Pepsin Solüsyonu

%0.9 Serum fizyolojik

2N HCl

Hazırlanışı:

% 0.5' lik pepsin solüsyonu hazırlamak için 50 ml %0.9' luk serum fizyolojik üzerine 250 mg pepsin ilave edildi. 2 N HCl kullanılarak solüsyonun pH' sı 1.5 olarak ayarlandı. Hazırlanan pepsin solüsyonu, her bir olguya bir tane kullanılmak üzere 1.5 ml' lik ependorf tüplerine koyuldu ve -20 °C' de saklandı.

3. Etanol serileri

%70, %80, %96

5.2. Yöntem

Patolojik olarak Glioblastoma multiforme tanısı alıp çalışmaya dahil edilen tüm olgulara ait arşiv materyallerinin mikroskop altında hematoksilin eosin boyalı preparatlarından malign alanlar belirlenerek, %50' den fazla tümör alanı içeren parafin bloklardan 10 µm kalınlığında 4 kesit alındı. Olguların 54' üne DNA izolasyonu, QIAmp DNA FFPE Tissue Kit' de modifikasyonlar yapılarak oluşturulan protokol ile her bireye bir DNA banka numarası verilerek kayıt altına alındı.

Çalışmaya dahil edilen 54 olgunun tümör dokularından elde edilen DNA örneklerinde; dizi analizi yöntemi ile *IDH* in 4. ekzonunda mutasyon taraması yapıldı. DNA dizi analizi sonrasında bulunan değişimlerin patojenitesinin değerlendirilmesi işlemi Chromas versiyon 2.33 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışmanın 2. yönteminde 20 olguya ait parafin bloktan tek hücre süspansiyonları hazırlanarak 10q23/*PTEN* delesyonlarını tespit etmek amacıyla FISH analizi yapıldı. Cut off (eşik değeri) değerini belirlemek amacıyla tümörü çevreleyen normal beyin dokusunun az olması nedeniyle, hasta grubu ile yaş olarak uyumlu, ölüm nedenleri santral sinir sistemi patolojisine bağlı olmayan 10 postmortem bireye ait beyin dokusundan elde edilen tek hücre süspansiyonuna da FISH analizleri yapıldı.

5.2.1. QIAmp DNA FFPE Tissue Kit ile DNA İzolasyonu

Patoloji Anabilim Dalı tarafından GBM tümör tanısı konmuş olgulara ait parafin bloklardan 1.5 ml' lik steril mikrosantrifüj tüplere 10 µm kalınlığında 4 kesit alınarak DNA izolasyonu QIAmp DNA FFPE Tissue Kit' in modifiye edilmesiyle aşağıdaki gibi yapıldı;

Deparafinizasyon;

1. 1.5 ml' lik ependorf tüplerdeki 10 µm kalınlığında 4 kesit üzerine 800 µl ksilol eklenerek parafin çözününceye kadar 5-15 dk karıştırıcıda bırakıldı.
2. 14 000 rpm' de 3 dk santrifüj edilerek pellete dokunmadan süpernatant (sıvı kısım) dikkatle uzaklaştırıldı.
3. 1. ve 2. adımlar dokunun büyüklüğüne göre 2 ya da 3 kez parafin tamamen çözününceye kadar tekrarlandı.
4. 800 µl %100 etanol eklenerek 14 000 rpm' de 3 dk santrifüj edilir ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
5. 800 µl %70 etanol eklenerek 14 000 rpm' de 3 dk santrifüj edilir ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
6. 800 µl %50 etanol eklenerek 14 000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
7. Etanol süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra pelletin kuruması için 37 °C etüvde 10-15 dk etanol tamamen uzaklaşınca kadar bırakıldı.

Dokunun parçalanması

8. Doku büyükse saat camı üzerinde bir damla su içinde bistüri yardımıyla kıyıldıktan sonra yüksek hızda santrifüj edilerek su mümkün olduğunca uzaklaştırıldı.
9. Pellet üzerine 180-190 µl Buffer ATL ve 20-30 µl proteinaz K eklenerek vortekslendi.

NOT: Bir kısım örneğe manuel olarak hazırlanan lizis buffer uygulanmış olup prosedür aşağıdaki gibidir;

200-500 µl lizis buffer örneğe eklendi ve vortekslendi.

Örnekler 56 °C' de inkübe edildi.

Sabah ve akşam olmak üzere 20 µl proteinaz K (20 mg/ml stok solusyonu) ilavesi yapıldı.

Doku tamamen parçalanıncaya kadar lizis 2-5 gün devam ettirildi.

Lizis sonrası örnek proteinaz K inaktivasyonu için 95 °C' de 10 dk bekletildi. Yönteme 13. adımdan devam edildi.

10. 1 saat ya da doku tamamen parçalanıncaya kadar 56 °C' de inkübe edilir. Etkili bir lizis sağlamak için karıştırıcı-çalkalayıcı kullanıldı.
11. 90 °C' de 1 saat inkübe edildi. (90 °C' de inkübasyon kısmen nükleik asitlerin formaldehit modifikasyonlarını bozar.)
12. Tüpün kapağında kalan solusyonu uzaklaştırmak için kısa santrifüj yapıldı.
13. 200 µl buffer AL ve 200 µl etanol (%96-100) önceden karıştırılarak örneğe birlikte eklendi ve pipetaj yapıldı.
14. Kapakta solusyon kalmaması için kısa santrifüj edildi.
15. Karışım dikkatle kenarları ıslatadan QIAamp MinElute kolon içine alındı. Kapak kapatılarak 6000 g' de 2 dk tüm solusyon alta geçene kadar santrifüj edildi.
16. Spin kolon temiz bir toplama tüpüne alındı ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
17. Kolon dikkatle açılarak 500 µl Buffer AW1 eklendi. 6000 g' de 2 dk santrifüjlendi. Kolon temiz bir toplama tüpüne alındı ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
18. Kolon dikkatle açılarak 500 µl Buffer AW2 eklendi. 6000 g' de 2 dk santrifüjlendi. Kolon temiz bir toplama tüpüne alındı ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
19. Zarın tamamen kuruması için 20 000 g' de 3 dk santrifüj edildi.
20. Kolon 1.5 ml' lik ependorf tüpe alınarak filtrat içeren toplama tüpü atıldı. Dikkatle spin kolonun merkezine 20-100 µl Buffer ATE (elüsyon buffer) bırakıldı.
21. Kapak kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında en az 1 dk inkübe edildikten sonra 20 000 g' de santrifüj edildi.

5.2.2. Genomik DNA' nın Spektrofotometre ile Konsantrasyonunun Tespiti

Parafin bloklardan genomik DNA izolasyonu işleminden sonra genomik DNA örnekleri spektrofotometrede “5µl DNA örneği+95 µl enjeksiyonluk su” olacak şekilde sulandırılarak 260/280, 260/230 absorbans değeri oranları ve DNA konsantrasyonları ölçüldü. Spektrofotometrede okunan değerler göz önüne alınarak stok genomik DNA' lar istenen konsantrasyonlarda sulandırılarak çalışma solüsyonları hazırlandı. Genomik DNA örnekleri uzun süre saklanabilmeleri için -80 °C’ de muhafaza edildi.

5.2.3. IDH1 Geni Mutasyon Taraması

5.2.3.1. IDH1 Geninin PCR ile Amplifikasyonu

IDH1 geninin 4. ekzonunun amplifikasyonunda kullanılacak primer dizileri Primer 3 programı kullanılarak hazırlandı. (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) IDH1 geni için kullanılan primerlerin dizileri ve PCR ürünü baz uzunlukları Tablo 2’ de verildi.

Çalışmaya dahil edilen 54 GBM bireyinde IDH1 geninin 4. ekzonu amplifiye edildi. Agaroz jel elektroforezinden sonra PCR ürünleri NucleoSpin Extract II kiti ile saflaştırıldı. Tablo 2’ de verilen primerler kullanılarak sekans reaksiyonu (Cycle Sequencing) gerçekleştirildi. Bu işlemten sonra PCR ürünleri sephadexten geçirilerek saflaştırıldı. Son olarak saflaştırılan PCR ürünleri 3130 genetik analiz cihazında (Applied Biosystems) yürütülerek ekzon ve ekzon-intron bağlantı bölgelerindeki değişimler belirlendi.

Tablo 2. IDH1 geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve PCR ürünü uzunlukları.

Primer No	Primer dizisi (5'-3')	Primer adı	PCR Ürün (bp)
540	tggcagattttggtgtactcag	IDH1_EX_4_F	539
541	tcataccttgcttaatgggtgtag	IDH1_EX_4_R	
718	gagctctatatgccatcactgc	IDH1_EX_4_F2	259
778	tatgggtgccatttggtgatttc	IDH1_EX_4_R3	
779	tgctgcagaagctataagaagc	IDH1_EX_4_F3	358
541	tcataccttgcttaatgggtgtag	IDH1_EX_4_R	

PCR içeriği

Mutasyon analizi için yapılan ilk 1X 25µl' lik PCR aşağıdaki gibi hazırlandı;

1X

5X PCR Tamponu.....	5 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM).....	1 µl
Pr F (10pmol/µl).....	1 µl
Pr R (10pmol/µl).....	1 µl
Taq Polimeraz (5U/µl).....	0.1 µl
gDNA (25 ng/µl).....	2.5 µl
dH ₂ O.....	12.9 µl
Toplam : 25 µl	

PCR koşulları

94 °C	4'Başlangıç denatürasyonu	
94 °C	30'' Denatürasyon	} 38 döngü
60 °C	1' Bağlanma	
72 °C	1' Sentez (Uzama)	
72 °C	6' Son sentez (uzama)	
10 °C	∞ Bekleme	

Toplam reaksiyon hacmi distile su ile 25 µl' ye tamamlandı. Her reaksiyona kontaminasyon kontrolü için DNA içermeyen bir negatif kontrol (dH₂O) eklendi.

PCR, Applied Biosystems 9700 termocycler cihazında gerçekleştirildi.

5.2.3.2. IDH1 Geni Ekzonları PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroferezi ile Yürütülmesi

PCR reaksiyonları sonucu oluşan ampliconları yürütmek için %2' lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler (2 µl PCR ürünü + 2 µl yükleme tamponu+4 µl dH₂O) kuyucuklara yüklendi ve 100 Voltta 30 dk yürütüldü. Agaroz jel elektroferezi sonuçları jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2000, KODAK, ABD) ile değerlendirildi.

5.2.3.3. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

Tablo 2' deki primerlerle amplifiye edilen PCR ürünleri Nucleospin® Extract II (Macharey-Nagel) kiti ile firmanın önerdiği gibi aşağıdaki protokol doğrultusunda temizlendi;

1. Son hacmi 25 µl olan PCR ürünlerin bulunduğu platelerdeki kuyucukların üzerine 200 µl NT Buffer eklendi.

2. PCR ürünü-NT Buffer karışımı 2 ml' lik toplama tüpü üzerindeki Nucleospin®Extract Column tüplerine aktararak, 11 000 g' de 1 dk santrifüj edildi.
3. Toplama tüplerindeki sıvı döküldükten sonra, Nucleospin®Extract Column tüpler temiz toplama tüplerinin üzerine alındı.
4. Nucleospin®Extract Column tüplerindeki membran üzerine 600 µl NT3 Buffer eklenerek 11 000 g' de 1 dk santrifüj edildi.
5. Toplama tüplerinde sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ikinci kez 11 000 g' de 2 dk santrifüj edilerek NT3 Buffer tamamen memrandan uzaklaştırıldı.
6. Nucleospin®Extract Column tüpleri 1.5 ml' lik eppendorf tüplerin üzerine alınarak membran üzerine PCR ürünlerinin bant yoğunluklarına göre 15-50 µl su eklendi ve oda sıcaklığında en az 1 dk bekletildikten sonra 11 000 g' de 1 dk santrifüj edildi.
7. Eppendorf tüpte kalan PCR ürünlerinden 2 µl alınarak %2' lik agaroz jelde 100 voltta 20 dk yürütülerek kontrol edildi.

5.2.3.4. Döngü Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)

Temizlenen PCR ürünleri döngü dizileme reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı. Döngü dizileme reaksiyonunda herbir ekzon için IDH1_EX_4_F, IDH1_EX_4_F2, IDH1_EX_4_R3 ve IDH1_EX_4_F3 primerleri kullanıldı. Döngü dizileme reaksiyonu, BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) kullanılarak Applied Biosystems 9700 termocycler cihazında gerçekleştirildi.

Primer seçiminde; dizilenecek bölgede on adet in üzerine baz tekrarının olmaması, seçilen primerin dizilenecek ekzona olan uzaklığı ve ekzon-intron bağlantı bölgesinde mümkün olduğunca fazla diziyi okumamamızı sağlayacak primerin seçilmesi gibi durumlara özen gösterildi.

PCR içeriği

Mutasyon analizi için yapılan ilk 1X 25µl' lik PCR aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>1X</u>	<u>PCR koşulları</u>
BigDye..... 1 µl	96°C 1' Başlangıç denatürasyonu
5X Buffer..... 1.5 µl	96°C 15'' Denatürasyon
Primer (10pmol/µl)..... 0.32 µl	50°C 15'' Bağlanma
Temizlenmiş PCR ürünü..... 0.5 µl	60°C 2' Sentez (Uzama)
dH ₂ O..... 6.5 µl	10 °C ∞ Bekleme
Toplam :10 µl	

PCR, Applied Biosystems 9700 termocycler cihazında gerçekleştirildi.

5.2.3.5. PCR Ürünlerinin Sephadex® İle Temizlenmesi

1. Kolon tüpler 2 ml' lik toplama tüpleri üzerine alındı.
2. 1 gr sephadex tartılarak 12-13 ml dH₂O içerisinde çözüldü.
3. Kolon tüplere 600 µl sephadex eklendi ve 750 g' de 2 dk santrifüj edildi.
4. Toplama tüpleri atıldı ve kolon tüpler 1.5 ml' lik eppendorf tüplerin üzerine alındı.
5. PCR ürünleri (son hacim 10 µl) kolon tüpteki sephadex üzerine, sephadexin yapısını bozmadan, dikkatli bir şekilde eklendi.
6. 750 g' de 5 dk santrifüj edildi.
7. 1.5 ml' lik eppendorf tüpe geçen PCR ürünleri (son hacim yaklaşık 13 µl), ABI 3130 genetik analiz cihazı üzerindeki platelere aktarılanaya kadar 4 °C' de saklandı.

5.2.3.6. DNA Dizi Analizi

Döngü dizileme reaksiyonundan sonra sephadexten geçirilen PCR ürünleri ABI 3130 (Applied Biosystems) genetik analiz cihazı üzerindeki platelere aktarıldı. Cihaz hazır hale geldikten sonra DNA dizi analizi başlatıldı.

5.2.4. Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH)

Çalışmaya dahil edilen GBM tanısı almış 20 olguya ve kontrol olarak kullanılacak normal beyin dokusundan alınan 10 olguya 10q23/*PTEN* lokusu açısından FISH analizi uygulandı. FISH analizi *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit' in modifiye edilmesiyle yapıldı.

5.2.4.1. Probların Seçilmesi

Konu ile ilgili literatür çalışmasını takiben olgulara ait interfaz hücrelerine kromozom 10q23/*PTEN*/CEN 10 Dual Color probun (Zytovision, Z-2078-200) uygulanmasına karar verildi. *PTEN* genini hedef alan prob ZyGreen (yeşil) ile, kromozom 10 α -satellit sentromerik prob ise ZyOrange (kırmızı) ile işaretlidir.

5.2.4.2. *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit ile FISH prosedürü

Deparafinizasyon ve Lizis

1. 1.5 ml' lik ependorf tüplerdeki 10 μ m kalınlığında 4 kesit üzerine 1.5 ml ksilol eklenerek 5-10 dk bekletildi.
2. Örnekler, ksilol uzaklaştırıldıktan sonra %100, %100, %90, %70, %50' lik alkol serilerinden her birinde 5' er dk olmak üzere geçirildi.
3. 5 dk distile suda bekletildi.
4. Sudan uzaklaştırılan örnekler önceden 98 °C' ye ısıtılmış Heat Pretreatment Solution Citric içinde 98 °C' de 15 dk bekletildi.
5. Örnekler hemen distile suda yıkandı.
6. %0.5' lik pepsin solüsyonundan 1.5 ml herbir örneğe eklenerek 37 °C su banyosunda 30 dk ya da doku tamamen parçalanıncaya kadar bekletildi.
7. Pepsin solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1.5 ml Wash Buffer SSC ilave edilerek 5 dk bekletildi.
8. Buffer uzaklaştırıldıktan sonra 1.5 ml PBS ilave edilerek 5 dk bekletildi.
9. PBS uzaklaştırıldıktan sonra tek hücre pelletinin yoğunluğuna bağlı olarak uygun miktarda Carnoy fiksatif eklenerek önceden alkol ile temizlenmiş lam üzerine yayma yapıldı.

10. Dehidratasyon için lam üzerine damlatılmış örnekler %70, %80, %96' lık alkol serilerinden herbirinde 1' er dk bekletilmek üzere geçirildi.
11. Lamalar oda ısısında kurumaya bırakıldı.

Denatürasyon ve Hibridizasyon (Karanlıkta)

12. Lamalar mikroskop altında incelenerek probun damlatılacağı alan belirlendi.
13. 10 µl prob belirlenen alana damlatılarak lamel ile kapatıldı ve rubber cement ile lamelin yapışması sağlandı.
14. 75 °C' de 10 dk denatürasyon yapıldı.
15. Lamalar nemli ve karanlık bir kutu içine alınarak 37 °C' de overnight hibridize edildi.

Hibridizasyon sonrası yıkamalar (Karanlıkta)

16. Lamalar 37 °C su banyosunda bulunan 1X Wash Buffer A içine batırılarak rubber cementten temizlendi.
17. Lamalar 2 defa 1X Wash Buffer A içinde 37 °C' de 5 dk yıkandı.
18. Lamalar %70, %80, %96' lık alkol serilerinden herbirinde 1' er dk bekletilmek üzere geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.
19. Oda ısısına getirilmiş DAPI/Antifade- Solution' dan 25 µl lam üzerine konulduktan sonra hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek lamel ile kapatıldıktan sonra 15 dk karanlıkta bekletildi.
20. 2-8 °C' de muhafaza edildi.

5.2.5. Biyoinformatik Analizler ve Verilerin Değerlendirilmesi

Genetik değişimler ve hasta yaşı arasındaki ilişki Mann Whitney testi kullanılarak değerlendirildi. Olguların sağ kalım süreleri Kaplan-Meier metodu (Log-Rank Test) kullanılarak değerlendirildi. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak alındı. Analizler "Statistical Package for the Social Services" (SPSS) yazılım programında yapıldı.

Dizi analizi sonuçları *Chromas v2.3* (www.technelysium.com.au/chromas.html), *NCBI BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), *SeqScape® software v2.5* programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler gen

bankasından alınan referans *IDH1* dizisi (GenBank kayıt no: NC_000002.11) ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

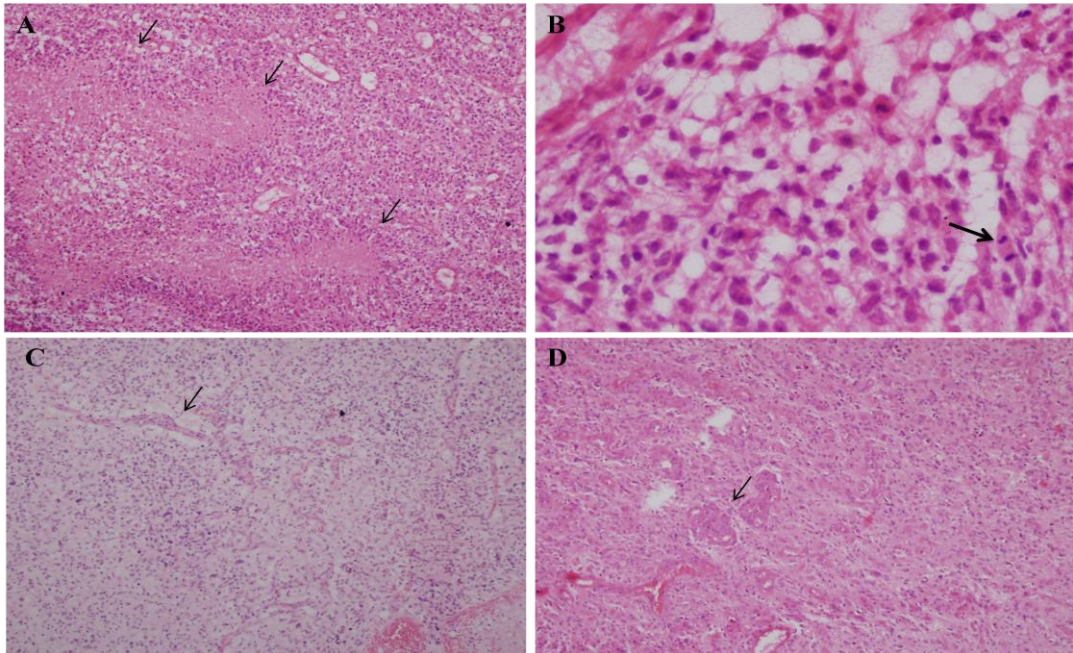
FISH analizi yapılan olgulara ait preparatlar Epi Floresan (Nikon E-800) mikroskopunda Fluorescence Imaging Sistem (Metasystem ISIS) ile uygun filtrelerle incelendi. Her olguda 100-200 interfaz nukleusu analiz edildi. Her hücre için hedef gene ya da kromozom sentromerine ait sinyaller sayıldı. Sinyallerin değerlendirilmesi sırasında üst üste gelmiş, birbirine çok yakın ve sinyal büyüklüğü birbirinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla olan) sinyaller değerlendirmeye alınmadı. Kullanılan probun analizi sırasında kontrol örneklerinden belirlenen cut off değeri kullanıldı. Cut off (eşik değeri) değeri, 10q23/*PTEN* hemizigot kayıpları için 9.6; monozomi için 6.8, homozigot delesyon için 3.5 olarak değerlendirildi (Tablo 6).

6. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı koyulmuş 54 olgu değerlendirmeye alındı (Resim 1). Bu olgulara ait parafin bloklardan elde edilen DNA örneklerinde *IDH1* geninin 4. ekzonu dizi analizi yöntemi ile incelendi. Yapılan dizi analizi sonucunda 5 olguda (% 9.3) heterozigot c.395G>A mutasyonu tespit edildi.

IDH1 geninin 4. ekzonunda c.395G>A (p.R132H) mutasyonu taşıyan tüm olgular (5 olgu) ve bu mutasyonu taşımayan 49 olgu arasından seçilen 15 olgu olmak üzere toplam 20 olguya ait parafin bloklardan tek hücre süspansiyonları elde edilerek 10q23/*PTEN* delesyonları FISH analizi ile incelendi. Ayrıca malign karakter içermeyen 10 normal beyin dokusuna kontrol cut off (eşik değeri) değerini elde etme amacıyla FISH analizi uygulandı.

Olguların histopatolojik tanıları, yaşları, cinsiyetleri ve sağ kalım süreleri hasta dosyalarından ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.



Resim 1. GBM'li olguların biyopsi kesitlerinden Hematoksilen-eosin boyama ile hazırlanan histopatolojik görüntüleri, **A.** Nekroz çevresinde palizat (10X büyütme), **B.** Mitotik figür (40X büyütme), **C-D.** Damar proliferasyonları (10X büyütme).

6.1.Klinik Bulgular

6.1.1. Çalışma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri

Araştırma grubumuzda dizi analizi yapılan 54 olgunun yaşları 31-82 arasında değişmekteydi. Kadınların yaş ortalaması 54 ve erkeklerin yaş ortalaması 55 olup bu olguların 18' i kadın (%33.3) ve 36' sı erkek (%66,6) olarak saptandı (Tablo 3).

Ayrıca FISH analizi yapılan 20 olgunun yaşları 33-82 arasında değişmekteydi. Kadınların yaş ortalaması 58, erkeklerin yaş ortalaması 63 olup 5' i kadın (%25), 15' i erkek (%75) olarak saptandı (Tablo 3).

Tablo 3. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları

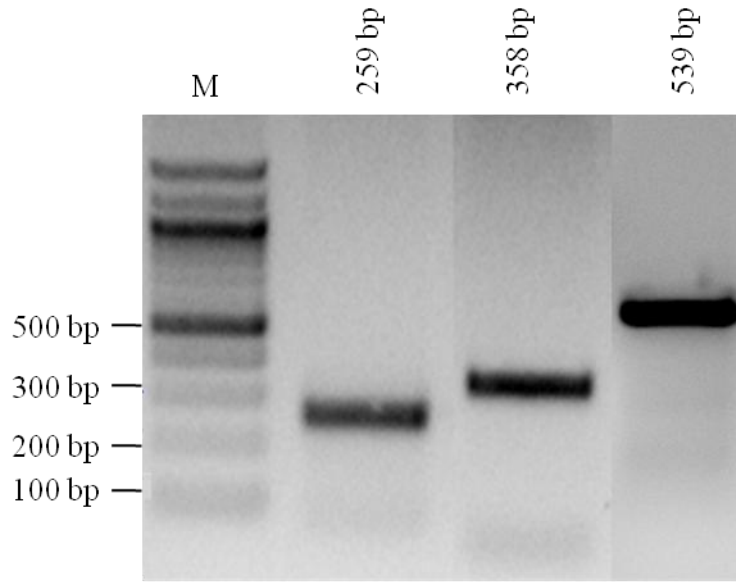
Cinsiyet	Yaş Grubu	n		%	
		Dizi analizi	FISH	Dizi analizi	FISH
Kadın	<39	2	0	3.7	0
	40-49	4	1	7.4	5
	50-59	6	2	11.1	10
	60+	6	2	11.1	10
Toplam		18	5	33.3	25
Erkek	<39	5	3	9.26	15
	40-49	10	1	18.52	5
	50-59	5	0	9.26	0
	60+	16	11	29.6	55
Toplam		36	15	66.7	75
Genel Toplam		54	20	100	100

6.2. *IDH1* Geninde Dizi Analizi ile Mutasyon Taraması

6.2.1. *IDH1* Geninin PCR ile Amplifikasyonu

Araştırma grubuna dahil edilen 54 olgunun tümör örneklerinden elde edilen DNA' lardan *IDH1* geninin 4. ekzonu için tasarlanan primerler ile amplifikasyon gerçekleştirildi.

Dördüncü ekzonun amplifikasyonu sonucunda 259, 358 ve 539 bp'lik ürünler elde edildi (Resim 2).



Resim 2. *IDH1* geni ekzonlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: NEB 100 bp Marker)

6.2.2. DNA Dizi Analizi

Araştırma grubuna dahil edilen 54 olgunun tümör örneklerinden elde edilen genomik DNA' lar ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonrası elde edilen *IDH1* geninin 4. ekzonu, dizilenerek değişimler analiz edildi. Elde edilen DNA dizi analizi sonuçları *IDH1*'in referans dizisi (GenBank kayıt no: NC_000002.11) ile karşılaştırıldı. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda; 54 olgunun 11' inde heterozigot değişiklik gözlemlendi (Tablo 4) 11 heterozigot değişikliğin altısı daha önce tanımlanmış olan c.315C>T SNP' lere karşılık gelmektedir (rs11554137). Diğer beş olgu (5/54; %9.3) ise bilinen c.395G>A

değişimi olup bu değişim herhangi bir SNP' e karşılık gelmemekle birlikte, bu IDH1 proteininin 132. pozisyonundaki argininin histidine dönüşümüne (p.R132H) neden olmaktadır (Resim 3).

Tablo 4. *IDH1* geni 4. ekzonu üzerinde görülen değişimler

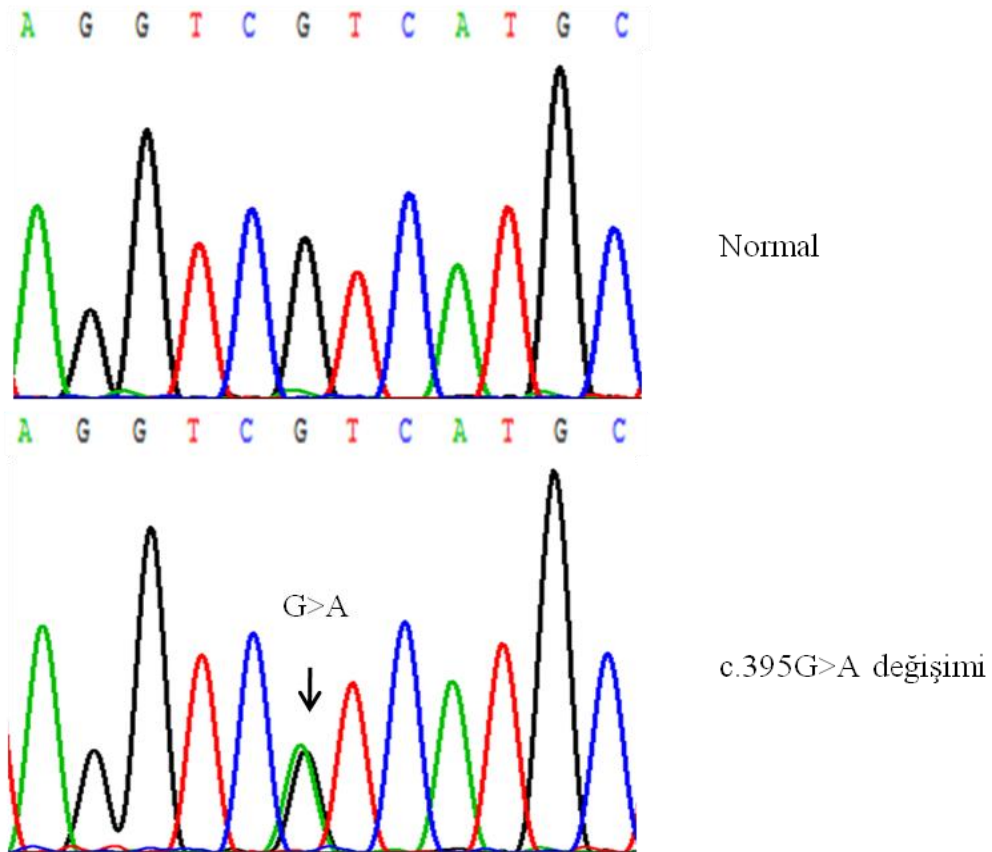
DNA No.	Sağ kalım (ay)	Yaş	Cins.	Ekzon	Nükleotid değişimi
5003	20	43	K	Ex-4	c.395G>A (p.R132H)
5004	5	62	K	Ex-4	c.315C>T (p.G105G) rs11554137
5005	N	31	K	Ex-4	---
5008	1	82	E	Ex-4	c.315C>T (p.G105G) rs11554137
5009	17	69	E	Ex-4	c.315C>T (p.G105G) rs11554137
5010	N	61	E	Ex-4	---
5011	N	52	E	Ex-4	---
5012	N	59	K	Ex-4	---
5013	N	47	E	Ex-4	---
5014	4	68	E	Ex-4	---
5015	N	49	K	Ex-4	---
5016	N	45	E	Ex-4	---
5018	N	50	K	Ex-4	---
5025	N	70	K	Ex-4	---
5028	5	69	E	Ex-4	---
5029	N	67	K	Ex-4	---
5030	15	55	K	Ex-4	---
5034	20	70	K	Ex-4	---
5037	N	44	K	Ex-4	c.315C>T (p.G105G) rs11554137
5042	5	75	E	Ex-4	---
5043	N	62	E	Ex-4	---
5044	6	76	E	Ex-4	---
5045	N	72	K	Ex-4	---
5046	N	50	E	Ex-4	---
5050	N	50	E	Ex-4	c.315C>T (p.G105G) rs11554137
5056	7	79	E	Ex-4	c.395G>A (p.R132H)
5058	9	59	K	Ex-4	---
5060	7	74	E	Ex-4	---
5061	N	65	E	Ex-4	c.315C>T (p.G105G) rs11554137
5062	1	77	E	Ex-4	---
5063	16	60	E	Ex-4	---
5064	N	61	E	Ex-4	---
5065	N	33	E	Ex-4	---
5066	N	49	K	Ex-4	---
5067	3	65	E	Ex-4	---
5070	N	41	E	Ex-4	---
5072	N	48	E	Ex-4	---
5073	N	50	K	Ex-4	---
5075	N	71	E	Ex-4	---
5076	N	50	E	Ex-4	---
5078	5	49	E	Ex-4	---
5090	2	36	E	Ex-4	c.395G>A (p.R132H)

Tablo 4' ün devamı

5095	24	33	E	Ex-4	c.395G>A (p.R132H)
5103	N	41	E	Ex-4	---
5113	N	37	E	Ex-4	---
5123	N	45	E	Ex-4	---
5125	N	50	K	Ex-4	---
5128	7	38	E	Ex-4	c.395G>A (p.R132H)
5132	N	50	E	Ex-4	---
5135	N	35	K	Ex-4	---
5136	N	45	E	Ex-4	---
5137	N	41	E	Ex-4	---
5140	N	60	K	Ex-4	---
5145	N	45	E	Ex-4	---

N: Bilgilerine ulaşamayan olgular

---: *IDH1* geninde değişim saptanmayan olgular



Resim 3. *IDH1* geninde tanımlanan c.395G>A mutasyonlu bir olguya ait kromatogram. Üst panel; normal olgu, alt panel; heterozigot mutant olgu

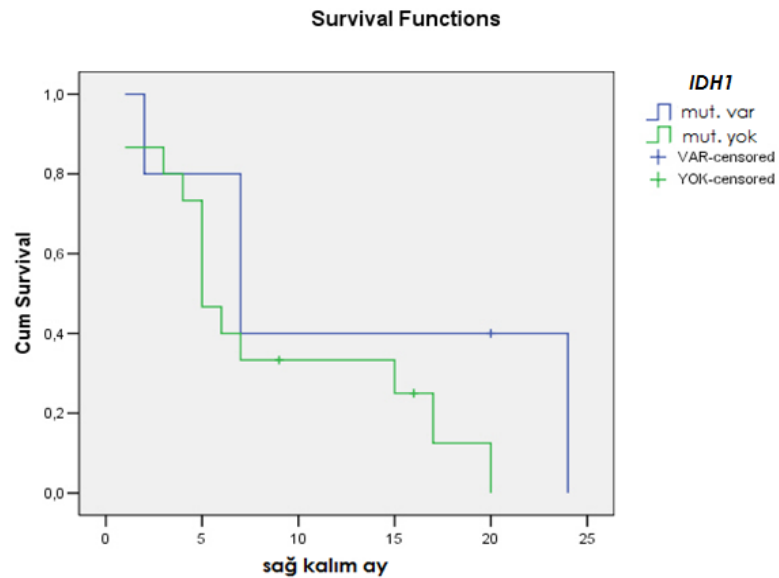
IDH1 c.395G>A mutasyonunu taşıyan olguların yaş ortalaması 46 iken bu mutasyonu taşımayan olguların yaş ortalaması 56 olarak saptandı. Yapılan Mann

Whitney istatistik analizi sonucunda bu mutasyonu taşıyan ve taşımayan olguların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (P=0.078) (Tablo 5).

IDH1 c.395G>A mutasyonu ile sağ kalım arasındaki ilişkinin varlığını anlayabilmek için; sadece c.395G>A mutasyonunu taşıyan olgular ile bu mutasyonu taşımayan olgular arasından seçilen 15 olgunun (FISH analizi yapılan 20 olgu) sağ kalım bilgilerine ulaşıldı ve 20 olgu değerlendirmeye alındı. Bu 20 olgunun sağ kalım süreleri ayrı ayrı Kaplan-Meier metodu ile (Log-Rank Test) değerlendirildi. *IDH1* c.395G>A mutasyonunu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 12 ay iken, bu mutasyonu taşımayan olgularda 8 ay olarak saptandı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir fark elde edilemedi (Log Rank, P= 0.169) (Şekil 7).

Tablo 5. *IDH1* c.395G>A mutasyonunu taşıyan ve taşımayan olguların yaş ilişkileri

	c.395G>A mutasyonlu	c.395G>A mutasyonsuz
Olgu sayısı	5/54	49/54
Ort. yaş	46	56



Şekil 7. *IDH1* c.395G>A mutasyonu taşıyan ve taşımayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım grafiği

6.3. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) analizi

Dizi analizi sonucunda c.395G>A mutasyonunu taşıyan tüm olgular (n=5) ve bu mutasyonu taşımayan 49 olgu arasından seçilen 15 olgu araştırma grubuna dahil edilerek toplam 20 olgunun tümör örneklerinden elde edilen tek hücre süspansiyonuna 10q23/*PTEN* lokusuna özgü prob ile FISH analizi uygulandı. FISH analizlerinde kullanılacak cut off değerini saptamak amacıyla malign hücre içermeyen 10 normal beyin dokusundan elde edilen tek hücre süspansiyonuna 10q23/*PTEN* lokusuna özgü prob ile FISH analizleri yapılarak her bir doku için 200 hücre sayıldı. Analizi yapılan 10 normal olguda görülen değişimlerin (monozomi 10, homozigot ve hemizigot delesyon) ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak cut off değeri (ort+ 3Std Sapma) belirlendi. GBM' li olguların FISH analizi sonuçları, kontrol grubundan elde edilen cut off değeri (Tablo 6) referans alınarak değerlendirildi.

Yapılan FISH analizi sonucunda; 20 olgunun 12' sinde (%60) 10q23/*PTEN* kaybı gözlemlendi. (Tablo 7). Bu değişimlerden 4' ü (%20) 10. kromozomun monozomisi ve 8' i (%40) hemizigot 10q23/*PTEN* delesyonu idi.

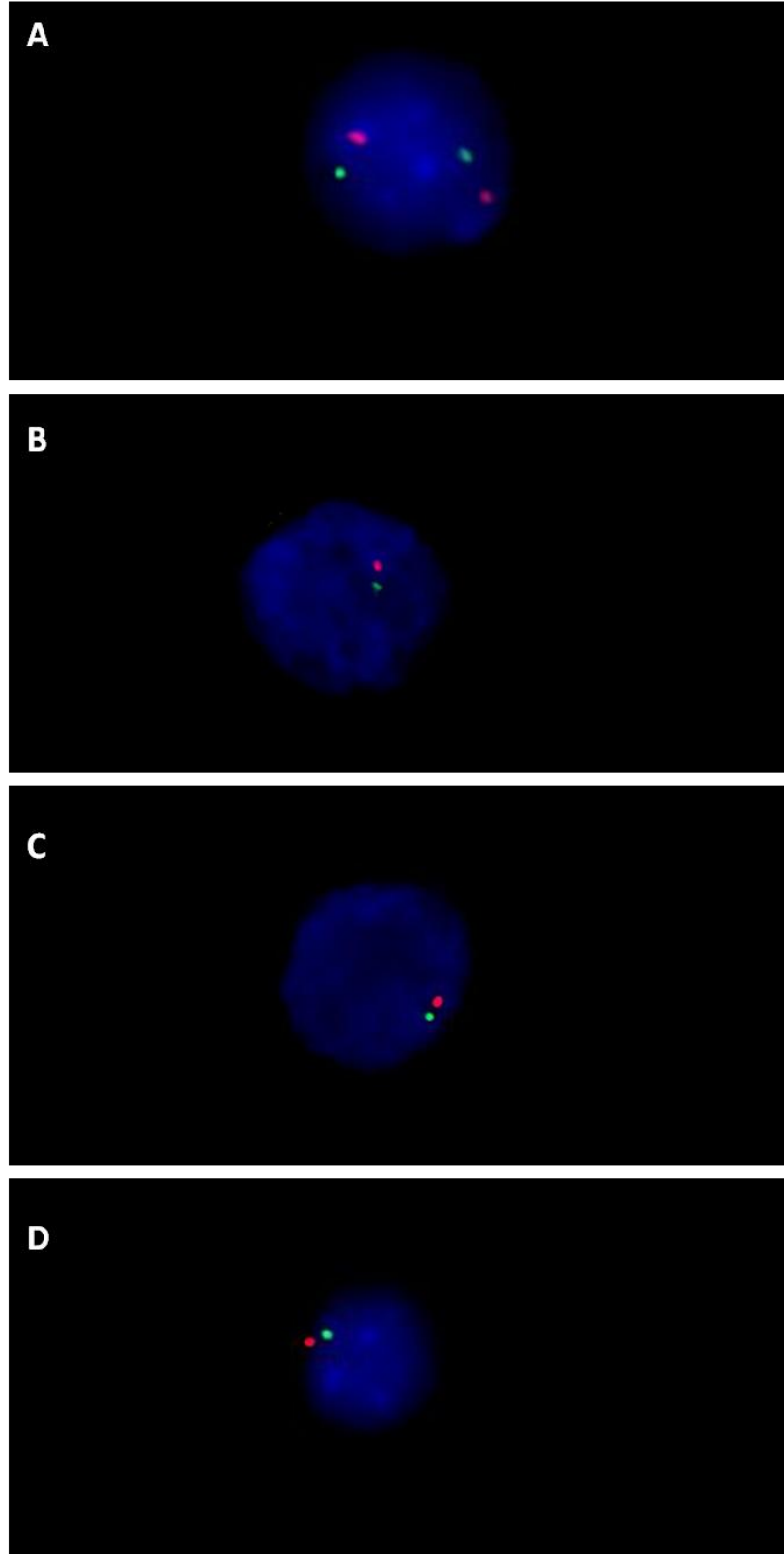
Tablo 6. Normal beyin dokusundan elde edilen Cut off değerleri

Örnek No	Monozomi 10	10q23/ <i>PTEN</i> Homozigot Delesyonu	10q23/ <i>PTEN</i> Hemizigot Delesyonu
K-PTEN 1	0	0	1
K-PTEN 2	0	0	3
K-PTEN 3	6	1	3
K-PTEN 4	0	1	5
K-PTEN 5	0	3	6
K-PTEN 6	0	0	2
K-PTEN 7	2	0	6
K-PTEN 8	2	0	5
K-PTEN 9	1	1	6
K-PTEN 10	1	1	2
Ort.	1.2	0.7	3.9
Std Sapma	1.8	0.9	1.9
3XStd. Sapma	5.6	2.8	5.7
Cut off (ort+ 3Std Sapma)	6.8	3.5	9.6

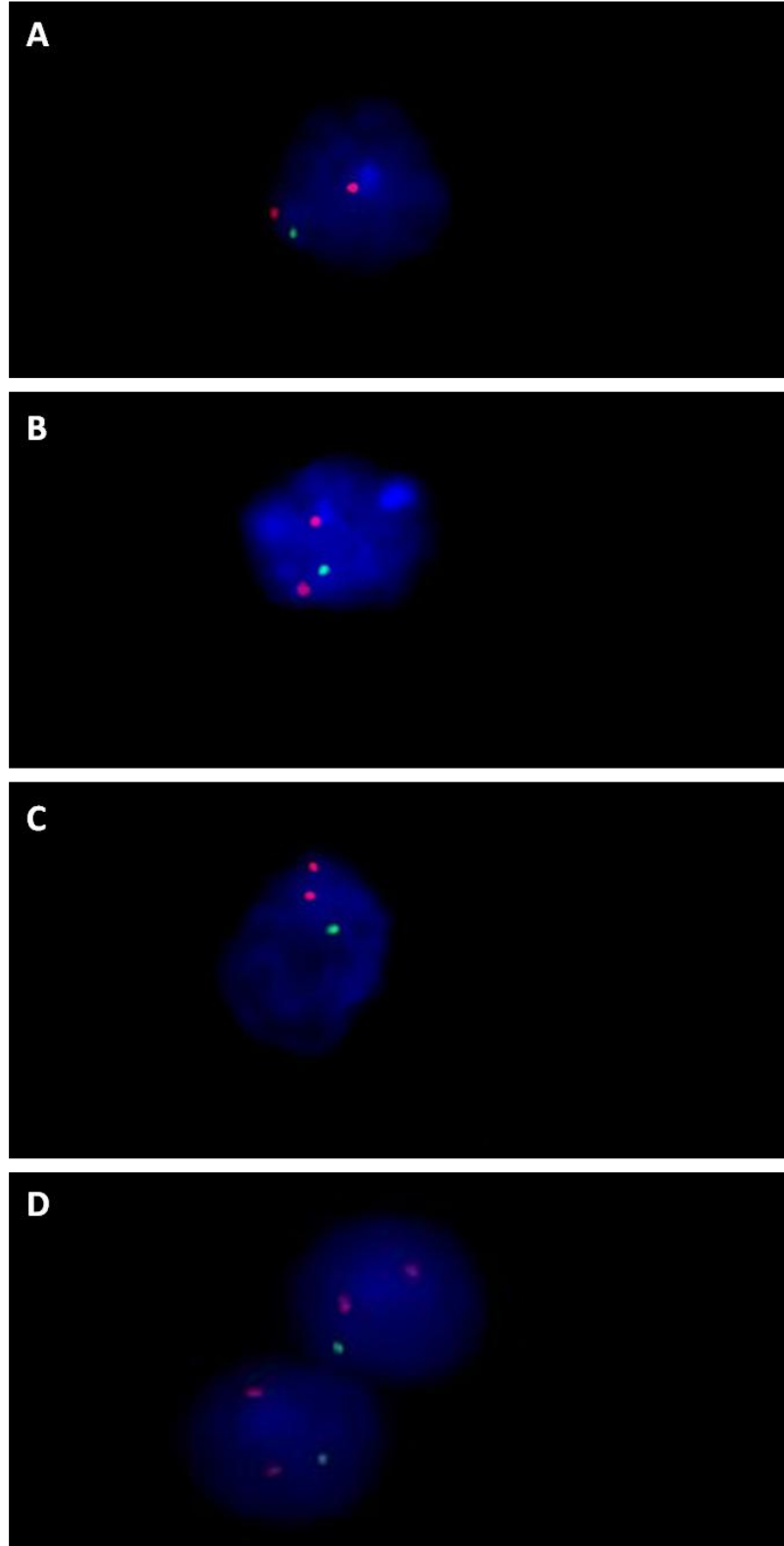
Tablo 7. 10q23/*PTEN* lokusunda görülen değişimler

Hasta No	Sağ kalım (ay)	Yaş	Cins.	Monozomi 10	Homozigot 10q23/ <i>PTEN</i> Delesyonu	Hemizigot 10q23/ <i>PTEN</i> delesyonu	10q23/ <i>PTEN</i> değişimi
GBM-F-1	15	55	K	0	4	16	Hemizigot delesyonu
GBM F2	4	68	E	13	0	9	Monozomi 10
GBM F3	1	77	E	0	0	2	Normal
GBM F4	16	60	E	8	6	4	Monozomi 10
GBM F5	5	62	K	2	3	11	Hemizigot delesyonu
GBM F6	17	69	E	3	0	9	Normal
GBM F7*	20	43	K	0	0	15	Hemizigot delesyonu
GBM F8	3	65	E	6	1	21	Hemizigot delesyonu
GBM F9	6	76	E	4	0	4	Normal
GBM F10	7	74	E	2	2	7	Normal
GBM F11	5	49	E	2	0	8	Normal
GBM F12	20	70	K	1	4	14	Hemizigot delesyonu
GBM F13*	2	36	E	1	0	2	Normal
GBM F14*	24	33	E	2	0	3	Normal
GBM F15	5	69	E	32	1	1	Monozomi 10
GBM F16*	7	79	E	3	0	17	Hemizigot delesyonu
GBM F17	5	75	E	0	1	12	Hemizigot delesyonu
GBM F18*	7	38	E	3	1	16	Hemizigot delesyonu
GBM F19	9	59	K	10	0	2	Monozomi 10
GBM F20	1	82	E	0	0	6	Normal

*: *IDH1* c.395G>A mutasyonu taşıyan olgular



Resim 4 Olgulara ait FISH görüntüleri **A.** GBM F6 olgusuna ait normal interfaz hücresi. **B-D.** GBM F4, F15, F19 olgularına ait interfaz hücresinde monozomi 10. (*PTEN* ; yeşil sinyal; CEN 10; kırmızı sinyal)



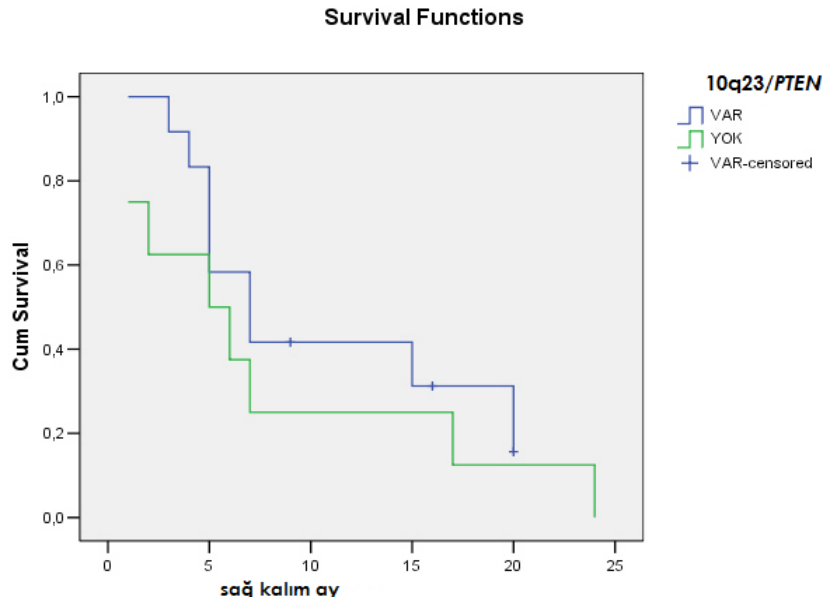
Resim 5. Olgulara ait FISH görüntüleri **A-D**. GBM F7, F8, F16 ve F18 olgularına ait interfaz hücresinde hemizigot 10q23/*PTEN* delesyonu (*PTEN* ; yeşil sinyal; CEN 10; kırmızı sinyal)

10q23/*PTEN* lokus kaybı taşıyan ve taşımayan olguların yaş ortalaması ayrı ayrı 62 olarak saptandı. Her iki gruptaki yaş ortalamaları aynı olduğundan anlamlılık testi uygulanmadı (Tablo 8).

10q23/*PTEN* lokus kaybı taşıyan olguların sağ kalım süreleri 10 ay, 10q23/*PTEN* lokus kaybı taşımayan olguların sağ kalım süreleri ise 8 ay olarak saptandı. 10q23/*PTEN* lokus kaybı taşıyan olgular ile taşımayan olguların sağ kalım süreleri ayrı ayrı Kaplan-Meier metodu ile (Log-Rank Test) değerlendirildi ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Log Rank, $P=0,404$) (Tablo 8, Şekil 8).

Tablo 8. GBM tümör örneklerindeki 10q23/*PTEN* lokus kaybı oranları ve sağ kalım süreleri ile ortalama yaşları.

	10q23/ <i>PTEN</i> kaybı taşıyan olgular (%)	10q23/ <i>PTEN</i> kaybı taşımayan olgular (%)
Olgu sayısı	12/20 (%60)	8/20 (%40)
Ortalama yaş (yıl)	62	62
Ortalama sağ kalım süresi (ay)	10	8



Şekil 8. 10q23/*PTEN* kaybı taşıyan taşıyan ve taşımayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım grafiği.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından IV. derece olarak sınıflandırılan Glioblastoma multiforme (GBM) astrosit hücrelerinden köken alan, hızlı seyirli tümörlerden biri olup tüm primer beyin tümörlerinin dörtte birini oluşturmaktadır. GBM' ler histopatolojik, klinik ve genetik açıdan astrositik hücrelerden *de novo* gelişen primer glioblastoma ve düşük dereceli (WHO II. derece) ya da anaplastik astrositomaların (WHO III. derece) hem daha yavaş ilerlemesi hem de daha malign hale geçmesiyle gelişen sekonder glioblastoma olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır (3, 6, 25).

Son yıllarda beyin tümörü genetiğinde önemli çalışmalar yapılmakta olup özellikle tanı, tedavi ve hasta sağ kalımına etkili olan moleküler markırlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu markırlardan *IDH1* sekonder GBM' ler için önemli bir tanı kriteri haline gelmiştir. Kanserdeki rolü daha önceleri tam olarak bilinmezken 2008 yılında Parsons ve arkadaşlarının GBM' li olgularda *IDH1* mutasyonlarının varlığını göstermesiyle, bu gen üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır (13, 25).

Kromozom 2q33.3' de lokalize 10 ekzonlu olan *IDH1* geni tarafından kodlanan IDH1 enzimi, izositratı α -ketoglutarata dönüştürmekte ve bu reaksiyonda NADPH' ın oluşumunu sağlamaktadır. Ayrıca lipid metabolizması, glukoz toleransı ve ürettiği NADPH sayesinde oksidatif hasarın hücresel kontrolünde rol oynamaktadır (52, 56).

Pek çok çalışmada, *IDH1* mutasyonlarının, hücresel metabolik fonksiyonlarda anahtar rol oynayan IDH1 enziminin substratını bağlama bölgesi olan ve evrimsel olarak korunmuş 132. kodonu (R132) etkilediği gösterilmiştir.

Literatürde GBM' li olgularda bildirilen *IDH1* mutasyonları; heterozigot, somatik c.C395G>A (p.R132H) nükleotid değişimi şeklindedir (10, 13, 41, 64, 68). Dang ve arkadaşları, *IDH1* R132 mutasyonlarının, enzime yeni bir özellik kazandırarak α -KG' ın 2HG' a indirgendini göstermişlerdir (11, 52, 60, 61). 2-HG, α -KG' ın yarışmalı inhibitörü olarak davranarak HIF1- α ' yı parçalayan enzimlerin inaktivasyonuna sebep olmaktadır. HIF1- α düşük oksijen seviyesinde tümör gelişimini kolaylaştıran bir transkripsiyon faktörüdür (25, 52, 62). Zhao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *IDH1* knockdown iken HIF1- α protein seviyesinin yüksek, yabancı tip IDH1' in

overekspresyonu sonucu ise HIF1- α protein seviyesinin düşük olduğunu göstermişlerdir (60). Bu sonuçlar, IDH1' in α -KG 'ı kontrol ederek HIF1- α seviyesini düzenlediğini göstermektedir (11, 25, 52, 54, 62). Yapılan çalışmalara rağmen IDH1 R132 mutasyonlarının tümörigenezdeki rolü tam olarak aydınlatılamamış olup p.R132H mutasyonunun 132. kodonu etkileyen diğer mutasyonlara göre daha etkili olduğu ve α -KG' ı daha hızlı azaltığı bildirilmektedir (11).

Yapılan birçok çalışmada 132. kodonu etkileyen IDH1 mutasyonu taşıyan olguların taşımayanlara nazaran daha genç yaşta oldukları ve sağ kalım sürelerinin anlamlı şekilde daha uzun olduğu gösterilmektedir (10, 12, 13, 25, 41, 65).

R132' yi (132. kodonu) etkileyen bir mutasyon varlığında NADP⁺-bağımlı IDH1' in yabancı aktivitesinin azaldığı ve NADPH' ı, 2-HG üretmek için kullandığı çalışmalarla gösterilmektedir (59-61). Oksijen radikallerini temizleme ve detoksifikasyon gibi süreçlerde rol oynayan ve radyo- ve kemoterapi gibi oksidatif strese karşı koruyucu bileşik olan NADPH' ın seviyesinin azalması, oksidatif strese karşı direncin azalmasına neden olmaktadır. Bu durum normalde radroterapi ve kemoterapiye direnç gösteren GBM olgularının IDH1 mutasyonu taşıdıkları durumlarda neden daha uzun sağ kalım gösterdiğini açıklayabilmektedir (10).

Literatürde IDH1 mutasyon oranını; Ichimura ve ark. %6 (12), Sonoda ve ark. %8 (68), Nobusawa ve ark. %8.8 (13), Mellai ve ark. %10 (66), Sanson ve ark. %10.7 (14), Parsons ve ark. ve Krell ve ark. %12 (41, 73), Balss ve ark. %12.3 (63), Yan ve ark. ve Kalkan ve ark. %12.5 (64, 74), Felsberg ve ark. %14.2 (75), Kang ve ark. %16 (76), Gravendeel ve ark. %19 (77), Bleeker ve ark. %20 ve Watanabe ve ark. %30 (10, 65) olarak saptamışlardır. Çalışmalarda tespit edilen IDH1 mutasyonları; 395. pozisyonadaki guanin nükleotidinin adenine dönüşümü olan c.395G>A (p.R132H) şeklindedir. Bu mutasyonun (p.R132H) dışında c.394C>T (p.R132C), c.394C>G (p.R132G), c.394C>A (p.R132S), c.395G>T (p.R132L) mutasyonlarının varlığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (10, 13, 66, 75).

Bazı çalışmalarda primer ve sekonder GBM' lerde görülen mutasyon oranları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Primer GBM' lerdeki IDH1 mutasyon oranını Mellai ve ark. %1.8 (66), Ichimura ve ark., Balss ve ark., Yan ve ark., Sanson ve ark., Sonoda ve ark.,

Watanabe ve ark. Felsberg ve ark. %3-7 (12, 14, 63-65, 68, 75) olarak Parsons ve ark., Bleeker ve ark., Kang ve ark. %11.7-16 (10, 41, 76) olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, sekonder GBM' lerdeki *IDH1* mutasyon oranını ise %50-88 olarak tespit etmişlerdir (10, 12-14, 41, 63-66, 68, 73-77). *IDH1* mutasyonunun özellikle sekonder GBM' ler için önemli markır olduğu literatürde belirtilmektedir (13).

Çalışmamızda, olgular primer ve sekonder ayrımı yapılmadan çalışmaya dahil edilmiş olup 54 GBM olgusunda *IDH1* geninin 4. ekzonu dizi analizi yöntemiyle sekanslanmış ve bulgular literatür ile karşılaştırılmıştır (Tablo 9). Analizi yapılan 54 olgunun 5' inde (%9.3) c.395G>A (p.R132H) mutasyonu saptanmıştır. Elde ettiğimiz oran literatür (%6-30) ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Literatürde pek çok çalışmada 132. kodonu etkileyen mutasyonları taşıyan GBM olgularının bu mutasyonları taşımayanlara göre daha genç yaşta olduğu tespit edilmiştir. Parsons ve ark., Balss ve ark., Ichimura ve ark., Sonoda ve ark., Nobusawa ve ark., Yan ve ark., Watanabe ve ark., Felsberg ve ark., Mellai ve ark. ve Kalkan ve ark., *IDH1* geninde mutasyon taşıyan olguların (ort. 32-47.9 yaş), taşımayanlara göre (ort. 52-61,5 yaş) daha genç yaşta olduğunu saptamışlardır (12, 13, 41, 63-66, 68, 74, 75, 77).

Çalışmamızda *IDH1* mutasyonu taşıyan olguların yaş ortalaması 46 iken taşımayanların 56 olduğu saptanmıştır. Bu bulgu literatür ile uyumlu olarak bulunmuştur.

IDH1 mutasyonları ve olguların sağ kalım sürelerinin ilişkilendirilmesi ile ilgili çalışmalarda; Parsons ve ark., Yan ve ark., Sanson ve ark., Sonoda ve ark., Nobusawa ve ark., Gravendeel ve ark. ve Kalkan ve ark. mutasyonu taşıyan olguların (ort. 19-66 ay) taşımayanlara göre (ort. 7-17 ay) daha uzun sağ kalım gösterdiklerini bildirmişlerdir (13, 14, 41, 64, 68, 74, 77).

Çalışmamızda *IDH1* mutasyonu taşıyan olguların sağ kalım süreleri 12 ay, taşımayanların ise 8 ay olduğu tespit edilmiş olup, mutasyonlu olguların daha uzun sağ kalım gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç literatürle uyumlu olarak bulunmuştur .

Çalışma grubumuzda mutasyonu taşıyan ve taşımayan olguların yaş ve sağ kalım ilişkilerini belirlemek için yapılan istatistiksel analizlerde *IDH1* c.395G>A mutasyonu

taşıyan GBM' li olguların az sayıda olmasından dolayı olguların hem yaş hem de sağ kalım süreleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo 9 Çalışmamızdaki *IDH1* mutasyonlarının literatür ile karşılaştırılması

Çalışmalar	IDH1 mutasyon oranı			IDH1 mut. tipi	Ort. yaş		Ort. sağ kalım (ay)	
	Primer GBM (%)	Sekonder GBM (%)	Toplam (%)		Mutasyon		Mutasyon	
					+	-	+	-
Balss ve ark. (2008)	7	88	12.3	p.R132H	40	52	-	-
Parsons ve ark. (2008)	-	-	12	p.R132H	33	53	44	13
Yan ve ark. (2009)	5	85	12.5	p.R132H	32	59	31	15
Sanson ve ark. (2009)	6	77	10.7	p.R132H	-	-	27.4	14
Sonoda ve ark. (2009)	5	67	8	p.R132H	35	57	66	17
Watanabe ve ark. (2009)	5	82	30	p.R132H	44.2	56.4	-	-
Kang ve ark. (2009)	16	-	16	p.R132H	-	-	-	-
Bleeker ve ark. (2009)	11.7	73.3	20	p.R132H p.R132C p.R132G p.R132L	-	-	-	-
Nobusawa ve ark. (2009)	-	-	8.8	p.R132H p.R132C p.R132G p.R132S	47.9	60.6	27.1	11.3
Ichimura ve ark. 2009	3	50	6	p.R132H	41	56	-	-
Felsberg ve ark. (2010)	7	81.25	14.2	p.R132H p.R132S	42	60	-	-
Gravendeel ve ark. (2010)	-	-	19	p.R132H p.R132X	-	-	24	7
Mellai ve ark. (2011)	1.8	78.9	10	p.R132H p.R132G	41.5	61.5	-	-
Kalkan ve ark. (2011)	-	-	12	p.R132H	41	57	19	16
Krell ve ark. (2011)	-	-	12	p.R132H	-	-	-	-
Çalışmamız (2012)	-	-	9.3	p.R132H	46	56	12	8

-: Bilgi elde edilemedi

Çalışmamızın ikinci kısmında *IDH1* p.R132H mutasyonu bulunduran GBM' li olgular ve bu mutasyonu bulundurmayan 49 olgu arasından seçilen 15 olgu ile toplam 20 olgu, 10q23/*PTEN* lokusu açısından FISH analizi ile değerlendirilmiş ve bulgular literatür ile karşılaştırılmıştır (Tablo 10).

10. kromozomun uzun kolunun 23. bölgesinde (10q23) bulunan *PTEN* tümör süpresör geni, protein tirozin fosfataz ailesine ait hem protein hem lipid fosfataz özellikte olup dual bir fosfatazı kodlamaktadır. *PTEN* hücre yaşlanması, apoptoz, hücre döngüsünün devamı, hücre proliferasyonu, hücre göçü, DNA hasarına cevap gibi pek çok hücrel fonksiyonda rol oynamakta olup tümör süpresör olma özelliğini lipid fosfataz aktivitesi ile hücre döngüsünün ilerlemesini önleyerek gerçekleştirmektedir (15, 16).

GBM' de 10q23/*PTEN* lokus delesyonlarının 40 yaşın üstündeki vakalarda daha sıklıkta görüldüğü tespit edilmiştir (43). Literatürde bildirilen GBM' li olgularda 10q23/*PTEN* kayıpları; homozigot delesyonlar, hemizigot delesyonlar ve 10. kromozomun monozomisi şeklinde görülmektedir (16, 43, 46).

Srividya ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada, FISH analizi ile %42.5 oranında homozigot 10q23/*PTEN* lokus delesyonu saptamış olup hemizigot delesyona rastlamamışlardır. 10q23/*PTEN* homozigot delesyonu taşıyan olguların (ort. 50 yaş), taşımayanlardan (ort. 43 yaş) anlamlı şekilde daha yaşlı olduklarını bulmuşlardır. Ayrıca 45 yaş üstü olguların kötü prognozlu olduğunu, ortalama sağ kalım süresinin (ort. 14 ay), delesyon taşımayan olgulara göre (ort. 24 ay) daha kısa olduğunu bildirmişlerdir (43).

Perry ve ark. yaptıkları çalışmada %41.6 (78) oranında, Dalrymple ve ark. %71 (79) oranında, Horiguchi ve ark. ve Amalfitano ve ark. %76.5 (33, 38) oranında monozomi 10 tespit etmişlerdir. Horiguchi ve ark. monozomi 10 ve kötü prognoz arasında anlamlı bir ilişki bulmazken Perry ve ark. anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (33, 78).

Korshunov ve ark. 2005 yılında, 189 GBM olgusunda FISH analizi ile %59 oranında 10q23/*PTEN* delesyonu tespit etmiş, bu olguların 60' ında monozomi 10, 51' inde hemizigot delesyon saptamışlardır. Çalışmalarında homozigot delesyona

rastlamamışlardır. 10q23/*PTEN* delesyonu gösteren olguların 40 yaşın üstünde ve sağ kalım sürelerinin dikkate değer şekilde kısa olduğunu belirtmişlerdir (46).

Çalışmamızda FISH analizi sonucunda; 20 olgunun 12' sinde (%60) 10q23/*PTEN* kaybı gözlenmiş, bu değişimlerden 4' ünün (%20) 10. kromozomun monozomisi ve 8' inin (%40) hemizigot 10q23/*PTEN* delesyonu olduğu gösterilmiştir. Tespit ettiğimiz monozomi 10 oranının Korshunov ve ark., (46) Horiguchi ve ark., (33) Dalrymple ve ark., (79) Perry ve ark. (78) ile Amalfitano ve arkadaşlarının (38) buldukları oranlara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Çalışmamızda homozigot 10q23/*PTEN* delesyonuna rastlanmamıştır.

10q23/*PTEN* lokus kaybı taşıyan ve taşımayan olguların yaş ortalaması 62 olarak saptanmış olduğundan istatistiksel anlamlılık testi uygulanmamıştır. 10q23/*PTEN* lokus kaybı taşıyan olguların sağ kalım süreleri 10 ay, taşımayan olguların sağ kalım süreleri ise 8 ay olarak saptanmış olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Log Rank, P= 0,404).

Tablo 10. Çalışmamızdaki 10q23/*PTEN* değişimlerinin literatür ile karşılaştırılması

Çalışmalar	10q23/ <i>PTEN</i> değişimi (%)		
	Monozomi 10	10q23/ <i>PTEN</i> Homozigot delesyonu	10q23/ <i>PTEN</i> Hemizigot delesyonu
Srividya ve ark. (2010)	-	42.5	-
Dalrymple ve ark. (1995)	71	-	-
Perry ve ark. (1997)	41.6	-	-
Horiguchi ve ark. (1999)	76.5	-	-
Amalfitano ve ark. (2000)	76.5	-	-
Korshunov ve ark. (2005)	32	-	27
Çalışmamız (2012)	20	-	40

-: Bilgi elde edilemedi

IDH1 mutasyonu ve kromozom 10' daki değişimlerinin birbirleriyle ilişkilendirilmesinde literatürde, Sanson ve ark. (14) 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *IDH1* mutasyonlarının yokluğu ile 10. kromozomun monozomisi arasında güçlü bir ilişki olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda monozomi 10 gördüğümüz 4 olguda *IDH1* mutasyonu bulunamamıştır. Olgu sayısının az olması nedeniyle çalışmamızda böyle bir ilişki varlığı gösterilememiştir.

8. SONUÇLAR

Yaygın bir glial tümör olan Glioblastoma Multiforme' nin genetik etiolojisinin belirlenmesine katkı sağlamayı amaçlayan çalışmamız kapsamında, 54 olgu DNA dizi analizi ile, *IDH1* p.R132H mutasyonunu taşıyan tüm olgular ve bu mutasyonu taşımayan olgular arasından seçilen 15 olgu olmak üzere toplam 20 olgu FISH analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda şu sonuçlara varılmıştır.

1. *IDH1* geni mutasyon taraması sonucunda 5 heterozigot c.395G>A (p.R132H) mutasyonu tespit edilmiştir. Çalışmamızda olgular primer ve sekonder ayrımı yapılmadan çalışmaya dahil edilip *IDH1* c.395G>A (p.R132H) mutasyon frekansı %9.3 olarak bulunmuştur.

2. *IDH1* R132 mutasyonlarının dokuya spesifik olması ve yüksek dereceli gliomların gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmesine karşın, *IDH1* mutasyonlarının biyolojik fonksiyonu hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bilgiler ışığında metabolik yolda önemli bir enzimi kodlayan *IDH1* geninin sadece mutasyon tespiti değil, yoldaki etkisi ve tümörigenezdeki rolünün aydınlatılması konusunda daha geniş olgu gruplarını içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

3. Çalışmamızın klinik kısmında, hasta dosyalarına ve dosya içeriklerine erişimde yaşanan aksaklıklar nedeniyle özellikle çalışma grubunu oluşturan 54 olgunun tümünün dosyalarına erişilememiş, erişilen dosyalardan ise tüm veriler elde edilememiştir. Bu tür çalışmalarda kliniğin daha çok katkı vermesi gerekmektedir. Bu şekilde hastaların demografik özellikleri, aldığı tedaviler ve sağ kalım sürelerinin doğru bir şekilde elde edilmesi yapılacak çalışmalar açısından çok önemlidir.

4. Parafine gömülü arşiv materyalleri üzerinde çalışmak birçok problemi beraberinde getirmekle birlikte yapılan optimizasyonlarla ürün kalitesi artırılabilir. Bu, hem DNA dizi analizi hem de FISH analizlerinde sorun olarak karşımıza çıkmıştır. En önemli sorun, dokunun fiksasyon sırasında geçirdiği evrelere bağlı olarak görülen DNA' nın kırık olması, PCR amplifikasyonu sonucu zayıf ürün oluşmasına neden olmaktadır. Amplifikasyonun başarıyla gerçekleşmesi için amplifiye edilecek bölgenin kırık olmaması önemlidir. PCR amplifikasyonu için daha kısa ampikon veren primerler seçilerek ürün kalitesi artırılabilir.

5. GBM biyopsi dokularının oldukça küçük olması, deparafinizasyon ve DNA izolasyon aşamalarında bir miktar doku kaybı yaşanması önemli sorunlardandır. Dolayısıyla elde edilen DNA miktarı oldukça az olmuş bu da tüm ekzonların çalışılması düşüncemize engel teşkil etmiştir. Ayrıca dokunun kaliteli ve çok olduğu örneklerden elde edilen DNA' nın daha kaliteli olduğu gözlemlenmiştir.

6. 10q23/*PTEN* lokusuna özgü prob ile yapılan FISH analizi sonucunda 8' i hemizigot, 4' ü 10. kromozomun monozomisi olmak üzere 12 olguda 10q23/*PTEN* kaybı gözlenmiştir.

7. GBM dokusu heterojen ve normal dokuya infiltrate özellikte olduğundan, FISH analizinde neoplastik olmayan hücrelerin sayısının varlığı çift sinyal görmemize neden olabilir. Ayrıca tek hücre süspansiyonunun kalitesi, lam üzerine düşen hücre sayısı da sinyalleri etkileyen faktörlerdendir. Bu nedenle tek hücre süspansiyonları hazırlanırken optimizasyonlar yapılarak (pepsin miktarı ve süresinin değiştirilmesi vs) hücre kalitesi artırılabilir.

8. FISH analizi için parafin bloktan tek hücre süspansiyonu elde edilirken uygun boyutta kesitlerin alınması ile çalışmayı etkileyebilecek artefakt ya da hücrelerin bir araya ya da üstüste gelmesi engellenmiş olur. Bu şekilde doğru hücre analizi gerçekleştirilir.

9. Parafine gömülü materyalden FISH analizi çalışmanın bir diğer zorluğu da DNA' nın degrade olmasına bağlı olarak var olan sinyalleri görememektir. Bunu önlemek için kontrol grubu sayısının fazla tutulması gerekir.

10. *IDH1* mutasyonu ile monozomi 10-10q23/*PTEN* delesyon ilişkilerinin anlaşılabilmesi için daha geniş olgu gruplarının değerlendirilmesi gerekmektedir.

11. Çalışmamızda *IDH1* geninin diğer ekzonlarını çalışmak üzere çalışılan ve/veya yeni arşiv materyallerinden ve kliniğin sağlaması durumunda taze doku materyallerinden DNA dizi ve FISH analizleri yapılmasının çalışmamızda elde edilen verilerin daha da anlam kazanabilmesi için yararlı olacağı düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü (2004-2006). 2004-2006 Yılları Türkiye Kansere İnsidansı,
2. Ali-Osman F (2005). Brain tumors. Humana Press. Totowa, N.J.
3. Hayat M (2011). Tumors of the central nervous system, volume 1 Gliomas: Glioblastoma (Part 1). Springer. New York.
4. 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.
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. Ohgaki H and Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol 170(5): 1445-1453.
7. Ohgaki H and Kleihues P (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci 100(12): 2235-2241.
8. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM and Kleihues P (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res 64(19): 6892-6899.
9. Kleihues P and Ohgaki H (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol 1(1): 44-51.
10. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A and Bardelli A (2009). *IDH1* mutations at residue p.R132 (*IDH1*(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. Hum Mutat 30(1): 7-11.
11. Hayat M (2011). Tumors of the central nervous system, volume 2 Gliomas: Glioblastoma (Part 2). Springer. New York.

12. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT and Collins VP (2009). *IDH1* mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 11(4): 341-347.
13. 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.
14. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih 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.
15. Knobbe CB, Merlo A and Reifemberger G (2002). Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol* 4(3): 196-211.
16. Govender D and Chetty R (2012). Gene of the month: *PTEN*. *J Clin Pathol* 65(7): 601-603.
17. 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 etc.
18. CBTRUS Central Brain Tumor Registry of the United States^ (2003-2008). Report on Primary Brain Tumors in the United States, Chicago
19. Michaud D, Schiff, D., Batchelor, T., (2012). Incidence of primary brain tumors.from <http://www.uptodate.com/contents/incidence-of-primary-brain-tumors>. (Retrieved 01 November 2012.
20. 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.
21. Kernohan JW, Mabon RF and et al. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24(3): 71-75.
22. Ringertz N (1950). Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 27(1): 51-64.
23. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J and Kelly P (1988). Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62(10): 2152-2165.
24. Pfragner R and Freshney RI (2004). Culture of human tumor cells. Wiley-Liss. Hoboken, N.J.

25. Garami M (2011). Molecular Targets of CNS Tumors. Croatia, InTech from <http://www.intechopen.com/books/molecular-targets-of-cns-tumors>.
26. DeAngelis LM and Mellinghoff IK (2011). Virchow 2011 or how to ID(H) human glioblastoma. *J Clin Oncol* 29(34): 4473-4474.
27. Sarkar C, Jain A and Suri V (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46(2): 108-119.
28. Iacob G and Dinca EB (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life* 2(4): 386-393.
29. Kleihues P, Cavenee WK and International Agency for Research on Cancer. (2000). Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press. Lyon.
30. Dobec-Meic B, Pikija S, Cvetko D, Trkulja V, Pazanin L, Kudelic N, Rotim K, Pavliceck I and Kostanjevec AR (2006) Intracranial tumors in adult population of the Varazdin County (Croatia) 1996-2004: a population-based retrospective incidence study. *J Neurooncol* 78, 303-310 DOI: 10.1007/s11060-005-9100-2
31. Ugonabo I, Bassily N, Beier A, Yeung JT, Hitchcock L, De Mattia F and Karim A (2011). Familial glioblastoma: A case report of glioblastoma in two brothers and review of literature. *Surg Neurol Int* 2: 153.
32. Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Shapiro WR, Selker RG, Fine HA, Black PM, Loeffler JS and Linet MS (2001). Cellular-Telephone Use and Brain Tumors. *New England Journal of Medicine* 344(2): 79-86.
33. Horiguchi H, Hirose T, Sano T and Nagahiro S (1999). Loss of chromosome 10 in glioblastoma: relation to proliferation and angiogenesis. *Pathol Int* 49(8): 681-686.
34. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P and Ohgaki H (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(6): 539-543.
35. Ohgaki H and Kleihues P (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(6): 479-489.

36. Murthy SK, DiFrancesco LM, Ogilvie RT and Demetrick DJ (2002). Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma. *Mod Pathol* 15(12): 1241-1250.
37. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P and Ohgaki H (1998). *PTEN (MMAC1)* mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(7): 684-689.
38. Amalfitano G, Chatel M, Paquis P and Michiels JF (2000). Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 116(1): 6-9.
39. Cancer Genome Atlas Research N (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216): 1061-1068.
40. Lino MM and Merlo A (2011). PI3Kinase signaling in glioblastoma. *J Neurooncol* 103(3): 417-427.
41. 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.
42. Nagasaka T, Gunji M, Hosokai N, Hayashi K, Ikeda H, Ito M and Inao S (2007). FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 24(1): 1-5.
43. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, Arivazhagan A, Thennarasu K, Chandramouli BA, Hegde AS and Santosh V (2011). Homozygous 10q23/*PTEN* deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology* 31(4): 376-383.
44. Mao X and Hamoudi RA (2000). Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma multiforme. *Cancer Genet Cytogenet* 122(2): 87-92.

45. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R and Yamada KM (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280(5369): 1614-1617.
46. Korshunov A, Sycheva R and Golanov A (2005). The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer* 104(4): 825-832.
47. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM and Collins VP (1998). Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22(1): 9-15.
48. Kakkar A, Suri V, Jha P, Srivastava A, Sharma V, Pathak P, Sharma MC, Sharma MS, Kale SS, Chosdol K, Phalak M and Sarkar C (2011). Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. *Neurol India* 59(2): 254-261.
49. Ali IU, Schriml LM and Dean M (1999). Mutational spectra of *PTEN/MMAC1* gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 91(22): 1922-1932.
50. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D and Parsons R (1997). Somatic mutations of *PTEN* in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 57(19): 4183-4186.
51. Kloosterhof NK, Bralten LB, Dubbink HJ, French PJ and van den Bent MJ (2011). Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol* 12(1): 83-91.
52. 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.
53. Dang L, Jin S and Su SM (2010). *IDH* mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med* 16(9): 387-397.
54. Yu L, Qi ST and Li ZY (2010). Analysis of isocitrate dehydrogenase-1/2 gene mutations in gliomas. *Chin Med J (Engl)* 123(24): 3697-3705.

55. 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.
56. National Center for Biotechnology Information (2012). IDH1 isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble [Homo sapiens].from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3417>. (Retrieved 01.12.2012).
57. 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.
58. Murugan AK, Bojdani E and Xing M (2010). Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 393(3): 555-559.
59. 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.
60. 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 and Xiong Y (2009). Glioma-derived mutations in *IDH1* dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* 324(5924): 261-265.
61. 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.
62. Prensner JR and Chinnaiyan AM (2011). Metabolism unhinged: *IDH* mutations in cancer. *Nat Med* 17(3): 291-293.

63. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C and von Deimling A (2008). Analysis of the *IDH1* codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116(6): 597-602.
64. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batnisc-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B and Bigner DD (2009). *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360(8): 765-773.
65. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P and Ohgaki H (2009). *IDH1* mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174(4): 1149-1153.
66. Mellai M, Piazzzi A, Caldera V, Monzeglio O, Cassoni P, Valente G and Schiffer D (2011). *IDH1* and *IDH2* mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. *J Neurooncol* 105(2): 345-357.
67. Hartmann C, Meyer J, Balss 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 and 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(4): 469-474.
68. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Suzuki H and Tominaga T (2009). Analysis of *IDH1* and *IDH2* mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci* 100(10): 1996-1998.
69. Celep F (1999) Prostatlı Kanserli Hastalardan Alınan Biyopsi Materyallerinde Kromozomal Düzensizliklerin Doku Kültürü ve FISH Yöntemleriyle Belirlenmesi Doktora tezi Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Trabzon
70. Liehr T (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH) - application guide. Springer. New York.
71. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
72. Technical Manuel; Silver Sequence™ DNA sequencing System. Promega corporation, USA.

73. Krell D, Assoku M, Galloway M, Mulholland P, Tomlinson I and Bardella C (2011). Screen for *IDH1*, *IDH2*, *IDH3*, *D2HGDH* and *L2HGDH* mutations in glioblastoma. PLoS One 6(5): e19868.
74. Kalkan M (2011) Glioblastomalı Olgularda Mutasyon ve Metilasyon Paternlerindeki Değişikliklerin Araştırılması Doktora Tezi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eskişehir
75. Felsberg J, Wolter M, Seul H, Friedensdorf B, Goppert M, Sabel MC and Reifenberger G (2010). Rapid and sensitive assessment of the *IDH1* and *IDH2* mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. Acta Neuropathol 119(4): 501-507.
76. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, Lee JY, Yoo NJ and Lee SH (2009). Mutational analysis of *IDH1* codon 132 in glioblastomas and other common cancers. Int J Cancer 125(2): 353-355.
77. Gravendeel LA, Kloosterhof NK, Bralten LB, van Marion R, Dubbink HJ, Dinjens W, Bleeker FE, Hoogenraad CC, Michiels E, Kros JM, van den Bent M, Smitt PA and French PJ (2010). Segregation of non-p.R132H mutations in *IDH1* in distinct molecular subtypes of glioma. Hum Mutat 31(3): E1186-1199.
78. Perry A, Tonk V, McIntire DD and White CL, 3rd (1997). Interphase cytogenetic (in situ hybridization) analysis of astrocytomas using archival, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and nonfluorescent light microscopy. Am J Clin Pathol 108(2): 166-174.
79. Dalrymple SJ, Herath JF, Ritland SR, Moertel CA and Jenkins RB (1995). Use of fluorescence in situ hybridization to detect loss of chromosome 10 in astrocytomas. J Neurosurg 83(2): 316-323.

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı : 533
Konu:

Tarih: 06.07.2011

Sayın; Arş.Gör.Ceren SÜMER
Tıbbi Biyoloji ABD.

“Glioblastoma Multiforme Genetiğinin Araştırılması” başlıklı etik kurul 2011/80 no’lu tez çalışmasının raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.



Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı: “Glioblastoma Multiforme Genetiğinin Araştırılması”
Çalışmacılar: Arş.Gör.Ceren SÜMER, Prof.Dr.Figen CELEP, Prof.Dr.Havvanur TURGUTALP
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2011/80	Etik Kurul Toplantı Tarihi 04.07.2011	Etik Kurul Toplantı No 2011/17	Etik Kurul Karar No 6
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Faruk AYDIN’ın başkanlığında “Glioblastoma Multiforme Genetiğinin Araştırılması” başlığını taşıyan tez çalışmasının, araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar verilmiştir. (04.07.2011)

Prof.Dr. Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı
Tıbbi Mikrobiyoloji AbD

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : SÜMER, Ceren
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 17/05/1986, TRABZON
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0462 377 79 57
Faks :
E-Posta : cerensmr@gmail.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	:	
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	Halen
Lisans	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	: Trabzon Lisesi	2003

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Araştırma görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2010-halen

YABANCI DİL

İngilizce