

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**GLİAL TÜMÖRLERDE ARHI TÜMÖR SÜPRESÖR
GENİNDE LOH VE METİLYASYON PROFİLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sezin YAKUT

Doktora Tezi

Antalya, 2007

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**GLİAL TÜMÖRLERDE ARHI TÜMÖR SÜPRESÖR
GENİNDE LOH VE METİLASYON PROFİLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sezin YAKUT

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.
(Proje No: 2004.03.0122.005)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orijinalleri ekte sunulmuştur).

1- **Yakut S**, Berker-Karauzum S, Simsek M, Zorlu G, Trak B, Luleci G. Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet*, 2002. 61(1): p. 26-31.

2- Çetin Z, Karaüzüm SB, **Yakut S**, Mihçi E, Baumer A, Wey E, Taçoy Ş, Bağcı G, Lüleci G. M-FISH Applications in Clinical Genetics. *Genet Couns*, 2005. (16)3 : p. 257-68.

3- SB. Karaüzüm, T Bilgen, I Karadogan, **S Yakut**, Z Cetin, A Uğur, G Lüleci. Novel Cytogenetic Findings revealed by Conventional Cytogenetic and FISH Analyses in Leukemia Patients. *Exp Oncol*, 2005. 27(3): p. 229-32.

4- Karaguzel G, Akcurin S, **Yakut S**, Bircan I. An unusual case of chromosome 22q11 deletion syndrome with psychiatric disorder, hypoparathyroidism and precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2006. 19(5): p. 761-4.

5- Dr. Ercan Mihçi, Doç.Dr. Şükran Taçoy, **Arş.Gör. Sezin Yakut**, Dr. Hakan Ongun, Doç.Dr. İbrahim Keser, Doç.Dr. Bahar Kılıçarslan, Prof.Dr. Gülseren Bağcı, Prof. Dr.Güven Lüleci. Maternal origin and clinical findings in a case with trisomy 22. *The Turkish Journal of Pediatrics* dergisinde basım aşamasında.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir. / / 2007

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güven LÜLECI
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Hakan BOZCUK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Uğur ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2007 tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Nurettin OğUZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

1p31 bölgesinde lokalize olan ARHI geni, Ras protoonkogenine % 60 homoloji göstermesine karşın Ras ailesine ait tanımlanmış ilk tümör süpresör genidir. Maternal olarak susturulmuş ve sadece paternal allelden eksprese olan ARHI geninin, başta meme ve over olmak üzere kalp, karaciğer, pankreas ve beyin normal dokularında sürekli sentezlendiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla meme ve over kanserlerinin % 70-80'inde ARHI geninin ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. ARHI geninin glial beyin tümörlerinin gelişimde etkili olup olmadığı ise bilinmemektedir. Bu çalışmada normal beyin dokusunda ekspresyon gösteren ARHI geninin, glial beyin tümörü gelişiminde rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda, 21 glial tümörlü olgunun tümör ve periferik kan örnekleri ile 7 otopside elde edilen normal beyin doku örnekleri incelenmiştir. ARHI gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı RT-PCR tekniği ile değerlendirildiğinde, 21 glial tümör örneğinin 7'sinde (% 33.3) ARHI gen ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Ekspresyon azalmasına neden olabilecek mekanizmalardan biri olan heterozigosite kaybı, 1p31 bölgesinde yer alan D1S207, D1S226, D1S430, D1S488 ve D1S2638 olmak üzere 5 işaretli polimorfik markır kullanılarak fragment analizi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. 21 olgunun 2'sinde (% 9.5) LOH tespit edilmiş olup bu olgular gerçek zamanlı RT-PCR tekniği ile ARHI gen ekspresyonunda azalma gösteren 7 olgunun içerisinde yer almaktadır. Kalan 5 olgunun tümör DNA örneklerinde, ekspresyon azalmasına neden olabilecek bir başka mekanizma olan metilasyon araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarla ARHI geninin promotor bölgesinde 3 farklı CpG adacığı tanımlanmış olup, gen ekspresyon kaybı ile en çok CpG II bölgesi arasında ilişki bulunmuştur. Buradan yola çıkarak CpG II bölgesinin metilasyon profili, 5 olguda COBRA tekniği ve restriksiyon enzim kesimi teknikleri uygulanarak çalışılmıştır. Değerlendirme sonucunda 5 olgunun hiçbirinde *ARHI* geninin promotorundaki CpG adacığı II bölgesinde metilasyon belirlenmemiştir. Bulgularımız, ARHI tümör süpresör geninin ekspresyonundaki azalmanın glial beyin tümörü gelişiminde rol oynayabileceğini ve heterozigosite kaybının bu ekspresyon azalmasından sorumlu mekanizmalardan birisi olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Glial beyin tümörleri, ARHI, LOH, metilasyon

ABSTRACT

Although the ARHI gene, which is localized in the 1p31 chromosomal region, shows 60% homology to the Ras protooncogene, it is the first tumor suppressor gene defined in the Ras family. The maternally silenced ARHI gene that is expressed only from the paternal allele, is known to be constitutively expressed in primarily the normal breast and ovarian tissues, and in normal heart, liver, pancreas, and brain tissues also. Studies have revealed reduction in the ARHI gene expression in 70 to 80% of the breast and ovarian cancers. It is not known yet whether the ARHI gene plays a role in the development of the glial brain tumors or not. This study aimed detection of the role of ARHI gene, which is expressed in the normal brain tissue, in development of the glial brain tumors. In the study, tumor and peripheral blood samples of 21 cases with glial tumor, and normal brain tissue samples obtained from 7 autopsies were investigated. Evaluation of the ARHI gene expression levels by Real time RT-PCR revealed decrease in 7 (33.3%) of the 21 glial tumor samples. Analysis of loss of heterozygosity, which is one of the mechanisms that can lead to decrease in expression, was performed by fragment analysis using 5 labeled polymorphic markers localized in the 1p31 region, namely D1S207, D1S226, D1S430, D1S488, and D1S2638. LOH was detected in 2 (9.5%) of the 21 cases, who were included in the 7 cases who were found to reveal a decrease in the ARHI gene expression by real time RT-PCR. Methylation status, which is another mechanism that can lead to decrease in the ARHI expression, was investigated in the tumor DNA samples of the remaining 5 cases. Studies performed revealed 3 different CpG islands in the promotor region of the ARHI gene, where the CpG region II had the highest relation with the gene expression loss. Thus, the methylation profiles of the CpG region II in these 5 cases were investigated by COBRA technique and restriction enzyme analysis. Evaluation of the results revealed no methylation in the CpG island region II located in the promotor of the ARHI gene in any of the 5 cases studied. Our results revealed that decrease in the ARHI tumor suppressor gene expression may play a role in the glial brain tumor development, and that loss of heterozygosity can be one of the mechanisms responsible for this reduction in the ARHI gene expression.

Key Words: Glial brain tumors ARHI, LOH, methylation

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca yol göstericiliği ve desteği için sayın danışman hocam Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Tez çalışmamda önerileri ile katkıda bulunan ve destek ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Güven LÜLECI'ye,

Tez savunma sınavımda juri üyeliği yapan sayın hocalarıma,

Doktora tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ekibine,

Çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Recai TUNCER, Arş. Gör Dr. Ethem GÖKSU'ya, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. E. İnanç GÜRER'e, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Mustafa BERKER'e, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Uğur ÖZBEK'e ve Arş.Gör. Özden HATIRNAZ'a ve çalışanlarına,

Yoğun çalışma gerektiren doktora sürecinde inançları ve göstermiş oldukları sabır ve destek için tüm aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karsinogeneziste Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler	3
2.1.1. Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Genlerde Meydana Gelen Değişiklikler	3
2.1.2. Onkogenlerin Aktivasyonu	4
2.1.3. Tümör Süpresör Genlerin (TSG) İnaktivasyonu	4
2.1.3.1. Tümörde Heterozigosite Kaybı (LOH)	5
2.1.4. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesinde ve Kontrolünde Görev Alan Genlerdeki Değişiklikler	6
2.1.4.1. Hücre Döngüsünün Kontrolünde Rol Oynayan Proteinler	6
2.1.4.2. Hücre Döngüsünde Yer Alan Kontrol Noktaları	8
2.1.5. DNA Tamirinde Görev Alan Genlerdeki Değişiklikler	8
2.1.6. Epigenetik Mekanizmalar ve İmprinting	9
2.1.6.1. Karsinogeneziste İmprinting	9
2.1.6.2. Karsinogeneziste Epigenetik Mekanizmalar ve DNA Metilasyonu	9
2.2. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi	14
2.2.1. Beyin Tümörü Görülme İnsidansı	14
2.2.2. Beyin Tümörünün Oluşumunu Etkileyen Faktörler	16
2.3. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	18
2.3.1. Glial Tümörler	18
2.3.1.1. Diffüz İnfiltratif Astrositik Tümörler	18
2.3.1.2. Oligodendrioglial Tümörler	22
2.4. ARHI (DIRAS3, NOEY2) Geni	26
2.4.1. ARHI Gen Ekspresyonunun Fenotipik Etkisi	28
2.4.2. ARHI Geninin Tümör Gelişimindeki Rolü	28
2.4.3. ARHI Geninin Sinyal İletimindeki Rolü	29
2.4.4. ARHI Monoallel Ekspresyonu ve ARHI Geninde Ekspresyon Kaybında Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	30
MATERYAL ve METODLAR	
3.1. Periferal Kandan DNA Eldesi	32
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler	32

3.1.2.	İşlemler	33
3.2.	Primer Tümör Dokusundan DNA İzolasyonu	34
3.2.1.	Kullanılan Çözeltiler	34
3.2.2.	İşlemler	35
3.3.	LOH Analizi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	36
3.3.1.	LOH Analizi için Kullanılan Primer Dizileri, PCR Karışımı ve Koşulları	36
3.3.2.	Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi	38
3.3.2.1.	Kullanılan Çözeltiler	38
3.3.2.2.	İşlemler	39
3.3.3.	LOH Analizi	39
3.3.3.1.	Sonuçların Değerlendirilmesi	39
3.4.	COBRA Tekniği ile Metilasyon Analizi	40
3.4.1.	Kullanılan Çözeltiler	40
3.4.2.	İşlemler	41
3.4.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
3.4.3.1.	Metilasyon Spesifik PCR için Kullanılan Primer Dizileri, PCR Karışımı ve Koşulları	46
3.4.3.2.	Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi	47
3.4.3.3.	Amplifikasyon Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	47
3.4.3.4.	Amplifikasyon Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi	48
3.4.3.5.	Sonuçların Değerlendirilmesi	49
3.5.	Primer Tümör Dokusundan RNA İzolasyonu	50
3.5.1.	Kullanılan Çözeltiler	50
3.5.2.	İşlemler	50
3.6.	cDNA Eldesi	52
3.6.1.	Kullanılan Kit	52
3.7.	TaqMan PCR Reaksiyonu	53
3.7.1.	Kullanılan Solüsyonlar	53
3.7.2.	Sonuçların Değerlendirilmesi	55
BULGULAR		
4.1.	Glial Kökenli Beyin Tümörlü Olguların Klinik Değerlendirmesi	56
4.2.	Glial Beyin Tümör Örneklerinde <i>ARHI</i> Geninin Ekspresyon Seviyesi Bulguları	59
4.3.	Glial Beyin Tümör Örneklerinde <i>ARHI</i> Geninde LOH Analizi Bulguları	61
4.4.	Glial Beyin Tümör Örneklerinde <i>ARHI</i> Geninde Metilasyon Analizi Bulguları	62
TARTIŞMA ve SONUÇLAR		65
KAYNAKLAR		72

Ek-1. Yakut S, Berker-Karauzum S, Simsek M, Zorlu G, Trak B, Luleci G. Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet*, 2002. 61(1): p. 26-31.

Ek-2. Çetin Z, Karaüzüm SB, **Yakut S**, Mihçı E, Baumer A, Wey E, Taçoy Ş, Bağcı G, Luleci G. M-FISH Applications in Clinical Genetics. *Genet Couns*, 2005. 16(3) : p. 257-68.

Ek-3. SB. Karaüzüm, T Bilgen, I Karadogan, **S Yakut**, Z Cetin, A Uğur, G Luleci. Novel Cytogenetic Findings revealed by Conventional Cytogenetic and FISH Analyses in Leukemia Patients. *Exp Oncol*, 2005. 27(3): p. 229-32.

Ek-4. Karaguzel G, Akcurin S, **Yakut S**, Bircan I. An unusual case of chromosome 22q11 deletion syndrome with psychiatric disorder, hypoparathyroidism and precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2006. 19(5): p. 761-4.

Ek-5. Dr. Ercan Mihçı, Doç.Dr. Şükran Taçoy, **Arş.Gör. Sezin Yakut**, Dr. Hakan Ongun, Doç.Dr. İbrahim Keser, Doç.Dr. Bahar Kılıçarslan, Prof.Dr. Gülseren Bağcı, Prof. Dr.Güven Luleci. Maternal origin and clinical findings in a case with trisomy 22. *The Turkish Journal of Pediatrics* dergisinde basım aşamasında.

SİMGELER ve KISALTMALAR

LOH	: Heterozigosite Kaybı
LOI	: İmprinting kaybı
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
MPF	: Maturation Promoting Factor
IGF2	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü 2
WT1	: Wilms Tümör 1
M6P	: Manno 6 Fosfat
PEG3	: Paternal Ekspres Gen 3
LOT1	: Lost on Transformation
ARHI	: Ras Homolog Member I
SAM	: S-Adenozilmetionin
DNMT	: DNA Metiltransferaz
MBD	: Methyl CpG Binding Domain
HDAC	: Histon Deasetilaz
SEER	: Surveillance, Epidemiology, and End Results
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
GBM	: Glioblastoma Multiforme
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome Ten
MDM2	: Murine Double Minute 2
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
RB	: Retinoblastoma
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
DMBT1	: Delete Malignant Beyin Tümör 1
MGMT	: O-6-Metilguanin DNA Metiltransferaz
TSA	: Trichostatin A
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Tümör süpresör gen inaktivasyonunda rol oynayan Knudson'ın iki vuruş hipotezi.	5
2.2.	LOH'a neden olan mekanizmalar.	6
2.3.	Transkripsyonun metilasyon ile baskılanmasındaki muhtemel mekanizma.	11
2.4.	Beyin tümörü insidansının cinsiyet ve yaşa bağlı olarak değerlendirilmesi.	14
2.5.	Beyin tümörü histolojik alt gruplarının 1973-2001 yılları arasındaki insidanslarının değerlendirmesi.	15
2.6.	Primer ve sekonder glioblastom gelişiminde rol oynayan genetik faktörler.	22
2.7.	Oligodendriogliomların gelişiminde rol oynayan genetik faktörler.	25
2.8.	<i>ARHI</i> geninin yapısı.	26
2.9.	<i>ARHI</i> , <i>Rap-1A</i> ve <i>H-Ras</i> proteinlerinin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması.	27
2.10.	<i>ARHI</i> proteininin N ve C terminal bölgelerinin homolog proteinlerle karşılaştırılması.	27
3.1.	<i>ARHI</i> geni dizisi üzerinde, kullanılan primerlerin yerleşimi.	44
4.1.	Glial beyin tümörlerindeki <i>ARHI</i> geninin mRNA düzeylerinin Applied Biosystem 7500 SDS yazılım programında analizinden sonra elde edilen bilgisayar çıktısı.	60
4.2.	Glial beyin tümürlü olgulardaki <i>ARHI</i> geninin mRNA düzeyleri.	60
4.3a.	17 no'lu olguda 1S430 bölgesinde gözlenen LOH profili.	62
4.3b.	15 no'lu olguda 1S488 bölgesinde gözlenen LOH profili.	62
4.4.	Glial beyin tümör örneklerindeki <i>ARHI</i> geninin metilasyon profili.	63

TABLULAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	Çeşitli kanser türlerinde metilasyonu tespit edilmiş genler.	13
2.2.	Beyin tümörlü olguların 5 yıllık yaşam süresi, cinsiyeti, yaşı, ırk ve yerleşimlerine göre değerlendirilmesi.	16
2.3.	Beyin tümörü ile ilişkili ailesel sendromlar.	16
2.4.	Epidemiyolojik çalışmalar sonrasında beyin tümörü gelişiminde rol oynadığı düşünülen olası faktörler.	17
2.5.	1p/19q kayıplarına ve p53 mutasyonuna bağlı olarak anaplastik oligodendriogliomların gruplandırılması.	23
4.1.	Gliyal kökenli beyin tümörlü olguların patoloji sonuçları.	56
4.2.	Gliyal kökenli beyin tümörlü olguların cinsiyetleri ve yaşları.	57
4.3.	Gliyal kökenli beyin tümörlü olguların ameliyat Tarihleri ve çıkartılabilen tümör büyüklüğü sonuçları.	58
4.4.	Gliyal kökenli beyin tümörlü olgulara uygulanan adjuvan tedaviler.	59
4.5.	Kromozom 1p31 bölgesindeki 5 mikrosatellit markırı için LOH sonuçları.	61
4.6.	Gliyal beyin tümör örneklerindeki <i>ARHI</i> geninin metilasyon oranları.	63
4.7.	Gliyal beyin tümör örneklerindeki <i>ARHI</i> gen ekspresyon kaybı pozitif olan olguların LOH ve metilasyon analizi sonuçları.	64

GİRİŞ ve AMAÇ

Primer beyin tümörleri tüm kanserlerin % 2'sini oluşturmaktadır. En yaygın beyin tümörleri glial hücrelerden köken alan gliomalar olup, % 44 oranında gözlenmektedir. Glial tümörlerin astrositom, oligodendriogliom, ependimoma ve miks gliom olmak üzere 4 farklı tipi bulunmaktadır. Beyin tümörlerinde genetik anormalliklerden biri 1 nolu kromozomdaki değişikliklerdir. Bu değişiklikler, delesyon ve amplifikasyon gibi kromozomal düzeyde görülebildiği gibi, DNA düzeyinde heterozigosite kaybı (LOH) olarak da ortaya çıkmaktadır. Tümör süpresör genler, resesif konumda fonksiyon kaybına uğrayarak kanserde rol oynamaktadırlar. Bir bireyin kan hücrelerinde tümör süpresör genin heterozigot konumda olması, bu genin halen fonksiyonel olabileceğini gösterirken, tümörlü dokuda bu heterozigotluğun kaybı, tümör süpresör genin fonksiyon kaybını göstermektedir. Bu nedenle tümör süpresör genlerde LOH varlığının araştırılması oldukça önem kazanmaktadır. Beyin tümörlerinden, özellikle oligodendriogliomlarda ve Glioblastoma Multiforme'de (GBM) 1p bölgesinde LOH gözlenmesi, bu bölgede tümör süpresör genlerin var olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, bazı epigenetik mekanizmalar da genin yapısını bozmaksızın tümör süpresör gende, fonksiyonel kayba neden olmaktadır. Bu epigenetik mekanizmalardan biri metilasyon olup, kanserden sorumlu genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu, tümör süpresör gen kaybına, hipometilasyonu ise protoonkogenlerin onkogenik aktivasyonuna neden olmaktadır. Dolayısıyla kanserden sorumlu genlerin promotor bölgelerinin metilasyon profilinin araştırılması ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır.

1p31 bölgesinde lokalize olan ARHI geni maternal olarak susturulmuş olan ve sadece paternal allelden eksprese olan Ras ailesine ait ilk tanımlanan tümör süpresör gendir. ARHI tümör süpresör geninin LOH ve metilasyon ilişkili mekanizmalar ile kaybı şimdiye kadar sadece meme, over, tiroid ve pankreas

tümörlerinde gösterilmiştir. Literatür taramalarında beyin tümörlerinde ARHI geni ile ilgili çalışma yapılmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada, toplam 21 glial tümör örneğinde, ARHI geninin ekspresyon seviyesinin gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile değerlendirilmesi, 1p31 bölgelerine spesifik 5 polimorfik markır kullanılarak LOH analizi yapılması ve LOH belirlenmeyen örneklerde ise ARHI genindeki metilasyon profilinin araştırılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Tümör hücreleri, hızlı ve sınırsız çoğalabilen, çevre dokuya yayılabilen ve özgün mikroçevresinden bağımsız olarak yaşamını devam ettirerek metastatik özellik kazanabilen hücrelerdir. Tümör hücreleri bu özelliklerini hücrenin, canlılığını devam ettirebilmesi, büyümesi ve farklılaşması gibi biyolojik olayları etkileyen pek çok mutasyonun birikmesi sonucu, genetik yapılarının değişmesi ile kazanmaktadır (1).

2.1. Karsinogeneziste Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler

Normal bir hücrenin yaşamsal fonksiyonunda rol oynayan genlerdeki değişiklikler karsinogenezise neden olmaktadır. Bu değişiklikler belirli başlıklar altında toplandığı zaman aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir (2).

- Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin genlerde meydana gelen değişiklikler
- Onkogenlerin aktivasyonu
- Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu
- Hücre siklusunun düzenlenmesinde ve kontrolünde görev alan genlerdeki değişiklikler
- DNA tamirinde görev alan genlerdeki değişiklikler
- Epigenetik mekanizmalar ve imprinting

2.1.1. Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Genlerde Meydana Gelen Değişiklikler

Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü birçok farklı tümör hücresi ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler (3). Bu büyüme faktörleri otokrin ve parakrin yollarla tümör gelişiminde rol oynamaktadırlar (3-5). Eğer bir tümör hücresi, hem büyüme faktörü hem de onun reseptörünü taşıyorsa, kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna 'Otokrin Büyüme Halkası' denir. Normal hücrelerde otokrin büyüme halkası belirli düzenleyici sistemler tarafından kontrol edilirken, kanser hücrelerinde bu denge bozulmuştur (6). Ancak tek bir büyüme

faktörü değil pek çok büyüme faktörü ve reseptörü karsinogeneziste birlikte etki gösterirler. İnvazyon ve metastazın da bu büyüme faktörleri ve reseptörlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı kabul edilmektedir (3-5).

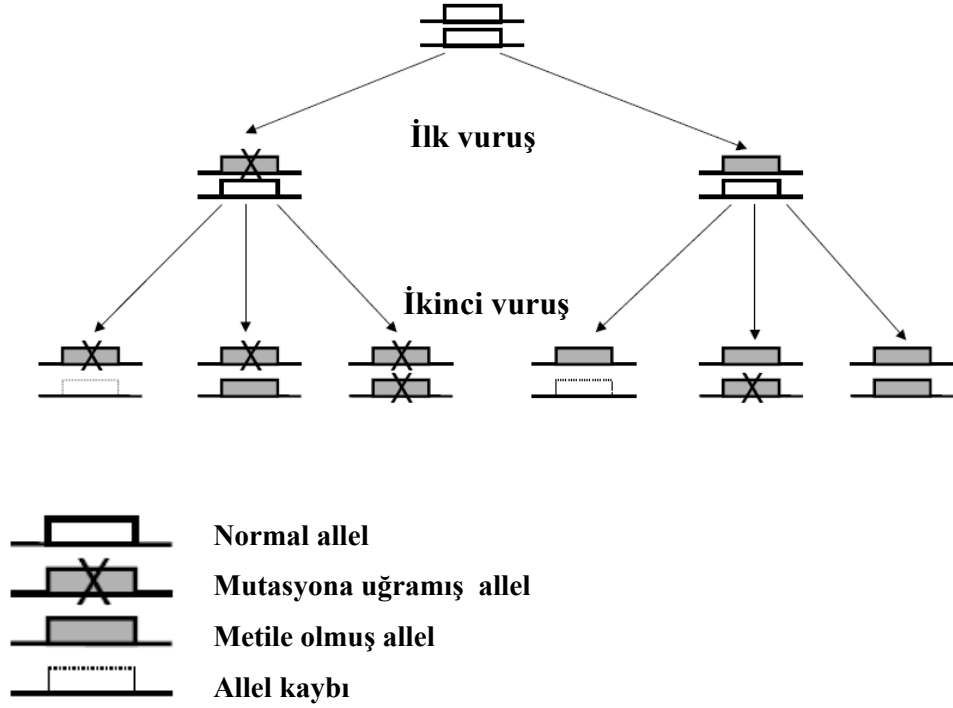
2.1.2. Onkogenlerin Aktivasyonu

Huebner ve Tadora 1969 yılında ilk olarak kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir (7). Protoonkogenler, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörlerinin regülasyonunda önemli rol oynayan genler olup, yapılarında meydana gelen genetik değişiklikler sonucunda, aktivasyon kazanırlar (8). Genetik değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşmaktadır ve bu durum onkogen ürünü proteinde yapısal değişikliklere neden olup, protein ekspresyonunu etkilemektedir. Onkogenik aktivasyonda rol oynayan mekanizmalardan ikincisi ise kromozomal translokasyonlar olup genel olarak 2 farklı yolla onkogenik aktivasyona neden olurlar. Bu translokasyonların bir tipinde, translokasyon sonucu yer değiştiren genin yapısı değişmeden, fakat yeni yerleştiği yerdeki genin promotörü tarafından sürekli ve kontrolsüz protein sentezinin eksprese edilebilir hale gelmesidir ve sonucunda onkogenik protein ürününün aşırı ekspresyonu sözkonusudur. Diğer tip translokasyonda ise, genin yapısı değişerek füzyon gen oluşmakta, bu gen ürünü füzyon protein karsinogenezise neden olmaktadır. En son mekanizma ise Hsr, double minut gibi sitogenetik olarak gözlenebilen ya da epizomal olarak ortaya çıkabilen gen amplifikasyonlarıdır. Böylelikle onkogenik DNA miktarındaki artış kontrolsüz onkogen ürünü protein artışına neden olmaktadır (9).

2.1.3. Tümör Süpresör Genlerin (TSG) İnaktivasyonu

Tümör süpresör gen ürünleri normalde hücre siklusunu kontrol ederek veya hasarlı hücreleri apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu inhibe etmektedirler. Bu yüzden bu genler tümör ve metastaz gelişimini engellemektedirler (9). Karsinogenezisteki Knudson'ın klasik 'iki vuruş' hipotezine göre, tümör süpresör genin her iki kopyasının kaybı neoplastik hücrelerin gelişimi için gerekli normal hücre fonksiyonların kaybına neden olmaktadır (Şekil 2.1) (10). Bu modele göre, ailesel geçiş gösteren kanserlerde ilk vuruş parental eşey hücrelerinde tümör süpresör genin bir allelinin mutasyona uğraması, ikinci vuruş ise diğer allelin

farklı genetik mekanizmalar ile somatik mutasyonudur. Sporadik kanserlerde ise tümör süpresör genin her iki allelinde 2 farklı mutasyon meydana gelmesi, tümör süpresör gen kaybına neden olmaktadır (10,11).

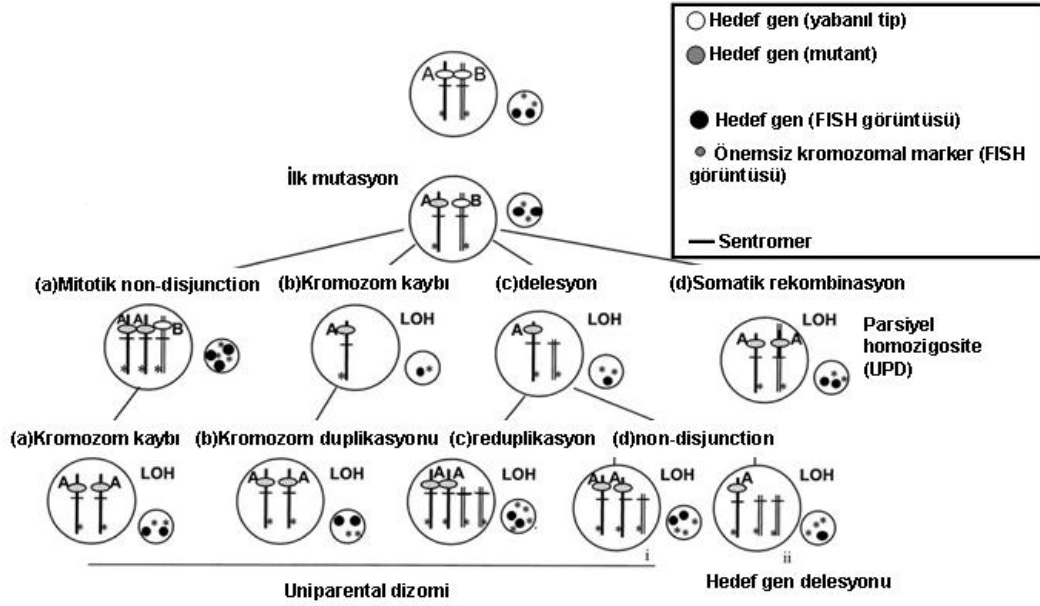


Şekil 2.1. Tümör süpresör gen inaktivasyonunda rol oynayan Knudson'ın iki vuruş hipotezi.

2.1.3.1. Tümörde Heterozigosite Kaybı (LOH)

Bir canlının somatik hücrelerinin konstitüsyonel genotipi heterozigot iken, çeşitli epigenetik mekanizmalarla homozigot yada hemizigot konuma gelmesi 'heterozigosite kaybı' olarak tanımlanır (12).

LOH, birçok farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilmektedir. Mitotik non-disjunction, tüm kromozomun kaybı, delesyon ve somatik rekombinasyon LOH'a neden olmaktadır (Şekil 2.2) (13,14).



Şekil 2.2. LOH'a neden olan mekanizmalar.

Kanserde, herhangi bir kromozomun sıklıkla belli bir bölgesindeki allelik kayıp o bölgede tümör süpresör bir genin varlığını düşündürmektedir. Bu hipoteze göre kanser gelişiminde rol oynayacağı düşünülen daha keşfedilmemiş birçok tümör süpresör gen olduğu düşünülmektedir. LOH analizi bu tümör süpresör genlerin muhtemel bölgelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (12).

2.1.4. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesinde ve Kontrolünde Görev Alan Genlerdeki Değişiklikler

Ökaryotik hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazlarından oluşmaktadır. Genel olarak, G1 fazı DNA sentezine (S fazına) ve G2 fazı ise mitoz bölünmeye (M fazına) hazırlık evreleridir. Bu fazlarda RNA ve protein sentezleri yapılır ve ayrıca hücre kendisini bölünme için yeniden organize eder (15).

2.1.4.1. Hücre Döngüsünün Kontrolünde Rol Oynayan Proteinler

Hücre döngüsünün kontrolünde protein fosforilasyonu önemli yer tutmaktadır. Bu fosforilasyon basamağında, siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) görev almaktadır. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterirler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak,

siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör alt üniteleri, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir. CDK'ların aktif formları, substratlarını (hücre siklusu kontrolünde rol oynayan gen ürünü proteinleri) fosforilleyerek onları aktif hale getirirler. Böylece substratın aktivasyon durumuna göre hücre döngüsü ya durur ya da bir sonraki döngüye geçer. Siklinler (A, B1, D ve E) döngünün çeşitli evrelerinde periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da ubiquitinasyon ile yıkılırlar. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK'ların (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25) aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. D tipi (D1, 2, 3) siklinler, hücre döngüsünün başlamasında rol oynayan proteinler olup, büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Bu tip siklinler, CDK4 ve CDK6'yı regüle ederler. Mitojenler ortamdan uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve CDK2'yi regüle eden siklin E, hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Siklin A ve B1, M fazına özgül siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır, sonra CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi en üst düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF ("M-phase/maturation promoting factor") olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla hücre mitoz evresinden çıkarak hücre döngüsünün bir döngüsü tamamlanır. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle değil, CDK'lara özgün, defosforilasyona yol açan CDI'leri ile de düzenlenir. CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ya siklinlere, ya CDK'lara ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. Görüldüğü gibi bu proteinler protein-protein kompleksleri oluşturarak birbirlerinin aktivitelerini düzenlerler. Hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan bu fosforilasyon/defosforilasyon mekanizmasını düzenleyen proteinlerin kontrolsüz ekspresyonu ya da hiç eksprese edilememesi kontrolsüz hücre bölünmesine, dolayısıyla karsinogenezise neden olmaktadır (15,16).

2.1.4.2. Hücre Döngüsünde Yer Alan Kontrol Noktaları

Kontrol noktaları, hücre döngüsünde kritik olayları kontrol ederek gerekli durumlarda bir sonraki evreye geçişi geciktiren noktalardır. Hücre döngüsünde 3 kontrol noktası bulunmaktadır (16).

1- G1 fazının sonunda (geç G1 evresi) yer alan G1 kontrol noktası;

DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller var olsa bile, hücrenin G1 fazından S fazına geçişinde DNA'nın hasarsız olup olmadığı kontrol edildiği noktadır. Eğer herhangi bir hasar saptanırsa, hasar onarılanaya kadar hücrenin S fazına girişi engellenir. Eğer hasar düzeltilmezse hücreler apoptozise uğrarlar.

2- G2 fazının sonunda (geç G2 evresi) yer alan G2 kontrol noktası;

Mitoza girişi belirleyen kontrol noktasıdır. S fazında tüm genomun replike olup olmadığı, replike olmuşsa hatalı olup olmadığı ve mitoz girebilmek için uygun çevresel şartların olup olmadığı kontrol edildiği ve buna göre hücrenin G2'den M fazına geçişinin mümkün olduğu kontrol noktasıdır.

3- M (Mitoz) kontrol noktası;

Metafaz evresinin sonunda mitotik iplikçiklerin oluşup oluşmadığının kontrol edildiği noktadır. İplikçik oluşumunda bir hata var ise kromatidlerin iplikçiklere bağlanması engellenir ve hata düzeltildikten sonra mitoz evresi tamamlanır (17).

Hücre döngüsü kontrol noktalarının herhangi birisinde meydana gelebilecek bozukluk genomik instabiliteye ve kontrolsüz hücre bölünmesine ve dolayısıyla karsinogeneze neden olmaktadır (15).

2.1.5. DNA Tamirinde Görev Alan Genlerdeki Değişiklikler

Gerek endojen gerekse ekzojen karsinojenler hücre siklusunda yavaşlamaya neden olmaktadır. Normal koşullarda bu yavaşlama sürecinde hücreler, DNA hasarını tamir etme fırsatı bulmaktadırlar. Eğer DNA hasarı tamir edilmezse, hücre ya apoptozise uğrar ya da hasarlı DNA'yı içeren hücre bölünmeye devam ederek mutasyon birikimine ve dolayısıyla karsinogeneze neden olur (18).

2.1.6. Epigenetik Mekanizmalar ve İmprinting

2.1.6.1. Karsinogeneziste İmprinting

Embriyonal ve postnatal dönemde bazı genlerin parental orijinine bağlı olarak ekspresyon göstermesi ‘imprinting’ olarak tanımlanmaktadır (19). İmprint genlerin ekspresyonu DNA metilasyonu, yeniden nükleozom modellenmesi ve histon değişimleri gibi olaylarla susturulmaktadır. Bu durum normal fetal veya davranışsal gelişim için kritik olan genlerin ekspresyonunu sınırlamak için gerçekleşmektedir. Normal insan hücrelerinde şimdiye kadar tanımlanmış 20 - 25 bin genden yaklaşık 83’ünün imprint olduğu bilinmektedir (20).

Susturulmuş genlerin çoğu embriyonik büyüme ve davranışsal gelişim ile ilişkili olmasına karşın, bazı susturulan genler ise yetişkin bireyde tümör süpresör gen veya onkogen olarak fonksiyon göstermektedirler. İnsulin benzeri büyüme faktörü 2 (*IGF2*), *H19*, Wilms tümör 1 (*WT1*), siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan *p57KIP2*, Manno 6 fosfat (*M6P*), paternal eksprese gen 3 (*PEG3*), bir nükleer transkripsiyon faktörü kodlayan transformasyon kaybı (lost on transformation, *LOT1*) ve aynı zamanda *ARHI* (Ras homolog member I) geni insanda tümör ilişkili susturulmuş genler arasında yer almaktadırlar (21-26).

2.1.6.2. Karsinogeneziste Epigenetik Mekanizmalar ve DNA Metilasyonu

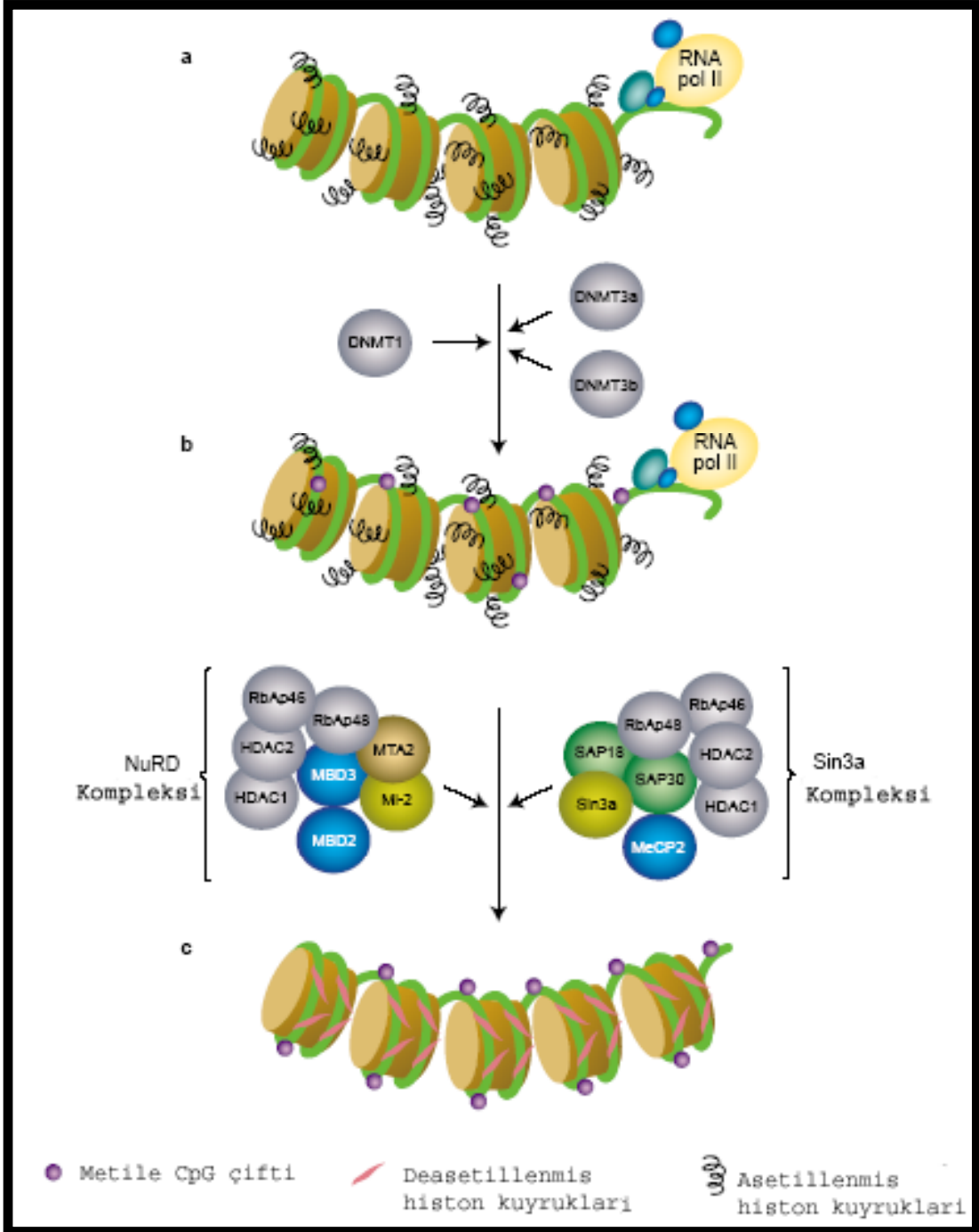
DNA dizisinde bir farklılık yaratmadan gen ekspresyonunu değiştiren ve bir sonraki oğul döle aktarılabilen değişiklikler epigenetik değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (27). Epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, yeniden kromatin modellenmesi ve histon deasetilasyonu öne çıkar (28).

DNA metilasyonu, omurgalılarda CpG adacıkları adı verilen, 200-2000 bp uzunluğunda ve CG dinükleotidi açısından zengin genomik bölgelerdeki sitozin bazlarında meydana gelmektedir. Sitozin bazları sadece CG dinükleotidi varlığında metillenebilir. Metilasyon, S-adenozilmetionin (SAM)’i metil grubu vericisi olarak kullanan DNA metiltransferaz (DNMT) adı verilen enzimler tarafından gerçekleştirilir. Üç tip DNMT tanımlanmıştır. DNMT1 (koruma metilazı), replikasyon sırasında daha önce metillenmiş halde bulunan sitozin bazlarını tanıma ve replikasyon sırasında metilasyonu yavru hücrelere aktarma yani metilasyonun

korunmasını sağlama özelliğine sahiptir. DNMT3a ve DNMT3b ise “*de novo*” metilasyondan sorumludurlar (29).

Yapılan çalışmalarda, kromatin üzerindeki aktif ve inaktif bölgelerin DNA metilasyonunun dağılımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnaktif bölgelerde DNA metile haldeyken, aktif bölgelerde metilasyon gözlenmez. Metile dizilerde DNA replikasyonu sırasında baz eşleşmesinde bir değişiklik olmaz ve replikasyon sonrasında atasal zincirin komplementeri olan yeni sentezlenen zincirde yer alan sitozine, metil grubu DNMT1 tarafından takılır ve böylelikle metilasyon oğul döllere aktarılır (29).

Normal dokularda CpG dinükleotidlerinin büyük bir kısmı aktif ya da inaktif olmalarına bakılmaksızın metillenmemiş haldedirler. Kanser hücrelerinde ise bu genlerin büyük bir kısmı metile haldedir (30). Metillenmenin nasıl sonuçlandığı ile ilgili iki görüş öne sürülmüştür. İlk görüşe göre metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma özelliğini inhibe eder. Pek çok transkripsiyon faktörünün metilasyon tanıma bölgelerinin bulunduğu ve metilasyona duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak daha sonra metilasyon tanıma bölgeleri bulunmayan ve metilasyona duyarsız transkripsiyon faktörleri de keşfedilmiştir. Bunun sonucunda, daha genele yayılabilir bir görüş ortaya atılmıştır. Günümüzde de kabul gören bu görüşe göre, DNA metilasyonu metil içeren DNA’ya bağlanabilen proteinlerin (MBD) bağlanmasına öncülük eder. Bu proteinlerin en iyi tanımlanmış örnekleri MeCP2, MBD2 ve MBD3’tür. Bu proteinler histon deasetilazlarla (HDAC1 ve HDAC2) ve kromatin yeniden modellenme aktiviteleri ile birlikte çalışırlar. Tüm bu kompleksler kompakt bir kromatin yapısı meydana getirerek, transkripsiyonu baskırlar (Şekil 2.3) DNA hipermetilasyonunun dışında hipometilasyon da, kromozom instabilitesine, retrotranspozon elementlerin ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak karsinogenezisin gelişiminde önemli bir rol oynayan epigenetik mekanizmadır (30).



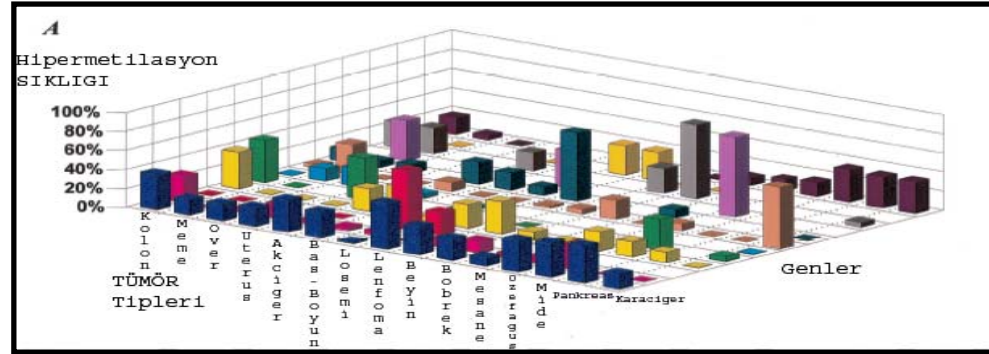
Şekil 2.3. Transkripsiyonun metilasyon ile baskılanmasındaki muhtemel mekanizma (30,31).

Transkripsiyonel olarak aktif olan kromatin metile değildir ve yüksek düzeyde asetillenmiş histon uzantıları içerir (kısa, siyah uzantılar). CpG adacıkları DNMT'lerden biri tarafından metillenir (pembe boncuklar) ancak kromatin hala asetillenmiş histon içerir. Metillenmiş DNA, metil grubu içeren DNA'ya bağlanabilen proteinlerce (MBD2 ve MeCP2) hedeflenir ve ilişki içinde buldukları büyük protein komplekslerinin içerdiği histon deasetilazlar (HDCA1 ve 2) ve kromatin-yeniden modelleme aktiviteleri (Mi-2 ve Sin3a) ile kromatinin yapısında değişimlere sebep olurlar.

DNA metilasyonu karsinogeneziste önemli yer tutmaktadır. Esteller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 15 farklı tümör tipinde hipermetilasyon olduğu belirlenmiş çok sayıda gen bildirilmiştir. Bu genler arasında *p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}*, *p14^{ARF}*, *p73*, *APC* ve *BRCA1* gibi tümör baskılayıcı genler, *MLH1*, *GSTP1* ve *MGMT* gibi DNA onarım genleri, *CDH1*, *TIMP3* ve *DAPK* gibi metastaz ve invazyon genleri bulunmaktadır (Tablo 2.1) (32).

Son dönemlerde yapılan çalışmalar DNA metilasyonunu, serum, plazma ya da idrar gibi biyolojik örneklerde, kanserin erken dönemde tespitinde kullanılabilecek bir markır olarak öne çıkarmaktadır (33). Örneğin prostat kanserinde *GSTP1* geninde % 31 ve özofagiyal adenokarsinomada *APC* tümör süpresör geninde % 25 oranında belirlenen hipermetilasyon, her iki tümörde de DNA metilasyon markırını olarak plazmada tespit edilebilmektedir (34).

Tablo 2.1. Çeşitli kanser türlerinde metilasyonu tespit edilmiş genler.



	$p16^{INK4a}$ ■	$p14^{ARF}$ ■	$p15^{INK4b}$ ■	$MGMT$ ■	$hMLH1$ ■	$BRCA1$ ■	$GSTP1$ ■	$DAPK$ ■	$CDHI$ ■	$TIMP-3$ ■	$p73$ ■	APC ■
Kolon	%37	%28	%0	%39	%44	%0	%4	%13	?	%27	%0	%18
Meme	%17	%0	%0	%0	%0	%13	%31	%7	%42	%27	%0	%5
Over	%18	%5	?	%0	?	%19	%0	%9	?	?	?	%0
Uterus	%20	%16	?	%21	%43	?	%0	?	?	?	?	?
Akciğer	%31	%6	%0		%0	%4	%9	%16	?	%19	%0	%0
Baş-Boyun	%27	%4	?	%32	?	?	%0	%18	?	?	?	%0
Lösemi	%1	%5	%62	%6	%6	%0	%0	%9	%40	?	%31	?
Lenfoma	%48	%0	%24	%25	?	?	%2	%72	?	?	%30	?
Beyin	%30	%9	?	%34	%0	?	%5	?	?	%26	%0	%0
Böbrek	%23	%13	?	%8	?	?	%20	?	?	%78	%0	%8
Mesane	%9	%5	?	%4	?	?	%0	%9	?	?	?	%10
Özofagus	%33	%8	?	%20	?	?	%7	?	%84	?	?	%15
Mide	%36	%26	?	%16	%32	?	%0	?	?	?	?	%34

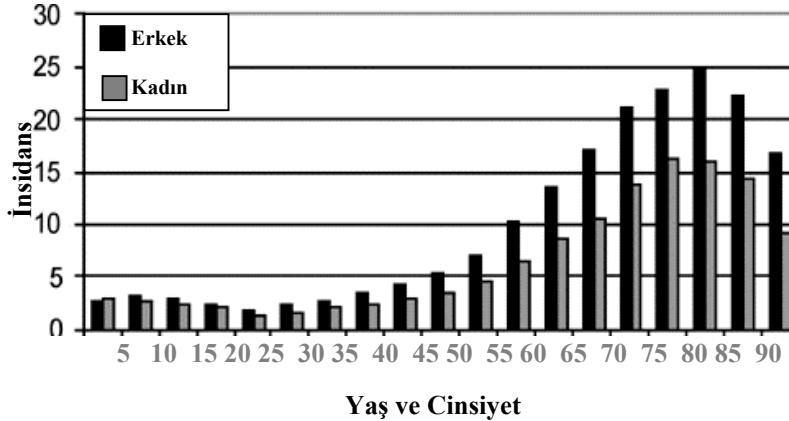
2.2. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi

Beyin tümörü insidansına ait bilgiler, SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) verilerinden alınmıştır (35).

Toplumda bir yılda gözlenen tüm kanser vakalarının yaklaşık % 1.5-2'sinde tümörler, primer veya metastatik olarak beyinde yerleşim göstermektedir (36). Beyin tümörleri benign veya malign olabilmektedir. Malign tümörler de primer ve metastatik tümörler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (37).

2.2.1. Beyin Tümörü Görülme İnsidansı

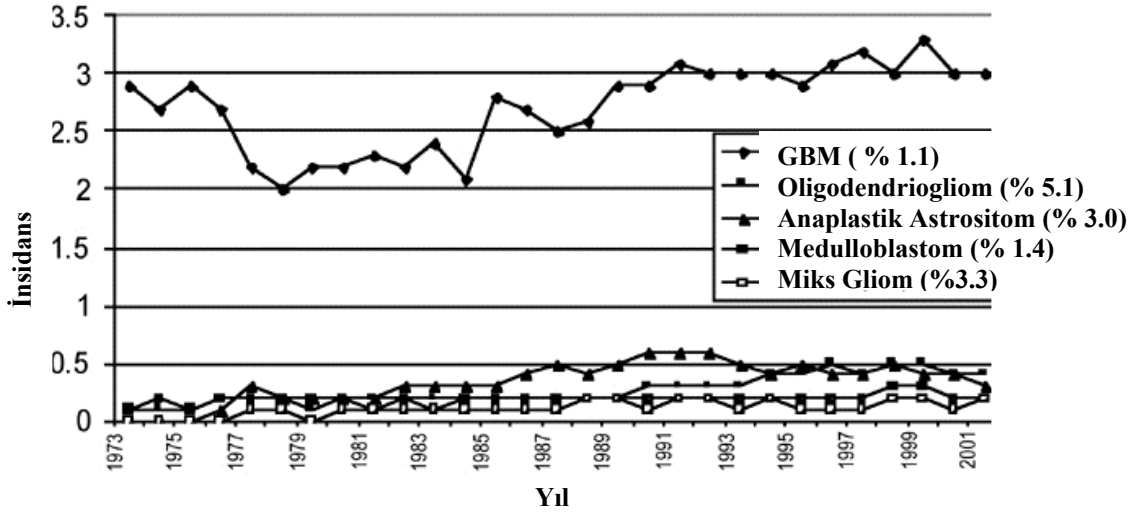
1973-2001 yılları arasında dünyada 38.453 malign beyin tümürlü olgu rapor edilmiştir. Yaş faktörü göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede, beyin tümörü insidansı 100.000'de 6.1 olarak bildirilmiştir. En yaygın gözlenen glioblastoma multiforme (GBM) olgu sayısı bu yıllar arasında 16.797 ve insidansı 100.000'de 2.8 iken ikinci en yaygın gözlenen astrositomda ise 100.000'de 1.2 olarak verilmektedir. 1980-1990'lı yıllardan sonra beyin tümörünün görülme sıklığında bir artış görülmektedir. Bu artış, son yıllardaki tanı yöntemlerinin gelişimi ile ilişkilendirilebilmektedir. Beyin tümörü insidansı yaşa bağlı olarak değerlendirildiğinde, erken çocukluk döneminde az bir artış olmakla birlikte, yaş ilerledikçe insidans belirgin oranda artmaktadır. İnsidans çocuklarda 100.000'de 2.5, genç yaş erişkinlerde 5.5 ve daha yaşlılarda 17.5 olarak görülmektedir. Ayrıca beyin tümörü insidansının erkeklerde, kadınlara göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.4) (35).



Şekil 2.4. Beyin tümörü insidansının cinsiyet ve yaşa bağlı olarak değerlendirilmesi.

İrklara göre beyin tümörü insidansı değerlendirildiğinde, Afrikalı-Amerikalılarda 100.000'de 3.6 ve Caucasianlarda 6.7 olmak üzere belirgin bir oranda artış görülmektedir. Ayrıca beyin tümörünün görülme oranı küçük yerleşim bölgesinde yaşayanlarda 1000'de 4.89 ve metropolitan şehirlerde yaşayan kişilerde 6.5'dir.

1973 ve 2001 yılları arasında beyin tümörlerinin histolojik alt gruplarındaki sıklık oranlarına bakıldığında, başta GBM olmak üzere oligodendriogliom, anaplastik astrositom, medulloblastom ve miks gliomlarda insidans artışı gözlenmektedir. (Şekil 2.5) (35).



Şekil 2.5. Beyin tümörü histolojik alt gruplarının 1973-2001 yılları arasındaki insidanslarının değerlendirmesi.

Beyin tümörlü olguların 5 yıllık yaşam süresi oranlarının, yaşa, cinsiyete, ırka ve yerleşim durumlarına göre değerlendirilmesi Tablo 2.2'de verilmektedir. 1973 ve 2001 yılları arasında beş yıllık yaşam süresinde 1970'li yıllarda % 21, 1980'li yıllarda % 27 ve 1990'lı yıllarda % 31'lik bir artış gözlenmiştir. Ancak GBM için ortalama 1 yıllık yaşam süresi 1970'li ve 1980'li yıllar arasında bir artış gösterirken, 1980'li yıllardan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır (35).

Tablo 2.2. Beyin tümörlü olguların 5 yıllık yaşam süresi, cinsiyeti, yaşı, ırk ve yerleşimlerine göre değerlendirilmesi.

Parametre	5 yıllık yaşam süresi oranı (%)
Cinsiyet	
Erkek	26.7
Kadın	28.8
Yaş	
Çocuk (< 20 yaş)	66.1
Genç / orta yaş erişkin (20-65 yaş arası)	27.8
Daha yaşlı erişkin (> 65 yaş)	2.7
Irk	
Caucasian	26.8
Afrikalı – Amerikalı	32.8
Diğerleri	36.9
Yerleşim	
Metropolitan	28.0
Metropolitan olmayan	25.6

2.2.2. Beyin Tümörünün Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Bazı kalıtsal sendromlar, radyasyon ve bazı immün baskılayıcı ajanların beyin tümörlerinin gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenler beyin tümörlü hastaların çok az bir kısmında etkilidir (36).

Beyin tümörleri ile ilişkili bazı kalıtsal hastalıklar tüm beyin tümörlerin % 1-2'sini oluşturmaktadır (Tablo 2.3) (38).

Tablo 2.3. Beyin tümörü ile ilişkili ailesel sendromlar.

Sendrom	Gen	Kromozomal Lokalizasyon	Protein Fonksiyonu	Sendrom ile ilişkili tümör tipi
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	17p13.1	Transkripsiyon faktörü, apoptozis	Astrositomlar
Nörofibromatozis tip 1	<i>NF1</i>	17q11.2	GTPaz aktive edici protein homoloğu	Astrositomlar, ependimomlar, meningiomlar
Nörofibromatozis tip 2	<i>NF2</i>	22q12.2	Erzin / moesin / radiksin benzeri	Schwannom, meningiomlar
Ailesel adenomatöz	<i>APC</i>	5q21-q22	β– katenin	Medulloblastom

polipozis koli (Turcot sendrom A)			regülatörü	
Kalıtısal nonpolipozis kolorektal kanser (Turcot sendrom B)	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MLH3</i> <i>PMS1</i> <i>PMS2</i>	3p21.3 2p22-p21 14q24 2q31-q33 7p22	Mismatch repair	Glioblastoma multiforme
Nevoid bazal hücreli karsinom sendromu / Gorlin's sendrom	<i>PTCH</i>	9q22.3	SHH (sonic hedgehog) için reseptör ve SMO (smoothened)'yu inhibe eder	Medulloblastom
Cowden hastalığı (çoklu hamartom sendromu, Lhermitte-Duclos)	<i>PTEN</i>	10q22-q23	Fosfotaz ve Tensin homoloji	Sıklıkla tiroid, meme kanseri nadiren astrositom
Melanom-astroisitom sendromu	<i>CDKN2A</i> / <i>p14ARF</i>	9p21	Hücre siklusu kontrolü (G1-S) / p53 seviyesi kontrolü	Astrositomlar

Terapotik dozlarda verilen iyonize radyasyonun, beyin tümörü gelişiminde bilinen risk faktörleri arasında yer almasına karşın, tanı amaçlı X-ray ışınlarının beyin tümörleri ile ilişkili olup olmadığına dair çelişkili sonuçlar bildirilmektedir (39,40).

Organ transplantasyonu sonrasında kullanılan immün baskılayıcı ajanların kullanımına bağlı olarak başka kanserler de olmak üzere beyin tümörü riski de artmaktadır (41).

Diğer taraftan beyin kanseri gelişimindeki rolü tam olarak kanıtlanmayan ve üzerinde bilimsel çalışmaların devam ettiği olası nedenler ise Tablo 2.4'de verilmektedir (36).

Tablo 2.4. Epidemiyolojik çalışmalar sonrasında beyin tümörü gelişiminde rol oynadığı düşünülen olası faktörler.

Faktör	Etkinlik ve Örnekler
<i>Mobil telefonlar</i>	Radyofrekans dalgalarına maruz kalma
<i>Düşük frekanslı elektromanyetik alan</i>	Evde ve işyerinde maruz kalma
<i>Spesifik enfeksiyonlar</i>	Virüsler, Toxoplazma gondii, in utero influenza and varicella
<i>Alerji</i>	Atopi

<i>Diyet</i>	Nitrosamine / nitrosamide / nitrit / nitrat /Aspartat
<i>Sigara, pipo kullanımı</i>	
<i>Alkol kullanımı</i>	
<i>Kimyasal ajanlar</i>	Saç boyaları, solventler, pestisit, hava kirliliği
<i>Meslekler</i>	Yapıştırıcı fabrikalarında ve petrol rafinelerinde çalışanlar

2.3. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Beyin tümörleri temelde köken aldıkları hücre tipine göre sınıflandırılır ve isimlendirilirler. İlk olarak Bailey ve Cushing tarafından ortaya konulan bu sınıflandırma, günümüzde 2000 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından temel alınarak geliştirilmiş ve evrensel olarak kabul edilmiştir (42).

2.3.1. Glial Tümörler

En yaygın primer beyin tümörleri gliomalardır. Genel olarak intraaksiyal yerleşimli, kapsülsüz ve diffüz büyüme gösteren tümörlerdir (43). Astrositik, oligodendrositik veya ependimal hücrelerden köken almaktadırlar. Tüm glial tümörler hücresel tiplerine göre 4 gruba ayrılmaktadır.

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

Bu üç gruptaki glial tümörler tüm beyin tümörlerinin %70'ini oluşturmaktadır (44).

2.3.1.1. Diffüz İnfiltratif Astrositik Tümörler

Astrositlerden köken alan infiltratif tümörler artan histolojik parametrelere bağlı olarak histopatolojik olarak, WHO Grade II, III ve IV olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır.

Düşük Dereceli Astrositomlar (WHO Grade II)

Astrositomlar karakteristik olarak subkortikal beyaz cevher ve frontal bölgede yerleşim gösterirler. Daha yüksek grade'li tümörlerle kıyaslandığı zaman daha fazla farklılaşma ve daha az çoğalan hücre grubuna sahiptirler. Cerrahi müdahale ile tümör başarılı bir şekilde alınabilir fakat tümörün tekrarlama riski oldukça yüksektir. Astrositomlar genellikle daha genç yaşları etkilerler (ortalama etkilenme yaşı: 35) ve ortalama yaşam süresi 6 yıldır (44).

Anaplastik Astrositomlar (WHO Grade III)

Anaplastik astrositomlar, düşük dereceli astrositomlardan büyük oranda farklılık göstermemektedirler. Mikroskopik olarak artan hipersellülerite, nükleer ve sitoplazmik pleomorfizm, nükleer hiperkromatizm ve düzensizlik gibi anaplastik özelliklere ve ayrıca belirgin mitotik aktiviteye sahiptirler. Bu gruptaki çoğu hastalarda (bazı iyi yanıt alınan hastalar hariç) kemoterapiye ve/veya radyoterapiye iyi yanıt alınmamaktadır. Ancak yaşam süresi düşük dereceli astrositomlar ile kıyaslandığında oldukça kısa olup, ortalama sağ kalım süresi 2 yıl olarak belirtilmektedir (45).

Glioblastoma Multiforme (GBM) (WHO Grade IV)

Tüm beyin tümörlerinin %25'ini oluşturan GBM, yetişkinlerde görülen en yaygın beyin tümörü olup diffüz astrositomların en malign formudur (43). Astrositlerden köken alan tümörler arasında en malign ve prognozu en kötü olan alt grubu oluşturmaktadır. Tümörde nekroz odakları, kistler, kanama alanları, vasküler endotelial proliferasyonu ve mitoz oldukça sıktır. Mikroskopik olarak anaplastik astrositomlardan nekroz içermeleriyle ayrılırlar (46). Glioblastomlar genellikle iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi primer glioblastomlar olup, *de novo* grubu oluştururlar. İkincisi ise sekonder glioblastomlar olup, düşük grade'li astrositik tümörlerden köken alırlar. Primer glioblastomlar sekonder glioblastomlardan daha sık gözlenmektedir (47). Glioblastomlu hastaların ortalama yaşam süresi 12-15 aydır (48).

Astroitik Tumorlerin Genetiği

LOH 10q ve 10 Nolu Kromozom Üzerinde Yer Alan Fosfataz ve Tensin Homolog Geni (PTEN) Mutasyonu

Glioblastomlarda 10 nolu kromozomun uzun kolunda heterozigosite kaybı (LOH 10q), % 60-80 oranıyla en sık görülen genetik değişiklik olup, 10q'da gözlenen bu heterozigosite kaybı anaplastik glioblastomların % 35'inde görülmektedir (49-52). Birçok LOH çalışmasında yaygın olarak 10p14-p15, 10q23-24 ve 10q25-pter olmak üzere 3 bölgede delesyonun belirlenmesi, 10 nolu kromozom üzerinde birçok tümör baskılayıcı genin yer aldığını göstermektedir (49-51,53).

LOH 10q, primer ve sekonder glioblastomlarda benzer sıklıkta görülmektedir. Ancak çoğu primer glioblastomlarda 10 nolu kromozomun tamamen kaybı gözlenirken, sekonder glioblastomlarda ise 10q'da kısmi delesyon veya 10q'nun tamamen kaybı gözlenmektedir (54).

10q23 bölgesinde lokalize olan *PTEN* bir tümör baskılayıcı gen olup, glioblastomlu olguların % 15-40'ında mutasyona uğramaktadır (55). *PTEN* genindeki mutasyonlar primer glioblastomlarda daha sık görülürken, sekonder glioblastomlarda daha nadir gözlenmektedir (56). *PTEN* homozigot delesyonları her iki grupta da % 2'den daha az bir oranda görülmektedir (57). 2003 yılında yapılan bir çalışmada, *PTEN* ekspresyon kaybının gözlenmesinde metilasyonun da rol oynayabileceği ancak çalışmadaki glioblastomlu olgu sayısı az olduğu için, metilasyonun glioblastom üzerindeki etkinliğinin gösterilebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır (58).

P14^{ARF} ve *p53* Mutasyonu

Kromozom lokalizasyonu 9p21 olan *p14^{ARF}* geninin ekspresyon kaybı, glioblastomlu olguların yaklaşık % 76'ında gözlenmektedir. Ekspresyon kaybı ya homozigot delesyon ya da promotor metilasyonu ile ilişkilidir. *p14^{ARF}* genindeki homozigot delesyonlar primer ve sekonder glioblastomlar arasında sıklık açısından herhangi bir farklılık göstermezken, ekspresyon kaybının oluşumunda etkili olan

promotor metilasyonu sekonder glioblastomlarda daha sık gözlenen bir genetik mekanizmadır (59).

17p'de lokalize olan *p53* geni, hücre siklusunun kontrolünde, apoptoziste, anjiogeneziste, DNA tamir mekanizmasında ve hücre farklılaşmasında anahtar bir role sahip olan 53kDa'luk bir protein kodlamaktadır (60). *p53* geni, yetişkinlerde görülen düşük grade astrositomların ve sekonder glioblastomların yaklaşık %50'sinde mutasyona uğramaktadır (61-63). *p53* mutasyonları primer glioblastomlarda % 10-20 oranında görülmektedir (63).

Murine Double Minut 2 (*MDM2*) Amplifikasyonu

MDM2 geni 12q14.3 bölgesinde lokalizedir. *MDM2* proteini *p53*'e bağlanarak onun fonksiyonunu inhibe etmekte ve proteolitik degradasyonunu sağlamaktadır. Böylelikle *MDM2* ekspresyon fazlalığı *p53* fonksiyon kaybı için alternatif bir mekanizma oluşturmaktadır (64). *MDM2* geni primer glioblastomların %10'unda *p53* mutasyonu olmaksızın amplifiye olmaktadır (65). Diğer taraftan *MDM2* gen ürünü olan protein, primer glioblastomların yaklaşık % 50'sinde aşırı ekspresyon gösterirken, sekonder glioblastomlarda *MDM2* ekspresyonunda herhangi bir anormallik gözlenmemektedir (66).

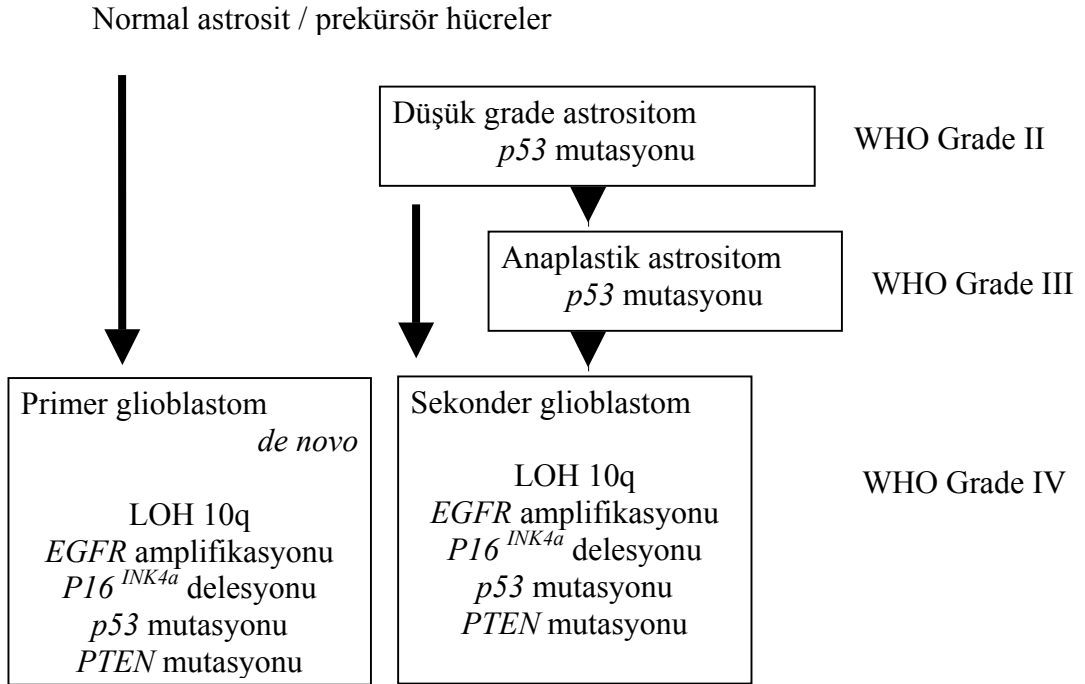
Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (*EGFR*) Geni Amplifikasyonu

7p12'de lokalizasyon gösteren *EGFR* geninin amplifikasyonu primer glioblastomlu olguların yaklaşık % 40'ında gözlenirken sekonder glioblastomlarda nadir görülen bir genetik değişimdir (67,68). *EGFR* amplifikasyonu hastaların yaşı ile oldukça ilişkili olup 35 yaş altındaki hiçbir glioblastomlu hastada belirlenmemiştir (69). *EGFR* ekspresyonundaki artış, primer glioblastomlu (>% 60) olgularda sekonder glioblastomalara (<% 10) kıyasla daha yaygındır (62). *EGFR* ekspresyon artışı gözlenen glioblastomlu olgularda radyoterapiye yanıt daha az olmasına rağmen, yapılan çalışmalar sonucunda *EGFR* ekspresyonunun prognostik önemi ile ilgili yeterli istatistiksel veriler elde edilememiştir (70,71).

Retinoblastoma (RB) Geni Mutasyonu

Retinoblastoma geni 13q14 bölgesinde lokalize olup hücre siklusunun G1-S fazları arasındaki regülatör basamağı kontrol eden 107kDa'luk bir protein kodlamaktadır (72). *RBI* promotor metilasyonu primer glioblastomlarda %14 oranında bulunurken sekonder glioblastomlarda % 43 oranında gözlenmektedir. Ayrıca düşük grade astrositom ve anaplastik astrositomlarda *RBI* metilasyonunun yer almaması, bunun astrositom gelişiminde geç evrelerde ortaya çıkan bir genetik değişim olduğunu göstermektedir (73).

Astrositik tümörlerde gözlenen tüm bu genetik değişiklikler ve tümör evrelendirilmesi ile ilişkiler Şekil 2.6'de görülmektedir.



Şekil 2.6. Primer ve sekonder glioblastom gelişiminde rol oynayan genetik faktörler (69).

2.3.1.2. Oligodendrioglial Tümörler

Oligodendriogliom

Oligodendriogliomların oligodendrositlerden veya oligodendrioglial öncül hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir. Bu tümörler en yaygın olarak yetişkinleri etkilemektedir (74,75). Histolojik olarak % 50'si düşük grade, iyi farklılaşmış tümörleri (WHO grade II), % 50'si ise yüksek grade anaplastik oligodendriogliomları

(WHO grade III-IV) oluşturmaktadır (75,76). Genel olarak bu tümörler yavaş çoğaldıklarından astrositik tümörlerden daha iyi prognoz göstermektedirler (77,78).

Oligodendriogial Tümörlerin Genetiği

Kromozom 1 ve 19

19 nolu kromozomun uzun kolunun (19q) kaybı oligodendriogial tümörlerde en yaygın görülen genetik anormalliktir. Olguların büyük bir çoğunda 19q kromozom kayıplarına ilave olarak, 1 nolu kromozomun kısa kolunun (1p) kaybı da gözlenmektedir. 1p ve 19q kayıpları grade II tümörlerinin % 80-90'ında ve grade III tümörlerinin ise % 50-70'inde belirlenmiştir (79). Bu kromozomal kayıplar tümör lokalizasyonları ile ilişkilidir ve en yaygın olarak frontal tümörlerde bulunmuştur (80). Delesyon haritalama çalışmaları yaygın delesyon görülen bölgeleri belirlerken, özellikle 1p36 ve 19q13.3 bölgesinde tümör baskılayıcı genlerin varlığını ortaya koymuştur (79). Anaplastik oligodendriogliomlarda 1p ve 19q kayıplarının varlığında, bu olgulara uygulanan tedaviye olumlu yanıt gözleendiği bildirilmektedir (81,82).

p53 Mutasyonu

1p ve 19q'da genetik değişiklikler olmaksızın *p53* mutasyonları oligodendriogial tümörlerin bir alt sınıfı olan miks oligoastrositomlarda (%10-15) gözlenmektedir (82). 1p/19q kaybı ve *p53* mutasyonlarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak anaplastik oligodendriogliomlar 4 gruba ayrılabilir (Tablo 2.5) (83).

Tablo 2.5. 1p/19q kayıplarına ve p53 mutasyonuna bağlı olarak anaplastik oligodendriogliomların gruplandırılması.

Grup	1	2	3	4
1p kaybı	+	+	-	-
19q kaybı	+	-	-	-
p53 mutasyonu	-	-	+	-
Kemoterapiye cevap yüzdesi (%)	100	100	33	18
Kemoterapiye cevap süresi (ay)	>31	11	7	5
Sağ kalım süresi (ay)	>123	71	71	16

Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri

EGFR geni oligodendriogial tümörlerde glioblastomlarda olduğu gibi amplifiye olmamaktadır. *EGFR* geninde amplifikasyon olmamasına rağmen, *EGFR* gen ürünü proteininde WHO grade II ve III oligodendriogial tümörlerin yaklaşık % 50'sinde aşırı ekspresyon görülmektedir (84). Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (*PDGF*) ve reseptörü, aynı zamanda vasküler endotelial büyüme faktöründe (*VEGF*) ekspresyon artışı oligodendriogial tümörlerde sıklıkla görülmektedir (85,86).

Diğer Genetik Değişiklikler

Malignant astrositik tümörlerde olduğu gibi, p14, p15 ve p16 genlerinin lokalize olduğu 9p21 bölgesindeki homozigot delesyonlar anaplastik oligodendriogliomlarda da gözlenmektedir (82).

10q kayıpları, 1p/19q kayıpları olmaksızın anaplastik oligodendriogliomlarda yaygın olarak bulunmaktadır (87). *PTEN* gen mutasyonları anaplastik oligodendriogliomlarda nadir görülen bir genetik değişimdir (88). Bunun yanında 10q bölgesinde yer alan delete malignant beyin tümörleri 1 (*DMBT1*) genindeki mutasyonlar anaplastik oligodendriogliomalarda da gösterilmiştir (87).

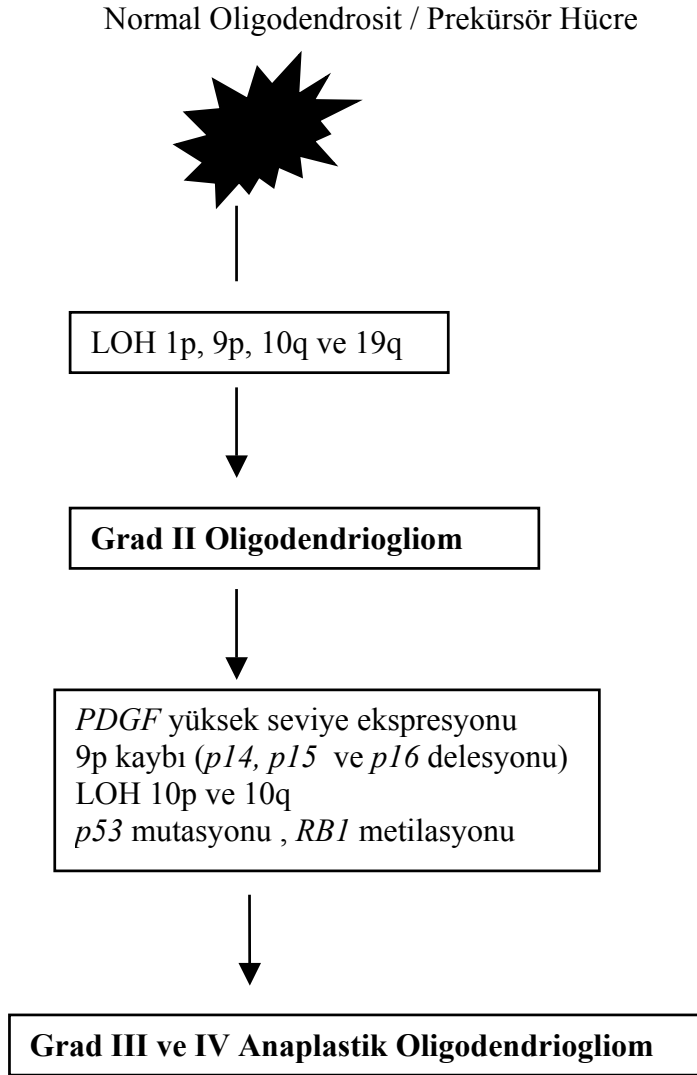
Oligodendriosit transkripsiyon faktörleri olan *Olig 1* ve *Olig 2*'nin oligodendriogial tümörlerde yüksek seviyede eksprese edildiğinin gösterilmesinden sonra, bu transkripsiyon faktörlerinin oligodendriogial tümörlerde spesifik markırlar olabileceği düşünülmüş fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda bu transkripsiyon faktörlerinin astrositik tümörlerde de aşırı ekspresyonu belirlenmiştir (89,90).

Hipermetilasyon

Yukarıda geçen genetik mekanizmalar dışında oligodendriogial tümörlerde epigenetik mekanizmalardan biri olan hipermetilasyon da yaygın olarak görülmektedir. Promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (*CDKN2A*), siklin bağımlı kinaz inhibitör 2B (*CDKN2B*), retinoblastoma 1 (*RBI*), tümör protein 73 (*TP73*) ve O-6-metilguanin DNA metiltransferaz (*MGMT*) gibi bazı genlerin transkripsiyonel olarak baskılanması söz konusudur (91,92) Bu genlerin çoğu hücre siklusunun kontrolünde

yer almakta iken, *MGMT* DNA'nın tamir mekanizmasında yer alan bir enzimi kodlamaktadır (93).

Astrositik tümörlerde gözlenen pek çok genetik anormallikler, oligodendriogial tümörlerde de gözlenmektedir (Şekil 2.7) (94).



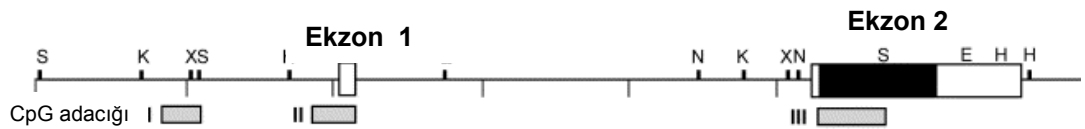
Şekil 2.7. Oligodendriogliomların gelişiminde rol oynayan genetik faktörler.

2.4. *ARHI* (*DIRAS3*, *NOEY2*) Geni

RAS proto-onkogenleri tanımlanmış ilk onkogenler olup bu ailenin üyeleri, insan kanserlerinin pek çoğunda özellikle pankreas, melanoma, tiroid, kolon, akciğer, meme ve overde devamlı aktif formda bulunmaktadır (95).

RAS aktivasyonunda ve aktivasyonunun kontrolünde pek çok proteinin işe karıştığı bilinmektedir. 1999 yılında *Ras* proteinlerini kontrol eden ve yine bir *RAS* ailesi üyesi olan ilk tümör baskılayıcı gen; *NOEY2/ARHI* klonlanmıştır. *ARHI* geni normal meme ve over dokularında sürekli sentezlenirken, tümör gelişimi ile gen ekspresyonunda % 70-80 oranında azalma gözlenmektedir. *ARHI* geninin bir diğer önemli özelliği de genomik imprinting'e uğrayan ilk tümör supresör gen olmasıdır (26).

ARHI geninin yaklaşık olarak 7.2 kb uzunluğunda olduğu, 2.0 kb uzunluğunda 5' bölgesi, 2 ekzon, 1 intron ve 1.2 kb uzunluğunda 3' bölgesi içerdiği gösterilmiştir. Ekzon 1, 81 baz çiftinden oluşan 5' translyasyona uğramayan bölgeyi, ekzon 2 ise protein kodlayan bölgeyi içermektedir. İki ekzon 3.2 kb'lik intron ile birbirinden ayrılmaktadır. Ekzon 2'nin *Ras* süper ailesine ait 229 aminoasitlik küçük GTP bağlama proteini kodladığı tespit edilmiştir. Genomik yapı analizleri sonucunda, metilasyonun sıklıkla gözlemlendiği 3 CpG adacığı belirlenmiştir. Bunlardan 2 tanesinin (CpG adacığı I ve II) genin promotor bölgesinde yer aldığı ve ekzon 1 bölgesine bitişik olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.8) (96).



Şekil 2.8. *ARHI* geninin yapısı.

Peptid dizi homolojisi deneylerine göre, amino terminal bölgesindeki 35. aminoasitten başlayarak, *ARHI* proteini *Ras* süper ailesinden *Rap1A* ile %56, *Rap1B* ile %56, *Rap2A* ile %58, *Rap2B* ile %62, *K-Ras* ile %59 ve *H-Ras* ile %54 homoloji göstermektedir (97). *ARHI* proteini, amino terminalinde kendine özgü 34 aminoasitlik bir uzantıya sahiptir. Bu bölgede yapılan dizi analizi sonuçları, bölgede α -heliks yapının varlığını göstermiştir. N terminal bölgesinde meydana gelen

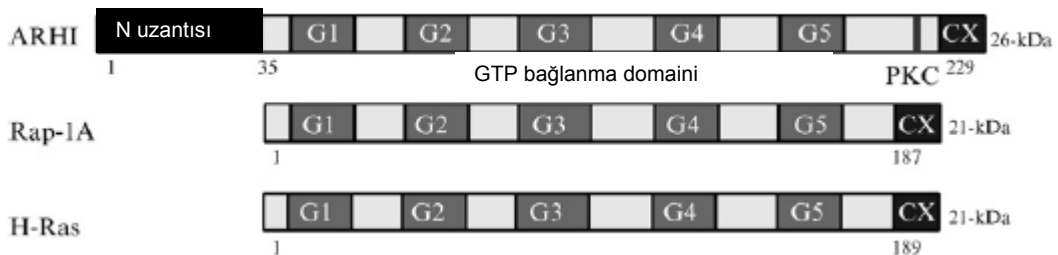
delesyonlar *ARHI*'in GTP bağlanma ve protein ekspresyonunu etkilemeksizin hücre büyümesi üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu uzantının tek başına *ARHI*'in inhibitör aktivitesi için önemli olduğu öne sürülmektedir (Şekil 2.9) (98).

	35	44	46	51	54	64	74	84	94	104					
ARHI	IRDYRVVVV	SGTAGV	KS	ITLL	HKWASGN	RR	EYLP	TIENTY	COL	LGCSHG	LSL	HITDSKS	G	DGNRALQRH	
Rap1-A	MREYKLVVL	SGG	VGKS	SALT	VQFVQGI	FVE	KYDPTI	EDSY	RKQ	VEVDCQ	Q	CML	EILD	TAG	TEQFTAMRDL
H-Ras	MTEYKLVVV	SG	GVG	SALT	IQLIQNH	FD	EYDPTI	EDSY	RKQ	VVIDGET	CLL	DILD	TAG	Q	EYSAMRDQ
	1	10	12	17	20	30	40	50	60	61	70				
	GTP bağlanma domaini					Effektör domain			GTP bağlanma domaini						
	105	114	124	134	144	154	163	173							
ARHI	VIARGHAFVL	VYSVT	KKETL	EELKAF	YELI	CKIKGN	NLHK	F	FLV	LVGNKS	D-D	THREVAL	NDGATCAMEW		
Rap1-A	YMKNGQGFAL	VYSITA	QSTF	NDLQDL	REQI	LRVK-DT	-ED	V	MIL	VGNKC	DLEDER	VVGK	EQGQNLARQW		
H-Ras	YMRTGEGFLC	VFAIN	NTKSF	EDIHQY	REQI	KRVK-DS	-DD	V	MVL	VGNKC	D-LA	ARTVES	RQAQDLARSY		
	71	80	90	100	108	118	127	137							
	GTP bağlanma domaini														
	174	182	192	201	211	221	229								
ARHI	NC	AFME	ISA	KTDV	NVQELF	HMLL	-NY	KKK	PTTGL	QEPEK	KSQ	PNTTEK	LLDK	CIIM	
Rap1-A	CN	CAF	LESSA	KSKIN	VNEIF	YDLV	RQLNRK	TPVE	KKKPKK	KS	-----	-----	CLLL		
H-Ras	-G	PIY	ETSA	KTRQ	GVEDAF	YTLV	REIROH	KLRK	LNPPE	SGPG	CM	SCK-	-----	CVLS	
	138	146	156	166	176	185	189								
	GTP bağlanma domaini						CAAX motifi								

Şekil 2.9. *ARHI*, *Rap1-A* ve *H-Ras* proteinlerinin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması.

ARHI proteini, 1.'si yüksek oranda korunmuş 5 tane GTP bağlanma bölgesi, 2.'si putatif efektör YLPTIENTY bölgesi ve 3.'sü korboksi terminalinde yer alan membrana lokalizasyonu sağlayan CAAX motifi (C: Sistein; A: alifatik aminoasit; X: herhangi bir aminoasit) olmak üzere Ras/Rap aile üyelerine ait 3 tipik motif içermektedirler. *ARHI* proteininin CAAX motifinde meydana gelebilecek mutasyonlar, membran ile ilişkisini koparmaktadır.

ARHI proteininin efektör domaininde yer alan YLPTIENTY yerine *Ras* ve *Rap* aile üyelerinde YDPTIEDSY bulunmaktadır. Buna ek olarak *ARHI*, *p21ras* proteininin aminoasit dizisi ile kıyaslandığı zaman, *ARHI* proteininde *p21Ras*'da bulunan 12. sıradaki glisinin yerine alanin, 61. sıradaki glutamin yerine glisin aminoasitinin bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10) (26).



Şekil 2.10. *ARHI* proteininin N ve C terminal bölgelerinin homolog proteinlerle karşılaştırılması.

2.4.1. *ARHI* Gen Ekspresyonunun Fenotipik Etkisi

Çoğu tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonu, farelerdeki homologlarının knock-out edilmesiyle değerlendirilmektedir. Sığır ve domuzlar *ARHI* homologunu eksprese ederken, farelerde bu genin homologunun olmaması elverişli knockout hayvanların hazırlanmasına engel olmuştur. Farelerde *ARHI* geni homologunun olmamasının nedeni olarak *ARHI* gibi bazı genlerin, kırıkların sıklıkla gözleendiği noktalarda bulunması ve yeniden düzenlenmeler sonucunda oluşabilecek delesyonlarla bu tip genlerin ortadan kaybolabildiği gösterilmektedir (99).

İnsan *ARHI* geninin vektörler aracılığı ile farelere transfeksiyonu sonucu, farelerde insan *ARHI* geni ekspresyonu sağlanmıştır. *ARHI* transgenini eksprese eden farelerde transgen içermeyenlere oranla daha düşük vücut ağırlığı tespit edilmiş ve testis, timus gibi bazı belli organlarda gelişim bozukluğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, *ARHI* transgenini yüksek oranda eksprese eden farelerde *ARHI*'in prolaktin ekspresyonunu inhibe ettiği ve buna bağlı olarak farelerde bozuk meme bezi gelişimi ve overde folikül oluşmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak *ARHI*'in meme bezi ve over gelişiminde önemli bir role sahip olduğu ve yokluğunun meme ve over kanserine neden olduğu belirlenmiştir (100).

2.4.2. *ARHI* Geninin Tümör Gelişimindeki Rolü

ARHI geni, ilk defa normal meme ve over epitel hücre hatlarında eksprese edilen, fakat tümör hücrelerinde eksprese edilmeyen genleri belirlemek için kullanılan 'differential display PCR tekniği' kullanılarak belirlenmiştir. Normal over dokusunda yüzeysel epitel hücrelerde eksprese edilen genler arasında yer alan *ARHI* geni, over kanserinde en çok ekspresyon azalması gösteren gen olarak belirlenmiştir (26).

İmmünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanılarak, meme tümör hücreleri ile komşu normal meme epitel hücrelerindeki *ARHI* gen ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında, *ARHI* ekspresyonundaki azalmanın meme kanser progresyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (101).

ARHI'in folliküler tiroid kanseri gelişimindeki rolü LOH ve metilasyon teknikleri kullanılarak gösterilirken, pankreas kanserindeki rolü kantitatif gerçek

zamanlı RT-PCR çalışmalarıyla belirlenmiştir (102,103). Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde hipermetilasyona bağlı *ARHI* ekspresyonunda azalma mikroarray yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (104).

2.4.3. *ARHI* Geninin Sinyal İletimindeki Rolü

ARHI gen ekspresyon kaybı olan hücrede adenovirüs aracılı *ARHI* gen ekspresyonunun yeniden sağlanması, genin hücre büyümesini inhibe etme özelliği ile uyumlu olarak, *p21WAF1/CIP1* sinyal yolunu regüle eder ve siklin D1 sinyal yolu regülasyonunu engeller (26). Son yıllarda yapılan Western blot analizleri sonucunda *ARHI* tekrar ekspresyonunun *JNK* yolunu çalıştırdığı, fakat *Ras/Map* ve PI3 kinaz sinyal yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir (105).

ARHI'in kanser gelişimini hangi mekanizma ile sağladığını göstermek için *ARHI* ile etkileşen proteinler için maya ikili hibrid sistemi kullanılarak bir insan meme epitel hücre cDNA kütüphanesi taranmış ve *ARHI*'in *STAT3* ile etkileşime girdiği bulunmuştur. *STAT3*, nukleustan hücre yüzeyine sinyal ileten ve gen transkripsiyonunu aktive eden bir latent transkripsiyon faktörüdür. *STAT3* meme ve over kanserlerinde genelde fosforillenmiştir ve aktif haldedir. Bu kanserlerde, *IL-6* gibi sitokinler ve büyüme faktörleri *STAT3*'ü aktive ederek proliferasyonu stimule ederler. *ARHI-STAT3* etkileşimi memeli hücrelerinde koimmunopresipitasyon ile gösterilmiştir. Etkileşim, *STAT3* için spesifiktir, çünkü *ARHI* *STAT1* veya *STAT5a*'ya bağlanamazken, hem fosforile hem defosforile *STAT3* formları, *ARHI* ile etkileşime girmektedir. *ARHI*, *STAT3*'ün DNA bağlanma bölgesine bağlanarak *STAT3*'ün aktivitesini belirgin olarak inhibe etmektedir ve bu inhibisyonu *STAT3* fosforilasyonunu önemli derecede etkilemeden gerçekleştirdiği gösterilmiştir. *ARHI* ve *STAT3*, SKOv3 hücrelerinde birlikte eksprese edildiğinde *ARHI*'in sitoplazmada *STAT3* ile bir kompleks kurduğu ve *IL-6* tarafından indüklenen nukleusa *STAT3* translokasyonunu önlediği belirlenmiştir. N-terminali (NTD) olmayan *ARHI* mutantının da inhibitör aktivitesi göstermesi, *ARHI*'daki benzersiz N-terminal uzantısının nukleustaki *STAT3*-aracılı transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonuna katkıda bulunmadığını göstermektedir (105,106).

2.4.4. *ARHI* Monoallelik Ekspresyonu ve *ARHI* Geninde Ekspresyon Kaybında Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

Normal ve tümörlü dokularda *ARHI* geninin monoallelik ekspresyonu ilk defa polimorfizm çalışmalarıyla belirlenmiştir. Promotor bölgesinde bulunan +231 G/A polimorfizm çalışmasında 2'si kanser hücre hattı ve 2'si normal meme epitelyal hücre hattı olmak üzere toplam 4 örnekte *ARHI*'in sadece A allelinden veya sadece G allelinden eksprese olduğu gösterilmiştir. *ARHI* geninin sadece paternal allelden ekspresyon gösterdiği ise dinükleotid tekrar dizilerinin kullanıldığı aile çalışmalarında belirlenmiştir (26).

Over ve meme tümörlerinin % 40'ında *ARHI* geninde ekspresyon kaybına LOH'un neden olduğu gösterilmiştir (26,107).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, *ARHI* geni üzerinde yer alan üç CpG adacığında meydana gelen metilasyonun ve kromatin modifikasyonunun, bu genin maternal allelinin sessizleştirilmesinde rol oynadığını göstermiştir (107-109).

ARHI promotor bölgesinde yer alan CpG adacık II'de her iki allelde meydana gelen hipermetilasyon *ARHI* gen ekspresyon kaybı ile sonuçlanmıştır ve bu hipermetilasyon meme ve over kanserlerinin % 10-15'inde gözlenmiştir (109). CpG adacıklarında meydana gelen metilasyonu ortadan kaldıran ajanların ve/veya histon deasetilaz inhibitörlerinin kullanılmasıyla bu tümör süpresör gendeki susturulmuş her iki allelin de yeniden aktive olabileceği gösterilmiştir (108,109). Kromatin immünopresipitasyon deneyleri sonucunda normal hücrelerdeki *ARHI* ile ilişkili olan histon H3 lizin 9/18 asetilasyon seviyesinin, *ARHI* ekspresyonu olmayan meme kanser hücre hatlarından belirgin oranda yüksek olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri hücrelerine histon deasetilaz inhibitörleri verildiğinde, *ARHI* geninin yeniden ekspresyonunu, aynı zamanda histon H3 lizin 9/18 asetilasyonunda artışı ve histon H3 lizin 9 metilasyonunda azalışı da sağlayabilmektedir (108,110).

Over ve meme tümörlerinin %20-30'unda *ARHI* ekspresyon azalması, E2F1 ve E2F4'ü içeren transkripsiyonel mekanizmalar ve aynı zamanda *ARHI* mRNA'sının yarı ömrünü azaltan RNA bağlanma proteinleri ekspresyonu ile olmaktadır. EMSA, kromatin immünopresipitasyon (ChIP) deneyleri ve Western blot yöntemleri ile E2F1 ve E2F4'ün meme ve over kanser hücrelerinde *ARHI*

promotor bölgesine bağlandığı ve E2F1 ve E2F4 proteinlerinin kanser hücrelerinde daha yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlanma hücrelerin histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri , trichostatin A (TSA) ile muamelesi sonrasında azalmaktadır (111).

Translasyona uğramayan 3' ucunda (UTR) yer alan AU'ca zengin elementlere (ARE) bağlanan proteindeki (HuR) değişikliklerin hızlı mRNA turnover'ına sebep olabileceği gösterilmiştir. HuR'nin normal hücrelerde *ARHI* geninin ARE bölgesine bağlanabildiği ancak, over kanserlerinde normal over epitel hücrelerine kıyasla HuR proteininin bu bölgeye bağlanma aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir ve dolayısıyla bu durum *ARHI* mRNA'sının hızlı turnover'ına neden olmaktadır (105).

ARHI geni ile ilgili çalışmalar, şimdiye kadar başta meme ve over tümörleri olmak üzere folliküler tiroid ve pankreas tümörleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Meme ve over kanserleri ile ilgili yapılan bir çalışmada *ARHI* geninin normal beyin dokusunda da eksprese edildiği gösterilmiş fakat yapılan literatür taramalarında beyin tümörlerinde bu gen ile ilgili çalışma yapılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada, toplam 21 glial tümör örneğinde, *ARHI* geninin ekspresyon seviyesinin gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile değerlendirilmesi, 1p31 bölgelerine spesifik polimorfik markırlar kullanılarak LOH analizi yapılması ve LOH gözlenmeyenlerde ise *ARHI* genindeki metilasyon profilinin araştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METODLAR

Bu çalışmada, 21 glial tümörlü olgunun örneklerinde *ARHI* tümör süpresör geninin etkili olup olmadığını gösterebilmek için LOH, metilasyon analizi ve gerçek zamanlı RT-PCR teknikleri kullanılmıştır.

3.1.Periferel Kandan DNA Eldesi

Glial tümörlü olgulardan operasyon öncesi alınan periferel kan örneklerinden DNA izolasyonu için, yüksek tuz konstrasyonu kullanılarak proteinlerin çöktürölme esasına dayanan yöntem kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler

0.5 M EDTA (pH:7.4 - 8.0): 100 ml 0.5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 18.6120 g EDTA (Sigma) 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH'ını 7.4'e ayarlamak için NaOH çözeltisi kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Eritrosit Liziz Tamponu

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0.5 M EDTA

1 litre liziz tamponu hazırlamak için 8.28 g NH₄Cl (Sigma), 1 g KHCO₃ (Sigma) ve 4 ml 0.5 M EDTA (Sigma) toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

0.1 M NaCl: 100 ml 0.1 M NaCl solüsyonu hazırlamak için 23.4 g NaCl (Sigma) 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

Lökosit Liziz Tamponu (WBL)

0.1 M NaCl

0.5 M EDTA (pH: 7.4 – 8.0)

100 ml WBL hazırlamak için 2.5 ml NaCl (Sigma), 5 ml EDTA (Sigma) ve 92.5 ml steril distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

9.5 M Amonyum Asetat Çözeltisi: 36.613 g amonyum asetat (Sigma) 20 ml distile suda çözüldü. Sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. Otaklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi: 10 g SDS (Sigma) 100 ml distile suda çözüldükten sonra filtreden (Orange Scientific) geçirilerek steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K Çözeltisi: 10 mg proteinaz K (Sigma) 1ml steril distile suda çözüldü. Daha sonra 50 µl'lik alikotlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

% 70'lik Etanol: 70 ml % 99'luk etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.

3.1.2. İşlemler

1. Her bireyden K₃EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan alındı.
2. K₃EDTA'lı tüp içerisindeki 10 ml kan 50 ml'lik santrifüj tüpüne transfer edildi ve transfer edildikten sonra alt üst edilerek homojenize edildi.
3. Üzerine toplam hacim 40 ml olacak şekilde soğuk liziz tamponu ilave edildi ve vorteks aracılığı ile karıştırıldı.
4. 15 dakika -20 °C'de inkübe edildi.
5. 10 dakika 1500 rpm'de +4 °C'de santrifüj (Sigma) edildi.
6. Dökelti atılıp çökelti elle vurularak iyice homojenize edildikten sonra üzerine toplam hacim 20 ml olacak şekilde ikinci kez soğuk liziz tamponu ilave edildi ve vorteks aracılığı ile iyice kısa süreli karıştırıldı.

7. 10 dakika 1500 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
8. Dökelti atılıp çökelti iyice karıştırılarak homojenize edildi ve çökeltinin üzerine 9.4 ml WBL tamponu, 500 µl % 10'luk SDS ve 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.
9. 37 °C'de bir gece etüvde bekletildikten sonra ertesi gün üzerlerine 3.7 ml 9.5 M amonyum asetat çözeltisinden eklendi. Beyaz köpüklü bir görünüm oluşuna kadar elle vurularak iyice karıştırıldı.
10. Oda ısısında 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.
11. Protein içeren çökelti tüpte bırakılarak, DNA'yı bulandıran dökelti, mikropipet ile başka bir 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:2 oranında saf etanol yavaşça eklendi ve tüp alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı.
12. Toplanan DNA, içine 500 µl % 70'lik etanol konulmuş 1.5 ml'lik ependorf tüpüne pipet ucu ile transfer edildi.
13. 10 dakika 13000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj (Sigma) edildi.
14. Santrifüj sonrasında dökelti atıldı ve dipte kalan DNA'dan alkolün uzaklaşması için ependorf tüpünün kapağı açık şekilde yaklaşık 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi.
15. Kurumuş olan DNA üzerine 50-100 µl steril distile su ilave edildi.
16. Yaklaşık 20 dakika 37 °C etüvde DNA çözünmeye bırakıldı.
17. Elde edilen DNA örneklerinin optik dansite (OD) ölçümleri 260 nm'da spektrofotometre (Shimadzu,UV-1601) kullanılarak ölçüldükten sonra, konsantrasyonları 25 ng/ml olacak şekilde sulandırılıp uzun süreli -20 °C'de, kısa süreli +4 °C'de saklandı.

3.2. Primer Tümör Dokusundan DNA İzolasyonu

3.2.1. Kullanılan Çözeltiler

0.1 M Tris HCl (pH: 7.4): 1.211 g tris baz (Sigma) 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH'ını 7.4'e ayarlamak için saf HCl çözeltisi kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA (pH: 8.0) [Bkz. Syf. 32]

% 10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi [Bkz. Syf. 33]

Proteinaz K Çözeltisi [Bkz. Syf. 33]

Tampon A: 1000 µl 0.1 M Tris-HCl (pH: 7.4) ve 40 µl 0.5M EDTA (pH: 8.0) 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine aktarıldı ve toplam hacim 10 ml olacak şekilde steril distile su ilave edildi.

Ayrıştırma Tamponu: 10 ml tampon A üzerine 840 µl proteinaz K ve 340 µl SDS solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan ayrıştırma tamponu, içerisinde 3 ml olacak şekilde ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

3.2.2. İşlemler

1. Tümör örneği, içerisinde 1 ml ayrıştırma tamponu bulunan ependorf içerisine alındı ve el homojenizatörü yardımı ile solüsyon içerisinde iyice parçalandı ve homojenize edildi.
2. Materyal 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alınarak üzerine 2 ml ayrıştırma tamponu ilave edildi.
3. Daha önceden 65 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde yaklaşık 1.5 saat inkübe edildi.
4. Üzerine 1 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edilerek vorteks aracılığı ile iyice karıştırıldı.
5. 30 dakika 5000 rpm'de 25 °C'de santrifüj edildi.
6. Çökelti tüpte bırakılarak, DNA'yı bulunduran dökelti mikropipet ile başka bir 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 2 katı kadar hacimde izopropanol (Sigma) eklendi ve yavaşça alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı.
7. Toplanan DNA, içine 500 µl % 70'lik etanol konulmuş ependorf tüpüne pipet ucu ile transfer edildi.
8. 10 dakika 13 000 rpm'de 25 °C'de santrifüj edildi.

9. Santrifüj sonrasında dökelti atıldı ve dipte kalan DNA'nın uzaklaşması için yaklaşık 1 saat 37 °C etüvde ependorf tüpünün kapağı açık bir şekilde inkübe edildi.
10. Alkol uzaklaştıktan sonra, elde edilen DNA miktarına bağlı olarak üzerine 50-100 µl steril distile su ilave edildi.
11. Yaklaşık 20 dakika 37 °C'de etüvde DNA çözünmeye bırakıldı.
12. Elde edilen DNA örneklerinin OD değerleri 260 nm'da spektrofotometre kullanılarak ölçüldükten sonra, konsantrasyonları 25 ng/ml olacak şekilde sulandırılıp uzun süreli -20 °C'de, kısa süreli +4 °C'de saklandı.

3.3. LOH Analizi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Glial tümörlü olguların periferik kanından ve tümör örneklerinden elde edilen genomik DNA örneklerinde ilgili bölgenin çoğaltılması PCR ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde yüksek derecede polimorfik kısa, ardışık tekrar eden diziyeye sahip ve FAM (mavi) floresan boyası ile işaretli mikrosatellit markırlar (1p31 bölgesinde yer alan ve 1p31 bölgesinin telomerik bölgesinden sentromerik bölgesine doğru sıralanan D1S2638, D1S430, D1S207, D1S226 ve D1S488 markırları) kullanıldı. Polimorfik mikrosatellit markırlar, <http://www.gdb.org> web sayfasından seçildi. Amplifiye edilecek olan DNA yüksek ısıda denatüre edildi. Daha sonra kalıp DNA ve primer dizinin hibridize olabilmesi için gerekli sıcaklık sağlandı. Hibridizasyon sonrasında dNTP'lerin, gerekli tuzların ve uygun tampon çözeltisinin bulunduğu ortamda Taq DNA polimeraz aracılığıyla primerlerden itibaren DNA sentezi başlatıldı.

3.3.1. LOH Analizi için Kullanılan Primer Dizileri, PCR Karışımı ve Koşulları

Primer dizileri:

D1S226 (İleri): 5' - 6-FAM- GCTAGTCAGGCATGAGCG - 3'

D1S226 (Geri): 5' - 6-FAM- GGTCACCTTGACATTCGTGG - 3'

D1S488 (İleri): 5' - 6-FAM- GCAAACAGAGACTTCACCT- 3'

D1S488 (Geri): 5' - 6-FAM- CTTCCAGGGACTAGAATGG- 3'

D1S430 (İleri): 5' - 6-FAM- TCCAGATTTAGTGTCATTTCCC- 3'

D1S430 (Geri): 5' - 6-FAM- CACTTACAGTAACAAGCCCCAG- 3'

D1S207 (İleri): 5' - 6-FAM- CACTTCTCCTTGAATCGCTT- 3'

D1S207 (Geri): 5' - 6-FAM- GCAAGTCCTGTTCCAAGTCT- 3'

D1S2638 (İleri): 5'- 6-FAM- CTTGGATTGGTGGGTA- 3'

D1S2638 (Geri): 5'- 6-FAM- AGGTTTCAGGGTGGCT- 3'

D1S226, D1S488, D1S207, D1S430 ve D1S2638 primerleri için hazırlanan PCR karışımı:

	Stok derişim	Kullanılan Miktar
Reaksiyon Tamponu	10X	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
dNTP karışımı (dATP, dTTP,dCTP,dGTP)	20 mM	1,5 µl
Primer (İleri)	10 pmol/µl	1,5 µl
Primer (Geri)	10 pmol/µl	1,5 µl
DNA	100 ng/µl	1 µl
Tag DNA Polimeraz	5 U/µl	0,2 µl
H ₂ O		13,8 µl

Toplam hacim 25 µl'de PCR reaksiyonu kuruldu.

D1S226, D1S488, D1S207 ve D1S2638 primerleri için PCR Koşulları:

94 °C'de	5 dakika	1 döngü
94 °C'de	45 saniye	} 32 döngü
50 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1 dakika	
72 °C'de	10 dakika	1 döngü

D1S430 primeri için PCR Koşulları:

94 °C'de	5 dakika	1 döngü
94 °C'de	45 saniye	} 32 döngü
55 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1 dakika	
72 °C'de	10 dakika	1 döngü

3.3.2. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi

3.3.2.1. Kullanılan Çözeltiler

10X Tris- Borat-EDTA (TBE) Tamponu

0.089 M Tris-Borat (Sigma)

0.089 M Borik Asit (Sigma)

0.002 M EDTA (Sigma)

500 ml 10X TBE tamponu hazırlamak için 54 g tris-baz, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) son hacim 500 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

1X TBE Tamponu: 1X TBE tampon çözeltisi hazırlamak için 10X TBE tampon çözeltisi 1:9 oranında distile su içerisinde seyreltildi. Oda sıcaklığında saklandı.

EtBr (Etidyum-bromid) (Sigma) Çözeltisi: 10 mg EtBr 1ml distile suda çözüldü. Işık geçirmeyen bir şişede +4 °C'de saklandı.

Yükleme Tamponu

% 0.5 (w/v) ksilen siyanol (Sigma)

% 95 (w/v) formamid (Sigma)

% 5 (w/v) bromfenol mavisi (Sigma)

100 ml yükleme tamponu hazırlamak için 95 ml formamid, 0.5 g ksilen siyanol ve 0.5 g bromfenol mavisi toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Çözelti +4 °C'de saklandı.

% 2'lik Agaroz Jel Çözeltisi: 50 ml % 2'lik agaroz jel çözeltisi hazırlamak için 1 gr agaroz (Sigma) 50 ml 1X TBE tamponunda çözelti berrak oluncaya kadar kaynatılarak çözüldü. Çözelti berraklaştıktan sonra ısı 50 °C'ye gelene kadar soğutuldu. Daha sonra stok EtBr solüsyonundan 1 µl eklenerek karıştırıldı. Çözelti, içine tarağı önceden yerleştirilerek hazırlanmış olan elektroforez küvetine boşaltıldı. Agaroz çözeltisi oda ısısında 40-45 dakika polimerizasyon için bırakıldı.

3.3.2.2. İşlemler

1. Elektrofotez tankına 1X TBE tamponu konuldu. Jel, tarak çıkartıldıktan sonra bu tampon içerisine alındı.
2. 5 µl PCR örneği, 2 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak jelde tarağı oluşturmuş olduğu kuyulara yüklenerek yaklaşık 20 dakika 120 volt potansiyel farkında yürütüldü.
3. Örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra UV ışıkta görüntülenerek PCR sonuçları kontrol edildi.

3.3.3. LOH Analizi

PCR ürünleri elde edildikten sonra örnekler 1:30 oranında steril distile su ile sulandırıldı. PCR ürünleri -20 °C'de saklandı. 23.5 ml hidi formamid (Applied Biosystems) üzerine +4 °C'de ve karanlıkta saklanan farklı bir floresan boya ile işaretlenmiş Genescan™ 500 LIZ™ internal büyüklük standardından (Applied Biosystems) 0.5 µl ve PCR ürününden ise 1 µl eklendi ve karıştırıldı. 5 farklı polimorfik markır ile yürütülen LOH analizinde, tümör örneği için 5 tüp ve periferik kan örneği için 5 tüp olmak üzere her olgu için toplam 10 tüp ABI 310 cihazına (Applied Biosystems) yüklendi.

3.3.3.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

ABI 310 cihazından elde edilen ham veriler Genescan (Applied Biosystems) adı verilen bir genotipleme yazılım programına aktarılarak analiz edildi. Bu program, ABI 310 cihazında örneklerin yükleniş sıralarını, cihazın çalışma koşullarını, kullanılan markırların büyüklüklerini, hangi floresan boya ile işaretlendiklerini, hangi büyüklük standardının kullanıldığını ve elde edilen ham verinin analiz edilmesini sağlayacak veri girişinden oluşmaktadır. Bu programa girilen ham veriler, mikrosatellit markırlar ile amplifikasyondan sonra meydana getirdiği ayrışmış bant bilgileridir. Genescan yazılım programına aktarılan bu bilgiler bilgisayar ekranında pikler şeklinde görülür. Normal ve tümör örneklerinin piklerinin büyüklükleri karşılaştırılarak LOH analizi gerçekleştirilir. LOH varlığının veya yokluğunun gösterilebilmesi için aşağıda belirtilen matematiksel bir işlem uygulandı.

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Normal allel II yüksekliği}}{\text{Normal allel I yüksekliği}}}{\frac{\text{Tümör allel II yüksekliği}}{\text{Tümör allel I yüksekliği}}}$$

Allel I: küçük allel (mikrosatellit tekrar sayısı az olan)

Allel II: büyük allel (mikrosatellit tekrar sayısı fazla olan)

Eğer LOH değeri ≤ 0.5 ise; tümör örneğinin büyük allelinde , ≥ 1.5 ise; tümör örneğinin küçük allelinde LOH varlığını göstermektedir.

3.4. COBRA Tekniği ile Metilasyon Analizi

Metilasyon, CpG adaları içinde bulunan sitozin bazlarında meydana gelmektedir. Sodyum bisülfid uygulaması sayesinde metile olan sitozin bazları değişime uğramaz ancak metile olmayan sitozin bazları urasil bazına dönüşür. Amaç, COBRA tekniği ile metile ve metile olmayan DNA dizilerinde farklılık oluşturarak, ilgili gendeki CpG adacığı içermeyen bölgeye özđü hem metile bölgeyi hem de metile olmayan bölgeyi tanıyabilen tek bir primer yardımı ile, glial beyin tümöründen elde edilen DNA'larda ilgilenilen bölgeyi amplifiye etmek, ve PCR sonrasında metile olan bölgede kesim yapan spesifik bir restriksiyon enzimi kullanılarak metilasyonun varlığını veya yokluğunu göstermektir.

3.4.1. Kullanılan Çözeltiler

4 M NaOH (Merck): 8 g sodyum hidroksit (Sigma) 50 ml distile suda çözöldü. Oda sıcaklığında saklandı.

10 mM Hidrokuin (Sigma): 0.55 g hidrokuin ve 50 ml distile suda çözöldü. Hazırlanan örneğin 1:10 dilue edilmesi için, 10 mM hazırlanan tüpten 1 ml alınarak 9

ml distile su içerisine ilave edildi. Solüsyon alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta, oda sıcaklığında saklandı.

3 M Sodyumbisülfid (NaBiS)(Sigma): 7.52 g sodyumbisülfid, 20 ml dH₂O içinde çözüldü. 4 M NaOH kullanılarak pH 5'e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

7.5 M Amonyum Asetat (Sigma): 28.9 g amonyum asetat, 20 ml distile suda çözüldü. Çözüldükten sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. Otaklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

% 70'lik Etanol [Bkz. Syf. 33]

GeneClean III Kiti (Bio 101 sistem, Q-Biogen)

Kit İçeriği

NAI (sodyum iodid)

EZ-GLASSMILK

New Wash Buffer

Elution solüsyonu

New Wash Water

New Wash Buffer hazırlanması

20 ml distile su

22.14 etanol

1 ml New Wash Water

3.4.2. İşlemler

I. gün

1. DNA'ların OD değerleri, 260 nm dalga boyunda, spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak ölçüldükten sonra konsantrasyonları hesaplandı ve her örnekten 5 µg DNA alınarak 50 µl'ye deiyonize su ile tamamlandı.
2. Denatürasyon sağlanması için her uygulamada taze olarak hazırlanan 4 M NaOH solüsyonundan 5.5 µl eklenerek örnekler vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
3. 42 °C'de hibridizasyon fırınında (Techne) 45 dakika bekletildi.

4. İnkübatörden alınan DNA'lar spin edildikten sonra üzerlerine 30 µl hidrokuin eklendi ve vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
5. Örneklerin limoni bir renk aldığı gözlendikten sonra 520 µl NaBiS ilave edildi ve tekrar vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
6. 14 000 rpm'de 45 saniye mikrosantrifüjde (Eppendorf) çevirdikten sonra üzerlerine mineral yağ damlatılarak 55 °C ayarlanmış hibridizasyon fırınında, karanlıkta 16-20 saat kadar bekletildi

II.gün

7. DNA'nın sodyum bisülfid solüsyonundan çekilebilmesi için GeneClean III Kiti (Bio 101 Sistem, Q-Biogen) kullanıldı.
8. 15 ml'lik falkon tüpler alınıp numaralandırıldı. Her bir tüpe NaI (sodyum Iodür) solüsyonundan 2 ml kondu. 55 °C'deki DNA örneklerinden ~650 µl alınarak bu NaI üzerine eklendi.
9. DNA'yı bağlama için kullanılan EZ-GlassMilk solüsyonundan 20 µl eklendi, vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
10. 30 dakika hafif hızda çalkalamaya (Edmund Buhler) bırakıldı.
11. Örnekler 3500 rpm'de 10 dakika 9 °C'de santrifüj edildi ve üst faz dikkatli bir şekilde döküldü.
12. New Wash sıvısından 2 ml her tüpe ilave edildi, vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı ve 10 dakika 3500 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
13. Üst faz dikkatli bir şekilde döküldü.
14. New Wash solüsyonundan 1 ml alınarak dipteki çökelti otomatik pipet yardımı ile karıştırıldı ve örnek temiz ependrof tüplere alındı.
15. 3 dakika, 14 000 rpm'de, 25 °C'de santrifüj edildi
16. Üst faz dökülerek ependrof kurutma kağıtlarının üstüne ters çevrildi ve kurumaya bırakıldı.
17. 37 °C'ye getirilmiş olan elution solüsyonundan 100 µl eklendi ve vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
18. 15 dakika 37 °C'lik hibridizasyon fırınında bekletildi.
19. 14 000 rpm'de, 10 dakika, 25 °C'de santrifüj edildi
20. Üstte kalan faz ependorf tüpe aktarıldı.

21. Üzerine 11 µl 4 M NaOH eklendi ve vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 15 dakika bekletildi.
22. İnkübasyonu takiben 111 µl 7.5 M amonyum asetat eklendi ve vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
23. Üzerine 666 µl % 100 etanol eklendi, tekrar vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı ve 1 gece –20 °C’de bekletildi.

III. gün

24. Örnekler vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı ve 30 dakika 14 000 rpm’de, 25 °C’de santrifüj edildi, üst faz dikkatlice döküldü.
25. % 70 etanolden 500 µl - 1 ml eklenip vorteks kullanılarak kısa süreli karıştırıldı.
26. 20 dakika 14 000 rpm’de santrifüj edildi. Dökelti atıldıktan sonra çökelti kurumaya bırakıldı.
27. 31 µl steril su eklenip otomatik pipet yardımı ile karıştırıldı, buza kondu ve OD değerleri 260 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ölçüldü.

3.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

COBRA tekniği ile metilasyon analizinde önemli olan bir başka nokta da kullanılan DNA polimeraz enziminin “hot start” özellikte olmasıdır. Bunun nedeni metilasyonun genellikle GC bakımından zengin bölgelerde meydana gelmesidir. Dolayısıyla denatürasyonu normal bir diziye oranla daha zor olacaktır ve denatürasyon süresinin uzun tutulması gerekmektedir. Ancak sıradan bir DNA polimeraz, uzun süren denatürasyonlarda aktivite kaybına uğrayacak ve amplifikasyon ya düşük seviyede ya da hiç olmayacaktır. Bu amaçla uzun denatürasyon döngülerine dayanıklı “hot start” özellik taşıyan DNA polimeraz enzimleri tercih edilmektedir. Bu çalışmada *ARHI* geni metilasyonunun saptanması amacı ile hot start özellikli platinium DNA polimeraz (Invitrogen) kullanılmış ve genin tek bölgesinden dizayn edilmiş bir çift primer ile çalışılmıştır (Şekil 3.1).

TAGGTA AAAAATATTAGTTAATATATGTAAGGTATATATTGGTTTGATTTGGAAAGTCGGT
ATATTTTTGGAGGAGGAGGGGTTTTGGTTAGTGGTGGTAGGAGGGAGGTTGTGGAAGTTAGG
GTTTTTGTATATATATGNGAAGTTTGTAAATATGTTTTAGAAAAGAAATAGANGGTATATGTAT
TTTTAAAAGGTAAATGATTTTTAAACGGTGTAGATTNINAGTTAAATTTTTTTTCGGATTAG
AGAAAGATTTGGAAAGGGAAGGAGATTGTTTATAGAATATAAAATTTTTTTTCGTAAAAGAT
AGTATTGTATAGGATTATTTTTAAAATATGTTAGAAAATATATTTTTGGGGTAAAATATTTTTG
ATCGTTTTTATAGGTTGTTATTTGTTATGTGATGTTATATTAGAATTAGGTTGGAATTTGT
TTTGAGATAGGTTTTTATTTTTGTTGTTTAGATTGGAGTATAGTGGTTGTGATTACGGTTTT
ATTGTAGTTTTCGATTTTTTTGATGTGGGAGGTTAAGTGATTTTTTTTATATTAGTTTTTTT
AAATAGTTGGGATTATAGCCGTTATTATTATATTGGGTAAAATTTTTTTAAAGTAGAGA
TAAGTTTTTTTTTATGTTGTTTAGGTTGTTTTAAATTTTTGTTTTAAATTTTTTTATTTTT
TTAGGATTATAGCCGTTAGGTTAGATTTTATAGGTTTTTATAGGTTTTTATAGTTTTTACGTATTAGTTAT
TTGGTAGGGGAGGGATTATAGTGGTAGAAGAGTAGTATTAGTGGTTTTATATTATATATT
TTGGTTTTAGTTGGTTGGGGTATATAAAAATAGGTTGTTATCGTTAACGATTAGGTTTTATA
GGGTATTGTTGTTAAAATTTGTTGTTAATAATTTTTTATATATTTTTTAAAACGTTCCGGTA
GGCGGTGGTGCAGTGTGTTTAAATGTATTCGTTCGTTAGGCGTTTTATAGGTAAGGGAGAAAAG
AAGTTAGACGGAGTTCGGAGATGTGGAGGGTAGACGTAGGCGTATTTGGAAAAGGGATTG
GCGGTGGGAGGCGTAGAGGGAAAAAGGAACGATATAATCGGGTTTTTTAATCGTTGGCGG
ATTCGATGGGGCGTTTTGCGAGGGTTCCGGCAGGGTTTTGTTAGGATAGTAGTATTGCGT
TTAAGGAGTGAGAGGTTATTCGGGNTATTGGAGTTAGATTTTTAATTCGTTTTAGTGGGA
GGCGAAGAATAACGAAAGTTTTCGTATTTTTTATTTTTNTAATGGTTAATGATATTAAGGT
TTTTTATATGGTTATTTGTTATTTGTATATTTTTTAGTGAAATGTTTGTGTTATGTTTTTTGA
TTATTTTTTAATTTGGATTTTTTAAAATAAATTGATTTTTGAGTTATTTATATATTTTAGAT
ATTGGTTGTATGTTAGATATATGGTTTTGTAAATATTTTTTTTTTAGGTAATTTTTTTAGT
ATCGTTATAGGGTTTTTTATAAAGTAAAAGTTTTAAATTTATGGAGTTAATTTATTAAT
ATTTTTTTTTATCGGTTTTGTTATTAATGTTAATTTAAGAATTTTTTGTGTTAGTTTTAGA
TAATAGTTTGTGTTTTTTTTAAAATCGTTTTGTAAATTTTATTCGTTATAGTTATATTTAGT
TATTTTTAATTTATGTAAGGGTTATTTTTGCGGGGGGAATTTATAGATGTTTTGTTTT
TTTAGTATTATTTGTGGAAGGATTTATTTGTTTTGTATTTAATTTGTTTTGGATTTTCGTT
TTAAAATTAGTTGGATCGGTTTTTTGTTGGTAAAAGTTTTGTTTTGAAGTTTTATTTTTAATAGG
TGAGAAAAAGTTTTATAGTTAATAGTTTTTTTTTTAATTTGTAATTTTCGTTTTGAATTTTT
GGATTAGTTTTTCGATTGTTGTAGATGTTAAGCGGATTTTCGCGTCGTTTTGCGTTGGGTT
AGTTTTTTATAGTTGGTTTTTTATTACGTATTGCGTAAGCGGAATTTATGTTTTGTTATTT
ATATTTTTTTCGTTTTTCGATTTTCGTTTTTGTGCGTAAGTCGGAATATAAAAATCGCGGAG
GAGTGAGTTTTTGGGGTGTTTAGTTGGTTGTTCGCGTAGTTTTTTTCGAGTAGCCTATTTG
TTTTTTAGGTTGTTTGGTTTCGTTGTTTCGAGAAAAGGTAAGTTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTAG
GGGTATTTGAAAATAATAAGTGTAGATAAAGTAGTAGATGTTGTTGCGTAGTANAAGTT
TATGGGCGAGTTGTTTTTGAATTTGGAATTAGGTTTTTTTTTTGGCAGGATTACGTAAGAAT
TATTCGTAGTTTTTTCGGGTTTTTGGTAGGTTTTGTAATTTGTATTTTGGATAGTTTTCGTTG
GGAAGTTAGTATTTTTTAAATATAAAAAGAACGAGGTTTGATAAGTGTGCGAGTTTTAAAGGT
TGATATAGTGTATTATTATAGTTGCGTANGTAGTTAGTGTTTAGGAAGTAATAGTGGGA
GTTATGTAGTGTGAAAGTAAGATTGAAATGGGCGAGGAGGGTAGTAGTCGTTATAGTTAT
TAGAGAGAAATTTGATTTTTGTAGGTGCGTGGTGATGTTTATGAGTTAGGTTGGTGTCGTA
ATAGTAGCCGCGGGATTTTTGAGTTTTCGTACGGTCGTTGGGTTTGGACGTTTTTTGTTTTT
TGGAAATTTTTTATTTTTTTTTTTAGTTTTGAGGTTAGGTTGGTTTTGGGAAGGTGGAACGAGTG
TGGAGGGAGTGGGGGGGGGTTTTATTGTTTGANAATGANAATTTTTTTTTTATATTTTGGGA
AATTTAGTTATTACGTGTGTTTTTTATTAATTTTTTTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTGATAGA
GACGGCGGTTTTTTTTATGTTATTTAGGTTAGTTTTGAATTTTTTGTGTTTAAAGCAGTTTTT
TTATTTTTGATTTTTTAAAGTGTGGAATTATAGGTATGAGTTAATGCGTTCCGTTGTTTTT
ATTAATTTTTTATGAATGAATTTGTATATATATTTTTTTAGANTAGGAAGTNATGTANAAT
AGAATAATTAGTAATGTATATTTTTTAAATGTGGATGTTGGTGGTTNATAGATATTTGGT
TTTTATTGGAATTTTTGATATTAATATGNNAGTTTTATAAATAGTTGTGGAGAGTGTAGATA
AGGTTAGGATTTTTGTGATTAGAGAATTTTTTAGTTCGTTGAAGATTTAAGGAAAAGTTGGAT
TGTTGATTTTTGTTAATAAATAAGATGTGAAAGATTGTATTTATTTAGTAGAAAATTTTTT
AGTTTTTTAAGTTAAATTTTATTAAGGTTATTATTGTTAAAGGAATTTGTTTTAGGATT
TGGATAGTTGATGTTATTTAATATTAGATGATATTAATTAATTTATATTTTTATAGATT
GGAATAAAGTGTAGATTTTTATTTGAAAAGTTGTA AAAAATGAATGGTTAGATATATGTAT
GTATTTATTTTTATATTAATTTTTAAATATTTATTGTATTAATTTTTTTGGTTTTTTTTTAAT

TAAGAATATAAAAATTATTTATTTAAATTTTGTATTTAAGTTTAGAATATTTTTAGAAATT
ATATTATTTTAAAGAAGTTAGATTAGAATTAGAAGTAANTTAANTTTGAAGATATAATAA
TTAGTAATAATATTTTTTTTTTTTTTAAATGAAAATTTAATATGGGGTGGGTATGTTGTGT
TATATTTGTAATTTAATATTTTTGGGAGGTTGATGTAGGAGGATPATTTGAATATAGGAG
TTTAAGATTANTTTGGATAATATAGTAAAATTTTGTTTTATAAAAAATAANAAAATTAG
TTGGGTATGGTGTATATGTTTGTAGTTTTAGTTATTCGGGAGGTTGAGGTGANAGGATT
GATTGATTTTAGGAGGTTGAGGTTGTAGTGAGTTATGATCGTATGATTGTATTTTAATTT
GAGGGATANAGTAAGATTTTGATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTATTATTA
AAATTTAATATGGATATATTATTTTTTTATGGGATTTGTATATTTTAAAAAGGGTTTTT
TTTTTTAGTATTGGGANANTATNTGTTAATTACGTAGTTAGTAANATAGGTTATTTTAT
ATAGGGAGTGTGTTATTTATAAAAAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTATTGTATATGATA
ATTATAGTTGTATTTGAAAAAANTGTATTTAAGGATPATTTATTTTAAAAATATGTN
TAAATTTTATATTTAGTGTATAGGAATNATATTTGTTTGTATPATTTTATTTTTTGT
TAAAGGTTAGTTATGTGGTTTTGTTTGTATGGTGTAAAAATTTTTTTTTATTTGATTTAGG
ATGTTTTTGAAGTAGTTTTTTTTGGGTAGTTGTTTGGTATTTAGGATATATTTGTGAGAAA
ANTNTTTATAATTTAATTTATTTATGTTTATTTTTGAATTTAAAAANTTTATTTGATTG
TTTAATTTTTGAAATTTNTTTTATTTTTANAAGGTTGAATTTAAAAATTTTGTAAAGG
TANTAGTTATGGTAAAAAAAATTTATTTGTTTTGTAAAAAATTTATTTAATATTTATAA
TTTTTTTTAATTTAAAAATTANATTTGAAAAGAAAGGTTTATATATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTATTTTATTGTTATTGTGATTAAGGATTTATGAATTAAGATTTTTTTTTTTAGTTTT
TGGTGGTATATGGTGATAGTATGTTTAGAGTAAAGGTGTTTTTTATGTTNTTTTGGGN
TGTATTGATTGTAGGATTTTTTTTTTTTTATATTTTATATTAGTGAATTTAAAAATTTTT
TTTTTTTTTTTTGTANTGATGATTTTGTAGTTTTAATTAGGGNGACGGTGTATTNTAAAT
GTTATTTTGGTATTTAGTTTTATAGAGTGGGGAAAAATTTTTTTATTTGTTTTTTTTTGAT
TGTTTAGTTTATTTAATTTAAATTTAATTTTATAAGCGAGGAAATGAGAGTGTTTTTT
GTAGGGGTGTAGTGAGAATTTAATAAAAATAGTTTAAAGGAAAGAAAAATAAAGGTAGTATT
GTTGTATTTTNTAGATGGTAAAAAGTAAATTTATTTATGTTTGTTTAATATATATTTTGT
TGTTTTNTCGTTTTAGTAGGTTGAATTTGTGTGTTTGGGAATTTTTTTTTCGTTGTGTGTA
TTTTTTTTACGTTATAGGGTGGATTTTTTTAGAGTTTATGNGGAGTAGTTGGTTAGTTGA
TATGTTTTGATAAGATTGTAGGTTATTANTATTATTTTTTTATCGTTTTATTTTTTTA
GGGTTTTTTTTGTTGTTAGTTAAGTGTGGGAGAATTTGTGTACGTATTTTTTTTTTCGAATT
TTAACGATGGGTAACGTTAGTTTTGGTTTTAAGGAATAGAAGTTGTTGAAGCGGTTGCCG
TTTTTGTTTCGTTTTGTTTATTTTTCGCGTTTTTAAGTTTTATAGGAAGATTAGAGATTAT
CGCGTCGTGGTAGTCGGTATCGTTGGTGTGGGAAAAAGTACGTTGTTGTATAAGTGGGCC
AGCGGTAATTTTCGTTATGAGTATTTGTGATTATTGAAAAATTTTATTGTTAGTTGTTG
GGTTGTAGTTACGGTGTGTTTTTTTTGTATATTATCGATAGTAAAGAGTGGCGACGGTAAT
CGCGTTTTGTAGCGTTACGTTATAGTTCCGGGTTACGTTTTCGTTTTGGTTTTATTTAGTT
ATTAAGAAGGAAATTTTGAAGAGTTGAAGGTTTTTTATGAGTTGATTTGTAAGATTAAA
GGTAATAATTTGTATAAGTTTTTTATCGTGTGGTGGGTAATAAAAAGTATGATATTTTAT
CGGGAGGTGGTTTTGAATGATGGTGTATTTGTGCGATGGAGTGGAAATTCGTTTTTTATG
GAGATTTTAGTTAAGATCGATGTGAATGTGTAGGAGTTGTTTTATATGTTGTTGAATTAT
AAGAAAAAGTTTATTATCGGTTTTTAGGAGTTCCGAGAAGAAATTTAGATGTTAATATT
ATTGAGAAGTTGTTTGATAAGTGTATAATTATGTGAGTTTTGGGTTTTAAGAGTTAGTTT
TTTTTATTTTGTAGCGTGTAGAAAACGTGGATTTATTTTATTTATGTTATATGTATATGGT
TGATTTTGTGTTGTTGTTTGGATTGTAATATTTATGTTGTTAATACGTATATTTTGTAA
TGGATAATTTTTTTTTTTTTTTAGGTTAGAGAATTTAAATTTGTTAAAAATTTGTTATTTGA
AGAGGAGAATAAAAATGTAGTATGATGTATTTAAAGTAAGGTTTTTAGTAATGAATGTAAT
GAGAGAAAATGTTTTGAAAAGAATAAAAATTTAAATGAATAGAAAGAAAAATGGAAGG
CGTTTTTTTTGGTAATTCGATTATTGTGTATTATTTTTAAATATTTTATATTTTGTAAAGT
TTTAATTATATTTTTTAATTGTGTATTTAAGAAAAGTGTTTTTTATAATAAAAAGTTTTTGA
TAAATTGTTGCGTGATATATATTAATAAAAAAAAAATGAATATGTTGATTATTAGGGTGTG
GGAGTAGAGAAAATTTGTAAAGTGATTTTTTATTAAAGATGTTAGTAGTTTTTTATGTTAT
TTAAAAATGTTTGTAGTATTTTGTATAGTAGTTTGTAAAAGTGTAATAGTTTATTTGATTTA
ATAAAGTTTTTTTTGTATGTAATTAGTTGTAANAATTTGTTTTATTANAAAATAAAAATAT
TGTTTTATTGTATTTAAATTTAAATTTATTTGTTAAAAGTTTTTAAATAAGAAATTTTATAT
ATGGATGTTTTGTTATGTTGAAATTTAATATGGGAGGGGGTGTPTTAGGGAGGTT
TTTTGTAATATANAGTTGTTTTGTGTTTTTTTTGAAATTTGATATTTTCGAAAAATTTTAGGTA
TTTTTGAGGAAAATGTTTATAGTGTGTTGTTTTANAGGAAGCGGGTGAAGTAAGTTT
TTGTTTTTTGTTTTTTTTTATATTTTGAATATTTGGATATAGGTAATAGGGAGTAGAATG

AAAGATAAGGGGAGGAATGATATTTGAGANATTTTTTTATAAGGGAGTTTTTAAAGAGAT
TATATTTGAATATAATTTTTTTGAGCGAGGGAATAAAGTATATATATTTTTGTTTTGANA
7201 GTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTGGGAAANGTTTAGGGGAGGT

Şekil 3.1. *ARHI* geni dizisi üzerinde, kullanılan primerlerin yerleşimi.

Her PCR döngüsünde, önceden *SssI metilaz* enzimi ile muamele edilerek tamamen metillenmesi sağlanan bir DNA örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu amaçla spektrofotometrik ölçüm ile 5 µg olarak sulandırılan sağlıklı bir DNA örneği; *SssI metilaz*, S-adenozil metionin ve 10X reaksiyon tampon çözeltisi karışımı ile 4 saat 37 °C’de bekletildikten sonra yukarıda belirtildiği şekilde sodyum bisüfit muamelesine tabii tutuldu. Bu örneğin tümüyle metile olduğu varsayılarak her deneyde, örneklerle birlikte pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.4.3.1. Metilasyon Spesifik PCR için Kullanılan Primer Dizileri, PCR Karışımı ve Koşulları

Primer dizileri:

ARHI (İleri) 5’- GTTGGGTTAGTTTTTTATAGTTGGTT - 3’

ARHI (Geri) 5’- AACCAAACAACCTAAAAACAAATAC – 3’

ARHI primerleri için hazırlanan PCR karışımı:

	Stok Derişim	Kullanılan Miktar
Tampon	10X	5 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
dNTP karışımı (dATP, dTTP,dCTP,dGTP)	40 mM	1,5 µl
Primer (İleri)	10 pmol/µl	2,5 µl
Primer (Geri)	10 pmol/µl	2,5 µl
DNA	100 ng/µl	1 µl
Platinum Tag DNA Polimeraz (İnvitrogen)	2 U/µl	0,4 µl
H ₂ O		34,1 µl

Toplam hacim 50 µl’de PCR reaksiyonu kuruldu.

PCR Koşulları:

94 °C'de	5 dakika	1 döngü
94 °C'de	50 saniye	} 35 döngü
57 °C'de	1 dakika	
72 °C'de	50 saniye	
72 °C'de	7dakika	1 döngü

3.4.3.2. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi

10X Tris- Borat-EDTA (TBE) Tamponu: [Bkn. Syf. 38]

1X TBE Tamponu: [Bkn. Syf. 38]

EtBr (Etidyum-bromid) Çözeltisi: [Bkn. Syf. 38]

Yükleme Tamponu: [Bkn. Syf. 38]

% 2'lik Agaroz Jel Çözeltisi: [Bkn. Syf. 38]

İşlemler [Bkn. Syf. 39]

3.4.3.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

1. 20 µlt PCR ürününün üzerine 2 µlt BstUI tamponu ve 0.4 µlt BstUI restriksiyon enzimi konuldu.
2. Üzerine, üstlerini kaplayacak şekilde mineral yağ ilave edilerek 1 gece 60 °C'lik hibridizasyon fırınında enzim kesimine bırakıldı.

3.4.3.4. Amplifikasyon Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Kontrol Edilmesi

30X Poliakrilamid: 29 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı

10X Tris- Borat-EDTA (TBE) Tamponu: [Bkn. Syf. 38]

1X TBE [Bkn. Syf. 38]

TEMED (AppliCHEM): +4°C’de saklandı

% 10 Amonyum Per Sülfat (APS) (AppliCHEM): 5 g APS 50 ml distile su içerisinde çözüldü. +4 °C’de saklandı

Yükleme Tamponu: [Bkn. Syf. 38]

EtBr (Etidyum-Bromid) Çözeltisi: [Bkn. Syf. 38]

% 8’lik Poliakrilamid Jel Çözeltisi: 25 ml % 8’lik poliakrilamid jel çözeltisi hazırlamak için 6.6 ml 30X poliakrilamid solüsyonundan alındı. İçerisine 200 µl APS ve 20 µl TEMED kondu, karıştırıldı ve hızlı bir şekilde jel iki cam arasına döküldü. Tarak yerleştirildi. ~30 dakika jelin polimerizasyonu için oda ısısında bekletildi.

1. Elektrofotez tankına 1X TBE tamponu konuldu. Poliakrilamid jel bu tampon içerisine alındı, daha önce yerleştirilen tarak çıkartıldı.
2. 7 µl PCR örneği, 2 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak jelde tarağın oluşturmuş olduğu kuyulara yüklenerek yaklaşık 2 saat 300 volt potansiyel farkında yürütüldü.
3. Örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra cam levhalar arasından jel

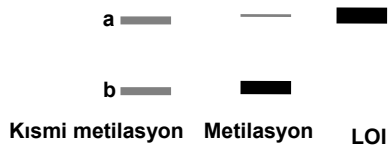
alındı. Bir kabın içerisine kondu. Jelin üstünü kaplayacak şekilde 1XTBE kondu ve üzerine 40 µl etidium bromür ilave edildi. ~30 dakika solüsyon içerisinde bekletildi.

4. Solüsyon içerisinden çıkartılan jel UV ışık altında kontrol edildi.

3.4.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışılan örneklerin göstermiş oldukları bant paternlerine göre örneklerin metilasyon profilleri DigiDoc 1000 programına göre değerlendirildi. *ARHI* geni normalde maternal alleli imprint olan bir gendir. Maternal allel hep metile durumdadır. O yüzden COBRA tekniği sonrasında sadece metile bölgeyi tanıyan BstUI restriksiyon enzimi ile kesim sonrasında maternal allel hep kesime uğrayacaktır. Eğer paternal allel üzerinde bir metilasyon söz konusu ise metilasyon derecesine bağlı olarak, kesim ürününün yoğunluğu normal gen ürününe göre daha fazla olacaktır. Analiz sonrasında, normal gen ürünü ve kesim ürünü yoğunlukları birbirlerine eşit ise bu kısmi metilasyon (normal), normal ürünün yoğunluğu, kesim ürünü yoğunluğundan belirgin derecede az ise metilasyon ve normal ürün yoğunluğu kesim ürünü yoğunluğundan belirgin derecede fazla ise imprinting'in kaybolması (LOI) olarak değerlendirilmiştir.

BstUI ile kesim sonrasında;



$$\frac{b}{a+b} \text{ --- } \% 50 \text{ Kısmi metilasyon}$$

$$\frac{b}{a+b} \text{ --- } \geq \% 85 \text{ Metilasyon}$$

$$\frac{b}{a+b} \text{ --- } \leq \% 10 \text{ LOI}$$

3.5. Primer Tümör Dokusundan RNA İzolasyonu

3.5.1. Kullanılan Çözeltiler

SV Total RNA İzolasyon Kiti (Promega)

Kit İçeriği:

SV RNA liziz tamponu

SV RNA dilüsyon tamponu

SV RNA yıkama solüsyonu

Sarı kor tamponu

MnCl₂

DNaz I enzim

DNaz inkübasyon karışımı

DNaz durdurma solüsyonu

Nükleaz içermeyen distile su

3.5.2. İşlemler

1. 30 mg büyüklüğündeki tümör örneği kit içerisinde bulunan ependrof tüp içerisine alındı.
2. Üzerine 175 µl SV RNA liziz tamponu ilave edildi ve el homojenizatörü ile iyice parçalandı ve homojenize edildi.
3. Homojenize edilmiş tümör materyali üzerine 350 µl SV RNA dilüsyon tamponu ilave edildi ve 3-4 defa alt-üst edilerek iyice karıştırıldı.
4. 3 dakika 70 °C'de su banyosunda inkübe edildi.
5. 10 dakika 12 000-14 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.

6. Dökelti mikropipet aracılığı ile dikkatlice temiz bir ependrof tüp içerisine alındı.
7. Üzerine 200 µl saf etanol eklendi ve 3-4 defa mikropipet ile karıştırıldı.
8. Karışım kit içerisinden çıkan spin kolonu üzerine eklendi.
9. 1 dakika 12 000-14 000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Kolondan aşağıya sızan çözelti atıldı ve kolon üzerine 600 µl SV RNA yıkama solüsyonu ilave edildi.
11. 1 dakika 12 000-14 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
12. Kit içerisinden çıkan sarı kor tamponundan 40 µl, 0.09 M MnCl₂'den 5 µl ve Dnaz I enziminden ise 5 µl konularak DNaz inkübasyon karışımı hazırlandı.
13. Kolondan aşağıya sızan çözelti atıldı ve kolon üzerine hazırlanan DNaz inkübasyon karışımından 50 µl ilave edildi.
14. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
15. İnkübasyon sonrasında kolon üzerine 200 µl SV DNaz durdurma solüsyonu ilave edildi.
16. 1 dakika 12 000-14 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
17. Kolon üzerine 600 µl SV RNA yıkama solüsyonu ilave edildi.
18. 1 dakika 12 000-14 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
19. Kolondan aşağıya sızan çözelti atıldı ve kolon üzerine 250 µl SV RNA yıkama solüsyonu ilave edildi.
20. 2 dakika 14 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
21. Kolon kit içerisinden çıkan ependrof tüpü içerisine alındı ve üzerine 100 µl nükleaz içermeyen distile su ilave edildi.
22. Kolon içerisine koyduğumuz ependrof tüpünün açık kapağı santrifüj içerisinde dış yöne bakacak şekilde yerleştirildi.
23. 1 dakika 12 000-14 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
24. Kolon atıldı ve ependrof tüpü içerisinde toplanan RNA -70 °C'de saklandı.

3.6. cDNA Eldesi

3.6.1. Kullanılan Kit

TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)

Kit içeriği:

10X Reverse Transkripsiyon Tamponu
MgCl₂ (25 mM)
10X Random Hekzamer (50 mM, 5nmol)
Multiscribe Reverse Transkriptaz (50 U/μl)
RNaz İnhibitörü
Nükleaz içermeyen distile su

cDNA reaksiyonu hazırlanan PCR karışımı:

10X Reverse Transkripsiyon Tamponu	5 μl
MgCl ₂	11 μl
dNTP'ler	2.5 μl
10X Random Hexamer	2.5 μl
RNaz İnhibitorü	3 μl
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1.25 μl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	14.75 μl
RNA	2 μg (~10 μlt)

Toplam hacim 50 μl'de PCR reaksiyonu kuruldu.

PCR Koşulları:

25 °C'de	10 dakika	1 döngü
48 °C'de	60 dakika	1 döngü

Yukarıda belirtilen reaksiyon gerçek zamanlı RT-PCR cihazında (Applied Biosystems) gerçekleştirildi.

3.7. TaqMan PCR Reaksiyonu

3.7.1. Kullanılan Solüsyonlar

Universal Master Mix (UMM) (Applied Biosystems)

ARHI geni için gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR primer ve problemlerinin tasarımı, daha önceden yayımlanmış olan *ARHI* ilişkili makaleden alınmıştır [Yuan J., 2003]. Reaksiyonda iç kontrol olarak, ikinci bir flöresan boya bağlı olan rRNA (Ribozomal RNA) primer ve problemleri kullanıldı (Applied Biosystems). 2 genin aynı tüp içerisinde çalışılması hem *ARHI* geninin hem de rRNA'nın mesaj miktarının aynı anda belirlenmesine olanak vermiştir. *ARHI* genine ait primer ve problemlerin dizileri aşağıda verilmiştir.

ARHI genine ait primer ve prob dizileri:

ARHI (ileri) 5'- TCTCTCCGAGCAGCGCA - 3'

ARHI (geri) 5' – TGGCAGCAGGAGACCCC - 3'

ARHI (prob) 5'-6-FAM- TGTCTTCTAGGCTGCTTGGTTCGTGCC -TAMRA- 3'

ARHI primerleri için hazırlanan gerçek zamanlı RT-PCR karışımı:

	Stok Derişim	Kullanılan Miktar
Universal Master Mix (UMM)	2X	12,5 µl
<i>ARHI</i> Primer (İleri)	10 pmol/µl	0,5 µl
<i>ARHI</i> Primer (Geri)	10 pmol/µl	0,5 µl
<i>ARHI</i> (prob)	10 pmol/µl	0,5 µl
rRNA Primer (İleri)	10 pmol/µl	0,5 µl
rRNA Primer (Geri)	10 pmol/µl	0,5 µl
rRNA (prob)	10 pmol/µl	0,5 µl
DNA	250 ng/µl	5 µl
H ₂ O		4,5 µl

Toplam hacim 25 µl'de PCR reaksiyonu kuruldu.

TaqMan PCR reaksiyonu, yukarıda belirtilen primer ve problar kullanılarak, aşağıda belirtilen şartlarda gerçek zamanlı RT-PCR cihazı (Applied Biosystems) ile gerçekleştirildi.

PCR Koşulları:

50 °C'de	2 dakika	1 döngü
95 °C'de	10 dakika	1 döngü
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
62 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
61 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
60 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
59 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
58 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
57 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 1 döngü
56 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	
95 °C'de	45 saniye	} 40 döngü
55 °C'de	45 saniye	
72 °C'de	1.5 dakika	

3.7.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılarak hesaplandı. Bu metodta, ARHI geninin ΔCt değeri iç kontrol olarak kullanılmış olduğumuz rRNA geninin Ct değeri ve ARHI geninin Ct değerinin birbirinden çıkartılmasıyla bulundu. Aynı şekilde kontrol olarak kullanılmış olduğumuz otopsilerden elde edilen normal beyin dokusunun ΔCt değerini de otopsilerden elde edilen normal beyin dokusunun Ct değerinin rRNA geninin Ct değerinden çıkartılmasıyla bulundu. $\Delta\Delta Ct$ değerleri ise ARHI geninin ΔCt değerinin normal beyin dokusunun ΔCt değerinden çıkartılmasıyla hesaplandı (112).

BULGULAR

4.1. Glial Kökenli Beyin Tümörlü Olguların Klinik Değerlendirmesi

Çalışma kapsamına alınan glial kökenli beyin tümörlü toplam 21 olgunun patolojik değerlendirilmesi sonucunda, 13'ünün GBM, 5'inin oligodendriogliom, 2'sinin anaplastik astrositom ve 1'inin ise anaplastik oligoastrositom tanısı aldığı belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Glial kökenli beyin tümörlü olguların patoloji sonuçları.

OLGU NO	PATOLOJİ SONUÇLARI
1	Oligodendriogliom
2	Oligodendriogliom
3	GBM
4	GBM
5	GBM
6	GBM
7	Anaplastik astrositom
8	GBM
9	Anaplastik astrositom
10	GBM
11	GBM
12	GBM
13	GBM
14	GBM
15	Oligodendriogliom
16	Oligodendriogliom
17	Oligodendriogliom
18	GBM
19	GBM
20	GBM
21	Anaplastik oligoastrositom

Olguların yaş aralığının 21-76 (ortalama yaş: 53) olduğu görülmüş ve 21 bireyin 14'ü erkek olup erkek:kadın oranı ise 2:1 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Glial kökenli beyin tümörlü olguların cinsiyetleri ve yaşları.

OLGU NO	CİNSİYET	YAŞ
1	E	46
2	K	22
3	E	44
4	E	72
5	E	62
6	K	56
7	E	59
8	K	68
9	E	55
10	E	76
11	E	57
12	E	58
13	K	71
14	E	61
15	E	33
16	E	42
17	K	43
18	E	21
19	K	60
20	E	55
21	K	55

Beyin tümörlü hastaların sağ kalım sürelerini etkileyen faktörlerden biri ameliyat ile çıkartılan tümör büyüklüğüdür. 21 olgunun 14'ünde tümörün görülen kısmının tümü (gross total), 7'sinde ise tümörün belli bir kısmı (subtotal) ameliyat ile çıkartılabilmektedir. Çalışmaya dahil edilen 21 olgunun 9'u halen hayatta bulunmaktadır. Ölen olguların 9'unun ortalama yaşam süresinden daha az ve 2'sinin ise ortalama yaşam süresinden daha uzun bir sağ kalım süresine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen olguların ameliyat tarihleri ve ameliyatta tümörün ne kadarlık bir kısmının çıkarılabildiği ve sağ kalım süreleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Glial kökenli beyin tümörlü olguların ameliyat tarihleri, çıkartılabilen tümör büyüklüğü, sağ kalım sürelerinin sonuçları.

OLGU NO	AMELİYAT TARİHİ	AMELİYAT İLE ÇIKARTILABİLEN TÜMÖR BÜYÜKLÜĞÜ	SAĞ KALIM
1	2006	Subtotal	halen hayatta
2	2006	Subtotal	halen hayatta
3	2006	Subtotal	ameliyattan sonra 3 ay
4	2005	Gross total	ameliyattan sonra 3 ay
5	2005	Gross total	halen hayatta
6	2005	Gross total	ameliyattan sonra 6,5 ay
7	2005	Gross total	ameliyattan sonra 3 ay
8	2005	Subtotal	ameliyattan sonra 6 ay
9	2005	Gross total	halen hayatta
10	2005	Gross total	ameliyattan sonra 4 ay
11	1999/ 2005	Gross total	ameliyattan sonra 6,5 yıl
12	2005	Gross total	halen hayatta
13	2005	Gross total	ameliyattan sonra 7 ay
14	2004/ 2005	Gross total	ameliyattan sonra 16 ay
15	2005	Gross total	halen hayatta
16	2006	Gross total	halen hayatta
17	2006	Subtotal	halen hayatta
18	2006	Gross total	bilgisi yok
19	2006	Subtotal	ameliyattan sonra 5 ay
20	2006	Gross total	halen hayatta
21	2006	Subtotal	ameliyattan sonra 6 ay

Gross-total : tümörün ~%100'ü çıkartılmış

Subtotal: tümörün %10-80'i çıkartılmış

Ameliyat sonrasında 21 olgunun 16'sına adjuvan tedavi uygulanmıştır. 1 olgunun tedavisi başka bir merkezde yapıldığı için bu olgunun tedavisi ile ilgili bilgiye ulaşılamamıştır. Olgulara uygulanan adjuvan tedaviler Tablo 4.4'de gösterilmektedir.

Tablo 4.4. Gliyal kökenli beyin tümörlü olgulara uygulanan adjuvan tedaviler.

OLGU NO	ADJUVAN TEDAVİ
1	tedavi uygulanmamış
2	RT
3	RT
4	RT-1 kür tmz
5	RT-tmz
6	tedavi uygulanmamış
7	RT
8	tedavi uygulanmamış
9	RT- 6 kür tmz
10	tedavi uygulanmamış (olgu eş zamanlı prostat ca tanısı almıştır)
11	2003'de tanı sonrası RT, 6 kür PVC, tmz, nüks, 2005'de tekrar ameliyat
12	RT-1 kür tmz
13	RT-tmz
14	2004'de tanı sonrası RT, 2 kür tmz, nüks , 2006'da tekrar ameliyat
15	RT-5 kür tmz
16	RT
17	RT
18	Bilgisi yok
19	RT-1 kür tmz
20	RT-tmz
21	tedavi uygulanmamış

RT: Radyoterapi

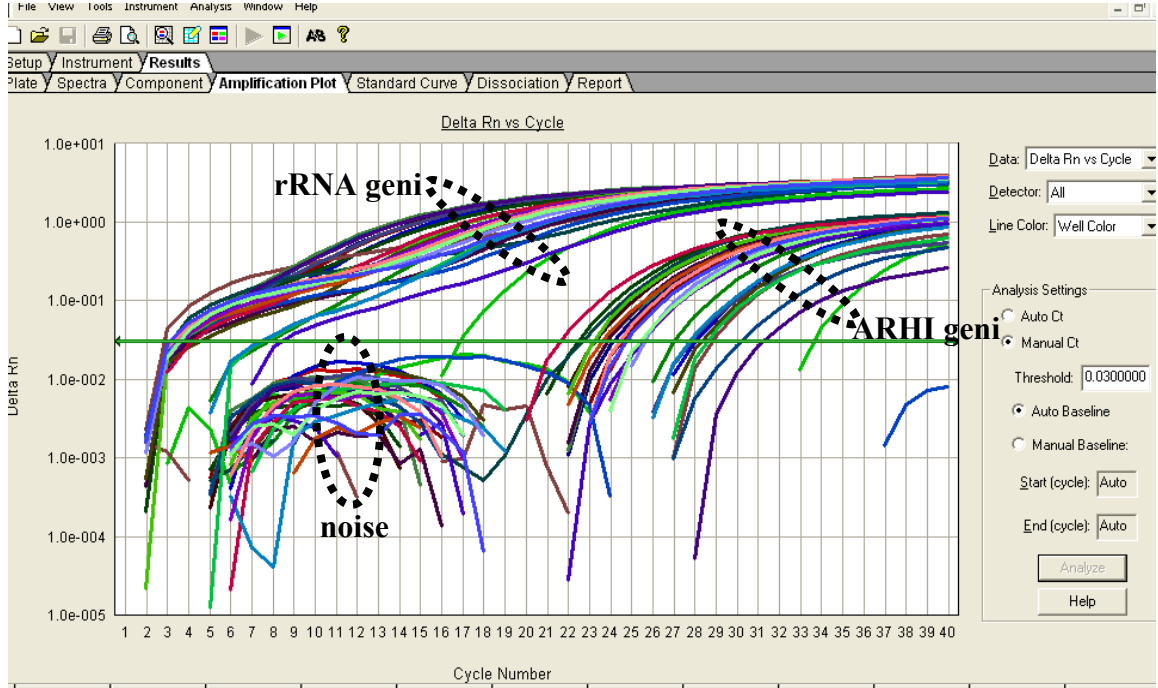
Tmz: Temozolomid

PVC: Procarbazine + CCNU + Vincristine

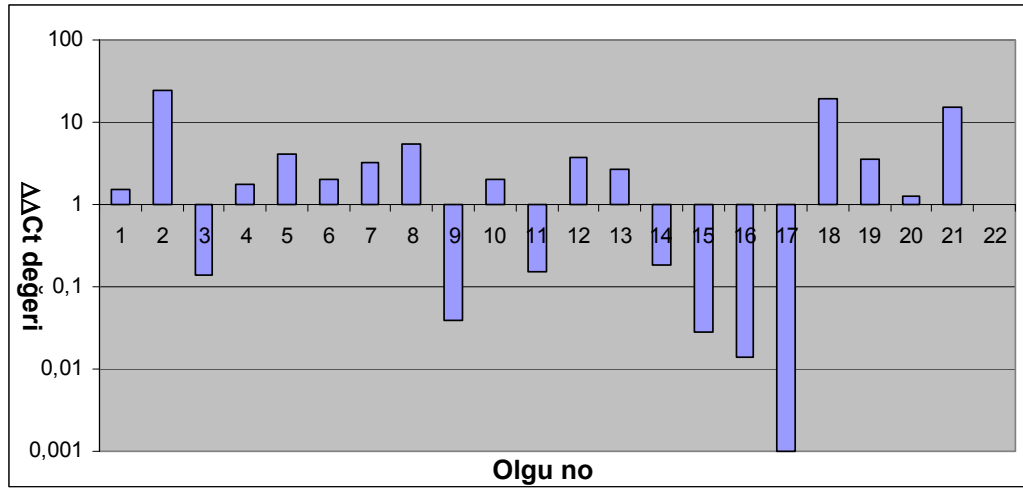
4.2. Gliyal Beyin Tümör Örneklerinde *ARHI* Geninin Ekspresyon Seviyesi Bulguları

Meme ve over kanserlerinde *ARHI* tümör süpresör geninin ekspresyon azalmasının meme ve over kanseri gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak, çalışmamızda daha önce sadece normal beyin hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiş olan *ARHI* geninin, 21 gliyal beyin tümöründeki ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Gliyal beyin tümörlerinde *ARHI* gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için, spesifik primer ve prob seti kullanılarak gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Gliyal beyin tümörlerindeki *ARHI* gen ekspresyon seviyesindeki değişimi gösterebilmek için tüm hücrelerde ekspresyonu olduğu bilinen ribozomal RNA (rRNA) geni iç kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca gliyal beyin tümörlerindeki *ARHI* gen ekspresyonu, 7 otopside alınan normal beyin

dokusundaki *ARHI* gen ekspresyon seviyesi ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Çalışılan 21 gliyal beyin tümörünün 7'sinde (% 33.3) *ARHI* gen ekspresyon seviyesinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.1-4.2).



Şekil 4.1. Gliyal beyin tümörlerindeki *ARHI* geninin mRNA düzeylerinin Applied Biosystem 7500 SDS yazılım programında analizinden sonra elde edilen bilgisayar çıktısı.



Şekil 4.2. Gliyal beyin tümürlü olgulardaki *ARHI* geninin mRNA düzeyleri.

1-21: Gliyal beyin tümör örnekleri (3, 9, 11, 14, 15, 16 ve 17 nolu olgularda *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenmiştir)

22: 7 otopside elde edilen normal beyin hücrelerindeki *ARHI* geninin ekspresyon seviyelerinin ortalaması.

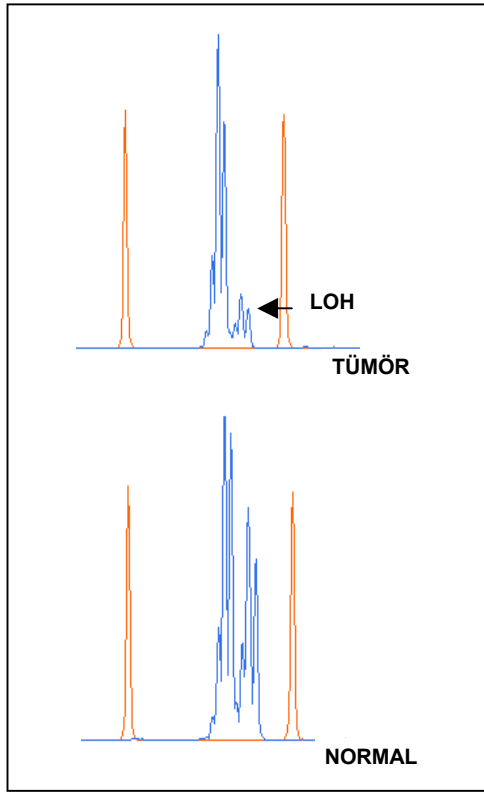
4.3. Glial Beyin Tümör Örneklerinde *ARHI* Geninde LOH Analizi Bulguları

ARHI geninde ekspresyon azalmasına sebep olabilecek mekanizmalardan birisi olan LOH analizi tüm olgularda yapılmıştır. Glial tümörlü olguların periferik kanından ve tümör örneklerinden elde edilen genomik DNA örneklerinde LOH analizi *ARHI* geninin lokalize olduğu 1 nolu kromozomun kısa kolunda p31 lokusuna spesifik D1S226, D1S488, D1S430, D1S207 ve D1S2638 mikrosatellit markırları kullanılarak yapılmıştır. LOH varlığının veya yokluğunun gösterilebilmesi için kan ve tümör örneklerinin piklerinin büyüklükleri karşılaştırılarak, matematiksel bir işlem uygulanmıştır. Matematiksel hesaplamalar sonucunda, 21 örneğin 2'sinde (% 9.5) LOH tespit edilmiştir (Tablo 4.5). LOH belirlenen 2 olgu gerçek zamanlı RT-PCR tekniği ile ekspresyon azalması belirlenen 7 olgudan 2'sidir.

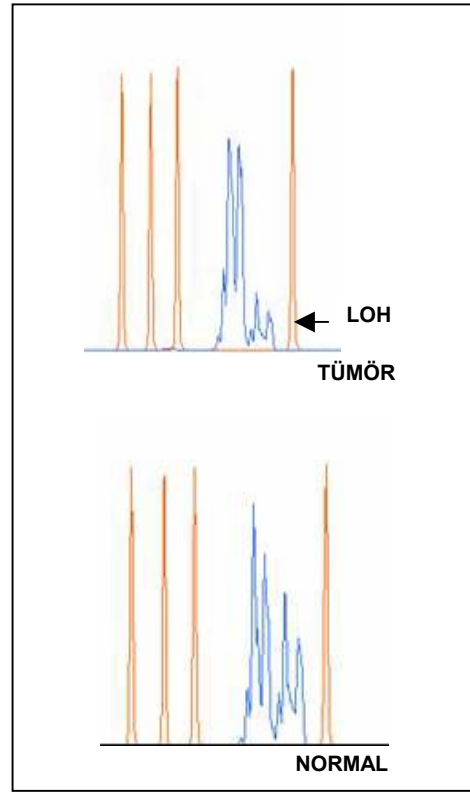
Tablo 4.5. Kromozom 1p31 bölgesindeki 5 mikrosatellit markırı için LOH sonuçları.

Olgu no	D1S226	D1S488	D1S430	D1S207	D1S2638
1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
7	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
8	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
9	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
10	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
11	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
12	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
13	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
14	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
15	Normal	LOH	Normal	Normal	Normal
16	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
17	Normal	Normal	LOH	Normal	Normal
18	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
19	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
20	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
21	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

21 olgunun 2'sinde belirlenen LOH sonuçları aşağıdaki şekillerde görülmektedir (Şekil 4.3a-b).



Şekil 4.3a. 15 no'lu olguda 1S488 bölgesinde gözlenen LOH profili.

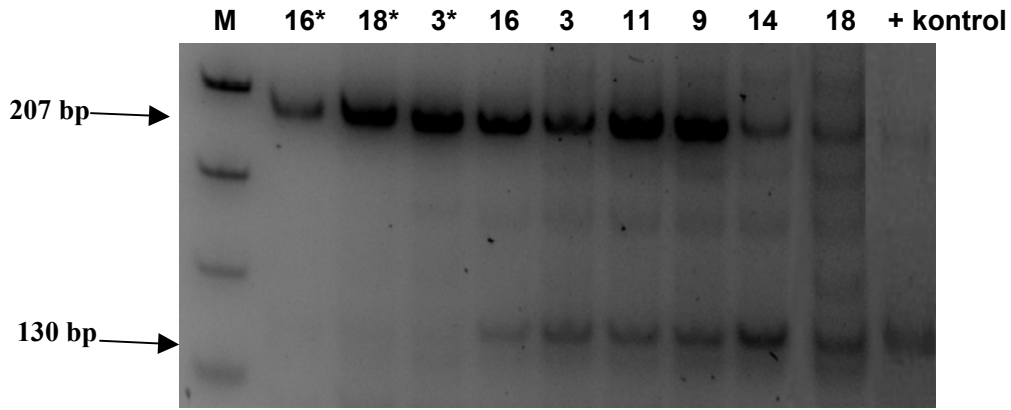


Şekil 4.3b. 17 no'lu olguda 1S430 bölgesinde gözlenen LOH profili.

4.4. Glial Beyin Tümör Örneklerinde *ARHI* Geninde Metilasyon Analizi Bulguları

Gerçek zamanlı RT-PCR analizi sonucunda *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenen 7 olgudan 2'sinde ekspresyon azalmasına neden olabilecek mekanizmalardan birisi olan LOH gözlenmiştir. Kalan 5 olgunun tümör DNA örneklerinde, ekspresyon azalmasına neden olabilecek bir başka mekanizma olan metilasyon profili araştırılmıştır. *ARHI* geninin yapısı incelendiği zaman, genin 3 CpG adacığı (CpG I, II ve III adacığı) içerdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu 3 CpG adacığından CpG II'deki metilasyonun *ARHI* geninin ekspresyon azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak bu çalışmada tercih edilen CpG II bölgesi olmuştur. Metilasyon analizi için COBRA tekniği ve restriksiyon enzim kesimi teknikleri kullanılmıştır. Çalışılan örneklerin göstermiş oldukları bant paternlerine göre örneklerin metilasyon profilleri, DigiDoc 1000 programına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında, normal gen

ürünü ve kesim ürünü yoğunlukları birbirlerine eşit ise bu kısmi metilasyon (normal), normal ürünün yoğunluğu, kesim ürünü yoğunluğundan belirgin derecede az ise hipermetilasyon ve normal ürün yoğunluğu kesim ürünü yoğunluğundan belirgin derecede fazla ise imprinting'in kaybolması (LOI) olarak kabul edilmiştir. Değerlendirme sonucunda 5 olgunun hiçbirinde *ARHI* geninin CpG adacığı II bölgesinde metilasyon belirlenmemiştir (Şekil 4.4). Olgulara ait metilasyon oranları Tablo 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Glial beyin tümör örneklerindeki *ARHI* geninin metilasyon profili.

3, 9, 11, 14, 16: gerçek zamanlı RT-PCR sonucunda *ARHI* geninde ekspresyon azalması gözlenen olgular

18: kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR sonucunda *ARHI* geninin ekspresyonu normal gözlenen olgu

*: Enzim kesimi uygulanmayan PCR ürünleri

Tablo 4.6. Glial beyin tümör örneklerindeki *ARHI* geninin metilasyon oranları.

Olgu no	Metilasyon oranı
16	%31 *
3	%40 *
11	%29 *
9	%30 *
14	%60 *
18	%42 *
+ kontrol	%75 *

*: Kısmi metilasyon (*ARHI* geni için normal metilasyon paterni)

Hipermetilasyon : \geq %89

Hipometilasyon : \leq % 5

Çalışma sonucunda gerçek zamanlı RT-PCR tekniği ile *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenen 7 olgunun LOH analizi ve metilasyon profili Tablo 4.7’de verilmektedir.

Tablo 4.7. Glial beyin tümör örneklerindeki *ARHI* gen ekspresyon kaybı pozitif olan olguların LOH ve metilasyon analizi sonuçları.

Olgu no	Ekspresyon kaybı	LOH	Hipo/hipermetilasyon
3	+	-	-
9	+	-	-
11	+	-	-
14	+	-	-
15	+	+	-
16	+	-	-
17	+	+	-

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Primer beyin tümörleri tüm kanserlerin % 1.5-2'sini oluşturmakta olup, köken aldıkları hücre tipine göre sınıflandırılmaktadırlar (36,42). En yaygın beyin tümörleri glial hücrelerden köken alan gliomalar olup, % 70 oranında gözlenmektedir (44).

Bu çalışmanın kapsamını, 13'ü GBM, 5'i oligodendrogliom, 2'si anaplastik astrositom ve 1'i anaplastik oligoastrositom olmak üzere toplam 21 glial tümörlü olgu oluşturmaktadır. GBM, genellikle 45-70 yaş arası (yaş ortalaması: 53) erişkinlerde görülen, en malign astrositik beyin tümörüdür. Ancak daha genç yaşta da görülebilmektedir (113). Çalışmaya dahil edilen 13 GBM olgusundan bir tanesinin yaşının 21, geriye kalan 12 olgunun yaş ortalamasının 59 olduğu belirlenmiş ve bu bulgular literatür ile uyumlu bulunmuştur. Oligodendrogliomlar, genellikle ortalama 40-42 yaşlarında gözlenmektedir (113). Bu çalışmadaki 5 oligodendrogliomlu olgunun yaş ortalaması 37 olup, literatürde verilen genel ortalamadan çok az da olsa düşük olduğu görülmüştür. Anaplastik astrositomun görülme yaşı 41 olarak belirtilmekte (113) iken, bu çalışmadaki 2 olgunun yaş ortalaması 57 olarak belirlenmiş ve literatürde verilen genel ortalamadan yüksek bulunmuştur. Hem astrositik hem oligodendrositik hücrelerden kaynaklanan mikst gliomlar grubunda olan anaplastik oligodendrogliomlar ise sıklıkla 46-49 yaş aralığında görülmekte (113) iken bu çalışmadaki anaplastik oligodendrogliomlu bir olgunun yaşı 55 olarak belirlenmiş ve literatür ortalamasından yüksek olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızdaki 21 glial tümörlü olgunun histolojik sınıflandırmalarına bağlı olarak yaş dağılımları GBM için literatür ile uyumlu bulunmasına karşın, diğer histolojik gruplarda literatür ile farklı sonuçların gözlenmesi olgu sayısının az olması ile ilişkilendirilebilir.

Beyin tümörü insidansının erkeklerde kadınlara göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (35). Çalışmadaki 21 glial tümörlü olgu değerlendirildiği zaman,

erkeklerde kadınlardan 2 kat daha fazla oranda beyin tümörü gözlenmiş olup, bu sonuç literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Beyin tümörlü hastaların sağ kalım süreleri; hasta yaşı, cinsiyeti, tümör tipi, evresi, lokalizasyonu, büyüklüğü, cerrahi uygulamanın yapılıp yapılmadığı, ameliyatla çıkarılan tümör büyüklüğü, tümörün radyoterapiye cevabı ve ameliyat öncesi olgunun performans durumu ile değişkenlik göstermektedir (36). GBM için ortalama sağ kalım süresi yaklaşık 12-15 ay olarak bildirilmektedir (48). Çalışmamıza dahil edilen 13 GBM tanılı olgudan 12'sinin sağ kalım süreleri 3 ay ile 6.5 yıl arasında değişmekte iken, geriye kalan 1 olgunun ameliyat sonrasında farklı bir klinikte tedavi görmesi nedeni ile, bu olgunun yaşam süresi hakkında bilgi edinilememiştir. 12 olgunun 7'si ameliyat sonrasında ortalama sağ kalım süresinden daha kısa, 1 olgu ise ortalama sağ kalım süresince yaşamıştır. İlk tanısını 1999 yılında alıp ameliyat olmuş, 2005 yılında ise nüks nedeni ile tekrar ameliyat edilen ve kaybedilen 1 olgu ise 6,5 yıl yaşamıştır. Literatürde bildirilen benzer uzun sağ kalım süresi gösteren GBM olguları nadir gözlenmesine karşın, uzun sağ kalım süreleri; olguların genç yaşta olmaları, olguların cinsiyeti (kadın), ameliyat ile tümörün gross total olarak çıkartılabilmesi, tümörün radyoterapiye cevabı ve ameliyat öncesi olgunun performans durumu ile ilişkilendirilmektedir (114,115). 6.5 yıl yaşayan 57 yaşındaki erkek olgu, yaş ve cinsiyet açısından literatür ile uyum göstermezken, tümörün ameliyat ile gross total olarak çıkartılması, ideal bir adjuvan tedavi almış olması ve buna olumlu cevap vermesi nedeniyle, bu olgunun uzun sağ kalım süresi literatür ile uyumludur. Diğer taraftan, halen hayatta olan 3 olgunun ameliyat edildikleri tarihin üzerinden yeterli zaman geçmemesi nedeni ile bu olguların sağ kalım sürelerinin literatür ile uyumlu olup olmadığını tartışmak mümkün değildir.

Oligodendriogliom tanısı almış olgular için, ortalama sağ kalım süresi 12-16 yıl olarak belirtilmektedir (43). Bu çalışmadaki 5 oligodendriogliomlu olgu halen yaşamaktadır. 2005-2006 yıllarında ameliyat olan bu olguların sağ kalım sürelerini, olguların klinik takibi devam ettiği için tartışmak mümkün değildir.

Anaplastik astrositom için ortalama sağ kalım süresi 2 yıl olarak bildirilmektedir (113). Bu çalışma kapsamındaki 2 anaplastik astrositom olgusunun

biri halen yaşamakta iken diğeri ameliyattan 6 ay sonra ölmüştür. 2005 yılında ameliyat olmuş ve halen sağ olan olgunun ameliyatla tümörü gross total olarak çıkartılmış ve ameliyat sonrasında radyoterapi görmüştür. 2005 yılında ameliyat olmuş ve ameliyattan sonra 6 ay yaşamış olan olgunun ortalama sağ kalım süresinden daha kısa yaşaması, ameliyatla tümörün subtotal olarak çıkartılması ve olgunun ameliyat sonrasında radyoterapi almaması ile ilişkilendirilebilir.

Anaplastik astrositomlu olgular için ortalama sağ kalım süresi ise 2-3 yıl olarak bildirilmektedir (43). Çalışmaya dahil edilen 1 anaplastik oligoastroitom olgusu, ameliyattan sonra 6 ay yaşamıştır. Anaplastik astrositomlu olgularda 10q bölgesinde LOH gözlenmesi, kötü prognoz ve kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir (116,117). Glial tümörlerde 10q bölgesinde LOH analizinin yapıldığı bir başka çalışmamızda, anaplastik oligoastroitom tanılı bu olguda 10q bölgesinde LOH belirlenmiştir. Bu olgunun ameliyat sonrası ancak 6 ay yaşayabilmiş olması, olgunun tümörünün subtotal olarak çıkarılmasından, ameliyat sonrasında radyoterapi almamış olmasından kaynaklanabileceği gibi, 10q bölgesinde LOH gözlenmesi ile de açıklanabilir. Genel olarak, sağ kalım süresi ile ilgili daha kesin yorum yapmak için eldeki veriler henüz olgunlaşmamıştır. Medyan takip süresinin henüz oldukça kısa oluşu (10 ay) nedeni ile sağ kalım analizinin daha sonra yapılması planlanmıştır.

Glial beyin tümörlerinde gözlenen genetik anormalliklerden biri, 1 nolu kromozomdaki değişikliklerdir. Bu tümörlerden oligodendrioglioma ve GBM'de 1p bölgesinde LOH gözlenmesi ise, bu bölgede tümör süpresör genlerin var olabileceğini göstermektedir (118). 1999 yılında 1p31 bölgesinde tanımlanan *ARHI* tümör süpresör geninde, gen ekspresyonuna yönelik olarak Northern blot tekniği kullanılarak normal meme ve over hücre hatlarında *ARHI* ekspresyonu gözlenirken, 8 meme kanser hücre hattının 7'sinde ve 9 over kanser hücre hattının 8'inde *ARHI* tümör süpresör geninin ekspresyon yokluğu gösterilmiştir (26). 2003 yılında gerçek zamanlı RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada, 26 primer meme kanser örneğinin 2'sinde *ARHI* geninin ekspresyonunda tamamen kayıp, 10'unda ise *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenmiştir (101). *ARHI* geninin ekspresyonunun varlığı normal meme ve over dokusu dışında kalp, karaciğer, pankreas, beyin ve tiroid dokusunda da gösterilmiştir (26,103). Mikroarray analizi ile folliküler tiroid

karsinoma örneklerinde *ARHI* geninin normal tiroid dokusu ile kıyasladığında daha az eksprese edildiğinin belirlenmesinden sonra, gerçek zamanlı RT-PCR tekniği kullanılarak parafine gömülü bloklardan alınan 17 folliküler tiroid karsinomu, 7 folliküler tiroid adenomu ve 5 multinodüler guatr ve komşu normal doku örneklerinde *ARHI* geninin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiş ve 13 folliküler tiroid karsinoma örneğinin 11'inde (% 84.6), folliküler adenom ve normal doku örneklerine kıyasla ekspresyon azalması belirlenmiştir (103). 2007 yılında yapılan bir başka çalışmada, *ARHI* geninin 52 primer pankreatik endokrin tümör [22'si iyi diferansiye pankreatik tümörü (WDET), 26'sı iyi diferansiye endokrin karsinomu (WDEC) ve 4'ü kötü diferansiye endokrin karsinomu (PDEC)] ve 16 normal pankreas dokusunda, gerçek zamanlı RT-PCR tekniği kullanılarak ekspresyon seviyesi araştırılmış ve 4 PDEC örneğinin 4'ünde (% 100), 26 WDEC örneğinin 11'inde (% 42.3) ve 22 WDET örneğinin 1'inde (% 4.5) normal pankreas örneğine kıyasla, *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenmiştir (102).

Daha önce normal beyin dokusunda *ARHI* geninin ekspresyonu gösterilmiş olmasına karşın, bu genin beyin tümörlerindeki ekspresyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk defa glial beyin tümör gelişiminde, *ARHI* geninin rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla 21 glial beyin tümürlü olguda, gerçek zamanlı RT-PCR tekniği kullanılarak, *ARHI* geninin ekspresyon seviyesi değerlendirilmiştir. 13 GBM örneğinin 3'ünde (% 23.1), 5 oligodendriogliom örneğinin 3'ünde (% 60) ve 2 anaplastik astrositom örneğinin 1'inde (% 50) olmak üzere toplam 7 olguda (% 33.3) *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenmiştir. Astrositik kökenli (anaplastik astrositom, GBM) toplam 15 tümör örneğinin 4 'ünde (% 26.7) ve 5 oligodendrositik kökenli (oligodendriogliom) tümör örneğinin 3'ünde (% 60) *ARHI* geninin ekspresyonundaki azalış, *ARHI* geninin oligodendrositik kökenli tümörlerin gelişiminde daha fazla etkili olabileceğini göstermektedir. *ARHI* geninin ekspresyonu normal olarak belirlenen 14 olguda ise glial beyin tümörünün gelişimi, *ARHI* geninden ziyade gen ürünü proteinin post translasyonel olarak inaktivasyonu ile ilişkilendirilebilir, ancak bunun deneysel olarak kanıtlanması gerekmektedir. Diğer taraftan, kanser multigenik bir hastalık olduğu için, *ARHI* gen ekspresyonunda azalma gözlenmeyen olgularda,

kanserden sorumlu diğ er birçok genin ekspresyon kaybı yada aş ırı ekspresyonunun olabileceğ i göz ardı edilmemelidir.

Normal hücrelerde *ARHI* geninin maternal alleli genomik imprinting ile susturulmuş olduğ undan, *ARHI* geni sadece paternal allelden eksprese olmaktadır. *ARHI* geninin ekspresyon azalmasına neden olabilecek mekanizmalardan birisi paternal allelde meydana gelebilecek LOH olarak gösterilmektedir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada, 3 over kanserine ait hücre hattı, 38 primer over kanseri ve 8 primer meme kanseri olmak üzere toplam 49 örnekte *ARHI* geninde LOH analizi gerçekleştirilmiş ve 22 informatif örneğ in 9'unda (% 40) LOH belirlenmiştir (26). 2005 yılında yapılan bir baş ka çalışmada ise, 17 folliküler tiroid karsinom, 7 folliküler tiroid adenom ve 5 multinodüler guatr ve bunların komş u normal doku örneklerinde, *ARHI* geni için LOH analizi uygulanmış ve informatif olan 14 örneğ in 9'unda (% 69) LOH gözlenmiştir (103).

Bu çalışmada, 21 glial beyin tümörlü olguda *ARHI* geninin heterozigosite kaybı incelenmiş ve 2 olguda (% 9.5) LOH belirlenmiştir. LOH gözlenen bu 2 olgu, gerçek zamanlı RT-PCR tekniğ i ile ekspresyon azalması belirlenen 7 olgu içerisinde yer almaktadır. Çalışma kapsamında oligodendriogliom tanısı almış 5 olgunun 3'ünde *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenmesi ve aynı zamanda bu 3 olgunun 2'sinde LOH gözlenmesi, olgu sayısı az olmasına karş ın oldukça önemli bir bulgudur. Bu sonuçlar *ARHI* geninin, diğ er glial tümörlere kıyasla oligodendrositik kökenli tümörlerin gelişiminde daha önemli olabileceğ ini ve oligodendrositik tümörlerdeki *ARHI* geninin ekspresyonunun azalmasında LOH'un etkin bir mekanizma olabileceğ ini göstermektedir. LOH gözlenmeyen 5 olgudaki ekspresyon kaybı ise, epigenetik mekanizmalar ya da kromatin yapının yeniden düzenlenmesi ile açıklanabilir.

LOH dışında epigenetik değ işimler de kanserin ortaya çıkış ında oldukça yaygın görülen bir mekanizmadır. Epigenetik değ işim, DNA'da yapısal değ işiklik olmaksızın ortaya çıkabilen ve bir sonraki oğ ul döle aktarılabilen özelliktir. Bunun en tipik örneklerinden biri, genin özellikle promotor bölgesinde yer alan CpG adacıklarındaki sitozin bazının metillenmesi ile o genin inaktif hale getirilmesidir (30). *ARHI* geninin genomik yapı analizleri sonucunda, genin promotor bölgesinde

yer alan 3 CpG adacığı belirlenmiştir (109). 2003 yılında 20 meme tümör örneği ile yürütölen bir çalışmada, CpG adacığı I bölgesinde metilasyon düzeyinde bir sapma belirlenmezken, 20 örneğin 2'sinde (% 15) CpG adacığı II ve 4'ünde (% 20) CpG adacığı III bölgesinde hipermetilasyon gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, CpG adacığı III'de CpG adacığı II'ye göre daha fazla metilasyon belirlenmesine rağmen, en fazla ekspresyon kaybına CpG adacığı II bölgesindeki hipermetilasyonun neden olduğu belirtilmiştir (109).

Buradan yola çıkararak bu çalışmada, CpG adacığı II bölgesi için metilasyon analizi gerçekleştirilmiştir. *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenen 7 olgunun 2'sinde LOH belirlenmesi nedeni ile, kalan 5 olguda metilasyon çalışılmış ve 3'ü GBM, 1'i anaplastik astrositom ve diğerleri oligodendriogliom tanısı alan glial beyin tümörlü olguların hiçbirinde *ARHI* geninin promotor bölgesinde yer alan CpG II adacığında metilasyon belirlenmemiştir. Hem metilasyon analizi yapılan olgu sayısının az olması, hem de olguların patolojik tanılarının heterojen olması nedeni ile daha fazla tümör örneğinde çalışıldığı taktirde *ARHI* geninin CpG II bölgesindeki metilasyon ile genin ekspresyonunun azalması arasında ilişki kurulabilecektir. Daha önceki çalışmalarda, farklı tümör tiplerinde *ARHI* geninin 3 CpG adacığında da metilasyon analizi gerçekleştirilmiş olup, *ARHI* geninin ekspresyonundaki azalma ile en fazla CpG II bölgesi ilişkilendirilmiştir (109). Ancak daha önce beyin tümörlerinde *ARHI* geni ile ilgili bir çalışma olmadığı için, bu tümörlerde sadece CpG II bölgesinin incelenmesi yeterli olmayabilir ve *ARHI* geninin ekspresyonundaki azalmadan diğer CpG adacığlarındaki hipermetilasyonlar da sorumlu olabilir. Bütçe yeterli olmadığı için bizim çalışmamızda sadece CpG adacığı II bölgesine bakılabilmemiştir.

ARHI geninin ekspresyonundaki azalma ile tümör progresyonu arasında bir ilişki olup olmadığını gösterebilmek için, 2003 yılında immünohistokimya ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, *ARHI* geninin ekspresyonunun komşu normal meme epitel hücrelerle kıyaslandığında, 64 DCIS (Ductal carcinoma *in situ*) örneğinin 23'ünde (% 41), 23 invazif karsinomun ise 16'sında (% 70) azalma gösterdiği ve sonuçta *ARHI* ekspresyonundaki azalmanın meme kanser progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101). 2007 yılında pankreatik dokularda tümör tipleri, proliferasyon dereceleri, hastalığın progresyonu

ve olguların yaşam süreleri incelenerek *ARHI* geninin ekspresyonunun klinik ve patolojik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *ARHI* ekspresyonunun en fazla PDEC (diferansiye endokrin karsinomu) örneklerinde azalma gösterdiği belirlenmiş olup, *ARHI* geninin ekspresyon derecesi ile tümör tipi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. 49 olgunun 47'sinde yaşam süreleri değerlendirilmiş ve kısa sağ kalım süresi ve hücre proliferasyonunun bir göstergesi olan Ki67 proteinindeki artış, *ARHI* geninin ekspresyonundaki azalma ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenen olgularda normal *ARHI* ekspresyonu belirlenen hastalara göre, hastalık progresyonu daha yüksek bulunmuştur (102).

ARHI geninin olguların sağ kalım süreleri üzerindeki etkisi değerlendirildiği zaman, ekspresyon azalması belirlenen 7 olgunun, 3'ü oligodendriogliom ve 1'i anaplastik astrositom tanısı almıştır. Bu 3 olgu halen sağ olup, literatürde oligodendriogliomlu olguların ortalama sağ kalım süresi 12-16 yıl ve anaplastik astrositom olguları için ise 2 yıl olarak bildirilmektedir (43, 113). 2005-2006 yıllarında ameliyat olmuş bu olgularda sağ kalım süresi ile *ARHI* geninin ekspresyonundaki azalma arasında bir ilişki olup olmadığı, olguların takibi sonucunda değerlendirilebilecektir. *ARHI* geninin ekspresyonunda azalma belirlenmiş diğer 3 olgu GBM tanısı almıştır. Bu olgulardan 1'i ortalama yaşam süresince yaşamış, 1'i ortalama yaşam süresinden daha uzun yaşamış olup (6.5 yıl), 1 olgu ise ameliyattan 3 ay sonra ölmüştür. Ekspresyon azalması belirlenen olgularda hem uzun, hem de kısa sağ kalım süreleri gözleendiği için, *ARHI* geninde ekspresyon azalması ile GBM'li olguların sağ kalım süreleri arasında bir ilişki olmadığı öne sürülebilmesine karşın, daha fazla olgunun çalışılarak bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, ilk defa bu çalışmada glial beyin tümörlerinde *ARHI* geninin değerlendirilmesi sonucunda elde edilen bulgularımız, *ARHI* tümör süpresör geninin ekspresyonundaki azalmanın başta oligodendrositik tümör gelişiminde olmak üzere astrositik kökenli tümörlerin gelişiminde de önemli olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Squire, J.A., et al., *Genetics basis of cancer*. In: Tannoct, I.F., et al., *The Basic Science of Oncology*. Third Edition. McGraw-Hill Companies press. p. 48-78.
2. McCormick, F., *Signalling networks that cause cancer*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(12): p. 53-56.
3. Siegfried, J.M., et al., *Growth factors and receptors in non small cell lung cancer*. In: Brambilla C, Brambilla E, ed. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*. New York, Marcel Dekker In, .1999. p. 317- 336.
4. Rabiasz, G.J., et al., *Growth control by epidermal growth factor and transforming growth factor in human lung squamous carcinoma cells*. Br J Cancer, 1992. **66**(2): p. 254-9.
5. Takanami, I., et al., *Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF- β 1 in pulmonary adenocarcinoma*. Path Res Pract, 1996. **192**(11): p. 1113-20.
6. Hastürk, S., *Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi*. In: Hastürk S, Yüksel M eds, *Akciğer Kanseri*. Istanbul, 2000: p. 1-27.
7. Huebner, R.J., et al., *Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **64**(3): p. 1087-94.
8. <http://web.indstate.edu/theme/mwking/oncogene.html>
9. Kopnin, B.P., *Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis*. Biochemistry, 2000. **65**(1): p. 2-27.
10. Knudson, A., *Mutation and cancer, statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Sci USA, 1971. **68**(4): p. 820-3.

11. Sugimura, T., et al., *Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis*. *Mutat Res*, 2000. **462**(2-3): p. 235-46.
12. Tucker, T., *Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis*. *Clin Genet*, 2002. **62**(5): p. 345-57.
13. Thiagalingam, S., et al., *Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence*. *Curr Opin Oncol*, 2002. **14**(1): p. 65-72.
14. Murthy, S.K., *Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma*. *Mod Pathol.*, 2002.**15**(12): p. 1241-50.
15. Collins, K., *The cell cycle and cancer*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. **94**(7): p. 2776-8
16. Garrett, M.D., *Cell cycle control and cancer*. *Current Science*, 2001. **81**(5): p. 515-22.
17. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/mitosis/checkpoints>
18. Kaufmann, W.K., et al., *Cell cycle control, DNA repair and initiation of carcinogenesis*. *FASEB*, 1993. **7**(12): p. 1181-91.
19. Hall J.G., *Genomic imprinting: review and relevance to human diseases*, *Am J Hum Genet*. 1990. **46**(5): p. 857–873.
20. Randy L., et al., *Imprinted and More Equal*, *American Scientist the magazine of Sigma Xi, The Scientific Research Society*: p. 143-49.
21. Abdollahi, A., et al., *LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein*. *Oncogene*, 1999.**18**(47): p. 6477-87.
22. Caspary, T., et al., *Oppositely genes p57 (Kip2) and igf2 interact in a Mouse model for Bechwith-Wiedemann syndrome*. *Genes Dev.*, 1999. **13**(23): p. 3115-24.
23. Feinberg, A.P., et al., *Cancer epigenetics takes center stage*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. **98**(2): p. 591-6.
24. Jinno, Y., et al., *Mosaic and polymorphic imprinting of the WT1 gene in humans*. *Nat Genet*, 1994. **8**(1): p. 13-4.
25. Maegawa, S., et al., *Epigenetic silencing of PEG3 gene expression in human glioma cell lines*. *Mol Carcinog.*, 2001. **31**(1): p. 1-9.

26. Yu, Y., et al., *NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**(1): p. 214-9
27. Feinberg, A.P., et al., *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
28. Rush, L.J., et al., *Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies*. Cancer Lett, 2002. **185**(1): p. 1-12.
29. Jones, P.A., et al., *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 163-7.
30. Stratthdee, G., et al., *Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions*. Expert Rev Mol Med, 2002. **2002**: p. 1-17.
31. Burgers, W.A., et al., *DNA methyltransferases get connected to chromatin*. Trends Genet, 2002.**18**(6): p. 275-7.
32. Etseller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001.**61**(8): p. 3225-9.
33. Laird, P.W., *The power and the promise of DNA methylation markers*. Nat Rev Cancer, 2003.**3**(4): p. 253-66
34. Chuang, C.K., *The power and the promise of DNA methylation markers*. Nat Rev Cancer, 2003.**3**(4): p. 253-66.
35. <http://www.seer.cancer.gov/>
36. McKinney, P.A., *Brain tumours:incidence, survival, and aetiology*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004. **75**;p.12-17
37. <http://www.healthandage.com>
38. Collins, V.P, *Brain tumors: classification and genes*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2004. 75 Suppl 2:ii2-11
39. <http://www.braintumor.org>,
40. Hardell, L., et al., *Case-control study on radiology work, medical x-ray investigations, and use of cellular telephones as risk factors for brain tumors*. MedGenMe, 2000. **2**(2):E2.
41. Schiff, D., et al., *Gliomas arising in organ transplant recipients: an unrecognized complication of transplantation?*. Neurology, 2001. **57**(8): p. 1486-8.

42. Kleihues, P., et al., *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. Lyon, France: International agency for research on cancer, 2000.
43. Prof. Dr. İskender. Sayek., *Beyin Tümörleri ve Tedavisi*, Temel Cerrahi. 3.baskı. Güneş Kitapevi. p. 2300-54
44. Chosdol K., et al., *Molecular pathways of glial tumorigenesis*. Current Science, 2002. **82**(6): p.648-54.
45. Shapiro, W.R., *Therapy of adult malignant brain tumors: what have the clinical trials taught us?*. Semin Oncol, 1986. **13**(1): p. 38-45.
46. Kitange, G.J., et al., *Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(3): p. 197-203.
47. Hilton, D.A., et al., *Genetic markers in the assessment of intrinsic brain tumours*. Current Diagnostic pathology, 2004. 10: p. 83-92.
48. Houllier, C., et al., *Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2218-23.
49. Rasheed, B.K., et al., *Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25*. Oncogene, 1995. **10**(11): p. 2243-6.
50. Karlbom, A.E., et al., *Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10*. Hum Genet, 1993. **92**(2): p. 169-74.
51. Ichimura, K., et al., *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, 1998. **22**(1): p. 9-15.
52. Ohgaki, H., et al., *Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours*. Virchows Arch, 1995. **427**(2): p. 113-8.
53. Fults, D., et al., *Microsatellite deletion mapping on chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme*. Int J Oncol, 1998. **12**(4): p. 905-10.
54. Fujisawa, H., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas*. Lab Invest, 2000. **80**(1): p.65-72.
55. Dahia, P.L., *PTEN, a unique tumor suppressor gene*. Endocr Relat Cancer, 2000. **7**(2): p.115-29.

56. Tohma, Y., et al., *PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(7): p. 684-9.
57. Knobbe, C.B., *Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas*. Brain Pathol, 2003. **13**(4): p. 507-18.
58. Nathalie, B., et al., *PTEN methylation and expression in glioblastomas*. Acta Neuropathol, 2003. **106**(5) : p. 479–85.
59. Nakamura, M., et al., *p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas*. Brain Pathol, 2001. **11**(2): p. 159-68.
60. Cadwell, C., et al., *The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth*. Gene, 2001. **277**(1-2): p. 15-30.
61. Campomenosi, P., et al., *Study on aneuploidy and p53 mutations in astrocytomas*. Cancer Genet Cytogenet, 1996. **88**(2): p. 95-102.
62. Watanabe, K., et al., *Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(4): p. 523-30.
63. Schmidt, M.C., et al., *Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(4): p. 321-8.
64. Haupt, Y., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **15**(387): p. 296-9
65. Reifenberger, G., et al., *Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations*. Cancer Res, 1993. **53**(12): p. 2736-9.
66. Biernat, W., et al., *Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(2): p. 180-5.
67. Wong, A.J., et al., *Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(19): p. 6899-903.
68. Ekstrand, A.J., et al., *Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1992. **89**(10):p. 4309-13.
69. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.

70. Barker, F.G., *EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(2): p. 410-8.
71. Huncharek, M., et al., *Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis*. Oncol Res., 2000.**12**(2): p. 107-12.
72. Beijersbergen, R.L., et al., *Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1287**(2-3): p. 103-20.
73. Nakamura, M., et al., *Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas*. Lab Invest, 2001. **81**(1): p. 77-82.
74. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
75. Louis, D.N., *Focus on central nervous system neoplasia*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 125-8.
76. Ellison, D., *Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2002. **28**(4): p. 257-82.
77. Smith, J.S., et al., *Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications*. Front Biosci, 2000. **5**: p. D213-31.
78. Kitange, G.J., *Genetic alterations and chemotherapeutic response in human diffuse gliomas*. Expert Rev Anticancer Ther, 2001. **1**(4): p. 595-605.
79. Reifenberger, G., et al., *Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(2): p. 111-26.
80. Mueller, W., et al., *Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 313-9.
81. Cairncross, J.G., *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(19): p. 1473-9.
82. Ino, Y., et al., *Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(4): p. 839-45.
83. Ueki, K., et al., *Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 196-201.

84. Reifenberger, J., et al., *Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors*. Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 29-35.
85. Di Rocco, F., et al., *Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas*. Neurosurgery, 1998. **42**(2): p. 341-6.
86. Chan, A.S., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(7): p. 816-26.
87. Sanson, M., et al., *Analysis of loss of chromosome 10q, DMBT1 homozygous deletions, and PTEN mutations in oligodendrogliomas*. J Neurosurg, 2002. **97**(6): p. 1397-401.
88. Jeuken, J.W., *PTEN mutation analysis in two genetic subtypes of high-grade oligodendroglial tumors. PTEN is only occasionally mutated in one of the two genetic subtypes*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **119**(1): p. 42-7.
89. Lu, Q.R., *Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10851-6.
90. Bouvier, C., *Shared oligodendrocyte lineage gene expression in gliomas and oligodendrocyte progenitor cells*. J Neurosurg, 2003. **99**(2): p. 344-50.
91. Dong, S.M., et al., *Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(8): p. 808-16.
92. Wolter, M., et al., *Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(12): p. 1170-80.
93. Etseller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
94. Gaspar, J., et al., *Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas*. Current Opinion in Oncology, 2003. **15**: p. 197-203.
95. Patten, S.E., et al., *Activation of the ras-mitogen-activated protein kinase pathway and phosphorylation of ets-2 at position threonine 72 in human ovarian cancer cell lines*. Cancer Res, 1998. **58**(10): p. 2253-9.

96. Luo, R.Z., et al., *Genomic structure and promoter characterization of an imprinted tumor suppressor gene ARHI*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1519**(3): p. 216-22.
97. Bourne, H.R., et al., *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. *Nature*, 1991. **349**(6305): p. 117-27.
98. Luo, R.Z., et al., *ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers*. *Oncogene*, 2003. **22**(19): p. 2897-909.
99. Fitzgerald, J., et al., *Why mice have lost genes for COL21A1, STK17A, GPR145 and ARHI: evidence for gene deletion at evolutionary breakpoints in the rodent lineage*. *Trends Genet*, 2004. **20**(9): p. 408-12.
100. Xu, F., et al., *The human ARHI tumor suppressor gene inhibits lactation and growth in transgenic mice*. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4913-20.
101. Wang, L., et al., *Loss of the expression of the tumor suppressor gene ARHI is associated with progression of breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(10): p. 3660-6.
102. Dalai, I., et al., *Low expression of ARHI is associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors*. *Neoplasia*, 2007. **9**(3): p. 181-3.
103. Weber, F., et al., *Silencing of the maternally imprinted tumor suppressor ARHI contributes to follicular thyroid carcinogenesis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(2): p. 1149-55.
104. Field, J.K., et al., *Methylation discriminators in NSCLC identified by a microarray based approach*. *Int J Oncol.*, 2005. **27**(1): p. 105-11.
105. Lu, Z., et al., *Transcriptional and posttranscriptional down-regulation of the imprinted tumor suppressor gene ARHI (DRAS3) in ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(8): p. 2404-13.
106. Nishimoto, A., et al., *Ras homologue member I directly inhibits signal transducers and activators of transcription 3 translocation and activity in human breast and ovarian cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(15): p. 6701-10.
107. Peng, H., et al., *ARHI is the center of allelic deletion on chromosome 1p31 in ovarian and breast cancers*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(5): p. 690-4.
108. Fujii, S., et al., *Reactivation of the silenced and imprinted alleles of ARHI is associated with increased histone H3 acetylation and decreased histone H3 lysine 9 methylation*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(15): p. 1791-800.

109. Yuan, J., et al., *Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers*. *Cancer Res*, 2003. **63**(14): p. 4174-80.
110. Feng, W., et al., *Multiple histone deacetylases repress tumor suppressor gene ARHI in breast cancer*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(8): p. 1664-8.
111. Lu, Z., et al., *E2F-HDAC complexes negatively regulate the tumor suppressor gene ARHI in breast cancer*. *Oncogene*, 2006. **25**(2): p. 230-9.
112. www.ambion.com/techlib/basics/rtpcr
113. www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultbrain/healthprofessional
114. Scott, J.N., et al., *Long-term Glioblastoma Multiforme Survivors: a Population-based Study*. *Can. J. Neurol. Sci*, 1998. **25**: p. 197.
115. Deb, P., et al., *Glioblastoma multiforme with long term survival*. *Neurology India*, 2005. **53**(3): p. 329-32.
116. Kunwar, S., et al., *Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival*. *Cancer Res*, 2001. **61**(29): p. 7683-8.
117. Brat, D.J., et al., *Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials*. *Neuro-oncol*, 2004. **6**(2): p. 96-103.
118. Nigro, J.M., et al., *Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(4): p. 1253-62.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Konya’da doğan Sezin YAKUT, ilköğretimini 1981-1986 yılları arasında Antalya Barbaros İlkokulu’nda tamamlamıştır. 1986-1993 yılları arasında Özel Antalya Koleji’nde ortaokul ve lise öğretimini görmüştür. 1993-1997 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Lisans Programını tamamlamıştır. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Temel Genetik yüksek lisans programına kayıt olmuş ve 25 Mayıs 1999 aynı Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başlamıştır. 2001 yılında yüksek lisans programından mezun olmuş ve aynı Anabilim Dalı’nda 2001 yılında Tıbbi Genetik doktora programına başlamıştır.