

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEMOZOLOMİDE
KARŞI GELİŞTİRDİKLERİ DİRENÇTE miR-484'ÜN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Serhat ALBAYRAK

Danışman
1. Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA
2. Prof. Dr. Zuhale HAMURCU

Yüksek Lisans Tezi

ŞUBAT 2024
KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEMOZOLOMİDE
KARŞI GELİŞTİRDİKLERİ DİRENÇTE miR-484'ÜN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Serhat ALBAYRAK**

Danışman

- 1. Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA**
- 2. Prof. Dr. Zuhale HAMURCU**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2022-11870 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**ŞUBAT 2024
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Serhat ALBAYRAK

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Glioblastoma hücrelerinin temozolomide karşı geliştirdikleri dirençte miR-484’ün rolünün araştırılması” adlı **yüksek lisans** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Serhat ALBAYRAK

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Zuhale HAMURCU

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA danışmanlığında **Serhat ALBAYRAK** tarafından hazırlanan “**Glioblastoma hücrelerinin temozolomide karşı geliştirdikleri dirençte miR-484’ün rolünün araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

Jüri

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA

Doç. Dr. Ahmet EKEN

Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Enstitü Müdürü

İTHAF

Bu tez çalışmasını, binler ömür de sürseler insanoğlunun hayatta erişebileceği en yüksek ve en hakiki bilginin bilgisizlik; en derin ve ince fıkırın rıza-ı ilahiyi kazanmak ve insanı şu kâinatın bir meyvesi kılan, insanı insan eden en esaslı hissiyatın gelişim ve değişim meyili içerisinde daima tazelenen muhabbet olduğunu kavrayabilecek kadar uyanık olan kalplere ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, tezimin her aşamasında önerilerini ve yardımlarını esirgemeyerek danışmanlığımı yapan danışmanım Prof. Dr. Zuhâl HAMURCU'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan, beni özgür şekilde düşünmeye ve bilim yapmaya teşvik eden hocam Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA'ya

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Venhar ÇINAR, Dr. Reyhan TAHTASAKAL ve Dr. Şerife ERDEM'e,

Çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)'ne

TYL-2022-11870 kodlu bu projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, her daim bana güvenip hep yanımda olan canım annem, babam ve kardeşlerime

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, zor zamanlarımı kolaylaştıran ve bana inanan tüm dostlarıma

en içten duygularıyla teşekkür ederim.

SERHAT ALBAYRAK

ŞUBAT 2024, KAYSERİ

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEMOZOLOMİDE KARŞI GELİŞTİRDİKLERİ DİRENÇTE miR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Serhat ALBAYRAK

Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Moleküler
Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2024

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA

Prof. Dr. Zuhul HAMURCU

ÖZET

Glioblastoma multiform (GBM) yetişkinlerde en sık görülen primer malign beyin tümörüdür. GBM'ler, heterojen olmaları, yüksek proliferasyon oranları, agresif özellikleri nedeniyle tedavilere büyük ölçüde dirençlidir. GBM tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapötik tedavi yöntemleri kullanılsa da hastalarda sağkalım süresi çok düşüktür.

Günümüzde alkilleyici ilaç Temozolomid (TMZ), GBM için yaygın olarak tercih edilen bir tedavi seçeneğidir. Bu standart tedavi, hastanın hayatta kalma oranını artırsa da yüksek O6-Metilguanin-DNA Metil Transferaz (MGMT), yanlış-eşleşme tamir mekanizması, baz eksizyon tamir mekanizması gibi DNA tamir mekanizmalarının GBM'de TMZ'nin toksik etkinliğini azaltarak TMZ direncine yol açtığı gösterilmiştir. Bu yüzden GBM için daha etkin tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

miRNA'ların kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz, apoptoz ve ilaç dirençliliği gibi birçok hücresel aktiviteyi düzenlediği bildirilmiştir. Kanser hücrelerinde bu yolların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan birisi de miR-484 olarak gösterilmiştir. Ancak GBM ile miR-484'ün ilişkisi bilinmemektedir.

Sunulan tez çalışmasında GBM hücrelerinin TMZ'ye karşı geliştirdiği ilaç direncinde miR-484'ün olası rolünün araştırılması amaçlandı. Bunun için iki farklı GBM hücreleri (IDH1-mutant olmayan U-87MG ve IDH1- mutant U-87 hücreleri) farklı konsantrasyonlarda TMZ, mimik-miR484 ve kombinasyonları ile muamele edildi ve muamele sonrası bu hücrelerin proliferasyon, klon oluşum ve apoptoza direnç özelliklerindeki olası değişiklikler araştırıldı.

Bulgularımıza göre; TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı etkilerine kıyasla kombinasyonlarının hücrelerin kanserojenik özelliklerini daha etkili olarak azalttığı ve TMZ ve miR484 kombinasyonun TMZ'nin etkinliğini artırdığı bulundu.

Sonuçlarımız, literatürde ilk kez temozolomid ve mimik-miR484 kombinasyonunun, TMZ'nin etkinliğini artırmak için yeni ve etkili bir alternatif tedavi stratejisi olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: GBM; miR-484; Temozolomid; İzositrat Dehidrogenaz (IDH); U-87 MG; IDH mutant U-87

INVESTIGATION OF THE ROLE OF miR-484 IN THE RESISTANCE DEVELOPED BY GLIOBLASTOMA CELLS TO TEMOZOLOMY

Serhat ALBAYRAK

Erciyes University, Institute of Genome and Stem Cell Department of Molecular
Biology and Genetics

Master Thesis, February 2024

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA

Prof. Dr. Zuhale HAMURCU

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor in adults. GBMs are largely resistant to treatments due to their heterogeneity, high proliferation rates and aggressive features. Although surgical resection, chemotherapy and radiotherapeutic treatment methods are used in GBM treatment, the survival time in patients is very low.

Today, the alkylating drug Temozolomide (TMZ) is a widely preferred treatment option for GBM. Although this standard treatment increases the patient's survival rate, it has been shown that DNA repair mechanisms such as high O6-Methylguanine-DNA Methyl Transferase (MGMT), mismatch repair mechanism, base excision repair mechanism lead to TMZ resistance by reducing the toxic effectiveness of TMZ in GBM. Therefore, more effective treatment strategies for GBM are needed.

It has been reported that miRNAs regulate many cellular activities such as proliferation, invasion, metastasis, apoptosis and drug resistance in cancer cells. One of the miRNAs involved in the regulation of these pathways in cancer cells has been shown to be miR-484. However, the effect of miR-484 on GBM is unknown.

In the presented thesis study, it was aimed to investigate the possible role of miR-484 in the drug resistance developed by GBM cells against TMZ. For this, two different GBM cells (IDH1-non-mutant U-87MG and IDH1-mutant U-87 cells) were treated with different concentrations of TMZ, mimik-miR484 and their combinations, and possible changes in the proliferation, clone formation and resistance to apoptosis properties of these cells were investigated after treatment.

According to our findings; It was found that the combination of TMZ and mimik-miR484 reduced the carcinogenic properties of cells more effectively compared to their separate effects, and the combination of TMZ and miR484 increased the effectiveness of TMZ.

Our results showed, for the first time in the literature, that the combination of temozolomide and mimik-miR484 could be used as a new and effective alternative treatment strategy to increase the effectiveness of TMZ.

Keywords; GBM; miR-484; Temozolomide Isocitrate Dehydrogenase (IDH); U-87 MG; IDH mutant U-87

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xi
TABLOLAR LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Glioma	4
2.3. Glioblastoma Multiforme (GBM)	5
2.3.1 Glioblastoma Multiforma Epidemiyolojisi.....	6
2.3.2. Glioblastoma Multiforme Sınıflandırılması.....	6
2.3.3. Glioblastoma Multiformanın Genetik Özellikleri.....	7
2.4. İzositrat Dehidrojenaz (IDH).....	8
2.4.1. İzositrat Dehidrojenaz Enziminin Rolü	9
2.4.2. İzositrat Dehidrojenaz Enziminin Kanser'deki İşlevi.....	10

2.5. Glioblastoma Multiforme'nin Tedavi Stratejileri.....	11
2.5.1. Cerrahi	11
2.5.2. Radyoterapi.....	11
2.5.3. Kemoterapi.....	12
2.6. Temozolomid (TMZ).....	12
2.6.1. Temozolomid Etki Mekanizması.....	13
2.6.2. Temozolomid'in Sitotoksik Etkisine Direnç	14
2.6.2.1. O6 -metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT)	14
2.6.2.2. Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR).....	15
2.6.2.3. Baz Eksizyon Onarımı (BER)	15
2.7. GBM'de İlaç Dirençliliği	16
2.8. MikroRNA (miRNA)	17
2.8.1. miRNA Biyogenezi.....	18
2.8.2. miRNA ve Kanser.....	19
2.8.3. miR-484	20
3.YÖNTEM VE GEREÇLER.....	21
3.1. GEREÇLER	21
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	21
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	21
3.2. YÖNTEM	22
3.2.1.Kullanılan Hücre Hatları.....	22
3.2.2. Hücre Kültürü	23
Besiyeri Hazırlanması	23
Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması	23
Hücrelerin Dondurulması.....	24
Hücrelerin Sayımı	24

Kullanılan mikroRNA (miRNA)'lar ve Hazırlanması	24
Hücrelerin miRNA ile Transfeksiyonu	25
Hücrelerin Temozolomid ile Muamelesi	25
3.2.3. Hücre Proliferasyon / Canlılık (MTS) Analizi	25
3.2.4. Klonojenik Tespiti	26
3.2.5. Apoptoz Analizi	26
3.2.6. İstatiksel Değerlendirme	27
4.BULGULAR	28
4.1. Temozolomid, mimik-miR484 ve kombinasyonunun U87 ve IDH1-mutant U87 kanseri hücrelerinin canlılığına/çoğalmasına etkisi	28
4.2. Temozolomid, mimik-miR484 ve kombinasyonunun U87 ve IDH1-mutant U87 kanseri hücrelerinin koloni oluşumuna etkisi	31
4.3. Temozolomid, mimik-miR484 ve kombinasyonunun U87 ve IDH1-mutant U87 kanseri hücrelerinde apoptoza etkisi	34
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	38
6.KAYNAKÇA	42
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER

2-HG	: 2-Hydroxyglutarat
ABC	: ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı
AGO	: Argonaut
ATP	: Adenozin trifosfat
BER	: Baz eksizyon onarımında
CDK	: Siklin bağımlı kinaz 4/6
CpG	: Sistein-fosfat-guanin
DGCR8	: DiGeorge Syndrome critical region 8
DMEM/F-12	: Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium/F-12
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
GBM	: Glioblastoma Multiform
IDH 1/2	: İzositrat dehidrogenaz enzim 1 ve 2
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MGMT	: O6-Metilguanin-DNA Metil Transferaz
MDM2	: Murin double minute 2
MTS	: Methods for Testing and Specification
MMR	: DNA mismatch repair
MSH2	: Melanosit uyarıcı hormon 2
MLH1	: MutL homolog 1
MiRNA	: Mikro RNA
NADP+	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PTEN	: Protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu
PMS2	: Saccharomyces cerevisiae 2

PARP-1	: Poli ADP-riboz polimeraz 1
RISC	: RNA-induced silencing complex
TCA	: Trikarboksilik asit
TMZ	: Temozolomid
TP53	: Transkripsiyon faktör 53
α-KG	: Alpha- ketoglutarate
μl	: Mikrolitre



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	21
Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	22



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri	4
Şekil 2. DSÖ Sınıflandırması ve Glioma Alt Tipleri	5
Şekil 3. Gliomaların Sınıflandırılması	7
Şekil 4. Glioblastomalarda Moleküler Değişim	8
Şekil 5. IDH1 ve IDH2 Proteni Yapısı	9
Şekil 6. IDH Enzimlerinin Rolü	9
Şekil 7. IDH-mutant Enzimlerinin işlevi	10
Şekil 8. Temozolomid ve Temozolomid mekanizması	13
Şekil 9. Temozolomid Direnç Mekanizmaları	14
Şekil 10. miRNA Biyogenezi	19
Şekil 11. Temozolomid ile muamele edilen U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı	29
Şekil 12. U87-MG hücrelerinde proliferasyon/canlılık oranı	30
Şekil 13. IDH1 mutant U87 hücrelerinde proliferasyon/canlılık oranı.....	31
Şekil 14. Temozolomid ile muamele edilen U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinde koloni oluşum oranı.....	32
Şekil 15. U87-MG hücrelerinde klon oluşum oranı	33
Şekil 16. IDH1 mutant U87 hücrelerinde klon oluşum oranı	34
Şekil 17. U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinin apoptoz oranı	35
Şekil 18. U87-MG hücrelerinin total apoptoz oranı	36
Şekil 19. IDH1 mutant U87 hücrelerinin total apoptoz oranı.....	37

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gliomalar, glial hücrelerden kaynaklanan tümörlerdir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 4 alt evrede toplanmıştır (Sonoda Y, 2020). DSÖ tarafından yapılan sınıflandırmada, gliomalar, izositrat dehidrogenaz (IDH) geninde görülen mutasyona göre IDH geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan olarak ikiye ayrılmış ve IDH mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastaların ölüm oranları arasında belirgin farkın olduğu dikkat çekmiştir (Louis ve ark., 2016).

Glioblastoma Multiform (GBM)'lerin, heterojen olmaları, yüksek proliferasyon oranları, agresif özellikleri hastalarda tedaviyi zorlaştırmaktadır. GBM hastalarında uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümör rezeksiyonu, temozolomide dayalı kemoterapi, radyoterapi veya bunların kombinasyonuna dayanmaktadır (Shergalis ve ark., 2018; Pearson ve ark., 2017; Fabian ve ark., 2019).

Günümüzde alkilleyici ilaç Temozolomid (TMZ), birincil GBM için yaygın olarak tercih edilen bir tedavi seçeneğidir. TMZ'nin aktif metaboliti, DNA'daki guanin kalıntılarını metile ederek çift zincir kırıklarına yol açmaktadır (Würstle ve ark., 2017; Tomar ve Shrivastava 2021). Bu standart tedavi, hastanın hayatta kalma oranını artırsa da yüksek O6-Metilguanin-DNA Metil Transferaz (MGMT), yanlış-eşleşme tamir mekanizması, baz eksizyon tamir mekanizması gibi DNA tamir mekanizmaları GBM'de TMZ'nin toksik etkinliğini azaltarak TMZ direncinde rol oynadığı ve TMZ'nin etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (Jiapaer ve ark., 2018; Karachi ve ark., 2018; Rabé ve ark., 2020).GBM'de gelişen ilaç dirençliliğini üstesinden gelmek için yeni tedavi stratejilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA) kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi birçok hücreyel aktivitenin düzenlenmesinde görev alırlar. Kanser hücrelerinde bu yolların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan biri de miR-484 olarak gösterilmiştir. miR-484'ün, bazı kanserlerde yüksek oranda eksprese edildiği ve onkogenik roller sergilediği (Li ve ark., 2017; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013; Wang ve ark., 2019), buna karşılık bazı kanserlerde ise ekspresyonunun düşük olup tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Zare ve ark., 2018; Hu ve ark., 2017; Lu & Lu, 2015).

Bu yüzden sunulan tez çalışmasında, mir-484'ün ilaç dirençliliğinde rol alabileceği ve artmış ekspresyonun TMZ'ye karşı duyarlılığı artırabileceği hipotezlenmiştir. Bu hipotezimiz test etmek için, TMZ, mimik-miR-484 ve TMZ+mimik-mir-484 kombinasyonu iki farklı GBM hücrelerine uygulanarak, hücre canlılığı, klon oluşumu ve apoptoz oranı ile miR-484'ün TMZ'ye karşı geliştirilen dirençte etkisinin araştırılması amaçlandı.

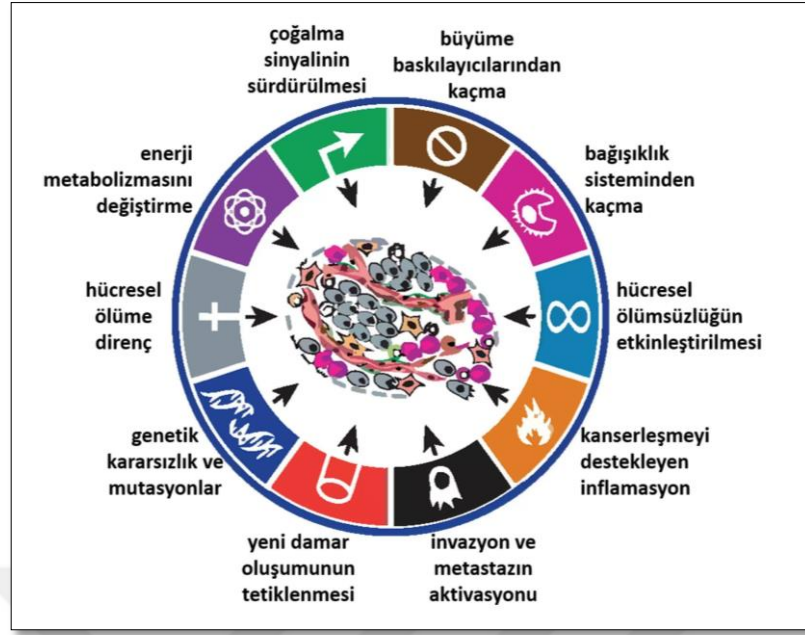
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Mutasyona veya genetik değişikliğe uğramış hücrelerin, kontrollü büyümeyi ve çoğalmayı sağlayan mekanizmalardan kaçarak hızlı ve kontrolsüz bir biçimde bölünmesidir (Roy ve ark., 2016; Hafaza ve ark., 2020). Kanser gelişiminin başlıca nedenleri, hücre döngüsünü düzenleyen bir veya daha fazla proteindeki genetik bozukluk, çevresel kanserojenlerin mutasyonlara sebep olması ve genetik aktarılan mutasyonlu genlerin varlığıdır.

Genellikle hem kalıtsal hem de çevresel faktörler bir arada bulunur ve kanserin gelişmesi için mutasyonların birikmesi gerekir (Vaghari-Tabari ve ark., 2021).

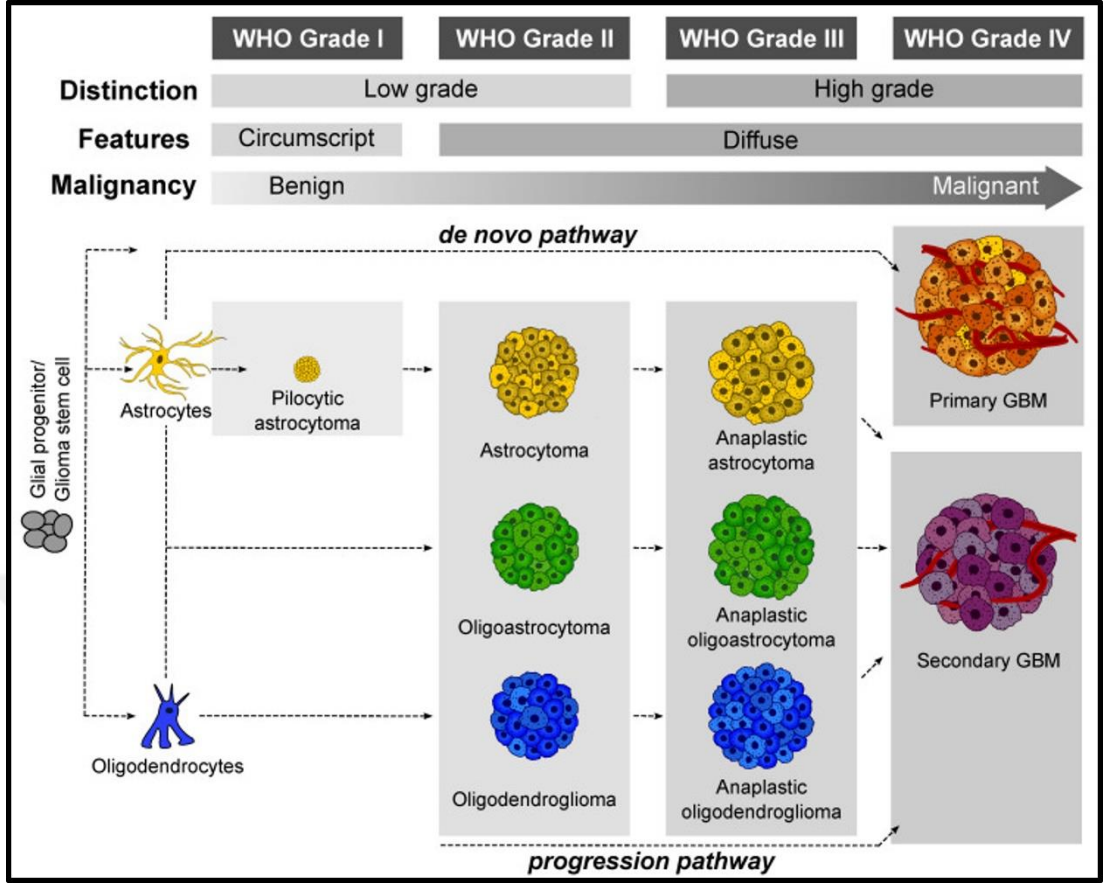
Kanserler köken aldıkları hücrelere, hücre heterojenitesine ve mutasyon durumuna göre sınıflandırılır (Hanahan ve Monje 2023). Proliferatif sinyallenmenin aktive edilmesi, büyüme baskılayıcılarının inaktive edilmesi, hücre ölüm mekanizmalarından kaçış, invazyon ve metastaz gibi bir çok özellik kanser hücrelerini sağlıklı hücreden ayırmaktadır (Şekil 1) (Traba ve ark., 2021; Hanahan ve Monje 2023).



Şekil 1. Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri (Hanahan ve ark., 2011)

2.2. Glioma

Gliomalar, glial hücreleri tarafından üretilen Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörleri olarak tanımlanmaktadır (Uddin ve ark., 2022). Beyin ve omurilikte en sık görülen primer tümörlerdir. DSÖ glioma tümörlerini; tümör genişliği, mitotik aktivite, proliferatif aktivite, nekroz ve genetik değişiklik parametrelerine göre dört evreye ayırmıştır (Alifieris ve Trafalis 2015). Anaplastik astrositom, anaplastik oligodendroglioma, anaplastik oligoastrocitom ve anaplastik ependimomlar gibi evre III glial tümörlerin yanı sıra glioblastoma multiforme ise evre IV olarak tanımlanmıştır (Şekil 2) (Ostrom ve ark., 2015; Sonoda 2020). Düşük dereceli gliomalar tipik olarak cerrahi rezeksiyonu mümkün kılarken , glioblastoma multiforme gibi daha yüksek dereceli gliomalar agresiftir ve tamamen yok edilmeleri neredeyse imkansızdır (Tilak ve ark., 2021).



Şekil 2. DSÖ Sınıflandırması ve Glioma Alt Tipleri (Tilak ve ark., 2021)

2.3. Glioblastoma Multiforme (GBM)

Glioblastoma Multiforme (GBM), yetişkinlerde en sık görülen yüksek insidansa sahip beyin tümörüdür. GBM diğer beyin tümörleri ile karşılaştırıldığında en agresif olanıdır (Yasaswi ve ark., 2021). Tüm primer beyin tümörlerinin %50'sinden fazlasını, tüm intrakraniyal neoplazmaların ~%20'sini oluşturan en yaygın beyin tümörüdür (Bryukhovetskiy ve ark., 2016). Dünya Sağlık Örgütü GBM'yi malign, mitotik olarak aktif ve nekroza yatkın olarak karakterize edilen dördüncü (IV) derece bir kanser olarak sınıflandırmaktadır (Carlsson ve ark., 2014). GBM'in ortalama başlangıç yaşının yüksek olması, tümörün konumu ve tedavi stratejilerinin yetersiz olmasından dolayı teşhis edildikten sonra ortalama sağkalım süresi 15 aydır (Vitovcova ve ark., 2020; Dymova ve ark., 2021).

2.3.1. Glioblastoma Multiforma Epidemiyolojisi

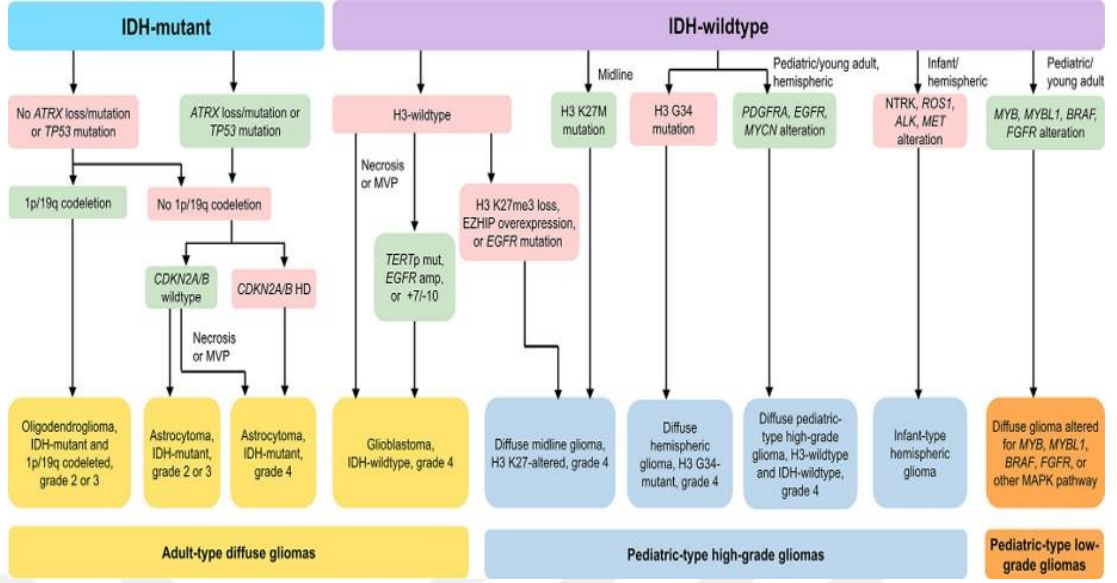
Merkezi sinir sistemi kanserlerinin görülme sıklığı yaklaşık %1,7'dir. Bu yüzde diğer kanser türlerine göre daha az olmasına rağmen, GBM ölüm oranı en yüksek olan kanser türlerinden biridir (ortalama sağkalım 15 ay). Günümüzde GBM, MSS'deki tüm kanser türlerinin %14,5'ini ve malign MSS tümörlerinin %48,6'sını oluşturmaktadır (Kaynar ve ark., 2021). Yaş ile birlikte GBM görülme oranı artmaktadır. Ortalama görülme yaşı 64'tür ve erkeklerde daha sık izlenir (Truitt ve ark., 2019). GBM'in mortalite ve morbidite oranı yaş ve cinsiyete göre değişmekle birlikte oldukça yüksektir (Ostrom ve ark., 2019).

2.3.2. Glioblastoma Multiforme Sınıflandırılması

Glioblastomalar tanım gereği yaygın astrositik gliomalardır ve IDH1 veya IDH2 genlerinde mutasyon yoktur, aynı zamanda IDH-vahşi tip olarak da bilinirler. Dünya Sağlık Örgütü 2021 yılı sınıflandırmasında glioblastoma için temel tanı kriterleri belirlemiştir. Ayrıca histolojik olarak nekroz veya mikrovasküler proliferasyon veya aşağıdaki üç moleküler özellikten birinin olması gerekir: TERT promotor mutasyonu; EGFR amplifikasyonu; ve kombine kromozom 7 ve kromozom 10 değişikliğidir (Park ve ark., 2023).

Bu nedenle, astrositom, IDH-mutant ve glioblastoma IDH-vahşi tip arasındaki biyolojik olarak farklı davranış nedeniyle artık astrositom, IDH-mutant evre 4 olarak yeniden sınıflandırılmış ve IDH-mutant glioblastoma artık sınıflandırmada yer almamaktadır.

Nekroz veya mikrovasküler proliferasyonu olmayan histolojik evre 2-3 IDH-yabani tip yaygın gliomalar için, TERT promotör mutasyonu tespiti ve EGFR mutasyon tespiti yapılmalıdır. Bu moleküler belirteçlerden bir veya daha fazlasının varlığı, nekroz veya mikrovasküler proliferasyon olmasa bile evre 4 IDH yabani tip glioblastoma tanısına yol açmaktadır (Singer ve ark., 2021; Park ve ark., 2023).



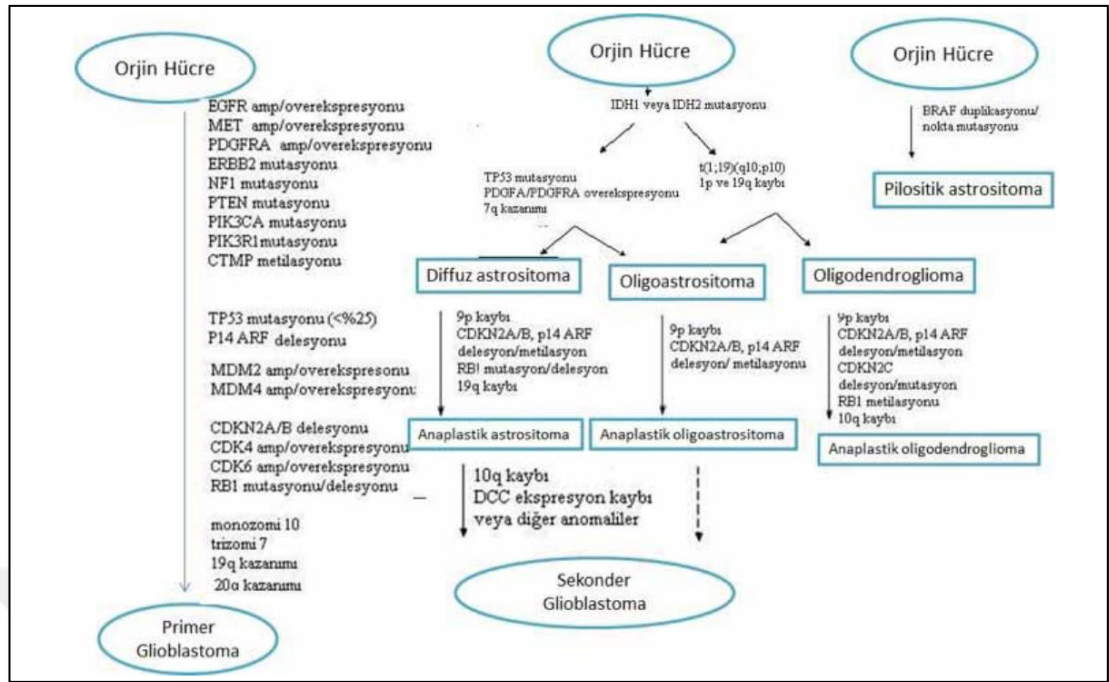
Şekil 3. Gliomaların Sınıflandırılması (Park ve ark., 2023)

2.3.3. Glioblastoma Multiformanın Genetik Özellikleri

GBM genetik olarak oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Hastalığın “multiforme” olarak adlandırılmasının nedeni aynı hücre dokusundaki genetik yapının farklılığı ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının farklı olmasıdır (Zhang ve ark., 2020).

GBM’ler, birbirinden farklı genetik mutasyonların tümörü tetiklemesi ile oluşur. Genetik parametrelerin değerlendirilmesi sonucu primer ve sekonder glioblastoma olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Silantyev ve ark., 2019).

Primer ve sekonder glioblastomalarda en çok meydana gelen genetik değişiklikler; tümör baskılayıcı protein 53 (TP53), siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK), p16^{lnk4}, Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve O6-metil-guanin–DNA-metiltransferaz (MGMT) genlerindeki mutasyonlardır. Bunların dışında kromozom 10 delesyonu, murin double minute 2 (MDM2) amplifikasyonu da saptanmıştır (Şekil 4) (Kalkan ve Atlı, 2014).



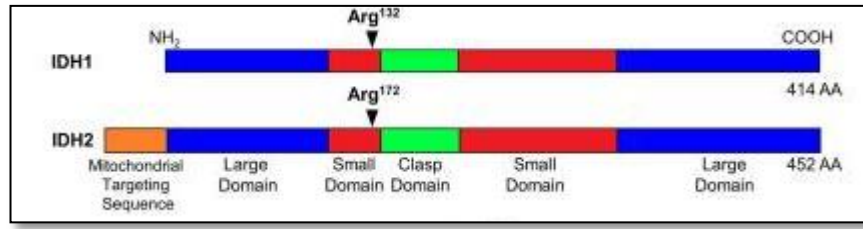
Şekil 4. Glioblastomalarda Moleküler Değişim (Kalkan ve Atlı, 2014)

2.4. İzositrat Dehidrojenaz (IDH)

IDH enzimleri, alfa-ketoglutarat (α -KG) oluşturmak üzere izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder ve Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADP +)'ı kofaktör olarak kullanır (Alshiekh ve Fuente, 2023).

Üç formu bulunan IDH enzimleri; Krebs döngüsü, glutamin metabolizması, lipogenez ve redoks regülasyonu gibi birçok ana metabolik tepkimede görev alan enzimlerdir. IDH1 ve IDH2 proteinleri yüksek derecede dizi benzerliğine sahiptir ve farklı genler tarafından kodlanır. IDH1 sitoplazma ve peroksizomlarda bulunurken, IDH2 ve IDH3 mitokondriyal matriste bulunmaktadır (Han ve ark., 2020).

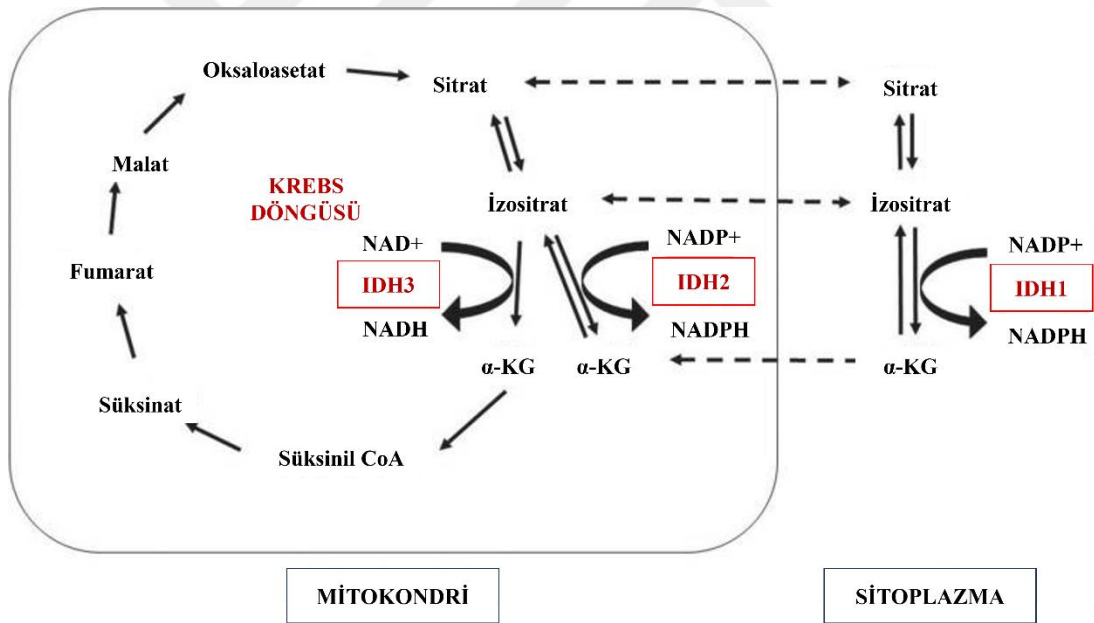
IDH1 ve IDH2; 2 aktif bölge içeren, 14 alfa sarmal ve 18 beta tabakadan oluşan homodimerik enzimlerdir. IDH alt birimleri büyük bir alan, küçük alan ve bir toka alanından oluşur ve IDH2 ek bir mitokondriyal hedefleme dizisi içerir (Şekil 5) (Waitkus ve ark., 2016).



Şekil 5. IDH1 ve IDH2 Proteni Yapısı (Waikutu ve ark., 2016)

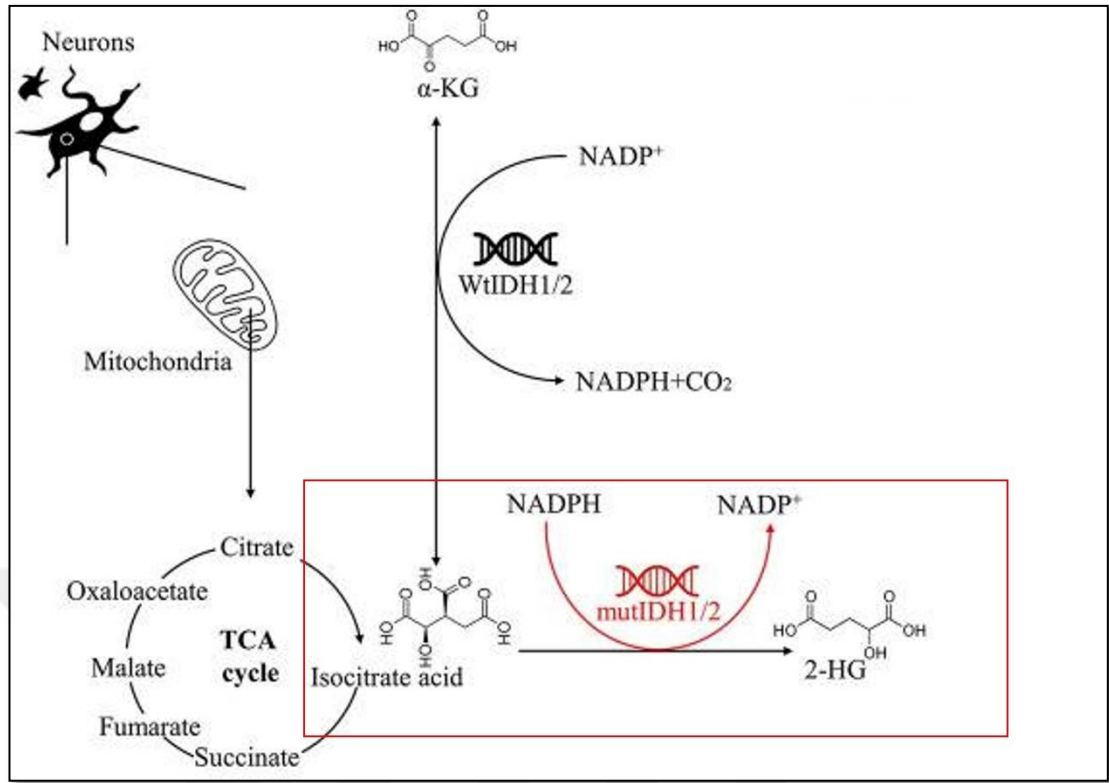
2.4.1. İzositrat Dehidrojenaz Enziminin Rolü

IDH enzimi krebs döngüsü içerisinde izositratın α -KG oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder ve NADP^+ 'nin indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ye indirgenmesinde önemli bir rol oynar (Huang ve ark., 2019). IDH3 ise NADP^+ yerine nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD^+)'ı kofaktör olarak kullanarak izositratın α -KG'ye dönüşümü düzenler (Şekil 6) (Ohba ve Hirose, 2016).



Şekil 6. IDH Enzimlerinin Rolü (Ohba ve Hirose, 2016)

IDH geninin aktif bölgesinde tek bir amino asit değişikliği ile oluşan mutasyon sentezlenen ürünün değişmesine neden olmaktadır. Bu mutasyonlar çoğunlukla IDH1'de arjinin 132 (R132) ve IDH2 arjinin 172'de meydana gelmektedir. IDH geni mutasyon sonucunda α -KG yerine yüksek düzeyde 2-hidroksiglutarik asit (2-HG) oluşumuna sebep olacaktır (Şekil 7)(Clark ve ark., 2016).



Şekil 7. IDH-mutant Enzimlerinin işlevi (Huang ve ark., 2019)

2.4.2. İzositrat Dehidrojenaz Enziminin Kanseri'deki İşlevi

Kanser hücrelerinde anormal metabolizma yaygındır. Bu anormallik metabolik enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. Metabolik süreçlerde etkili genlerden bir tanesi de IDH genidir. IDH geni, kanserde en sık tanımlanan mutasyona uğramış metabolik gendir; IDH1 ve IDH2 mutasyonları aktif bölge değişikliklerine neden olur. Bu mutasyonlar, onkogenleri aktive ederek veya tümör baskılayıcı genleri baskılayarak hücreleri neoplaziye yatkın hale getirebilir. Özellikle metabolik genlerdeki genetik mutasyonlar nedeniyle, onkometabolitlerin aşırı birikimi, kanserin gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunur (Wu ve ark., 2018).

IDH gen mutasyonları ilk kez kolorektal kanser vakasında tanımlanmıştır. IDH geninde aktif bölge mutasyonlarının ortak işlevi, α-KG'nin 2-HG'ye dönüşümünü katalize eden neomorfik bir enzim aktivitesidir (Waitkus ve ark., 2018).

2-HG onkometaboliti, histon ve Deoksiriboz nükleik asit (DNA) demetilasyonu ve hipoksiye adaptasyon gibi birçok hücresel sürece katılan çeşitli α -KG'ye bağımlı hidroksilazların aktivitesini inhibe edebilir. Bunların inhibisyonu hücre metabolizmasında, redoks homeostazisinde, hücrelerin epigenetik durumunda değişikliklere ve hücresel farklılaşmanın bozulmasına yol açar (Chen ve ark., 2016; Ni ve ark., 2022).

Mutasyonlu IDH genleri, kanserli hücrelerde 2-HG'nin birikmesine ve normal farklılaşma süreçlerini baskılayarak malign transformasyona izin vermektedir (Waitkus ve ark., 2016). Bu sayede kanser hücrelerinin gelişimine ve invazivlik kazanmasına katkıda bulunmaktadır.

2.5. Glioblastoma Multiforme'nin Tedavi Stratejileri

GBM, tedavisi oldukça zor olan kanserlerden biridir. Günümüzde bir çok terapötik tedavi stratejileri geliştirilmiş olsa da, **GBM** hastalarının prognozu yüksektir. Cerrahi, radyoterapi ve adjuvan kemoterapi gibi etkin tedavilerin varlığına rağmen glioblastoma hastalarının ortalama yaşam süresi 15 aydır.

2.5.1. Cerrahi

Cerrahi, nörolojik fonksiyonu korurken mümkün olan en fazla miktarda kanserli dokunun çıkarılmasını amaçlamaktadır. Cerrahi genel olarak brüt total rezeksiyon ve tümörün tamamen çıkarılması sağlanamadığında subtotal rezeksiyon olarak sınıflandırılır. Rezeksiyon yapılan hastaların sağkalım süreleri rezeksiyon yapılmayan hastalar ile kıyaslandığında önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Ancak tek başına cerrahi tedavi yetersiz kalmakta ameliyat sonrası radyoterapi ve kemoterapi tedavisi gerçekleştirilmelidir (Batash ve ark., 2017; Pour ve ark., 2023).

2.5.2. Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, DNA çift zinciri üzerinde hasar meydana getirerek hücrelerin apoptoza gitmesini sağlayan bir tedavi yöntemidir. Radyoterapi, uzun yıllar boyunca gbm için standart bir tedavi yaklaşımı olmuştur ve hala cerrahi ile birlikte **GBM** tedavisinde uygulanmaya devam edilmektedir (Batash ve ark., 2017). Geleneksel radyoterapi, foton ışınları kullanılarak iletilen 180-200 cGy'lik standart doz fraksiyonu boyutuna dayanmaktadır. GBM'in mevcut standart bakım tedavisi,

ameliyat sonrası Temozolomid ve Radyoterapi'nin eş zamanlı kullanımını içermektedir. Yaşlı ve durumu kötü olan hastalarda, modifiye edilmiş radyoterapi kullanılmış daha az yan etki ve daha az tedavi yükü elde edilmiştir (Pour ve ark., 2023).

Foton radyasyonu ile kontrolü iyileştirmeye yönelik doz yükseltme girişimleri, ek bir sağkalım faydası olmaksızın doku hasarının artmasına neden olmuştur. Sonuç olarak radyoterapi bir tedavi seçeneği olarak devam etmektedir ancak klinik açıdan hücreler radyasyon direnci göstermektedirler (Liu ve ark., 2020).

2.5.3. Kemoterapi

Cerrahi esnasında tümör hücrelerinin tamamının alınamaması, primer **GBM** vakalarında cerrahi sonrası kemoterapi tedavisi uygulanmaktadır. Kemoterapi gliomalarda hayatta kalmayı radyoterapiye göre %10 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle kemoterapi GBM'in tedavi başarısının artmasında önemli bir stratejidir (Shergalis ve ark., 2018).

Beyin tümörlerinde, kemoterapötik tedavi stratejilerinde karşılaşılan en önemli sorun kan beyin bariyeridir (KBB). KBB, kemoterapötiklerin dokuya ulaşmasını engellediğinden KBB'yi aşan ajanların tercih edilmesi gerekmektedir (Alifieris ve Trafalis, 2015).

GBM tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötikler alkilasyon ajanlarıdır. Alkilasyon ajanlarının kanser tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, özellikle **GBM** tedavisinde uygulandığı bilinmektedir. Son dönemde gbm hastaların büyük bir kısmında alkilasyon ajanı olarak temozolomid kullanılmaktadır (Alifieris ve Trafalis, 2015).

2.6. Temozolomid (TMZ)

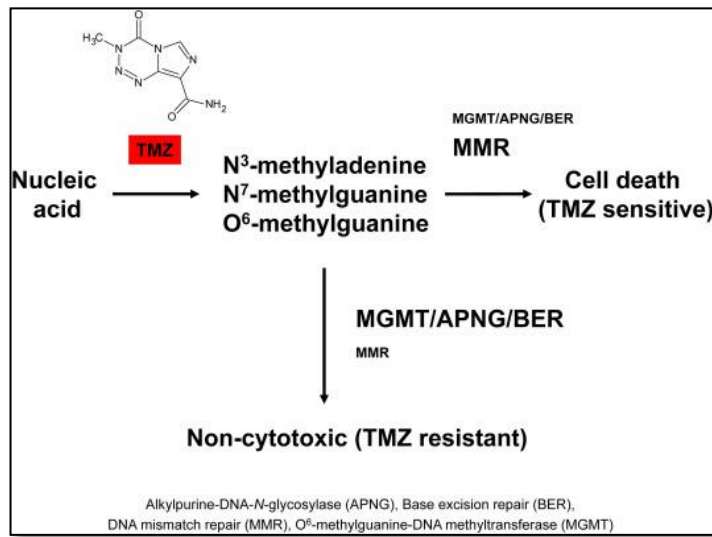
DNA alkilleyici ajanlar, antikanser ilaçların en eski sınıfıdır. Beyin tümörleri dahil birçok kanser türünde aktif olarak kullanılmakta ve önemini korumaktadır. Alkilleyici ajanlar, nükleik asit üzerine eklemeler yaparak DNA'ya zarar verir. Beyin tümörleri tedavisinde kullanılan ve etkili olan terapötik madde TMZ'dir (Jiapaer ve ark., 2018).

TMZ (ticari adı Temodar veya Temodal), 1980'li yıllarda geliştirilen imidazotetrazin sınıfında yer alan, ikinci nesil alkilleyici kemoterapötik ajandır (Abbaszade ve ark., 2021). Küçük bir lipofilik molekül olan TMZ, KBB'ye nüfuz edebilir ve bu nedenle MSS aktivitesine sahip birkaç ilaçtan biridir (Ortiz ve ark., 2021). TMZ, G2/M'de hücre döngüsü durmasını indüklediği ve sonunda apoptoza yol açtığı bilinen bir DNA alkilleyici ajandır (Lee S, 2016).

2.6.1. Temozolomid Etki Mekanizması

TMZ, 194.154 g/mol gibi düşük bir moleküler ağırlığa, lipofilik bir karaktere sahiptir ve güçlü bir alkilleyici ajan olarak görev yapar. Kimyasal adı 3,4-dihidro-3-metil-4-oksoimidazol olan TMZ, aktif metabolit 5-(3-metil-1-triazen-1-il)imidazol- üretmek için kendiliğinden hidrolize uğrar (Ortiz ve ark., 2021).

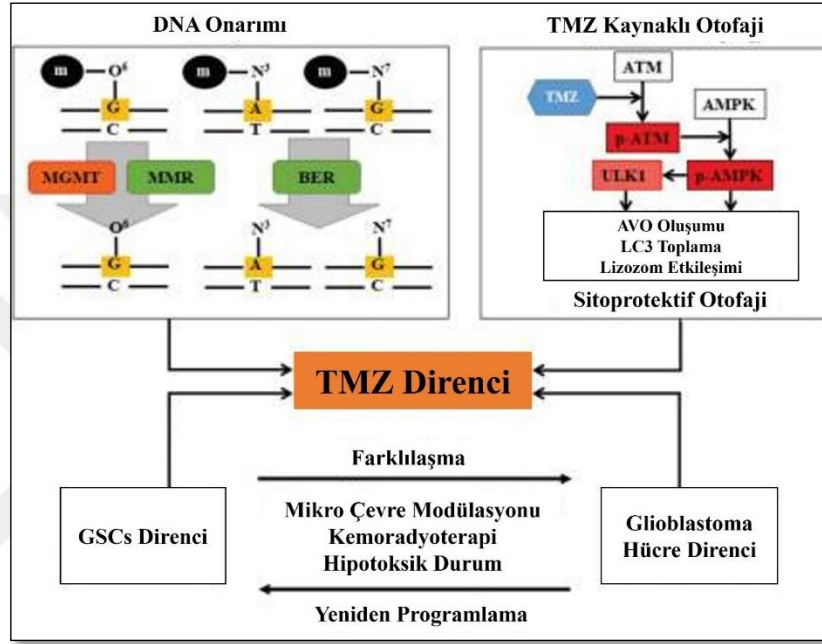
Asidik pH'da (< 5) stabildir, ancak nötr ve alkalik pH (>7) değerlerinde hızla aktif 5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-karboksamit (MTIC) ara ürüne hidrolize olur. MTIC ayrıca 5-amino-imidazol-4-karboksamit (AIC) ve metilhidrazine hidrolize edilir. TMZ'nin sitotoksitesine, genomik DNA'daki guaninler üzerindeki N7 ve O6 bölgelerine ve adeninler üzerindeki O3 bölgesine metil gruplarının eklenmesi aracılık eder (Şekil 8). Guanin üzerindeki O6 bölgesinin alkilasyonu, daha sonraki DNA replikasyonu sırasında metilguaninin karşısındaki sitozin yerine bir timin eklenmesine yol açar ve bu, hücre ölümüyle sonuçlanabilir (Lee S., 2016).



Şekil 8. Temozolomid ve Temozolomid mekanizması (Jiapaer ve ark., 2018)

2.6.2. Temozolomid'in Sitotoksik Etkisine Direnç

Mevcut standart TMZ tedavisi hastanın ameliyat sonrası hayatta kalma süresini uzatabilir ancak çoğu vaka sonunda TMZ'ye direnç gösterir. TMZ tarafından üretilen O6-metilguanin , O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) tarafından onarılır. MGMT'nin yanı sıra yanlış eşleşme tamiri (MMR) ve baz eksizyon onarımında (BER) TMZ direncine katkıda bulunur (Şekil 9) (Jiapaer ve ark., 2018).



Şekil 9. Temozolomid Direnç Mekanizmaları (Jiapaer ve ark., 2018)

2.6.2.1. O6 -metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT)

MGMT, O6- metilguanin içindeki metil grubunu çıkararak TMZ tarafından oluşturulan sitotoksik lezyonu doğrudan onaran ve TMZ'nin neden olduğu ölümcül DNA hasarının geçersiz olmasına yol açan DNA onarım enzimidir. Bu nedenle, O6-MeG'nin etkili onarımını sağlamak için MGMT'nin sürekli olarak yenilenmesi gerekir (Ortiz ve ark., 2021).

MGMT proteinini kodlayan gen, kromozom 10 üzerinde yer alır. MGMT ekspresyon seviyeleri, sistein-fosfat-guanin (CpG) gen adasındaki promoter bölgesinin metilasyon durumuyla doğrudan ilişkilidir. Bu gen, promotörünü oluşturan 25 CpG adasının metilasyonu ile epigenetik olarak düzenlenir. MGMT

promotörünün CpG bölgeleri metillenmediğinde, polimeraz proteine bağlanabilir ve proteinin ekspresyonunu indükleyebilir (Tomar ve ark., 2021).

MGMT proteini, TMZ kaynaklı DNA hasarına karşı koyan bir onarım mekanizması oluşturduğundan, MGMT ekspresyonunun seviyesi doğrudan kemoterapideki TMZ direnciyle ilişkilidir.

2.6.2.2. Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)

DNA sentezi sürecinde oluşan nükleotid baz uyumsuzluklarını düzelten bir sistemdir. TMZ tedavisiyle indüklenen 06-metilguanin (06-MeG), DNA replikasyonu sırasında timin ile yanlış eşleşme yapar. MMR sistemi yanlış eşleştirilmiş O6-MeG/T'yi tanır ve yeni sentezlenen ipliği keserek ana ipliği O6 - MeG'ye zarar vermeden bırakır. Bu anlamsız döngüler tekrarlanarak hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açar (Jiapaer ve ark., 2018).

MMR fonksiyonunun kaybı, TMZ'nin neden olduğu yanlış eşleştirmeye yanıt vermez ve TMZ'nin sitotoksik etkilerine karşı dirençle ilişkilendirilebilir. MMR yeteneği, melanosit uyarıcı hormon 2 (MSH2), mutL homolog 1 (MLH1) ve mayoz sonrası segregasyonla artan *Saccharomyces cerevisiae* 2 (PMS2) gibi MMR genlerinin mutasyonu nedeniyle bozulur. MMR genlerindeki mutasyonların birincil GBM'de nadir olduğunu, bu genlerin ise TMZ kaynaklı mutasyonlara karşı savunmasız olduğunu, böylece tümör hücrelerinin MMR yolunun bozulması nedeniyle TMZ'ye direnç geliştirdikleri belirlenmiştir (Lee S., 2016; Jiapaer ve ark., 2018; Tomar ve ark., 2021).

2.6.2.3. Baz Eksizyon Onarımı (BER)

Baz eksizyon onarımı oksitleyici bir madde, iyonlaştırıcı radyasyon veya alkilleyici maddeler tarafından indüklenen DNA hasarının onarımında rol oynar. Bu sistem, DNA glikosilaz, endonükleaz, polimeraz ve DNA ligazının çoklu kataliz reaksiyonlarından oluşur. N7 -guanin ve N3 – adeninin gibi TMZ'nin neden olduğu metilasyonu BER tarafından hızla onarılır, böylece GBM'nin hayatta kalmasını destekler (Tomar ve ark., 2021).

BER'in bir veya daha fazla bileşeni mutasyona uğradığında, BER'in DNA hasarını onarma yeteneğinde eksiklik ortaya çıkar ve TMZ'nin GBM'ye karşı sitotoksitesine katkıda bulunur.

BER bileşenleri arasında poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) çift etkili önemli bir enzim olarak bilinmektedir. PARP-1'in inhibisyonu, hücrelerde kırık DNA'nın birikmesine yol açarak hücre ölümüyle sonuçlanır. DNA hasarıyla oluşturulan PARP-1 hiper-aktivasyonu, NAD⁺ ve adenosin trifosfatın (ATP) tükenmesine ve ardından hücre ölümüne yol açar. Böylece BER aktivitesinin düzenlenmesi TMZ dirençli GBM'nin tedavisine katkı sağlamaktadır (Ortiz ve ark., 2021).

2.7. GBM'de İlaç Dirençliliği

ATP bağlama kaseti (ABC) taşıyıcıları, birçok substratı aktif olarak taşıyan A-G olarak adlandırılan yedi gen alt ailesine sınıflandırılan 49 proteinden oluşan bir ailedir. P-glikoprotein (ABCB1), çoklu ilaca dirençli protein 1 (ABCC1), meme kanserine dirençli protein (ABCG2) ve çoklu ilaca dirençli protein 10 (ABCC10) gibi önemli taşıyıcıları içermektedir (Vasan ve ark., 2020).

İnsanda tanımlanan ilk ABC taşıyıcısı ABCB1'dir. ABCB1'in aşırı ekspresyonu, çok çeşitli kemoterapötik ilaçlara karşı dirençte katkıda bulunur. ABCC1 ayrıca çok çeşitli antikanser ilaçlarına karşı da dirençte yol açar ve kapsamlı kanıtlar, kanser hücrelerinin mitoksantron, sakinavir, epipodofilotoksinler ve antrasiklinlere direncinin ABCC1 tarafından aracılık ettiğini göstermektedir. ABCG2 taşıyıcısı öncelikle meme kanseri, kolon kanseri, mide kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve yumurtalık kanserinde eksprese edilir (Li ve ark., 2017).

Bu proteinler, hücreleri hücre içi ilaç konsantrasyonunun neden olduğu ölümden koruduklarından, aynı zamanda ilacın biyoyararlanımını, hücre içi konsantrasyonunu ve kan-beyin bariyerinden geçişini azaltarak ilacın etkinliğini azaltarak etki göstermektedirler (Bukowski ve ark., 2020).

GBM'de ise ABCB1, ABCC1 ve ABCG2 gibi birçok taşıyıcı proteinin ekspresyonun yüksek olduğu ve bu proteinlerin ilaç dirençliliği ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Roy ve ark., 2022). Fakat etki mekanizmaları tam anlamıyla anlaşılamamıştır.

ABC taşıyıcıları, çoklu ilaç direnci'nin geliştirilmesindeki en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Hücrelerdeki antikanser ilaçlarının konsantrasyonunu arttırmak için ABC taşıyıcılarını bloke etmek veya etkisiz hale getirmek amacıyla tedaviler geliştirilmeye devam etmektedir.

Bu direnç mekanizmalarından dolayı GBM hücreleri TMZ'ye karşı direnç oluşturmaktadır ve tmz'nin etkinliğini kısıtlanmaktadır. TMZ'nin glioblastomların tedavisinde etkinliğini arttırmak ve glioblastom hücrelerini t'ye duyarlı hale getirmek için farklı tedavi stratejilerine ve yeni terapotiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.8. MikroRNA (miRNA)

miRNA'lar, transkripsiyon sonrası hedef mRNA'ların gen ekspresyonunu düzenleyen, 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlamayan küçük tek iplikçikli RNA molekülleridir (Lin ve Gregory, 2015; Correia ve ark., 2019). 1993 yılında *C.elegans*'da yapılan çalışmalar neticesinde gen ekspresyonun etkin transkripsiyonel düzenleyicisi olarak lin4 ve let7 miRNA'ları keşfedilmiştir (Budakoti ve ark., 2021).

Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Hedefi olan mRNA'ların 3'-kodlanmayan bölgelerine (3'-UTR) komplementer olarak bağlanan miRNA'lar translasyonu baskırlar (Yao ve ark., 2019). miRNA'ların gelişim, farklılaşma, hücre döngüsü, çoğalma ve apoptoz gibi farklı biyolojik süreçlerde görev aldığı bilinmektedir. miRNA'lar bu süreçlerde homeostazisi sağlama açısından son derece önemlidir (Conti ve ark., 2020).

Hedefledikleri genler kendi baz dizileriyle eşleşen genlerdir. Baz eşleşme özelliği sayesinde miRNA hedef mRNA'ya bağlanır. Bu da ya mRNA'nın yıkılmasına ya da protein translasyonunun engellenmesine neden olur (Loh ve ark., 2019).

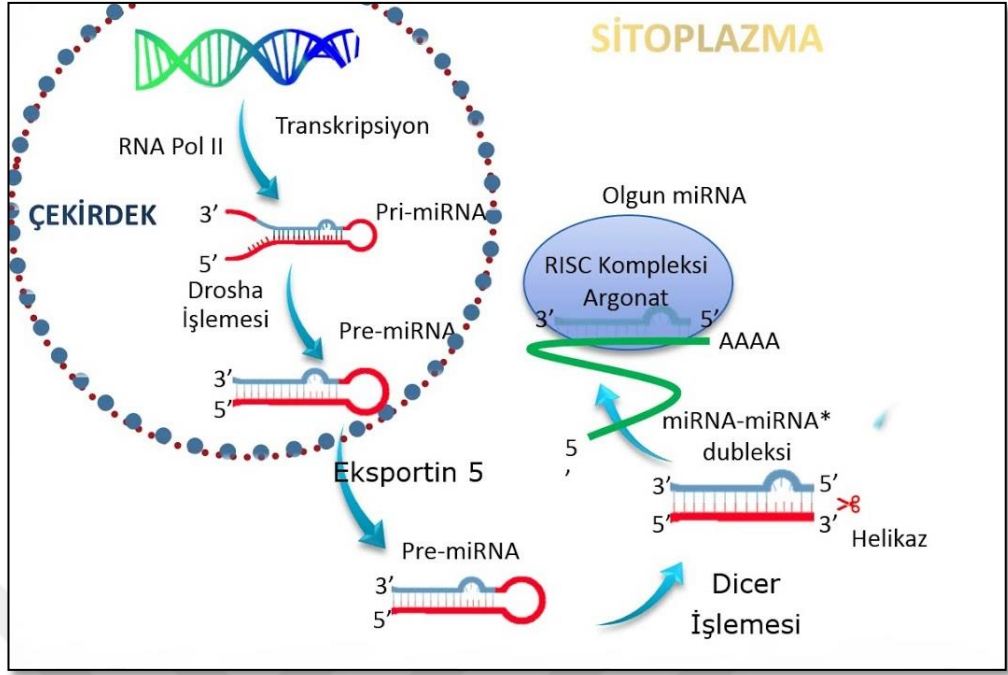
Ayrıca, miRNA'lar bir çok mRNA'ya bağlanır veya tek bir mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Stavast ve Erkeland, 2019). Yapılan çalışmalara göre, miRNA'lar insan genlerinin büyük bir kısmını düzenlediği ve anjiyogenez (Hamam ve ark., 2017), metastaz gibi süreçlerde de temel düzenleyici olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Goradel ve ark., 2019).

2.8.1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar, spesifik etkileşimleri sayesinde farklı dokularda ve gelişim aşamalarında gen ekspresyonunun anahtar transkripsiyon düzenleyicileri olarak rol oynamaktadır (Conti ve ark., 2020).

Günümüze kadar tanımlanmış miRNA'lar ya intragenik ya da intergeniktir. İntragenik kısım intron ya da ekzon tarafından düzenlenirken, intragenik kısım kendi promotörleri tarafından düzenlenir ve konakçı genden bağımsız olarak kopyalanır (Westholm ve Lai, 2011).

Çekirdekte başlayan miRNA biyogenezi, ilk olarak RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III miRNA'nın pri-miRNA'ya transkripsiyonunu gerçekleştirir (Ha ve Kim, 2014). Drosha ve onun yardımcı faktörü bir RNA bağlayıcı protein olan DGCR8 (DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8)'den oluşan kompleks pri-miRNA'yı tanıyarak ve pri-miRNA'yı parçalayarak yaklaşık 70-100 nükleotid uzunluğunda saç tokası benzeri bir yapı olan pre-miRNA'ya dönüştürür. Oluşturulan pre-miRNA'nın 3' uucunda bulunan 2 nükleotitlik çıkıntı Exportin-5 tarafından tanınır. Exportin-5, pre-miRNA'nın stabilitesini sağlayarak çekirdekten sitoplazmaya çıkmasını sağlar. Exportin-5, Ran-GTP ve pre-miRNA ile üçlü bir kompleks yapı oluşturur. Bu oluşan üçlü kompleksin konformasyonu Ran-GTP'nin Ran-GDP'ye hidrolizi ile değişir. Değişen konformasyon sonucu pre-miRNA sitoplazma içine serbest hale gelir. Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'nın olgunlaşması DICER olarak bilinen RNaz III enzimi tarafından gerçekleşir. Çift iplik halinde bulunan 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA duplexi oluşturulur. Oluşturulan bir iplik degrade olmaktadır. Diğer iplik ise argonaut (Ago 1-4) proteinleriyle birleşerek RNA induced-silencing complex (RISC) ile kompleks oluşturmaktadır. RISC miRNA ve mRNA'nın eşleşmesini sağlayarak mRNA'nın ya translasyonunun engellenmesine ya da yıkılmasına sebep olur (Şekil 10) (Rani ve Sengar 2022; Salim ve ark., 2022).



Şekil 10. miRNA Biyogenezi (Sönmez C., 2020)

2.8.2. miRNA ve Kanser

Kanserle ilişkili miRNA'lar hedef aldıkları mRNA'lara bağlı olarak onkogenik miRNA'lar veya tümör süpressör miRNA'lar olarak 2 gruba ayrılmaktadır.

Onkogenik miRNA'nın kanser hücrelerinde yüksek seviyede ekspresyonu, miRNA'lar hedefindeki mRNA'lara doğrudan bağlanıp tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılaması ve kanser hücrelerinin büyümesine, hareketliliğine ve metastazına yol açar. Bu da tümörün ilerlemesine katkıda bulunur (Inoue ve Inazawa, 2021).

Tümör süpressör miRNA'ların yüksek ekspresyonu ise hücre büyümesini, apoptozu, immün sistemi ve diğer kanserlerle ilişkili olayları düzenleyerek tümör oluşumunu engellemektedir.

Kanserle ilişkili miRNA'lar, dokularda farklı bir yanıt oluşturabilir, böylece miRNA'lar kanserlerde onkogenik veya tümör baskılayıcı rollerde etki oluşturabilmektedir. Onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNA'ların susturulması veya aktifleştirilmesi, kanser hücresinin çoğalmasını, tümör büyümesini, metastaz oluşumunu ve hücrenin hayatta kalması gibi olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Oliveto ve ark., 2017; Fridrichova ve ark., 2019).

2.8.3. miR-484

Kanser hücrelerinde birçok farklı miRNA tanımlanmıştır. Bu miRNA'ların kanserde proliferasyon, invazyon, metastaz, apoptoz ve ilaç dirençliliği gibi birçok biyolojik süreci düzenlediği bilinmektedir. Bazı kanser hücrelerinde bu yolların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan bir tanesi de miR-484'tür.

22 nükleotidden oluşan miR-484 insanlarda 6.kromozom üzerinde lokalizedir ve birçok kanserde rol oynadığı bilinmektedir (Jia ve ark., 2022).

Bazı kanserlerde miR-484 yüksek oranda eksprese edilerek onkogenik rol oynadığı, buna karşılık bazı kanserlerde ise düşük eksprese edilerek tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018).

Örneğin, meme kanser hücrelerinde miR-484'ün aşırı eksprese edildiği, hücre proliferasyonu arttırdığı ve onkogenik miRNA olarak etki gösterdiği belirlenmiştir (Zearo ve ark., 2014). Benzer bir çalışmada akciğer kanserinin ilerlemesinde miR-484'ün ekspresyonunun artması apoptozu engelleyerek tümör proliferasyona katkı sağladığı ve onkogenik miRNA olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Li ve ark., 2017). Hepatoselüler karsinom, renal karsinom, yumurtalık kanseri ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde miR-484'ün onkogenik olarak davrandığı ve hasta prognozuyla korelasyon gösterdiği literatürde bildirilmiştir (Merhautova ve ark., 2015; Wang ve ark., 2019).

Bu çalışmaların tam tersi olarak gastrik ve kolorektal kanserlerde miR-484'ün ifadesinin düşük seviyede olduğu ve tümör baskılayıcı olarak davrandığı gösterilmiştir (Zare ve ark., 2018). Farklı bir çalışmada ise servikal kanser hücrelerinde miR-484'ün aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu, metastazı, istilasını ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'i önemli ölçüde inhibe ettiği ve tümör supressör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Hu ve ark., 2021).

Dolayısıyla miR-484'ün kanserlerdeki rolü tam olarak belirlenmemiş ve yapılan çalışmaların bulguları rolünün belirlenmesi için yeterli değildir.

GBM'lerde farklı miRNA'ların invazyon, metastaz ve ilaç dirençliliği gibi hücresel aktivitelerin düzenlenmesinde görev yaptığı tanımlanmıştır. Ancak miR-484'ün rolü GBM'lerde henüz belirlenmemiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışması; ERÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) TYL-2022-11870 nolu proje tarafından desteklenmiş olup, tüm deneyler Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Genom Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tablo 1.Çalışmada Kullanılan Cihazlar

KULLANILAN CİHAZ	MARKASI
Laminar Akım Kabini	Clean Air, Esco Airstream, Class II
CO ₂ ’li İnkübatör	Panasonic, MCO-19 A/C (UV)
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Counter
Hassas Terazî	Sonyo
Su Banyosu	Sonyo
Çalkalayıcı	Heidolph
Derin Dondurucu	Uğur
Buzdolabı +4°C	Siemens
İnvert Mikroskop	Leica
Otoklav	Alp, CL-40M
Pipet Tabancası	Gilson
Mikropipet Seti	Gilson
Vorteks	Heidolph
İnvert Mikroskop	Nicon TI
Elisa-Reader Algılama Sistemi	Promega
Thoma Lamı	Neubauer

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

SARF MALZEME	KULLANIM AMACI
DMEM/F-12 Besiyeri, BI	Besiyeri Hazırlanması
Fetal Bovine Serum(FBS), Gibco	Besiyeri Hazırlanması
L-Glutamine, BI	Besiyeri Hazırlanması
Penisilin-Streptomisin, BI	Besiyeri Hazırlanması
Trypsin-EDTA(%0,05), BI	Hücre Pasajlanması
Serolojik Piper 5, 10, 20 ml Greiner Bio-one	Hücre Kültür Çalışmaları
Steril 6, 24, 96 Kuyucuklu Plaklar, Greiner	Deneysel Çalışmalar
Pipet Uçları (0,5-10, 10-100, 200-1000µl), Greiner	Hücre Kültür Çalışmaları
25cm ² ve 75cm ² Hücre Kültür Kapları, Greiner	Hücre Çoğaltılması
Steril Cryo Tüp, Isolab	Hücrelerin Dondurulması
Fosfat Buffer Saline (PBS), Biochrom	Hücre Kültür Çalışmaları
Dimetilsülfoksit (DMSO), Merck	Hücre Dondurulması
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), Gibco	Hücre Kültür Çalışmaları
Mutlak Etanol ve %70 Etanol	Hücre Kültür Çalışmaları
miRNA mimik (hsa-miR-484 cat: 4464066), ThermoFisher	U87-mutant ve mutant olmayan GBM hücrelerinde miR-484'ün ekspresyonunu indüklemek için
Hyperfect Transfeksiyon Ajanı, Qiagen	miRNA'nın hücre içine transfeksiyonu
MTS Reagent Powder, Promega	Hücre Canlılık Testi
Phenazine Methosulfate (PMS), Sigma-Aldrich	Hücre Canlılık Testi
Kristal Viyole (violet) Çözeltisi (%10), Sigma	Hücre Boyaması
Temozolomid, Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Annexin V Apoptoz Kiti	Apoptoz Analizi için

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmamızda agresif GBM hücre hattı olan insan kökenli U-87(mutant olmayan) (ATCC® HTB-14™) ve U87 IDH1-mutant (ATCC® HTB-14IG) hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları ticari olarak ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alındı.

3.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan hücreler steril şartlar altında uygun büyüme besiyeri (medya) kullanılarak %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübasyona bırakılarak çoğalması sağlandı, sonra pasajlama işlemleri yapıldı. Hücre kültürü çalışmalarının tamamı ve kültür işlemleri için gerekli olan malzemelerin hazırlanması steril laminar hava akımlı kabinlerde gerçekleştirildi.

Besiyeri Hazırlanması

Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium/F-12 (DMEM/F12) medyum ortamına; inaktive edilmiş Fetal Bowine Serum (FBS) (%5), L-glutamin (%1) ve Penisilin/Streptomisin (%1) ilave edilerek hücrelerin çoğalması için uygun besiyeri hazırlandı. Hazırlanan medyum kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi, kullanılmadan önce çıkartılarak su banyosunda 37°C'ye getirildi ve çalışmalarda kullanıldı.

Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

Deney süresince tüm hücre kültür aşamaları, çalışma ve öncesinde ultraviyole ışık ve %70 etanol ile sterilize edilen laminar hava akımlı çalışma kabininde yapıldı. Önceden dondurulmuş ve kriyo vial içerisinde -196°C'de sıvı azot tankında muhafaza edilen hücre hatları, sterilize edilmiş kabin içerisine alınarak buz üzerinde erimeye bırakıldı. Çözünen hücreler 15 ml'lik steril falkon tüpe alındı ve üzerine 9 ml FBS(+) besiyeri eklendi. 1500 rpm +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1 ml FBS (+) besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Hücre kültürü için pelletin büyüklüğüne göre 25 cm² ya da 75 cm²'lik flask tercih edildi. Tercihe göre 25 cm²'lik flask içerisine 4 ml, 75 cm²'lik flask içerisine 10 ml FBS(+) besiyeri eklendi. Besiyeri üzerine hücreler eklendi ve flask 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

Bu süreç içerisinde hücreler inverted mikroskopta incelendi. Hücrelerin flasklardaki yoğunluğu %80-90'lara ulaştığı zaman (konfluense) besi yeri atılarak flask içerisindeki ölü hücreler ve artıkları uzaklaştırıldı. Flask tabanına tutunan aderent hücreleri kaldırmak amacıyla 75 cm²'lik flaska 3 ml, 25 cm²'lik flaska 2 ml %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C %5 CO₂'li inkübatörde 2-3

dakika bekletildi. Hücrelerin tamamının kalktığından emin olmak için mikroskop altında incelendi. Tripsin aktivitesini sonlandırmak için flasklara eklediğimiz tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri eklendi ve flask tabanı iyice yıkandıktan sonra hücreler 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldıktan sonra 1500 rpm +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant kısmı atıldı kalan pellet medyumla çözündürüldü ve medyum içeren yeni flasklara transfer edildi. Bu şekilde hücrelerin pasajlanması ile hücrelerin sürekli çoğaltılması sağlandı.

Hücrelerin Dondurulması

Çalışma dışında kullanılmayan hücreler depolanmak üzere %90 tam kültür medyum ve %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (9:1 oranı) olacak şekilde dondurularak muhafaza edildi. Bunun için hücreler kademeli olacak şekilde önce -80°C'de bekletildi daha sonra -196°C'lik sıvı azot tankında ileride kullanılmak üzere saklandı.

Hücrelerin Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplama için, Thoma Lamı kullanıldı. Santrifüj edilerek toplanmış hücre pelleti taze medyum içerisinde çözündürülerek süspanse edildi. Sonra bu hücre süspansiyonundan 10µl alınarak Thoma lamına konuldu ve üzeri lamel ile kapatıldı. Daha sonra invert mikroskop kullanılarak 40x büyütmede uygun karelerde yer alan hücreler sayıldı ve ortalaması alındı. Falkondaki hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$1 \text{ ml'deki hücre sayısı} = \text{sayılan bölgedeki ortalama hücre sayısı} \times 10^4$$

Kullanılan mikroRNA (miRNA)'lar ve Hazırlanması

Çalışmamızda GBM hücrelerinde miR-484'ün ekspresyonunu artıracak mimik-miR-484 kullanıldı. Bu miRNA son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde nükleaz free su ile laminar hava akımlı kabinde hazırlandı. Amacımıza uygun miRNA "UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU" dizisine uygun olarak Thermo Fisher (hsa-miR-484 cat: 4464066) firmasından temin edildi.

Hücrelerin miRNA ile Transfeksiyonu

Hücrelerin miRNA ile transfeksiyonu için transfeksiyon ajanı olarak Hiperfekt kullanıldı. Tüm deneylerimizde hücrelerin çoğaltıldığı kültür ortamına son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde mimik-miR-484 ile transfekte edildi ve tüm deneylerimizde hücrelerin 72 saat miRNA'larla transfekte edilmesi sağlandı. Bunun için, deneyin amacına uygun şekilde hücreler kültür kaplarına ekildi ve 37°C %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan 24 saat sonra hücrelerin çoğaldıkları kültür ortamına mimik-miR-484 eklendi ve 72 saat boyunca etüvde transfeksiyonu sağlandı. 72 saat sonunda kültür sonlandırıldı ve deneyin amacına uygun testler yapıldı. Tüm işlemler steril şartlarda laminar hava akımlı kabinde yapıldı.

Hücrelerin Temozolomid ile Muamelesi

TMZ (CAS: 85622-93-1) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. TMZ DMSO ile çözündürülerek stok olarak hazırlandı. Hücrelerin farklı konsantrasyonlarda TMZ ile muamele edilmesi için stok olarak hazırlanmış TMZ medyum ile dilüe edildi ve hücreler farklı konsantrasyonlarda (1, 3, 5, 10, 20, 25, 50, 100 µM) 72 saat boyunca TMZ ile muamele edildi.

3.2.3. Hücre Proliferasyon / Canlılık (MTS) Analizi

Hücrelerin proliferasyon/canlılık oranını analiz etmek için [3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) analizi kullanıldı. Bu analiz için çalışmamızda kullanılan IDH-mutant U87 ve IDH-mutant olmayan U87 hücreleri uygun sayıda (1500 hücre/ 100µl) 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonlarının 24.saatinde bir kısım hücreler TMZ hücrelerin %50 sini öldürdüğü dozu bulmak için (IC:50 oranını belirlemek için) hücreler farklı konsantrasyonlarda TMZ (10, 20, 40, 80, 100 µM) ile muamele edilirken bir kısım hücreler 50 nM mimik-miR484 ile transfekte edildi. Daha sonra belirlenen %50 TMZ dozu (80, 100 µM) ile 50 nM mimik-miR484 kombine olarak hücrelere uygulandı. Kontrol olarak bir kısım hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı, bir kısım hücreler DMSO ile muamele edildi ve bir kısım hücreler ise kontrol miRNA ile muamele edildi. Kültür süreleri dolunca kültür sonlandırılarak hücreler MTS/PMS (Phenazine Methosulfate) solüsyonu ile muamele

edildi. Bunun için; MTS/PMS solüsyonundan (1000:50) her kuyucuğa 20µl eklenerek yaklaşık 1-2 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ELİSA okuyucuda 450 nm’de hücrelerin canlılık oranı ölçüldü.

3.2.4. Klonojenik Tespiti

Kanserli hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma düzeylerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bunun için hücre tipine uygun medya bulunan 6’lık kaplara IDH-mutant U87 ve IDH-mutant olmayan U87 hücreleri uygun miktarda ekimi yapıldı. İnkübasyonlarının 48.saatinde bir kısım hücreler TMZ (1, 3, 5, 10, 25, 50, 100 µM) ile muamele edilirken bir kısım hücelere 50 nM mimik-miR484 ile transfekste edildi. Daha sonra belirlenen %50 TMZ dozu (10 µM) ile 50 nM mimik-miR484 kombine olarak hücelere uygulandı. Kontrol olarak bir kısım hücelere hiçbir uygulama yapılmadı, bir kısım hücelere DMSO ile muamele edildi ve bir kısım hücelere ise kontrol-miRNA ile muamele edildi. Sonrasında 10-12 gün boyunca 37°C’de inkübasyona tabi tutuldu ve günlük olarak hücelere inver mikroskopta takip edildi. Hücelerin klon oluşumu tespit edildiğinde (kontrol hüceleri kabı tamamen doldurduğunda) kültür sonlandırıldı. Hücelerin bulunduğu ortamdan medya uzaklaştırıldı ve metanolla hazırlanmış %10’luk kristal-viyole ile hücelere boyandı. Daha sonra oluşan hücre kolonileri sayıldı.

3.2.5. Apoptoz Analizi

Anneksin-V analizi hücelerde apoptoz tayini için kullanılan bir yöntemdir. Bu analiz için çalışmamızda kullanılan IDH-U87 mutant ve IDH-mutant olmayan U87 hüceleri uygun sayıda (1500 hücre/ 100µl) 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve 37°C’de CO₂’li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonlarının 24.saatinde bir kısım hücelere TMZ (10 µM) ile muamele edilirken bir kısım hücelere 50 nM mimik-miR484 ile transfekste edildi. Bir kısım hücelere ise TMZ ve mimik-miR484 kombini ile muamele edildi. Kontrol olarak bir kısım hücelere hiçbir uygulama yapılmadı, bir kısım hücelere DMSO ile muamele edildi ve bir kısım hücelere ise kontrol-miRNA ile muamele edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücelere PBS ile yıkandıktan sonra tripsinasyon yöntemi ile toplandı. Örnekler, BioLegend’in 7-AAD ile FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kit (Cat No: #640922) protokolüne göre boyandı ve FACSARIAIII ile analiz edildi.

3.2.6. İstatiksel Değerlendirme

Tüm deneyler en az üç tekrar edildi. Sonuçlar standart sapmalarla ortalama değer olarak özetlendi. İstatiksel anlamlılık Student-t testi kullanılarak değerlendirildi p değerinin 0.05'ten küçük olduğu veriler istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatiksel analizler ve grafikler için GraphPad Prism 8.2.1 programı kullanılarak yapıldı.

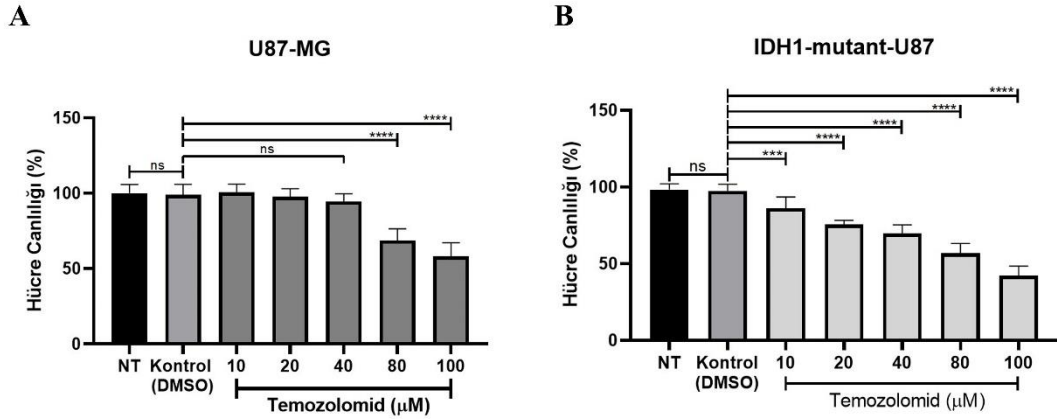


4.BULGULAR

4.1. Temozolomid, mimik-miR484 ve kombinasyonunun U87 ve IDH1-mutant U87 kanseri hücrelerinin canlılığına/çoğalmasına etkisi

U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücreleri 72 saat 10-100 μ M arasında artan konsantrasyonlarda TMZ ile muamele edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmazken, bir kısmı ise DMSO ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolduğunda farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan TMZ'nin hücre canlılığına olan etkisi MTS analizi ile belirlendi.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre TMZ uygulanan; U87 ve IDH1 mutant-U87 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrol hücrelerine kıyasla artan TMZ konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 11). 72 saat 10-100 μ M TMZ ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 80 ve 100 μ M konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 11A). 72 saat 10-100 μ M TMZ ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre artan TMZ konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma bulunurken 80 ve 100 μ M konsantrasyonlarında hücrelerin yaklaşık %50'sinin öldüğü bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 11B).

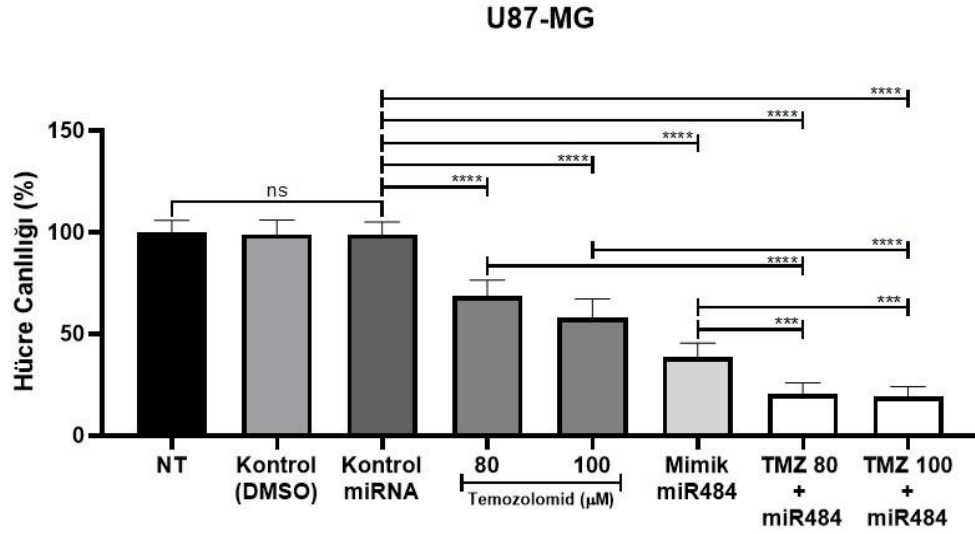


Şekil 11. Temozolomid ile muamele edilen U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı. A) 72 saat 10-100 µM temozolomid ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 80-100 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu. B) 72 saat 10-100 µM temozolomid ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 10-100 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns: $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan)

U87-MG hücreleri, 50 nM mimik-miR-484 ile 72 saat transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmazken, bir kısmı ise kontrol miRNA ile muamele edildi. 72 saatte hücrelerin %50'sini öldürdüğü 80 ve 100 µM temozolomid dozu ve mimik-miR-484 ile birlikte U87-MG hücreleri kombine olarak muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Muamele sonrası, GBM hücrelerin proliferasyon/canlılığındaki rolünü analiz etmek için MTS analizi yapıldı.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, mimik-mir484 ile transfekte edilen U87 hücreleri kontrol hücreleri ile kıyaslandığında canlılık oranının istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı olduğu bulundu ($p < 0.0001$) (Şekil 12). TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri kıyaslandığında kombinasyonun hücre canlılığını önemli oranda azalttığı bulunmuştur (Şekil 12).

Tüm MTS sonuçlarımız birlikte ele alındığında; TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücrelere kıyasla, hücre proliferasyonun/canlılığının önemli oranda baskılandığı ve tek başına TMZ ile muamele edilen hücrelerde gelişen direncin kombin ile kırıldığı bulundu (Şekil 12).



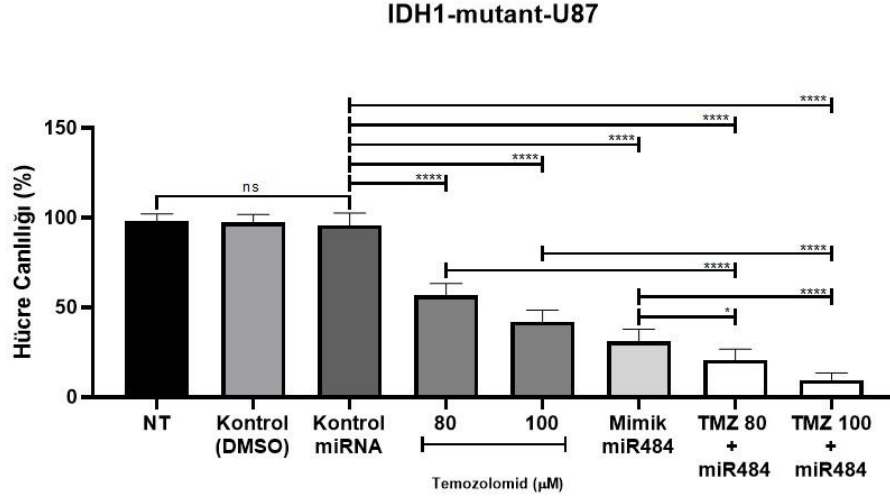
Şekil 12. U87-MG hücrelerinde proliferasyon/canlılık oranı. Tmz ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücrelere kıyasla, hücrelerde proliferasyonun önemli oranda baskılandığı bulundu (ns: $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

IDH1 mutant U87 hücreleri, 50 nM mimik-miR-484 ile 72 saat transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmazken, bir kısmı ise kontrol miRNA ile muamele edildi. 72 saatte hücrelerin %50'sini öldürdüğü 80 ve 100 μ M temozolomid dozu ve mimik-miR-484 ile birlikte IDH1 mutant U87 hücreleri kombine olarak muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Muamele sonrası, GBM hücrelerin proliferasyon/canlılığındaki rolünü analiz etmek için MTS analizi yapıldı.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, mimik-mir484 ile transfekte edilen IDH1 mutant U87 hücreleri kontrol hücreleri ile kıyaslandığında canlılık oranının istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı olduğu bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 13). TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri kıyaslandığında kombinasyonun hücre canlılığını önemli oranla azalttığı bulunmuştur (Şekil 13).

Tüm MTS sonuçlarımız birlikte ele alındığında; TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücrelere kıyasla, hücre proliferasyonun/canlılığının önemli oranda baskılandığı ve

tek başına TMZ ile muamele edilen hücrelerde gelişen direncin kombin ile kırıldığı bulundu (Şekil 13).



Şekil 13. IDH1 mutant U87 hücrelerinde proliferasyon/canlılık oranı. Tmz ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücelere kıyasla, hücrelerde proliferasyonun önemli oranda baskılandığı bulundu (ns: $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

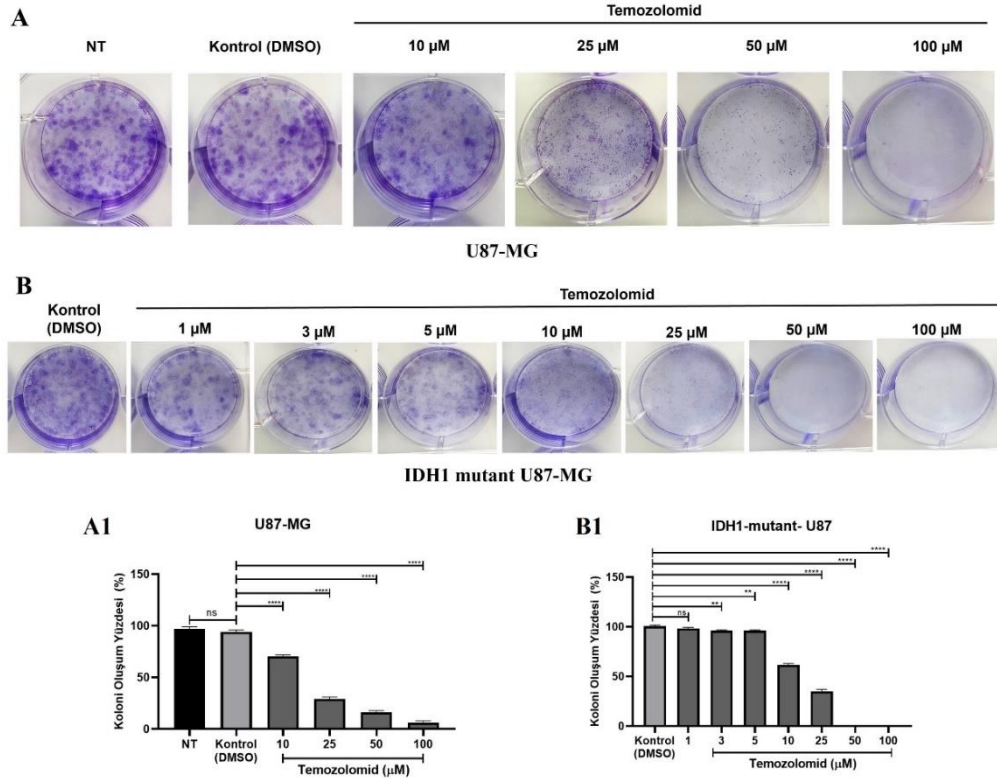
4.2. Temozolomid, mimik-miR484 ve kombinasyonunun U87 ve IDH1-mutant U87 kanseri hücrelerinin koloni oluşumuna etkisi

6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücreleri inkübasyonlarının 48. saatinde 1-100 μM arasında TMZ, 50 nM mimik-miR484 ve bunların kombinasyonu ile muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücelere hiçbir uygulama yapılmadı. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı konsantrasyonlarda hücelere uygulanan TMZ, mimik-miR484 ve kombinasyonlarının hücrelerin koloni oluşturma üzerine etkisini analiz etmek için klonojenik test yapıldı.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre;

1-100 μM arasında TMZ uygulanan; U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinde, koloni oluşumunun kontrol hücrelerine kıyasla TMZ konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı bulundu. 10-100 μM TMZ ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre koloni sayısında 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulunurken, 100 μM TMZ koloni

oluşumuna tamamen baskıladı ($p<0,0001$) (Şekil 14A). 1-100 μM TMZ ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre koloni sayısında 1-100 μM konsantrasyonlarında artan konsantrasyona bağlı olarak koloni oluşumunda anlamlı bir azalma bulunurken, 25 μM 'dan itibaren koloni oluşumunun tamamen baskılandığı bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 14B).

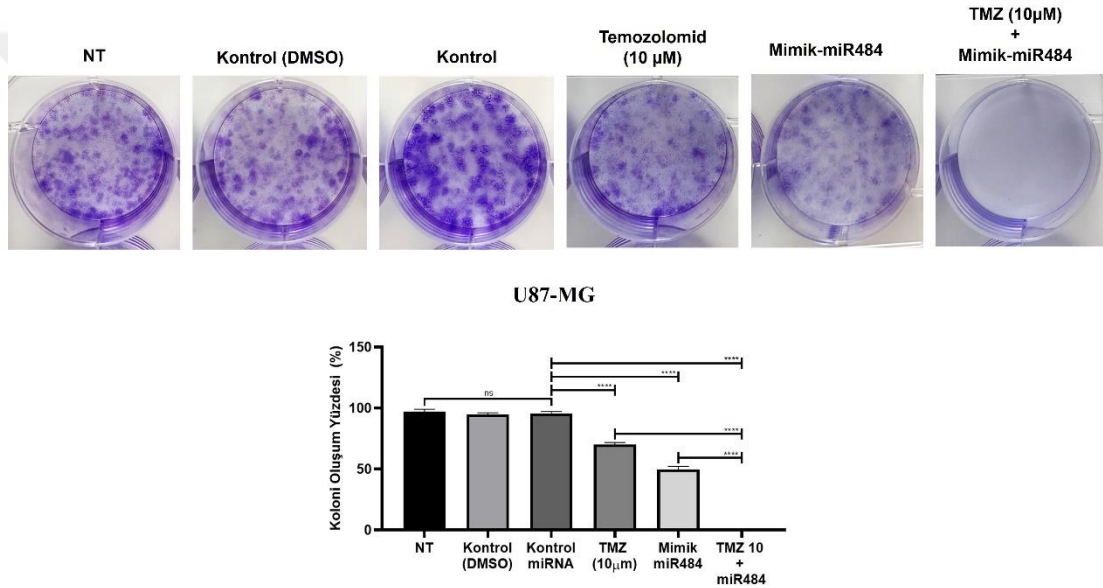


Şekil 14. Temozolomid ile muamele edilen U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinde koloni oluşum oranı. A)U87-MG hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. A1)10-100 μM temozolomid ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla artan doz miktarında koloni oluşumu önemli oranda azalmıştır. B) IDH1 mutant U87 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. B1) 1-100 μM temozolomid ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla artan doz miktarında koloni oluşumu önemli oranda azalmıştır (ns: $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

U87-MG hücreleri, 50 nM mimik-miR-484 ile 72 saat transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmazken, bir kısmı ise kontrol miRNA ile muamele edildi. 72 saatte hücrelerin %50'sini öldürdüğü 10 μM temozolomid dozu ve mimik-miR-484 ile birlikte U87-MG hücreleri kombine olarak muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Muamele sonrası, GBM hücrelerin proliferasyon/canlılığındaki rolünü analiz etmek için klonojenik test yapıldı.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, mimik-mir484 ile transfekte edilen U87-MG hücreleri kontrol hücreleri ile kıyaslandığında klon oluşum oranının istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı olduğu bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 15). TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri kıyaslandığında kombinasyonun klon oluşumunu önemli oranda azalttığı bulunmuştur (Şekil 15).

Tüm sonuçlarımız birlikte ele alındığında; TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücelere kıyasla, hücrelerin klon oluşumunu önemli oranda baskılandığı bulundu (Şekil 15).

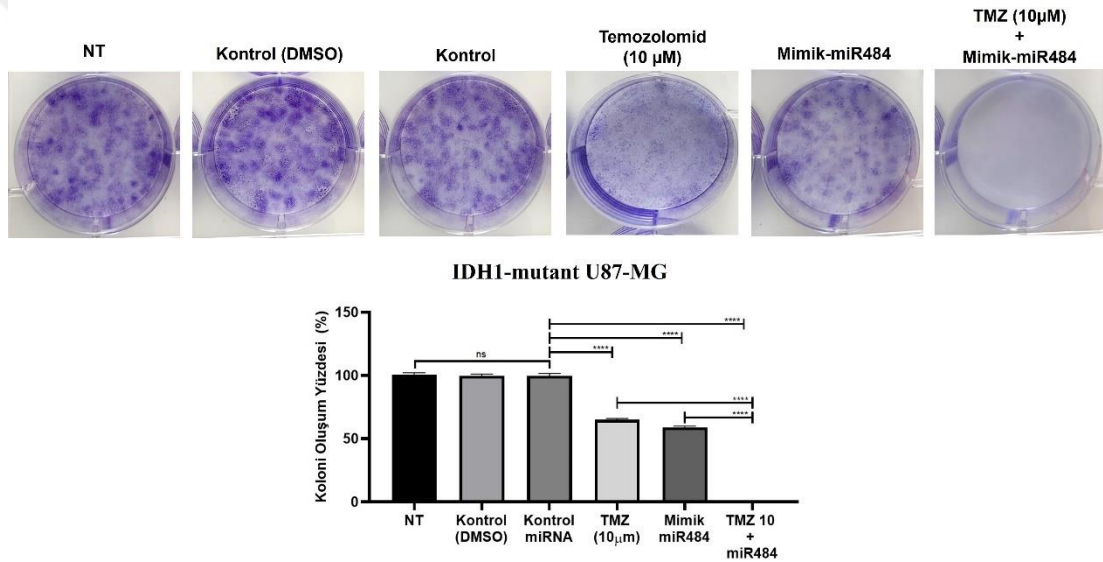


Şekil 15. U87-MG hücrelerinde klon oluşum oranı. Tmz ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücelere kıyasla, hücrelerde proliferasyonun önemli oranda baskılandığı bulundu (ns: $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

IDH1 mutant U87 hücreleri, 50 nM mimik-miR-484 ile 72 saat transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmazken, bir kısmı ise kontrol miRNA ile muamele edildi. 72 saatte hücrelerin %50'sini öldürdüğü 10 µM temozolomid dozu ve mimik-miR-484 ile birlikte IDH1 mutant U87 hücreleri kombine olarak muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücelere hiçbir uygulama yapılmadı. Muamele sonrası, GBM hücrelerin proliferasyon/canlılığındaki rolünü analiz etmek için klonojenik test yapıldı.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, mimik-miR484 ile transfekte edilen IDH1 mutant U87 hücreleri kontrol hücreleri ile kıyaslandığında klon oluşum oranının istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı olduğu bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 16). TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri kıyaslandığında kombinasyonun klon oluşumunu önemli oranda azalttığı bulunmuştur (Şekil 16).

Tüm sonuçlarımız birlikte ele alındığında; TMZ ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücelere kıyasla, hücrelerin klon oluşumunu önemli oranda baskılandığı bulundu (Şekil 16).

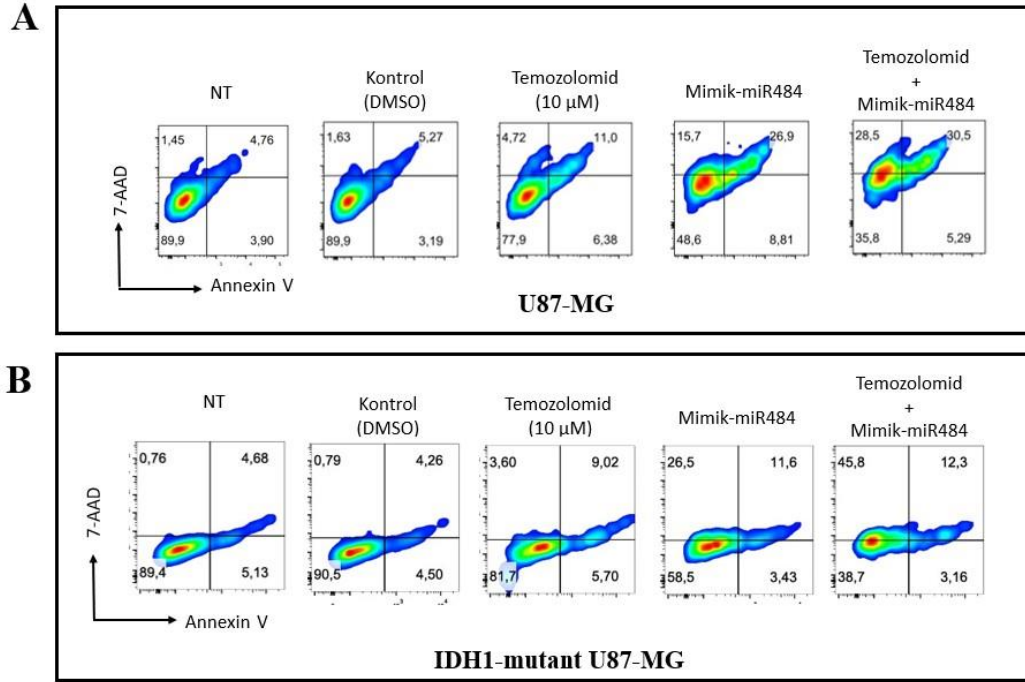


Şekil 16. IDH1 mutant U87 hücrelerinde klon oluşum oranı. Tmz ve mimik-miR484 kombinasyonu ile muamele edilen IDH1 mutant U87 hücrelerinde hem kontrol hücrelerine kıyasla hem de TMZ ve mimik-miR484'ün ayrı ayrı uygulandığı hücelere kıyasla, hücrelerde proliferasyonun önemli oranda baskılandığı bulundu (ns: $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.001$; **** $p<0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

4.3. Temozolomid, mimik-miR484 ve kombinasyonunun U87 ve IDH1-mutant U87 kanseri hücrelerinde apoptoza etkisi

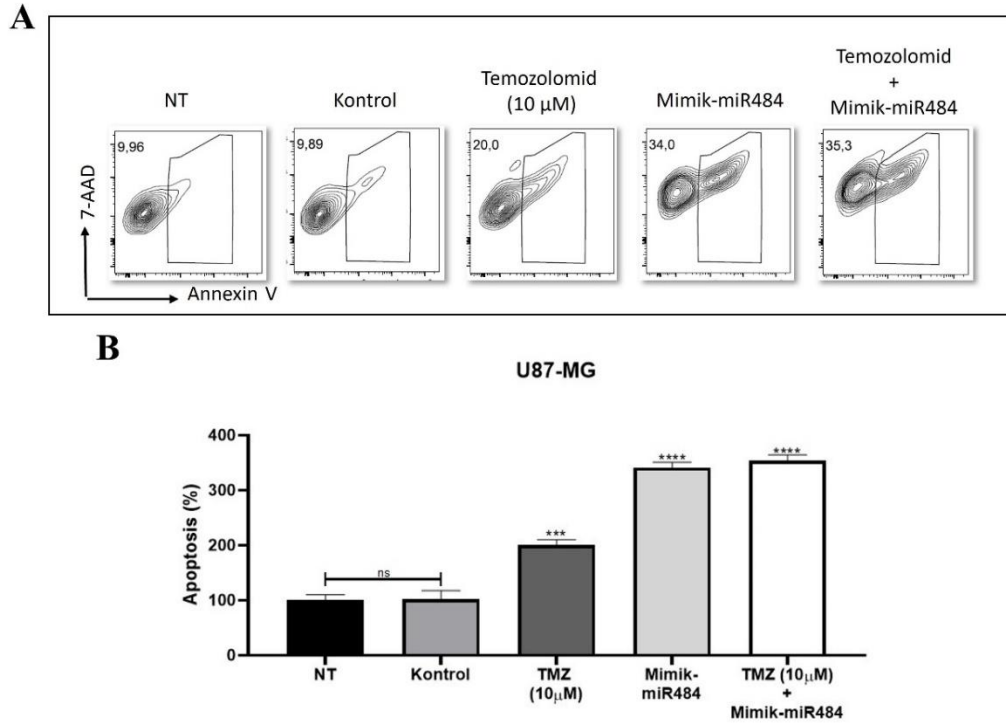
U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücreleri, 10 µM TMZ, 50 nM mimik-miR484 ve bunların kombinasyonu ile muamele edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmazken, bir kısmı ise kontrol-miRNA ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca hücelere uygulanan TMZ, mimik-miR484 ve kombinasyonunun hücrelerde apoptoz (erken ve geç) üzerindeki ölçüldü

(Şekil 17). Apoptoz analizi için Annexin V kiti kullanılarak flow sitometride ölçüm yapıldı.



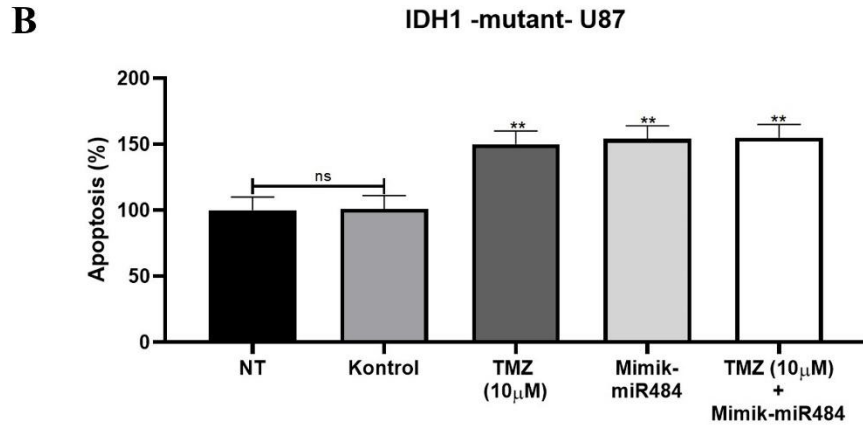
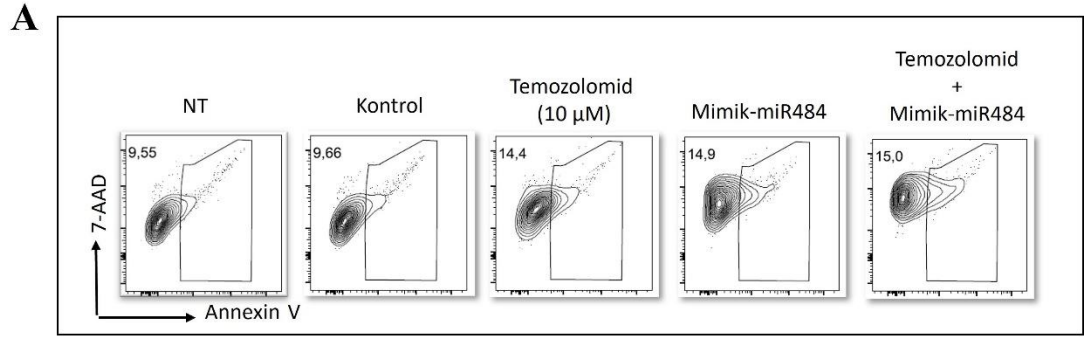
Şekil 17. U87-MG ve IDH1 mutant U87 hücrelerinin apoptoz oranı. A) U87-MG hücrelerinin apoptoz analizi sonucu apoptoz değişimi. B) IDH1 mutant U87 hücrelerinin apoptoz analizi sonucu apoptoz değişimi. (NT: uygulama yapılmayan)

U87-MG hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla 10 µM TMZ, mimik-mir484 ve aynı kombinasyonlarının uygulaması sonucu apoptoz oranında artış bulundu. TMZ uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Tek başına TMZ ile muamele edilen hücrelere kıyasla mimik-miR484 ve kombinasyonun uygulandığı hücrelerde apoptozun önemli oranda arttığı bulundu. ($p < 0,0001$) (Şekil 18)



Şekil 18. U87-MG hücrelerinin total apoptoz oranı. U87-MG hücreleri 10 µM TMZ, mimik-miR484 ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu muamelesiz hücelere kıyasla total apoptoz oranında artış bulundu . mimik-miR484 ve kombinasyon uygulanan hücreler ile sadece tmz ile muamele edilen hücreler kıyaslandığında ise apoptozun önemli oranda arttığı bulundu (ns: $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

IDH1 mutant U87 hücrelerinde tek başına TMZ ve mimik-miR484 ile muamele edilen hücreler kontrol hücreleri ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ancak kombinasyon uygulanan hücreler sadece TMZ ve mimik-miR484 uygulanan hücreler ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p = 0.0027$) (Şekil 19).



Şekil 19. IDH1 mutant U87 hücrelerinin total apoptoz oranı. Idh1 mutant U87 hücreleri 10 µM TMZ, mimik-miR484 ve aynı konsantrasyonlarda kombinasyonları ile muamelesi sonucu muamelesiz hücelere kıyasla total apoptoz oranında artış bulundu ancak kombinasyon uygulanan hücreler ile tek doz uygulanan hücreler kıyaslandığında ise apoptoz oranında anlamlı bir farklılık gözlenmedi (ns: $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$) (NT: uygulama yapılmayan).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Gliomalar, beyin ve omurilikteki sinir hücrelerini çevreleyen ve onların işlev görmesine yardımcı olan glial hücrelerde ortaya çıkan merkezi sinir sisteminin kötü huylu tümörleridir. GBM ise, kötü prognoz, hızlı proliferasyon, yüksek nüks oranları, güçlü bir infiltrasyon eğilimi ve kemoterapilere direnç gibi özellikleri ile beyin tümörünün en ölümcül (evre IV) tipini temsil eder. Histolojik olarak birbirleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, IDH1 (+) tümörlerin, IDH1 (-) tümörlere kıyasla prognozunun daha iyi olduğu ve daha uzun genel sağkalıma sahip olduğu gösterilmiştir.

GBM hastaları için uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümör rezeksiyonu, temozolomide dayalı kemoterapi, radyoterapi veya bu seçeneklerin bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Son yıllarda ise, GBM'lerin tedavisi için, cerrahi rezeksiyon sonrası radyoterapi ve kemoterapi de dahil olmak üzere multimodal agresif terapiler, hedefe yönelik tedaviler, gen terapisi ve immünoterapiler olmak üzere güncel tedavi yöntemleri klinikte veya pre-klinik çalışmalarda kullanılmaya başlansa da, halen hastaların ortalama sağkalım süresinde bir iyileşme görülmemiştir (Shergalis ve ark., 2018; Pearson ve Regad, 2017; Fabian ve ark., 2019).

Bu nedenle, GBM'ler için yeni hedeflerin ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir.

miRNA'lar 19-25 nükleotit büyüklüğünde küçük, kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar translasyonu inhibe ederek veya mRNA'ların susturulmasını tetikleyerek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. miRNA'lar küçük kodlanmayan RNA molekülleri olarak post-transkripsiyonel gen regülasyonunda

özellikle normal ve patolojik durumlarda çeşitli hücrel ve biyolojik olaylarda görevlidir. miRNA ekspresyonundaki bozulmalar kanser dahil birçok insan hastalığı için ortak özelliktir. Değişen miRNA ekspresyonları birçok insan malignitesinin patogenezi ile korelasyon göstermektedirler (Elango ve ark., 2019). GBM rol oynayan birçok miRNA tanımlanmıştır (Yi ve ark., 2018). Bu miRNA'lerden biri de miR-484'tür.

Son yıllarda miR-484 ile ilgili birçok alanda çalışma yapılmıştır. Kanserle ilgili çalışmaların da yoğunlukta olduğu görülmektedir. miR-484 ile yapılan çalışmalarda sonuçlar birbirleriyle uyumlu değildir. Kanser türüne göre miR-484'ün fonksiyonu değişiklik göstermektedir. Bazı kanser türlerinde miR-484 onkogen rol oynarken (Zearo ve ark., 2014; Ye ve ark., 2015; Li ve ark., 2017) bazı kanser türlerinde tümör supressör (Lu ve Lu, 2015; Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018) olarak davranmaktadır.

Mide kanserinde yapılan hem doku hemde hücre kültürü çalışmalarında miR-484'ün ekspresyonun azaldığı ve mide kanserinin oluşumunda anti-kanser rol oynadığı belirlenmiştir. Artan miR-484 ekspresyonun, mide kanseri hücrelerini G1 fazında durdurarak proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Jia ve ark., 2022).

Chai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kolorektal kanser dokularında miR-484 ekspresyonun anlamlı düzeyde azaldığı ve düşük miR-484 ekspresyonun kolorektal kanser gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Chai ve ark., 2015).

Başka bir çalışmada ise kolon kanserli hastalardan alınan serum örneklerinde ise evre 1-2'de miR-484'ün ekspresyon düzeyi belirgin şekilde azalmışken; evre 3-4'de miR-484'ün ifadesinde anormal bir artış olduğu görülmüştür. Bu da Lu ve arkadaşlarına kolon kanseri progresyonunun erken teşhisine ve izlenmesine yardımcı olabileceğini düşündürmüştür (Lu ve ark., 2015).

Servikal kanserde de benzer şekilde Hu ve arkadaşları, miR-484'ün ZEB1 ve SMAD2'yi hedefleyerek hücre proliferasyonu ve epitelyal-mezenkimal geçişi baskıladığını gösterdi (Hu ve ark., 2017). Gastrik ve kolorektal kanserlerde miR-484'ün ekspresyonunun düşük olduğu ve tümör supressör olarak davrandığı belirlenmiştir (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018; Lu ve Lu, 2015). Pankreas

kanserinde ise miR-484'ün tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu da pankreas kanserinin erken teşhisi için umut verici arasındadır (Yin-Zhao ve ark., 2022).

Meme kanserli hastaların serum örneklerinde miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu, hücrelerde proliferasyonu, kemorezistansı arttırdığı bildirilmiş ve onkogenik miRNA olarak davrandığı belirlenmiştir (Ye ve ark., 2015; Zearo ve ark., 2014). Bir başka çalışmada erken evre meme kanseri hastasının serum örneklerinde yapılan analizler miR-484 ekspresyon seviyesinin sağlıklı gönüllülere göre yüksek olduğunu göstermiştir (Halubekova ve ark., 2020).

Benzer şekilde hepatoselüler karsinomada, yumurtalık kanserlerinde, prostat kanserinde ve renal karsinomlarda da miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu ve hastalığın progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2020; Li ve ark., 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013).

Ayrıca küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde komşu sağlıklı dokulara göre tümörlü dokularda ve NSCLC hücre hatlarında ve akciğer normal hücrelerinde de miR-484 ekspresyonunun arttığı, NSCLC'nin ilerlemesini teşvik etmek için onkogen olarak işlev gördüğü çalışmada gösterilmiştir (Li ve ark., 2017).

GBM'de ise miR-484'ün rolü tam belirlenememiştir ve yapılan çalışmalar kısıtlıdır.

Yapılan bir çalışmada miR-484 ekspresyonu, düşük dereceli gliomaya kıyasla yüksek dereceli gliomada belirgin şekilde yukarı doğru düzenlenmiştir (Yi ve ark., 2018). Benzer bir çalışmada ise Renhui ve ark., yüksek miR-484 ekspresyonunun glioma hastaları için kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (Renhui ve ark., 2018).

miR-484'ün yukarı regülasyonu, glioma hücrelerinin göçünü, istilasını ve anjiyogenezini artırabildiği belirlenmiş ve etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Gu ve ark., 2023). Yapılan literatür incelemesine göre, GBM'de miR-484'ün rolü ve ilaç direncine karşı etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim daha önce yaptığımız bir çalışmada (TDK-2019-9172) IDH-mutant ve IDH mutant olmayan GBM hücrelerinde miR-484'ün rolü araştırılmış ve her iki GBM hücrelerinde miR-484'ün tümör süpressör olarak rol

oyunadığı bulunmuştur. Daha önceki çalışmamızdan yola çıkarak sunulan tez çalışmasında da hücrelerde artırılan miR-484 ekspresyonun TMZ karşı geliştirilen direkte etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bu yüzden hücreler de miR-484 ekspresyonunu artırma için hücreler mimik-miR484 ile transfekte edildi ve miR484'ün ekspresyonun arttığı hücelere TMZ uygulandı. Çalışma sonuçlarımız literetürde ilk kez, miR484 ve TMZ kombinasyonun hücre proliferasyonunu azalttığı, kolon olumunu baskıladığını gösterirken, apoptoz oranını değıştirmediğini gösterdi. Bu sonuç, GBM hücrelerinde tümör süpressör rol oynayan miR484 ekspresyonun TMZ'nin etkinliğini artırdığını ortaya çıkarttı. Hücrelerin apoptoza gitmesinde mimik-miR-484'ün uygulandığı hücelerle , mimik-miR484 ve TMZ kombnasyonunun uygulandığı hüceler benzer apoptotik özellik göstermiş olması, mimi-miR484'ün başka hücre ölüm yolağı üzerinden hüceleri ölüme götürebileceğini ya da hüceleri bölünme aşamasında durdurabileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak, TMZ ve mir-484 kombinasyonun GBM hücrelerinin proliferasyonunu, klon oluşumunu önemli oranda baskılandığını, miR-484'ün TMZ'nin etkinliğini artırarak çoğalmasını baskıladığını göstermiştir. Ancak miR-484'ün hangi moleküler mekanizma aracılığı ile TMZ'nin etkinliğini artırdığı çalışmamızda araştırılamamıştır. Bu yüzden iki farklı GBM hücrelerinde tümör süpressör olarak fonksiyon yapan miR-484'ün TMZ etkinliğindeki rolünü ortaya çıkartmak için moleküler mekanizmaların araştırılması ve daha ileri düzeyde in vivo çalışmaların yapılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbaszade Z, Bagca BG, Avci CB. Molecular biological investigation of temozolomide and KC7F2 combination in U87MG glioma cell line. *Gene*, 2021; 776: 145445.
- Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015; 152: 63–82.
- Alshiekh NR, Fuente MI. Therapies for IDH-Mutant Gliomas. *Current Neurology And Neuroscience Reports*, 2023; 23(5): 225–233.
- Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2017; 24(27): 3002–3009.
- Bryukhovetskiy I, Bryukhovetskiy A, Khotimchenko Y, Mischenko P. Novel cellular and post-genomic technologies in the treatment of glioblastoma multiforme (Review). *Oncology Reports*, 2016; 35(2): 639–648.
- Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, Coutinho, HDM, Nigam M. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cellular Signalling*, 2021; 83: 109995.
- Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2020; 21(9): 3233.
- Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Molecular Medicine*, 2014; 6(11): 1359–1370.
- Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2016; 22(8): 1837–1842.
- Chai J, Wang S, Han D, Dong W, Xie C, Guo H. MicroRNA-455 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer by targeting RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase. *Tumour Biology : The Journal Of The International Society For Oncodevelopmental Biology And Medicine*, 2015; 36(2): 1313–1321.
- Chen Y, Nagaraja NV, Fan B, Utley L, Lemieux RM, Popovici-Muller J, Dang L, Kim H, Yan L, Su SM, Biller SA, Yang H. Preclinical Drug Metabolism,

- Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Profiles of Ivosidenib, an Inhibitor of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 for Treatment of Isocitrate Dehydrogenase 1-Mutant Malignancies. *Drug Metabolism And Disposition: the biological fate of chemicals*, 2021; 49(10): 870–881.
- Conti I, Varano G, Simioni C, Laface I, Milani D, Rimondi E, Neri LM. miRNAs as Influencers of Cell-Cell Communication in Tumor Microenvironment. *Cells*, 2020; 9(1): 220.
- Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2019; 20(24): 6249.
- Dréan A, Rosenberg S, Lejeune FX, Goli L, Nadaradjane AA, Guehenne J, Schmitt C, Verreault M, Bielle F, Mokhtari K, Sanson M, Carpentier A, Delattre JY, Idbaih A. ATP binding cassette (ABC) transporters: expression and clinical value in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 2018; 138(3): 479–486.
- Dymova MA, Kuligina EV, Richter VA. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(12): 6385.
- Elango R, Alsaleh KA, Vishnubalaji R, Manikandan M, Ali AM, Abd El-Aziz N, Altheyab A, Al-Rikabi A, Alfayez M, Aldahmash A, Alajez NM. MicroRNA Expression Profiling on Paired Primary and Lymph Node Metastatic Breast Cancer Revealed Distinct microRNA Profile Associated With LNM. *Frontiers in Oncology*, 2020; 10: 756.
- Fridrichova I, Zmetakova I. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. *Cells*, 2019; 8(11): 1361.
- Gargini R, Segura-Collar B, Sánchez-Gómez P. Cellular Plasticity and Tumor Microenvironment in Gliomas: The Struggle to Hit a Moving Target. *Cancers*, 2020; 12(6): 1622.
- Goradel NH, Mohammadi N, Haghi-Aminjan H, Farhood B, Negahdari B, Sahebkar A. Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art. *Journal of Cellular Physiology*, 2019; 234(2): 1099–1110.
- Gu Y, Lei H, Ma P, Chen Y. MiR-484 promotes the malignant progression of glioma by inhibiting CDKN2A expression. *Folia Neuropathologica*, 2023; 61(3): 249-265.
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2014; 15(8): 509–524.
- Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, Kassem M, Zaher W, Alfayez M, Aldahmash A, Alajez NM. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death & Disease*, 2017; 8(9): e3045.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144(5): 646–674.
- Hanahan D, Monje M. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2023; 41(3): 573–580.

- Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British Journal of Cancer*, 2020; 122(11): 1580–1589.
- Hazafa, A., Rehman, K. U., Jahan, N., & Jabeen, Z. The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 2020; 72(3): 386–397.
- Holubekova V, Kolkova Z, Grendar M, Brany D, Dvorska D, Stastny I, Jagelkova M, Zelinova K, Samec M, Liskova A, Laucekova Z, Kudela E, Bobrovskaya M, Kalman M, Zubor P, Dankova Z. Pathway Analysis of Selected Circulating miRNAs in Plasma of Breast Cancer Patients: A Preliminary Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21(19): 7288.
- Hu Y, Xie H, Liu Y, Liu W, Liu M, Tang H. Retraction Note to: miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells. *Cancer Cell International*, 2021; 21(1): 255.
- Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H, Luo Y. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Frontiers in Oncology*, 2019; 9: 506.
- Inoue J, Inazawa J. Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential. *Journal of Human Genetics*, 2021; 66(9): 937–945.
- Jia YZ, Liu J, Wang GQ, Song ZF. miR-484: A Potential Biomarker in Health and Disease. *Frontiers in Oncology*, 2022; 12: 830420.
- Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 2018; 58(10): 405–421.
- Kalkan R, Atlı Eİ. Geçmişten Günümüze Glioblastoma Genetiği. *Türk Nöroşir Dergisi*, 2014; (24)3: 239-249.
- Kaynar A, Altay O, Li X, Zhang C, Turkez H, Uhlén M, Shoaie S, Mardinoglu A. Systems Biology Approaches to Decipher the Underlying Molecular Mechanisms of Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(24): 13213.
- Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 2016; 3(3): 198–210.
- Li T, Ding ZL, Zheng YL, Wang W. MiR-484 promotes non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2017; 96: 153–164.
- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2017; 36(1): 52.
- Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2015; 15(6): 321–333.

- Liu EK, Sulman EP, Wen PY, Kurz SC. Novel Therapies for Glioblastoma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2020; 20(7): 19.
- Loh HY, Norman BP, Lai KS, Rahman NM, Alitheen NBM, Osman MA. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20(19): 4940.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 2016; 131(6): 803–820.
- Lu X, Lu J. The significance of detection of serum miR-423-5p and miR-484 for diagnosis of colorectal cancer. *Clinical Laboratory*, 2015; 61(1-2): 187–190.
- Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Kovarikova A, Radova L, Svoboda M, Vyzula R, Demlova R, Slaby O. miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. *Biomed Research International*, 2015; 941980.
- Ni Y, Shen P, Wang X, Liu H, Luo H, Han X. The roles of IDH1 in tumor metabolism and immunity. *Future Oncology (London, England)*, 2022; 18(35): 3941–3953.
- Ohba S, Hirose Y. Biological Significance of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 in Gliomagenesis. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 2016; 56(4): 170–179.
- Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 2017; 8(1): 45–56.
- Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Luque R, Prados J, Melguizo C. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Current Neuropharmacology*, 2021; 19(4): 513–537.
- Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treatment and Research*, 2015; 163: 1–14.
- Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncology*, 2019; 21: 1–100.
- Park YW, Vollmuth P, Foltyn-Dumitru M, Sahm F, Ahn SS, Chang JH, Kim SH. The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 1-Key Points of the Fifth Edition and Summary of Imaging Findings on Adult-Type Diffuse Gliomas. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2023; 58(3): 677–689.
- Pour ME, Moghadam SG, Shirkhani P, Sahebkar A, Mosaffa F. Therapeutic cell-based vaccines for glioblastoma multiforme. *Medical Oncology*, 2023; 40(12): 354.

- Rani V, Sengar RS. Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022; 119(3): 685–692.
- Rezaei V, Rabiee A, Khademi F. Glioblastoma multiforme: a glance at advanced therapies based on nanotechnology. *Journal of Chemotherapy*, 2020; 32(3): 107–117.
- Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 2016; 53(3): 441–442.
- Roy LO, Lemelin M, Blanchette M, Poirier MB, Aldakhil S, Fortin D. Expression of ABCB1, ABCC1 and 3 and ABCG2 in glioblastoma and their relevance in relation to clinical survival surrogates. *Journal of Neuro-Oncology*, 2022; 160(3): 601–609.
- Salim U, Kumar A, Kulshreshtha R, Vivekanandan P. Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2022; 13(1): e1680.
- Stavast CJ, Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, 2019; 8(11): 1465.
- Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacological reviews*, 2018; 70(3): 412–445.
- Silantyev AS, Falzone L, Libra M, Gurina OI, Kardashova KS, Nikolouzakakis TK, Nosyrev AE, Sutton CW, Mitsias PD, Tsatsakis A. Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 2019; 8(8): 863.
- Singer LS, Feldman AZ, Buerki RA, Horbinski CM, Lukas RV, Stupp R. The impact of the molecular classification of glioblastoma on the interpretation of therapeutic clinical trial results. *Chinese Clinical Oncology*, 2021; 10(4): 38.
- Sonoda Y. Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. *International Journal of Clinical Oncology*, 2020; 25(6): 1004–1009.
- Tilak M, Holborn J, New LA, Lalonde J, Jones N. Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(4): 1831.
- Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, Shrivastava A. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on Cancer*, 2021; 1876(2): 188616.
- Traba J, Sack MN, Waldmann TA, Anton OM. Immunometabolism at the Nexus of Cancer Therapeutic Efficacy and Resistance. *Frontiers in Immunology*, 2021; 12: 657293.
- Truitt G, Gittleman H, Leece R, Ostrom QT, Kruchko C, Armstrong TS, Gilbert MR, Barnholtz-Sloan JS. Partnership for defining the impact of 12 selected rare

- CNS tumors: a report from the CBTRUS and the NCI-CONNECT. *Journal of Neuro-Oncology*, 2019; 144(1): 53–63.
- Uddin MS, Mamun AA, Alghamdi BS, Tewari D, Jeandet P, Sarwar MS, Ashraf GM. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. *Seminars in Cancer Biology*, 2022; 83: 100–120.
- Vaghari-Tabari M, Ferns GA, Qujeq D, Andevari AN, Sabahi Z, Moein S. Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. *Journal of Cellular Physiology*, 2021; 236(8): 5512–5532.
- Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 2019; 575(7782): 299–309.
- Vecchione A, Belletti B, Lovat F, Volinia S, Chiappetta G, Giglio S, Sonogo M, Cirombella R, Onesti EC, Pellegrini P, Califano D, Pignata S, Losito S, Canzonieri V, Sorio R, Alder H, Wernicke D, Stoppacciaro A, Baldassarre G, Croce CMA. microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013; 110(24): 9845–9850.
- Vitovcova B, Skarkova V, Rudolf K, Rudolf E. Biology of Glioblastoma Multiforme-Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21(15): 5324.
- Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology*, 2016; 18(1): 16–26.
- Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell*, 2018; 34(2): 186–195.
- Wang H, Liu D, Yang J. Prognostic risk model construction and molecular marker identification in glioblastoma multiforme based on mRNA/microRNA/long non-coding RNA analysis using random survival forest method. *Neoplasma*, 2019; 66(3): 459–469.
- Wang S, Wang W, Han X, Wang Y, Ge Y, Tan Z. Dysregulation of miR484-TUSC5 axis takes part in the progression of hepatocellular carcinoma. *Journal of Biochemistry*, 2019; 166(3): 271–279.
- Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 2011; 93(11): 1897–1904.
- Wu F, Cheng G, Yao Y, Kogiso M, Jiang H, Li XN, Song Y. Inhibition of Mutated Isocitrate Dehydrogenase 1 in Cancer. *Medicinal Chemistry*, 2018; 14(7): 715–724.
- Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019; 51: 11–17.
- Yasaswi PS, Shetty K, Yadav KS. Temozolomide nano enabled medicine: promises made by the nanocarriers in glioblastoma therapy. *Journal of controlled*

release : official journal of the Controlled Release Society, 2021; 336: 549–571.

- Ye FG, Song CG, Cao ZG, Xia C, Chen DN, Chen L, Li S, Qiao F, Ling H, Yao L, Hu X, Shao ZM. Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer research*, 2015; 75(7): 1504–1515.
- Yi R, Feng J, Yang S, Huang X, Liao Y, Hu Z, Luo M. miR-484/MAP2/c-Myc-positive regulatory loop in glioma promotes tumor-initiating properties through ERK1/2 signaling. *Journal of Molecular Histology*, 2018; 49(2): 209–218.
- Zare A, Ahadi A, Larki P, Omrani MD, Zali MR, Alamdari NM, Ghaedi H. The clinical significance of miR-335, miR-124, miR-218 and miR-484 downregulation in gastric cancer. *Molecular Biology Reports*, 2018; 45(6): 1587–1595.
- Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG, Soon PS. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer*, 2014; 14: 200.
- Zhang P, Xia Q, Liu L, Li S, Dong L. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020; 7: 562798.

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN TEMOZOLOMİDE KARŞI GELİŞTİRDİKLERİ DİRENÇTE miR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% **12**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **0**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **0**
YAYINLAR

% **12**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 12
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
3	Isabela Spido Dias. "Caracterização de PIMREG como biomarcador em gliomas", Universidade de São Paulo. Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais, 2023 Yayın	<% 1

Alıntılarını çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Serhat ALBAYRAK
Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

<u>DERECE</u>	<u>KURUM</u>	<u>MEZUNİYET TARİHİ</u>
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi	2024
Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	2020
Lise	Atatürk Mesleki ve Teknik A. Lisesi	2016

YABANCI DİL

İNGİLİZCE ORTA

Araştırmacı Olduğu Bilimsel Araştırma Projeleri:

Ferulik Asit ile Temozolomid Kombinasyonunun Glioblastoma Hücrelerinin Kanserojenik Özellikleri Üzerine Etkisinin Araştırılması (TSA-2019-9390), Genel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 03.10.2019 – 27.01.2023

Kromon Temelli Pirimidin Türevleri İn Agresif Meme Kanseri Hücre Hattı Olan MDA-MB-231 Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması (THD-2021-10838), Hızlı Destek Projesi, Araştırmacı, 02.12.2021- 29.12.2022

Sertifikalar:

- Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Deney Hayvanları ve Uygulama Yöntemleri Erciyes Üniversitesi. 2021, Kayseri
- TUSEB Uygulamalı Akış Sitometri Eğitimi, 2023