T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tibbi Biyoloji Anabilim Dali

IZOSITRAT DEHIDROGENAZ (IDH) GENINDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLIOBLASTOMALARDA miR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Nursultan NURDINOV

Danışman
Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Doktora Tezi

Şubat 2022
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

IZOSITRAT DEHIDROGENAZ (IDH) GENINDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLIOBLASTOMALARDA miR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Nursultan NURDINOV

Danışman
Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Bu araştırma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2019-9172 nolu proje ve 119S935 nolu TUBİTAK 1002 - Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir.

Şubat 2022
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tez hipotezi oluşturulmasından yazımına kadar bütün safhalarda kullandığım bütün bilgileri akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde ettiğimi, bu çalışmayla elde edilmeyen tüm literatür bilgilerine ve yorumlara atıf göstererek kaynaklar listesinde belirttiğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Adı-Soyadı: Nursultan NURDINOV

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Izositrat dehidrogenaz (IDH) geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan glioblastomalarda miR-484'ün rolünün araştırılması” adlı **Doktora Tezi,** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	**Danışman**
Nursultan NURDINOV	**Prof. Dr. Zuhal HAMURCU**

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Prof. Dr. Zuhal HAMURCU danışmanlığında **Nursultan NURDINOV** tarafından hazırlanan **"Izositrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan Ve Taşımayan Glioblastomalarda miR-484'ün Rolünün Araştırılması"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalı **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

…. / …. / 2022

JÜRİ: **İmza**

Danışman : **Prof. Dr. Zuhal HAMURCU**

Üye : **Dr. Öğr. Üyesi Halil ULUTABANCA**

Üye : **Doç. Dr. Ahmet EKEN**

Üye : **Prof.Dr. Nilgün GÜRBÜZ**

Üye : **Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN**

ONAY:

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

…. / …. / 2022

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımdaki ilk yol göstericim, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan, beni özgür şekilde bilim yapmaya teşvik eden sayın danışmanım Prof. Dr. Zuhal Hamurcu'ya;

Tezin her aşamasında değerli fikirleriyle katkı sağlayan değerli hocalarım Doç.Dr. Serpil Taheri, Doç.Dr. Elif Funda Şener'e;

Tez jüri üyeleri, değerli hocalarım Prof. Dr. Zuhal Hamurcu, Prof.Dr. Nilgün Gürbüz, Doç. Dr. Mümin Alper Erdoğan, Dr. Öğr. Üyesi Halil Ulutabanca ve Doç. Dr. Ahmet Eken'e,

Laboratuvarda çalışmayı ve bilgi tartışmayı eğlenceli hale getiren sevgili grup arkadaşlarım Ahsen Güler, Venhar Büşra Çınar, Nesrin Delibaşı Kökçü, Berkay Arslan, Serhat Albayrak, Berfin Ugur, Irem Metin, Sena Özkul, Mehmet Memiş, Zeynep Yılmaz ve Ahsen Erginsoy'a;

Doktora eğitimim ve eğitim dışında da desteklerini hep hissettiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hamiyet Altuntaş'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma ve öğretim üyelerine;

Tezimin çalışmasında kapısını her zaman açık tutan, tezimin başarılı bir şekilde ilerlemesine sebep olan, cihaz ve malzeme konusunda yardımını esirgemeyen sayın Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi kurumuna, bünyesindeki tüm çalışanlara ve sayın müdürümüz Prof.Dr. Yuzuf Özkul'a;

Tez çalışmamı finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TDK-2019-9172) ve TUBİTAK (1002-Hızlı Destek Programı, Proje no: 119S935) kurumuna;

Doktora sürecim boyunca aldığım Doğrudan Doktora Bursu için Hoca Ahmet Yesevi Üniversitesi Müteveli Heyet Başkanlığı'na ve tüm çalışanlarına, Destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren, bana yol gösteren ve her zaman başaracağıma inanan biricik annem, bütün aileme ve benim tüm başarılarımın sonsuz kaynağı olabilen rahmetli canım babam Seisenbai Nurdinov'a; Son olarak, hayat arkadaşım, sevgili eşim Arailym Tastemirova'ya ve canım kızım Nursultankızı Nurayum ve oğlum Nursultanuly İsa'ya; En içten duygularla teşekkür ederim.

Nursultan NURDINOV

Şubat, 2022, KAYSERİ

IZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMALARDA MİR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Nursultan NURDINOV

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Şubat 2022

Danışman: Prof.Dr. Zuhal HAMURCU

ÖZET

Gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 4 alt evrede toplanmıştır. Evre I ve Evre II "düşük evreli", Evre III ve Evre IV (glioblastoma multiforme, GBM) ise "yüksek evreli" kabul edilmiştir.

2016'da yapılan sınıflandırmada GBM'ler, izositrat dehidrogenaz (IDH) geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan olarak ikiye ayrılmış, IDH mutantı taşıyan ve taşımayan hastaların ölüm oranları arasında belirgin farkın olduğu dikkat çekmiştir.

Sağkalım oranının oldukça düşük olması ve uygulanan terapilerin yetersizliği, GBM'lerii tedavi açısından acilen GBM patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. miRNA'lar kanserin moleküler patolojisi ile ilgili bilinmeyenlere cevap olmaya aday gösterilmektedir.Bu aday miRNA'lardan biri de mir-484 olarak gösterilmiştir. Ancak GBM'lerde mi-484'ün rolü bilinmemektedir. Bu yüzden, önerilen projede, IDH geninde mutasyon taşıyan (IDH mutant-U-87) ve taşımayan (U-87) GBM hücrelerinin kanserojenik özellik kazanmasında mir-484'ün olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca hem glioma evreleri ile hem de IDH1 mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastaların doku örneklerinde miR-484'ün ekspresyon profili açısından bir farklılığın olup olmadığının araştırılması amaçlandı. Bu amacımız için IDH1-mutant olmayan U-87MG ve IDH1-mutant U-87 hücreleri, inhibitör-miR-484, mimik-miR-484 ve negatif kontrol olarak kontrol-mirna ile transfektekte edildi ve transfeksiyon sonrası bu hücrelerin proliferasyon, klonojenik, migrasyon ve apoptoza direnç özelliklerindeki olası değişiklikler araştırıldı. Ayrıca bu yolaklarda medyatör olarak görev yapan proteinlerin ekspresyonları Western blot ile analiz edildi. Ayrıca çalışmamızda glioma tanısı almış 33 hastanın doku örneklerinde mir-484'ün ekspresyon profili analiz edildi. Analiz

sonuçlarımıza göre, kontrol hücrelere göre, mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerinin kanserojenik özelliklerinde istatistiksel olarak önemli oranda azalma bulundu. Ayrıca IDH1 mutasyonu taşıyan hastalarda miR-484'ün ekspresyon profilinin taşımayanlara göre daha yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Yine, miR-484'ün ekspresyon profili glioma tümörlerinin farklı evreleri arasında karşılaştırıldığında, IV. evre GBM'lerde daha düşük olduğu, fakat bu farkın anlamlı olmadığı bulundu. Bu sonuçlarımız, mir-484'ün GBM'lerde tümör supressör olarak görev yaptığını ve GBM'lerin tedavisinde mir-484'ün teröpatik bir hedef olarak değerlendirilebileceğine işaret etmiştir.

Anahtar kelimeler: GBM; mir-484; IDH mutant U-87; Izositrat dehidrogenaz (IDH); U-87 MG

INVESTIGATION OF THE ROLE OF MIR-484 IN GLIOBLASTOMAS WITH AND WITHOUT MUTATION IN THE ISOCITRATE DEHYDROGENASE (IDH) GENE

Nursultan NURDINOV

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Medical Biology

Doctoral Thesis, February 2022

Supervisor: Ass.Prof. Zuhal HAMURCU

ABSTRACT

Gliomas are classified under 4 substages by the World Health Organization. Stages I, and II were considered "low grade", and Stages III, and Stage IV (glioblastoma multiforme, GBM) were a "high grade".

In the classification made in 2016, GBMs were divided into two subgroups as carrying and not carrying mutations in the isocitrate dehydrogenase (IDH) gene, and there was a significant difference between the mortality rates of patients with and without IDH mutants.

The low survival rate and the inadequacy of the applied therapies make it necessary to urgently investigate the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of GBM in terms of the treatment of GBMs. miRNAs are nominated to be the answer to the unknowns about the molecular pathology of cancer. One of these candidate miRNAs was also designated mir-484. However, the role of mi-484 in GBMs is unknown.

Therefore, the proposed project, it was aimed to investigate the possible roles of mir-484 in the carcinogenicity of GBM cells with and without (IDH mutant-U-87) mutations in the IDH gene. Also, was aimed to investigate whether there is a difference between the expression profile of miR-484 in tissue samples of patients with and without IDH1 mutation and glioma stages. For this purpose, IDH1 non-mutated U-87MG and IDH1-mutant U-87 cells were transfected with inhibitor-miR-484, mimic-miR-484, and control-miRNA as negative control and after transfection of these cells the proliferation, clonogenic, migration, and possible changes in apoptosis-resistance properties were investigated. In addition, expressions of proteins that act as mediators in these pathways were analyzed by Western blot. Also, in our study were analyzed the expression profile of mir-484 in 33 patients tissue samples diagnosed with glioma.

According to our analysis results, a statistically significant decrease was found in the carcinogenic properties of cells transfected with mimic-miR-484 compared to control. In addition, it was found that the expression profile of miR-484 was higher in patients with IDH1 mutations compared to IDH1 non-mutated, but this difference was not statistically significant.

Particularly, when the expression profile of miR-484 was compared between different stages of glioma tumors, stage-IV was found to be lower in stage GBMs, but this difference was not significant.

These results indicated that mir-484 acts as a tumor suppressor in GBMs and that mir-484 can be considered as a therapeutic target in the treatment of GBMs.

Key Words: GBM; miR-484; U-87 MG; Isocitrate dehydrogenase (IDH); IDH mutant U-87

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK i

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii

YÖNERGEYE UYGUNLUK iii

KABUL VE ONAY SAYFASI iv

TEŞEKKÜR v

ÖZET vi

ABSTRACT viii

İÇİNDEKİLER x

KISALTMALAR ve SİMGELER xiii

TABLOLAR LİSTESİ xv

ŞEKİLLER LİSTESİ xvi

1.GİRİŞ ve AMAÇ 1

2.GENEL BİLGİLER 4

2.1. Glioblastoma Multiforme 6

2.1.1.Glioblastoma Multiform (GBM) Epidemiyolojisi 7

2.1.2.Glioblastoma Multiform (GBM) Etiyolojisi ve Risk Faktörleri 8

2.2. Glioblastoma Multiform (GBM) Sınıflandırılması 9

2.2.1.Primer ve Sekonder Glioblastoma 11

2.3. İzosıtrat Dehidrojenaz (IDH) Enzimi 13

2.3.1.IDH genleri ve protein yapısı 13

2.3.2.İzositrat Dehidrogenaz Enziminin Trikarboksilik asit döngüsündeki rolü 14

2.3.3.Izositrat dehidrogenaz enzimi (IDH)'in kanserdeki rolü 14

2.4. Klinik başvuru ve Semptomları 17

2.5. GBM Tedavi Yaklaşımları 17

2.5.1. Cerrahi (cerrahi rezeksiyon) 18

2.5.2. Radyasyon tedavisi 19
2.5.3. İmmünoterapi 19
2.5.4. Sistemik kemoterapi 20
2.5.4.1. Temozolomid 21
2.5.5. Alternatif Elektrik Alan Terapisi 21
2.6. RNA Etkileşimlerin Keşfi ve Türleri 22
2.6.1. miRNA'lar 23
2.6.1.1. miRNA biogenezi 23
2.6.1.2. miRNA'nın nükleer işlenmesi 24
2.6.1.3. pre-miRNA'ların nükleustan sitoplazmaya taşınması 25
2.6.1.4. Sitoplazmik pre-miRNA'nın olgunlaşması 25
2.8. Mikro-RNA (miRNA) ve Kanser 26
2.8.1. miR-484 28
3.GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. Gereçler 30
3.1.1. Çalışmada kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeleri 30
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kullanılan Solüsyonlar 32
3.2. Yöntem 33
3.2.1. Hücre kültürü 33
3.2.1.1. Kullanılan hücre hatları 33
3.2.1.2. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması 34
3.2.1.3. Besiyeri Hazırlanması 35
3.2.1.4. Hücrelerin dondurulması 35
3.2.1.5. Hücrelerin sayımı 35
3.2.1.6. Kullanılan mikroRNA (miRNA) 'lar ve hazırlanması 36
3.2.1.7. Hücrelerin miRNA ile Transfeksyonu 36

3.2.2. Hücre Proliferasyon/Büyüme Analizi 37

3.2.2.1. Klonojenik Tespiti 37

3.2.2.2. Migrasyon tespiti (Wound healing assay) 37

3.2.2.3. İnvazyon tespiti 38

3.2.2.4. Western Blot Analizi 39

3.2.2.5. Gen Ekspresyonunun Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile Analizi 41

3.2.2.5.1. Örneklerin toplanması ve hasta gruplarının oluşturulması 41

3.2.2.5.2. Total RNA İzolasyonu 43

3.2.2.5.3. cDNA Sentezi 44

3.2.2.5.4. RT-PCR ile miRNA ekspresyon çalışması 45

3.2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme 46

4.BULGULAR 47

4.1. IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan hücrelerde miR-484'ün ekspresyon profili 47

4.2. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde proliferasyon/canlık oranı 48

4.3. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde klon oluşumu 49

4.4. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde migrasyon oranı 51

4.5.mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde invazyon oranı 53

4.6. Glioma hasta doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili 61

5.TARTIŞMA VE SONUÇ 65

6. KAYNAKLAR 71

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

% : Yüzde

2-HG : 2-Hydroxyglutarat

C° : Santigrat Derece

CT : Döngü eşiği (Cycle threshold)

DGCR8 : DiGeorge Syndrome critical region 8

DMEM/F-12 : Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium/F-12

DMSO : Dimetil sülfoksit

DSÖ (WHO) : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

dsRNA : Double-stranded RNA

ECL : Enhanced chemiluminescence

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

eF2K : Ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz

FAK : Focal adhesion kinase

FBS : Fetal Bovine Serum

GBM : Glioblastoma multiforme

hsa : Homo sapiens

IC50 : İnhibitör konsantrasyon 50 (%50)

ICP : Kafa içi basıncı

IDH 1 ve 2 : Izositrat dehidrogenaz enzim 1 ve 2

IDH-M : Izositrat dehidrogenaz mutant

IDH-WT : Izositrat dehidrogenaz yabani tip

KBB : Kan-Beyin Baryeri

kDa : Kilodalton

KPS : Karnofsky Performans Statüsü

miRNA : Mikro RNA

ml : Mililitre

MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA : Mesajcı RNA

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

MTS : Methods for Testing and Specification

$NADP^+$: Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat

nt : Nükleotit

PBS : Phosphate Buffered Saline (Fosfat tuz tamponu)
pH : Power of hydrogen
PMS : Fenazin metosülfat
pre-miRNA : Precursor miRNA
pri-miRNA : Primer transcript
Real Time PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC : RNA-induced silencing complex
RNAi : RNA interference
SD : Standart Deviation (Standart sapma)
SDS : Sodyum dodesil sülfat
TCA : Trikarboksilik asit
TTA (TTF) : Tümör Tedavi Alanları (Tumor Treating Fields)
UTR : Untranslated Region
α-KG : Alpha- ketoglutarate
µl : Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Evrelemesi 10

Tablo 2. IDH (+) ve IDH (-) glioblastomaların özellikleri (Louis ve ark., 2016)..... 11

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar..... 30

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler 31

Tablo 5. Çalışmaya dahil edilen glioma hastalarının özellikleri 42

Tablo 6. Doku örnekleri çalışılan hastaların özellikleri 43

Tablo 7. KEGG yolak analizi 55

Tablo 8. GO yolak analizi..... 56

Tablo 9. Glioma hastalarının doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili..... 61

Tablo 10. Glioma hastalarının özelliklerine göre miR-484 ekspresyon profili..... 62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri (Walenkamp ve ark., 2014).....5

Şekil 2. GBM'nin kesitsel görünümü 6

Şekil 3. Primer ve sekonder glioblastomlar gelişimindeki temel genetik yolaklar 12

Şekil 4. IDH1-yabani tip **(A)** ve IDH1-mutant **(B)** enzimlerinin işlevleri.....15

Şekil 5. GBM'nin kemo- ve radyo direncinde tanımlanmış mühtemel mekanizmaları 18

Şekil 6. miRNA biogenezi modeli.....24

Şekil 7. U-87 mutant ve mutant olmayan hücre hatları: 34

Şekil 8. Thoma lamının sayım yapılan kareleri 36

Şekil 9. IDH1 mutant olan ve IDH1 mutant olmayan hücrelerde mir-484 ekspresyon profili. 47

Şekil 10. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan hücrelerde miR-484'ün ekspresyon profili. 48

Şekil 11. U87-WT ve U87-mut GBM hücrelerinde miR-484'ün proliferasyona etkisi. 49

Şekil 12. U87-WT ve U87-mut GBM hücrelerinde miR-484'ün klon oluşumuna etkisi. 50

Şekil 13. U87-WT ve U87-mut GBM hücrelerinde miR-484'ün hücre migrasyonuna etkisi. 53

Şekil 14. U87-MG (A) ve U87-IDH1 mutant (B) hücrelerinde miR-484'ün invazyona etkisi. 54

Şekil 15. miR-484 ile transfekte edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde İntegrin/FAK/Src sinyal yolağında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri.....60

Şekil 16. Giloma hastalarının histolojik derecelerine göre miR-484 ekspresyon profili. 63

Şekil 17. Giloma hastalarının yaşları ile miR-484 ekspresyon profili arasındaki ilişki. 63

Şekil 18. Glioma hastalarının IDH gen durumuna göre mir-484 ekspresyon profili. ...64

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Gliomalar, glial hücrelerden kaynaklanan tümörlerdir ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından 4 alt evrede toplanmıştır. Evre-I ve Evre-II "düşük evreli", Evre-III ve Evre-IV (glioblastoma multiforme, GBM) ise "yüksek evreli" kabul edilmiştir (Sonoda Y, 2020). 2016'da 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).

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. GBM tedavisinde ilerlemeler olmasına rağmen, hastaların yaşam süreleri oldukça kısadır. GBM'lerin tedavisi için daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Shergalis ve ark., 2018; Pearson ve ark., 2017; Fabian ve ark., 2019).

miRNA'lar kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz ve apoptoz gibi birçok hücresel aktiviteleri düzenlenmesinde görev alırlar. Kanser hücrelerinde bu yolakların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan biri de mir-484 olarak gösterilmiştir. miR-484'ün, bazı kanserlerde yüksek oranda eksprese edildiği ve onkogenik roller sergilediği (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018; Lu ve Lu, 2015; Li ve ark., 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013; Wang ve ark., 2012), buna karşılık bazı kanserlerde ise ekspresyonun düşük olup tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018; Lu ve Lu, 2015). Ancak GBM'lerde miR-484'ün rolünü araştıran herhangi çalışmaya rastlanılmamıştır. Sadece bir çalışmada gliom kök hücrelerinde miR-484'ün rolü araştırılmış ve glioma tümörlerini başlatan özellikleri arttırdığı gösterilmiştir (Yi ve

ark., 2018). Diğer iki çalışmada da GBM hastalarının serum örneklerinden elde edilen eksozomlarda (Manterola ve ark., 2014) ve periferal kan örneklerinde (Roth ve ark., 2011) miR-484 ekspresyonunda sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu tespit edilmiş ancak görevi tanımlanmamıştır. Bu yüzden sunulan tez çalışmasında, literatür verilerinde hareketle miR-484'ün GBM'lerin agresifliğinde bir rolününün olabileceği, ayrıca miR-484'ün ekspresyonun kanser tipine göre değişiklik göstermesi ve farklı roller üstlenmesinden dolayı da (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018; Lu ve Lu, 2015; Li ve ark., 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013) IDH1-mutasyonlu ve IDH1 mutasyonu taşımayan GBM'ler arasında miR-484'ün ekspresyon profilinde bir değişiklik olabileceği ve miR-484'ün ekspresyonundaki değişikliğin GBM'de sağ kalımı artıran IDH mutasyonu ile ilişkisi olabileceği düşünüldü. Bu yüzden, in vitro şartlarda IDH geninde mutasyon taşıyan (IDH mutant-U-87) ve taşımayan GBM U-87 hücrelerinin agresifliğinde miR-484'ün ekspresyonunun ve olası rollerinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca önerilen projede, GBM ön tanısı almış hastaların doku örneklerinde miR-484'ün ekspresyon profilininin ve glioma evreleri ile miR-484'ün ekspresyon profili arasında bir olası bir ilişkinin varlığı, IDH (-) ve IDH (+) hastaların doku örneklerinde miR-484'ün ekpresyon seviyesi açısından bir farklılığın olup olmadığının araştırılması amaçlandı. Böylece, GBM'lerin agresiflik kazanmasında miR-484'ün bir rolünün olup olmadığı, eğer bir rolü varsa hangi rolü oynadığının (onkogen mi tümör supressör mü?) açığa çıkartılması, IDH-mutasyonlu ve IDH mutasyonlu olmayan GBM'ler arasındaki farklılıkta miR-484'ün olası etkinliği, GBM ön tanısı almış hastaların doku örneklerinde miR-484'ün ekspresyon seviyesi ile tümörün evreleri arasında olası ilişkinin bulunması, GBM'lerin tedavisinde miR-484'ün teröpatik bir hedef olarak değerlendirilmesi gerektiğinin gündeme getirilmesi hedeflendi.

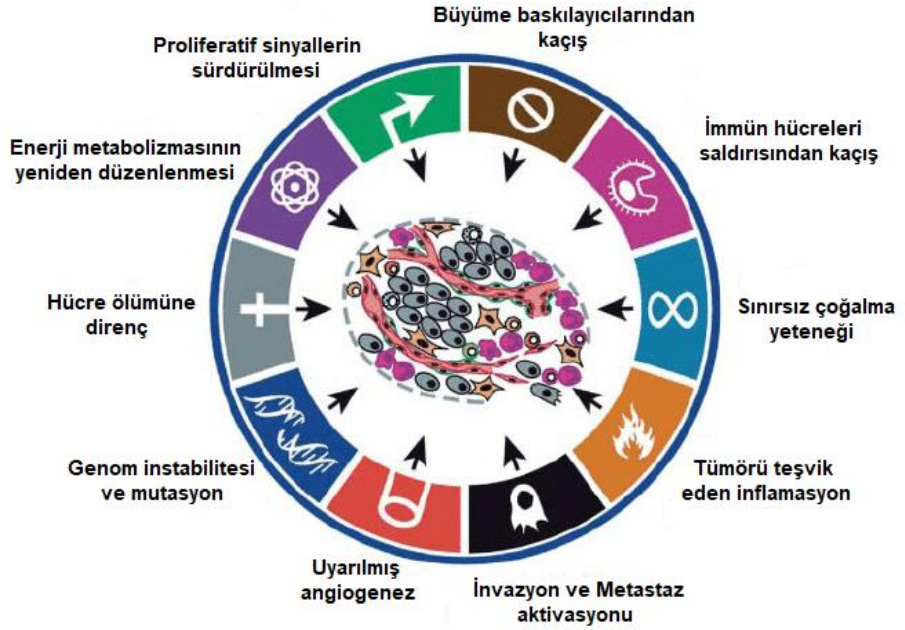
Bunun için IDH mutant-U-87 ve U-87MG GBM hücreleri inhibitör-mir-484, mimik-mir-484 ve kontrol-mirna ile transfekte edildi ve transfeksiyon sonrası bu hücrelerin kanserojenik (proliferasyon, klonojenik, migrasyon ve apoptoza direnç) özelliklerindeki olası değişikliklere araştırıldı ve bu yolaklarda medyatör olarak görev yapan proteinlerin (Src, Fak, İntegrin-β, Cyclin-D, FOXM1, eF2K, kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-8) ekspresyon seviyeleri analiz edildi. Ayrıca çalışmamızda glioma tanısı almış 33 hastanın doku örneklerinde ve inhibitör-mir-484 ve mimik-mir-484 ile transfekte edilmiş IDH mutant-U-87 ve U-87MG GBM hücrelerinde mir-484'ün ekspresyon

seviyesi Real-Time PCR ile analiz edildi.

Sonuçlarımız, miR-484'ün glioma hücrelerinde tümör süpressör olarak görev yaptığını ve miR-484'ün gliomaların agresflik kazanmasında rol oynadığını açığa çıkarttı. Ayrıca sonuçlarımız IDH1 mutasyonu taşıyan ve taşımayan GBM hücreleri ve hasta doku örnekleri arasında miR-484'ün ekspresyon seviyesi açısından bir farklılığın olmadığını gösterdi.

2.GENEL BİLGİLER

Kanser hücreleri, normal hücrelerden kontrolsüz çoğalmaları, apoptoza direnç göstermeleri, invazif özellik göstermeleri ve heterojen olmaları gibi birçok açıdan farklılık gösterirler. İnsan tümörleri, histopatolojik olarak çeşitlidir ve proliferatif sinyallerini sürdürmek, invazyon ve metastaz, farklılaşma, indüklenmiş anjiyogenez, büyüme baskılayıcılarından kaçınmak, enflamasyon, hücre ölümüne direnç veya replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme gibi bir dizi temel kanserojenik özellikler ile karakterize edilmektedir. Kanser hücrelerinin hızlı çoğalma geçirmesi için fazla enerji kaynağına ihtiyacı vardır (Şekil 1) (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bundan dolayı kanser hücreleri enerji için oksidatif fosforilasyon yolağını kullanan normal hücrelere göre daha hızlı enerji ihtiyacını karşılamak için oksijen varlığında bile glikoliz yolağını kullanmayı tercih etmektedirler (Marie ve Shinjo, 2011). Bu mekanizma kanser hücrelerinin metabolizmasında önemli rol oynayan, daha sonra Warburg etkisi olarak adlandırılan solunumdan fermentasyona kaymasıyla karakterize edilmektedir (Ferreira, 2010). Kanserin gelişimi ile hücrenin enerji metabolizması arasındaki ilişki uzun yıllardır yoğun araştırmanın odak noktasında yer alınmaktadır.



Şekil 1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri (Walenkamp ve ark., 2014).

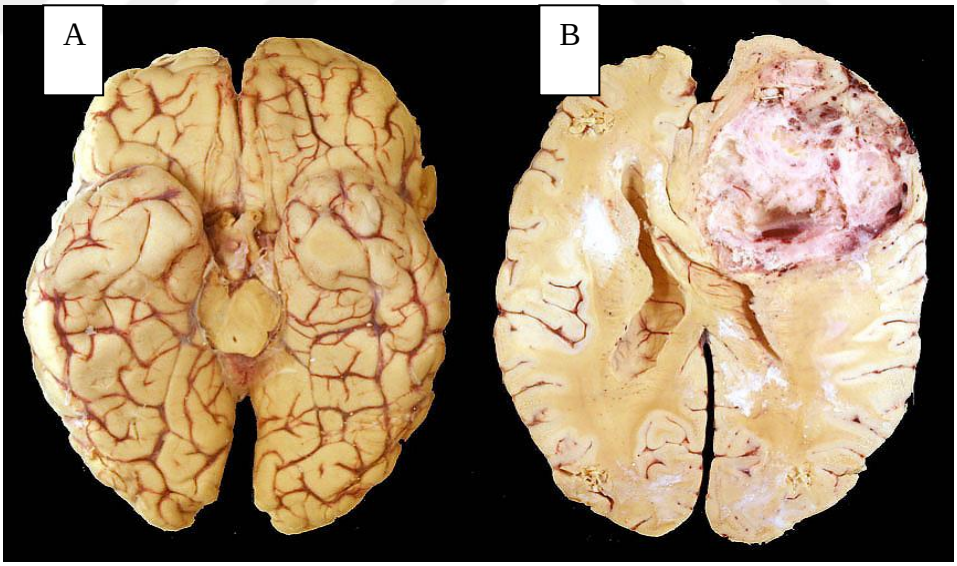
Son yıllarda yapılan birçok araştırma, enerji metabolik işlev bozukluğunun kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri olduğunu ve onkojenlerin, tümör baskılayıcıların, mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonlarının ve sinyal yolaklarının etkisi gibi birçok faktör tarafından yönlendirilebileceğini göstermiştir (Kroemer ve Pouyssegur, 2008). Bunların dışında, enerji metabolizmasında glikoliz ya da sitrat döngüsü gibi yolaklarda görev alan enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların de kanser metabolizması üzerinde önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir (Parsons ve ark., 2008; Maus ve Peters, 2017).

Glioblastoma multiforme (GBM), erişkinlerde en sık görülen kötü prognozlu beyin tümör tipini temsil etmektedir (Wirsching ve ark., 2016). Morfolojik heterojeniteye sahip olmasından dolayı diğer tümörlere göre daha agresif ve sağkalım oranı çok düşüktür (Stupp ve ark., 2005; Carlsson ve ark., 2014). Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü kontrol eden izositrat dehidrojenaz, süksinat dehidrojenaz ve fumarat hidrataz gibi enzimlerindeki mutasyonlar, GBM olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gelişimi üzerine etkisi olabileceği bilimsel araştırmalar ile kanıtlanmıştır (Al-Khallaf, 2017; Schmidt ve ark., 2019; Laurenti ve Tennant, 2016; Marquez ve ark., 2019).

2.1. Glioblastoma Multiforme

Santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu, glial hücrelerden gelişen ve genel olarak glioma olarak adlandırılan malin tümörler oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) glioma tümörlerini; tümör genişiliğine, mikrovasküler proliferasyona, genetik değişiklilere, nekroz ve çoğalma indeksine göre 4 evreye ayırmıştır (Gargini ve ark., 2020; Sonoda Y, 2020): Evre-I pilositik astrositom, Evre-II düşük evre astrositom, Evre-III anaplastik astrositom ve Evre-IV glioblastoma multiforme (GBM) olarak tanımlanmıştır.

Glioblastoma multiforme (GBM), diğer beyin tümörleri alt tipleri ile karşılaştırıldığında en agresif olanıdır, proliferasyon, nüks ve metastaz oranı yüksek, sağkalım oranı düşük ve kötü prognozludur. Ayrıca GBM'ler, farklılaşmış ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçlerini eksprese eden hücrelerden oluştuğu için oldukça farklı bir hücre bileşimi sergiler ve fenotipik olarak heterojenite gösterir. Bu yüzden "glioblastoma multiforme" olarak adlandırılır (Şekil 2) (Gargini ve ark., 2020; Sonoda Y, 2020; Kanderi ve Gupta, 2020; Louis ve ark., 2007; Rolle, 2015).



Şekil 2. GBM'nin kesitsel görünümü (www.standardofcare.com). **A)** Sağlam insan beynin MR görüntülemesi **B)** GBM'li hasta beynin MR görüntülemesi

Yetişkinlerde GBM'ler neredeyse sadece beynin serebral hemisferlerin özellikle frontal (%23.6), temporal (%17.4%), paryetal (%10.6), ve oksipital (%2.8) loblarında en sık görülse de, beyin sapı, beyincik ve omurilik gibi beynin alt kısımlarında ise çok nadir veya hiç görülmeyebilir (Engelhard ve ark., 2010; Adams ve ark., 2013; Davis, 2018).

Farklı sonuçlara yol açan farklı yaşlardaki primer GBM'ler, GBM'lerin %80'ini oluşturur ve yaşları ortalama 62 olan yaşlı hastalarda görülürken, düşük dereceli astrositoma veya oligodendrogliomadan kaynaklanan sekonder GBM'ler yaşları ortalama 45 olan genç hastalarda görülür. Sekonder GBM'ler genellikle frontal lobda bulunur, daha az nekroz derecesine sahiptir ve primer GBM'lerden daha iyi bir prognoz sergilerler (Gargini ve ark., 2020; Sonoda Y, 2020; Kanderi ve Gupta, 2020; Ostrom ve ark., 2016).

GBM'lerin, heterojen özellik göstermeleri, yüksek proliferasyon oranları ve agresif davranışları, GBM hastalarında tedaviyi zorlaştırmaktadır. GBM hastaları için uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümör rezeksiyonu (nöroşirürji), kemoterapi, radyoterapi veya bu seçeneklerin bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Bu yüzden, GBM tedavisinde ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, GBM hastaları için ortalama hayatta kalma süresi 12-15 aydan daha az sürmektedir. Bunun nedeni hastaların konvansiyonel kemoterapi ve radyasyona zayıf bir şekilde yanıt vermesidir. Bunun sonucunda yapılan standart tedaviden sonra hastalığın yeniden nüks geçirmesi izlenir. Bu nedenle, tanı, prognoz ve tedavi açısından GBM patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasına ve bu mekanizmaları hedefleyen daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Shergalis ve ark., 2018, Pearson ve ark., 2017, Fabian ve ark., 2019).

2.1.1.Glioblastoma Multiform (GBM) Epidemiyolojisi

Genel olarak, IDH geninde mutasyon taşıyan GBM (GBM IDH-M) tümörlerinin büyümesi başlangıçta yavaş olup, aşamalı olarak agresif hale gelir. Hızlı büyüyen türü IDH geninde mutasyon taşımayan (GBM IDH-WT) GBM'ler ise 3-6 ay içinde bulgu verebilir ve buna bağlı olarak tanı ve teşhisi gecikir, böylece tanıdan sonraki 3 ay içinde beyin tümörlü hastaların yaklaşık %95'inde ölüm görülür (Escamilla-Ramírez ve ark., 2020; Tamimi ve Juweid, 2017; Hanif ve ark., 2017). GBM'nin insidans oranları, ülkenin tıbbi imkanlarına ve sağlık politikalarına bağlı olarak değişmektedir (Thakkar ve ark., 2014). Her ne kadar yaklaşık 3.19/100.000'lik yıllık insidansa sahip bir tümör olsa da, tanıdan 14-15 ay sonra ölümle sonuçlanabilen kötü prognozu GBM'i önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir (Escamilla-Ramírez ve ark., 2020, Simińska ve ark., 2021; Burton ve ark., 2015). GBM görülme sıklığı, kadınlara göre erkeklerde, gençlere göre yetişkinlerde daha yüksektir. GBM yaş ortalaması 64 olan yetişkinlerde daha sık

görülür. İnsidans yaşla birlikte artar, 75-84 yaş aralığında daha yüksek oranda görülür, 85 yaşından sonra azalır (Lütgendorf-Caucig ve ark., 2020). Primer GBM'lerin sıklığı erkeklerde daha fazladır ve sekonder GBM ise kadınlarda daha sık ortaya çıkar (Thakkar ve ark., 2014; Ohgaki ve ark., 2004; 2005). T.C. Saglık Bakanlığı tarafından 2015 yılında yapılan istatistiksel sonuçlarda bu verileri desteklemektedir (Türkiye Kanser ist., 2015). Bununla birlikte, yenidoğan çocuklarda da GBM vakaları bildirilmiştir ve bu tümörün insidansının her 100.000 bebekte 1.1 ila 3.6 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Janisch ve ark., 1984; Winters ve ark., 2001). Çocuklarda ve yetişkinlerdeki GBM'ler arasında morfolojik bir fark bulunamamıştır, bildirilen tek fark glioma hücrelerinin proliferatif aktivitesinin erişkinlere göre çocuklarda daha yüksek olmasıdır (Mahvash ve ark., 2011).

2.1.2.Glioblastoma Multiform (GBM) Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Glioblastomanın etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Beynin gliyal dokularından kaynaklanan nadir, agresif bir neoplazm olan glioblastoma etiyolojisi, insan malignitelerinin en az anlaşılanlardan biri olmaya devam etmektedir. Belki de kısmen bu zorluklarından dolayı, GBM için az sayıda çevresel veya davranışsal risk faktörü doğrulanmıştır.

Artan kanıtlar diğer birçok kanser gibi, GBM'in de sporadik gelişim gösterdiği bilinmektedir (Kanderi ve Gupta, 2020; Escamilla-Ramirez ve ark., 2020). Hastalığın klinik öyküsünde ailesel gliomalar da kaydedilmiştir, ancak tümörün bu formu vakaların sadece %1'i için tanımlanmıştır (Schwartzbaum ve ark., 2006). Ek olarak, GBM'in çok az sayıda (%1-2) Turcot sendromu, Li-Fraumeni sendromu ve nörofibromatoz (tip 1 ve 2) gibi kalıtsal hastalıklarla ilişkili geliştiği rapor edilmiştir (Lütgendorf-Caucig ve ark., 2020).

GBM gelişimini etkileyebileceği düşünülen sigara içme, ilaç kullanımı ve alkol tüketimi gibi yaşam tarzı özellikleriyle ilişkisinde önemli bir fark gözlenmemiştir (Hochberg ve ark., 1990; Nelson ve ark., 2012).

Bununla birlikte, alerji, atopi hikayesi, bağışıklık faktörleri ve tespit edilen bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin düşük duyarlılıkta GBM gelişme riski olduğu bildirilmiştir (Brenner ve ark., 2002; Jones ve ark., 2019). Bununla birlikte, daha fazla artan kanıtlar steroid hormonları ve virüslerin de GBM etiyolojisini etkilediğini göstermektedir (Kabat ve ark., 2010; Pandey, 2011; Cobbs, 2011).

Son on yılda tüm dünya çapında cep telefonların kullanımı hızla artmıştır ve bu tür maruziyet, cep telefonlarından yayılan elektromanyetik alana maruz kalmanın potansiyel kanserojen etkileri konusunda artan endişe ile birlikte paralel olarak büyümüştür. Buna rağmen yapılan çalışmalar, cep telefonu kullanımının GBM gelişme riskini arttırmadığını gösteren çelişkili ve tutarsız raporlar yayınlamışlardır (Inskip ve ark., 2001; Deltour ve ark., 2012; Benson ve ark., 2013). Ancak uzun süreli kullanımla ilişkili daha fazla çalışmaların gerektiği rapor edilmektedir (Urbańska ve ark., 2014).

Sonuç olarak, çeşitli çalışmalar arasındaki heterojenlik, risk tahminlerindeki farklı varyasyonlar, kayıt için tanımlanmış bir nüfus popülasyonu eksikliği, örneklem büyüklüğündeki veya çalışma yerindeki farklılıklar, politik mücadele ve bilinmeyen bir dizi faktörler, GBM geilişiminde rol oynayan risklerin belirlemesini imkansız hale getirmektedir.

2.2. Glioblastoma Multiform (GBM) Sınıflandırılması

Tümor evrelemesi ve derecelendirmesi, prognostik belirleyici olması nedeniyle merkezi sinir sistemi tümörleri sınıflandırmasının ayrılmaz bir parçasıdır. Ancak derecelendirme (grade), tümörün yayılma derecesinin bir ölçüsü olan evrelemeden (stage) ayırt edilmelidir. Tümör derecesi, sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin mikroskop altında nasıl anormal göründüğünü tarif ederken, tümör evresi ise birincil tümörün ne kadar büyük olduğunu ve onun hasta vücuduna ne kadar yayıldığını belirler (Hermanek, 1978; Powers ve ark., 1995).

Düşük dereceli kanser hücreleri normal hücrelere daha çok benzeyen, cerrahi işlemle tedavi edilebilecek lezyonlarla ilişkili ve tipik olarak iyi prognoza sahip tümörlerdir (Abrigo ve ark, 2018). Derece arttıkça hücresel atipi, mitotik olarak aktif proliferasyon ve prognoz bakımından giderek kötüleşme söz konusudur (Abrigo ve ark, 2018; Pellerino ve ark, 2018).

Gliomların adlandırılması ve tehşisinde Uluslararası Standart Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılan sınıflandırma kullanılmaktadır. DSÖ sınıflandırma sistemi, malign özelliklerin sayılarının skorlanmasını temel alan St. Anne-Mayo sistemi ile tutarlı kriterleri kullanmaktadır (Komori, 2015). DSÖ tarafından 2007 yılında histolojik kriterlere dayanılarak yapılan Sinir Sistemi Tümörlerinin sınıflandırmasında tüm beyin tümörleri 7 ana gruba ayrılmışken, 2016 yılında yapılan son sınıflandırma ilk kez birçok tümör varlığını tanımlamak için kullanılan histolojik verilere ek olarak moleküler

parametreler kullanılarak yapılıştır ve 2007 yılındakine göre hem kavramsal hem de pratik bir gelişme sağlamıştır (Louis ve ark., 2007; Louis ve ark., 2016). 2016 yılında yapılan DSÖ derecelendirme sistemine göre, glioma tümörleri biyolojik davranışlarına, histopatolojik kriterlerle belirlenen klinik bulgularına ve malignitelerine göre 4 dereceye ayrılmıştır **[**Louis ve ark., 2016; Pearson ve ark., 2017; Zanders ve ark., 2019**]**: Derece-I pilositik astrositom, derece-II düşük evre astrositom, derece-III anaplastik astrositom ve derece-IV glioblastoma multiforme (GBM) olarak tanımlanmıştır. GBM, tüm gliomaların %70'ini oluşturan en malign ve öldürücü tipidir (Tablo 1) (Zanders ve ark., 2019; Bazzoni ve Bentivegna, 2019).

Tablo 1. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Evrelemesi

DSÖ Evrelemesi	Derecelendirme Özellikleri
Evre I	Düşük proliferatif potansiyele sahiptir ve cerrahi rezeksiyonlarla iyileşebilir.
Evre II	Genellikle yaygın infiltratif ve düşük proliferatif potansiyele sahiptir, ancak düşük tekrarlama oranı olasılığı, bazılarının ise yüksek derecede ilerleme riski vardır.
Evre III	Çoğunlukla anaplastik tümörler olarak bilinir. Malign histolojik özelliklere ve yüksek nüks oranına sahip, genellikle kemoterapi ve radyoterapi gerektirir.
Evre IV	Çok hızlı nüks etme yeteneğine sahip kötü huylu tümörler, çoğu MSS'de yaygın yayılma gösterirler.

2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü GBM'leri IDH geninde görülen mutasyona bağlı olarak IDH geninde mutasyon taşıyan (IDH(+)) ve taşımayan (IDH (-)) GBM'ler olarak iki sınıfa ayırmıştır (Louis ve ark., 2016; Gargini ve ark., 2020). IDH (+) ve IDH (-) GBM'ler histolojik olarak birbirleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, prognozu daha iyi olan IDH (+) GBM'ler tipik olarak genç hastaları etkiler ve düşük dereceli yaygın astrositom veya oligodendrogliomdan gelişirler. Dolayısıyla, IDH (+) GBM'ler, düşük dereceli diffüz glioma öykülerinden gelişen sekonder glioblastoma ile yakından ilişkilidir ve daha çok genç hastalarda ortaya çıkmaktadır. IDH (-) GBM'ler ise; klinikte primer olarak (yüksek dereceli) tanımlanmış de novo glioblastomalardır ve 55 yaşın üzerindeki hastalarda görülür (Wang ve ark., 2019a; Wu ve ark., 2019; Sonoda Y, 2020). Yine ilginç bir şekilde, yapılan klinik araştırmalara göre, IDH mutasyonu taşıyan hastaların, mutasyon taşımayan glioblastomalı hastalara göre nispeten olumlu bir sağkalım

gösterdikleri ortaya çıkmıştır (Tablo 2) (Louis ve ark., 2016; Sonoda Y, 2020; Mirchia ve Richardson, 2020).

Günümüzde IDH1 mutasyonu sekonder GBM'in (ikincil GBM'nin ~%70'i, birincil GBM'de %5-20'si) ayırt edici bir moleküler özelliği olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Tablo 2. IDH (+) ve IDH (-) glioblastomaların özellikleri (Louis ve ark., 2016).

	IDH (-)	**IDH (+)**
Sinonim	Primer globlastoma, IDH-yabani tip	Sekonder glioblastoma, IDH-mutant
Perkürsör (Öncü)-lezyon	Tanımlanmayan; de nova gelişen	Diffüz astrositom, Anaplastik astrositom
Glioblastomanın özellikleri	%90	%10
Yaş ortalaması	62	44
Erkek: Kadın oranı	1.41:1	1.05:1
Ortalama yaşam süreleri		
Cerrahi + radyoterapi	9.9 ay	24 ay
Cerrahi + radyoterapi + kemoterapi	15 ay	31 ay
Lokasyon	Supratentoriyal	Periferentiyal frontal
Nekrosis	Yoğun	Sınırlı
TERT promoter mutasyonu	%72	%26
P53 mutasyonu	%27	%81
ATRX mutasyonu	Nadir	%71
EGFR amplifikasyonu	%35	nadir
PTEN mutasyonu	%24	nadir

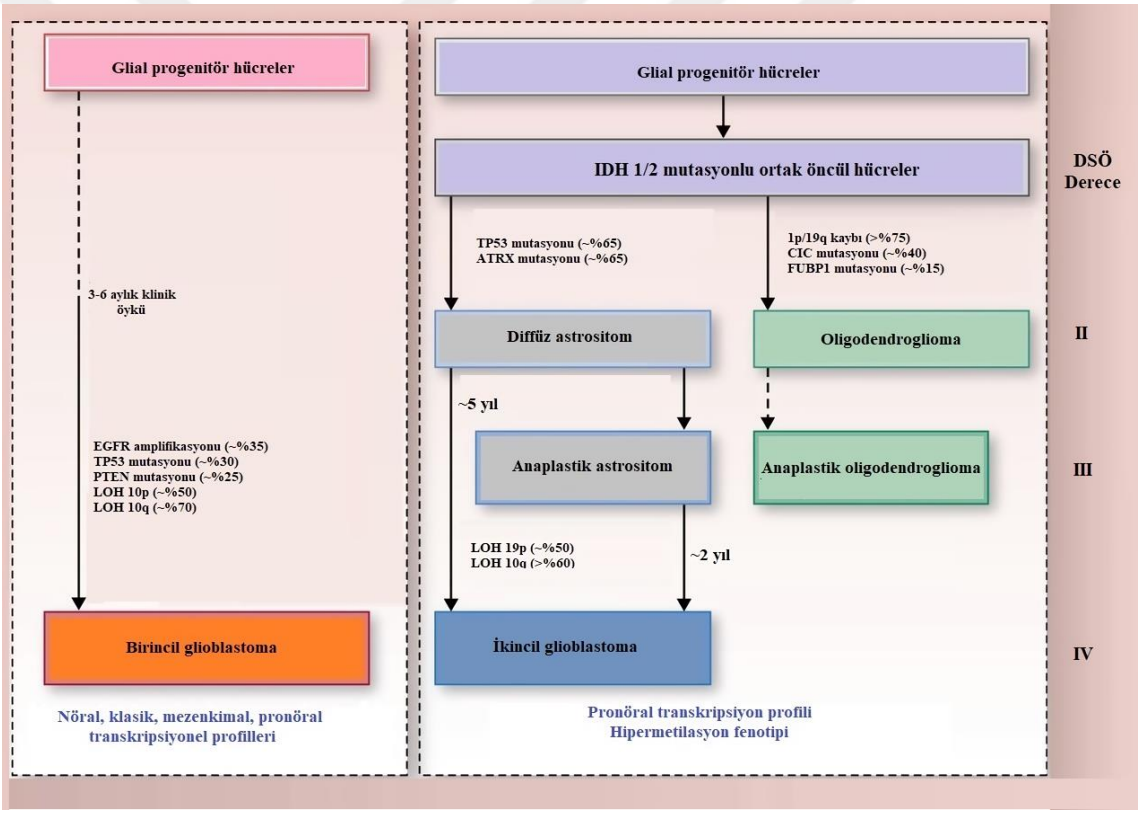
2.2.1.Primer ve Sekonder Glioblastoma

Günümüzde glioblastomlar, gelişme tarzına, farklı yaşlardaki hastaları çeşitli genetik yolaklardan etkileyen klinik davranışına, tümör biyolojisine ve IDH geninde görülen mutasyonuna bağlı olarak primer (de novo) veya sekonder olmak üzere iki alt grup altında değerlendirilmektedirler (Şekil 3) (Kleihues ve Cavenee, 2000; Tso ve ark., 2006).

Bu iki alt grubun birbirlerinden ayırt edilerek tanımının yapılması gerektiği ilk olarak 1940'da Alman nöropatolog Hans-Joachim Scherer tarafından ortaya atılmıştır (Peiffer ve Kleihues, 2006; Stoyanov ve ark., 2019). GBM'nin ana biyobelirteçi kabul edilen IDH geni mutasyonlarının keşfedilmesinden önce, birincil ve ikincil glioblastomların

çeşitli genetik değişikliklerinden dolayı farklı klinik ve biyiolojik davranış gösterdiği, buna rağmen aynı öncü hücreden geliştiği varsayılmaktaydı. Hatta bu birincil ve ikincil GBM'ler histolojik olarak ayırt edilemez olup, hem heterojenliliğinin anlaşılması hem de etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için klinik ve biyolojik açıdan bir ayrımın yapılmasının gerektiği önemle vurgulanmaktaydı (Ohgaki ve Kleihues, 2007; D'Alessio ve ark., 2019). Bu yüzden yoğun bir şekilde çalışmalar yapılışmıştır.

2016 yılında DSÖ tarafından yapılan muhteşem bir sınıflama sistemi bir önceki sınıflamaya göre daha güvenilir olmasından, hastalık biyolojisini anlamada daha net tahminlerin yapılmasına ve yeni dönem çalışmalarının başlatılmasına olanak sağlamıştır.



Şekil 3. Primer ve sekonder glioblastomlar gelişimindeki temel genetik yolaklar (Ohgaki ve Kleihues, 2012).

Primer glioblastomaların büyük çoğunluğu (yaklaşık %90) yaşlı hastalarda daha az malign prekürsör lezyonun klinik, radyolojik ve histopatolojik belirtilerini göstermeden birden *de novo* başlayarak hızla GBM'e (Derece IV) dönüşmektedir (Ohgaki ve Kleihues, 2012; Wirsching ve ark., 2016). Primer glioblastomlarda, genetik olarak heterozigotluk kaybı (LOH), p16INK4a delesyonu, TP53, EGFR ve PTEN mutasyonları

sık görülmesine rağmen IDH mutasyonları ile bir pozitif ilişki ortaya koyulmamıştır (Şekil 3) (Louis ve ark., 1993; Verhaak ve ark., 2010; Suri ve ark., 2011).

Sekonder glioblastomlar ise, daha düşük dereceli bir astrositik tümörden (Derece II veya Derece III) ilerleyebilir ve zamanla Derece IV tümörlere dönüşebilir (Ohgaki ve ark., 2004). Özellikle genç hastalarda (tüm vakaların sadece %5'i) ortaya çıkarlar, daha az nekroz derecesine sahiptir ve önemli ölçüde daha iyi bir prognoz taşırlar. Sekonder glioblastomun belirleyici temel genetik işareti, primer glioblastomlarda bulunmayan (veya çok nadir görülen) fakat sekonder GBM'lerin yaklaşık %80'inde eksprese edilen IDH mutasyonlarıdır (Ohgaki ve Kleihues, 2012; Cohen ve ark., 2013). Bunun dışında p53 mutasyonu, PDGFR aşırı ekspresyonu ve 17p, 19q, 10q'da heterozigotluk kaybı (LOH) en sık rastlanabilecek genetik değişikliklerdir (Şekil 3) (Kanu ve ark., 2009).

2.3. İZOSITRAT DEHIDROJENAZ (IDH) ENZIMI

2.3.1.IDH genleri ve protein yapısı

İzositrat dehidrogenaz (IDH), glutamin, lipit ve enerji metabolizmasında önemli bir rol oynayan trikarboksilik asit (TCA) döngüsü başta olmak üzere bir dizi hücresel süreçte yer alan enzimdir (Stander ve ark., 2004; Reitman ve Yan, 2010). Deneysel olarak ilk memeli IDH1 ve IDH2'nin kristal yapısı belirlenmiş ve her enzimin bir homodimerden oluştuğu gösterilmiştir (Ceccarelli ve ark., 2002; Hu ve ark., 2004; Pelosi ve ark., 2016).

IDH'ın yapısı, 14 alfa sarmal ve 18 beta tabakadan ibarettir. Esas olarak alfa sarmalları yapının her yerinde bulunurken, paralel ve antiparalel düzene sahip beta tabakaları yapının merkezinde yerleşim gösterirler (Pelosi ve ark., 2016; Xu ve ark., 2004; Yasutake ve ark., 2002). IDH enziminin, IDH1, IDH2 ve IDH3 olmak üzere 3 farklı izoformu mevcuttur ve bu izozimler 5 ayrı gen tarafından kodlanır (Willander ve ark., 2014; Thien ve Tran, 2021). IDH1, sitoplazma ve peroksizomda, IDH2 ise mitokondride bulunmaktadır ve bu iki izoform genleri sırasıyla IDH1 ve IDH2 enzimini kodlamaktadır (Stoddard ve ark., 1993). IDH1 ve 2'den ($NADP^+$-bağımlı emzimler) farklı olarak IDH3, NAD'ye bağlıdır ve trikarboksilik asit döngüsünde NAD'den NADH'ye indirgenirken izositratın 2-ketoglutarat (2KG)'a dönüşümünü katalizler (Ramachandran ve Colman, 1980; Al-Khallaf, 2017). IDH3, farklı genler tarafından kodlanan iki α (alfa), bir β (beta) ve bir γ (gamma) alt biriminden oluşan heterotetramer yapılı kompleks bir enzimi temsil edmektedir (Weiss ve ark., 2000). Fakat bu yapı özelliklerine ragmen günümüzde potansiyel IDH3 mutasyonlarına ilgili yeterince bilgi

bulunmamaktadır.

2.3.2.İzositrat Dehidrogenaz Enziminin Trikarboksilik asit döngüsündeki rolü

Trikarboksilik asit döngüsü (TCA), tüm canlı hücrelerin besinlerini yükseltgeyerek enerji kazanmasında önemli yer tutan hücresel oksijenli solunum reaksiyonunun glikolizden sonra gelen ikinci aşamasıdır. Bu aşama, oksijen varlığında normal olarak hücreler canlılıklarının sürdürülmesinde kullanacakları enerjiyi üretmek için trikarboksilik asit döngüsünü kullanırlar (Nowicki ve Gottlieb, 2015).

Genellikle mitokondride işlenen bu metabolitlerin ürettiği enerji, TCA döngüsünde yer alan indirgenmiş elektron taşıma zinciri tarafından kullanılmaktadır. Mitokondriyel NADH/NAD'lerin enerjisinde yüksek bir artış varsa, sitrat gibi bazı metabolitler, anabolik işlemlere katılmak için sitozole taşınır. IDH enzimleri bu işlemlerin oluşumunda ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 4) (Smith ve Robinson, 2011; Marquez ve ark., 2019).

IDH, iki aşamalı bir reaksiyonla izositratın alfa-ketoglutarata (2-oksoglutarat) dönüştürülmesinden sorumlu bir enzimdir. Bu reaksiyonun ilk aşamasında, izositratın ara madde oksalosüksinata oksidasyonu meydana gelir, bunu izleyen ikinci aşamada ise, oksalosüksinat beta-karboksilatını karbondioksit olarak kaybeder ve alfa-ketoglutarata dönüşür (Yen ve ark., 2010). IDH1 ve IDH2 izoformlarının, oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonları yoluyla bir izositratın oksidatif dekarboksilasyonu yoluyla üretilen NAPDH, oksitlenmiş glutatyon ve tiyoredoksini azaltarak hücrelerde lipid peroksidasyonuna ve oksidatif DNA hasarına karşı koruma sağladığı ve böylece oksidatif hasara karşı hücresel savunmada önemli roller oynadığı da bilinmektedir. Sonuç olarak, normal hücrelerde, IDH1 ve IDH2, oksidatif stresin regülasyonunda önemli roller oynamaktadır (Waitkus ve ark., 2016).

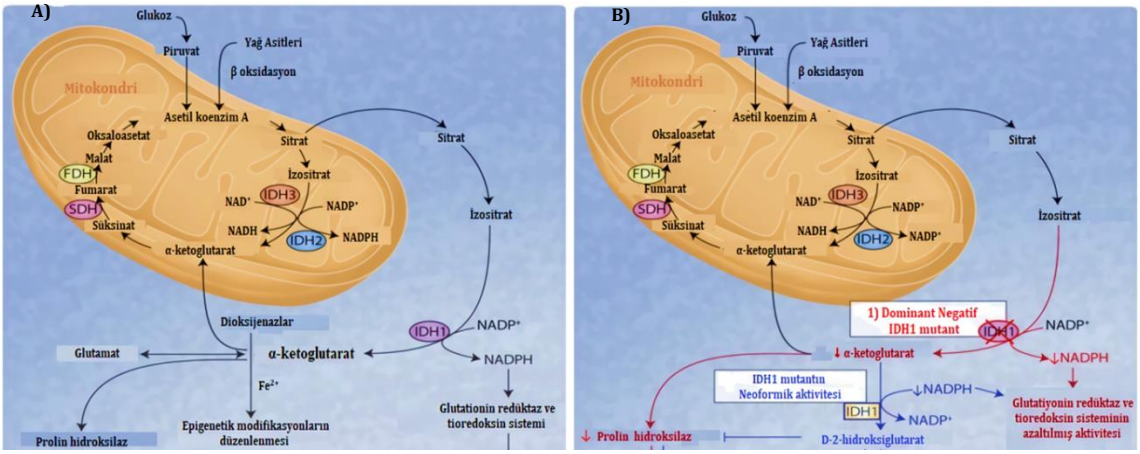
2.3.3.Izositrat dehidrogenaz enzimi (IDH)'in kanserdeki rolü

Enerji üretiminde oksidatif fosforilasyonla (TCA döngüsü) daha yüksek enerji elde edilmesine rağmen (Vander Heiden ve ark., 2009), hızla bölünen tümör hücreleri enerji ihtiyaçlarını kısa sürede karşılayabilmek için, oksijen varlığında bile glikolizi tercih eder. Bunun sonucunda glikoz metabolizması ile kanser hücrelerinin büyümesini hızla en üst düzeye çıkarırlar (Ward ve Thompson, 2012).

Kanser hücrelerinde, TCA döngüsünün üç temel enzimi olan süksinat dehidrogenaz,

fumarat hidrataz ve izositrat dehidrogenaz enzim mutasyonları en sık bilinen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar, onkogenleri aktive ederek veya tümör baskılayıcı genleri inhibe ederek hücreleri neoplaziye yatkın hale getirebilir (Sudarshan ve ark., 2007; Dang ve ark, 2009). Ayrıca, metabolik genlerdeki genetik mutasyonlar nedeniyle, belirli metabolitlerin (oncometabolit) aşırı birikimi, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına olanak sağlayabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

IDH mutasyonları ilk olarak kolorektal kanserlerde keşfedilmiş, glioblastomalarda ise ilk IDH mutasyonu, Parsons ve arkadaşları tarafından 2008 yılında 22 glioblastoma hasta örneğinde yapılan tam ekzom sekanslaması ile keşfedilmiştir (Parsons ve ark., 2008). İlginç bir şekilde, çalışmadaki neredeyse tüm sekonder GBM vakalarda IDH1 mutasyonları tespit edilirken, primer GBM vakalarında daha nadir olduğu belirlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, IDH mutasyonlarının derece II/III gliomaların ve sekonder GBM'lerin büyük çoğunluğunda, ayrıca akut miyeloid lösemi (AML), melanom dahil olmak üzere başka tümörlerde de oluştuğunu göstermiştir (Waitkus ve ark., 2016; Reitman and Yan, 2010). Daha sonraki yapılan çalışmalar, gliomaların derece-derece karşılaştırmasında, IDH-mutant tümörlerin, IDH-yabani tip tümörlere kıyasla anlamlı ölçüde daha uzun genel sağkalıma sahip olduğunu göstermiştir. IDH (-) GBM'ler 9-15 ay kadar bir sağkalım gösterirken, histolojik olarak benzer IDH (+) GBM'lerin ortalama 24-31 aylık bir sağkalım gösterdikleri rapor edilmiştir (Mirchia ve Richardson, 2020).



Şekil 4. IDH1-yabani tip **(A)** ve IDH1-mutant **(B)** enzimlerinin işlevleri (Gupta ve ark., 2011).

IDH1/2 mutasyonları, izositratın α-ketoglutarata dönüştürülememe sonucu onkometabolit olan 2-hidroksiglutaratın (2-HG) üretilmesine sebep olur (Zhang ve ark., 2019). 2-HG onkometaboliti hücreler için toksiktir, bu böylelikle gen regülasyonunda ve doku homeostazında önemli roller oynayan α-KG'ye bağımlı enzimleri inhibe eder. Aynı zamanda, histon de-metilazları da inhibe ederek DNA ve histon metilasyonunu değiştirerek farklılaşma sürecini inhibe ettiği bildirilmiştir (Clark ve ark., 2016; Ferroli ve ark., 2010; Lee ve ark., 2010).

Kanserde, IDH1 mutasyonlar tek bir allelde meydana gelir (heterozigottur). IDH1 ve IDH2'de oluşan mutasyonlar, bu enzimlerin aktif bölgelerindeki R132 (IDH1), R172 (IDH2) ve R140 (IDH2) gibi üç spesifik arginin kalıntısında meydana gelir (Clark ve ark., 2016). Gliomalar en çok R132H IDH1 mutasyonu içerirken, AML'lerin çoğunluğunun R132C mutasyonu içerdiği gösterilmiştir (Reitman ve Yan, 2010).

Metabolomik çalışmalar, IDH1 mutasyonuna sahip kanser hücrelerinin (çoğunlukla glioma ve akut miyeloid lösemide) kanserli olmayan hücrelerden daha yüksek seviyelerde 2-hidroksiglutarat (2-HG) içerdiğini göstermiştir (Dang ve ark., 2010; Gross ve ark., 2010; Boutzen ve ark., 2016). IDH (+) hücrelerde, IDH1 fonksiyon kaybına ve hücre içi α-KG seviyelerinin azalmasına bağlı olarak HIF-1α protein ekspresyonunu artırtığı bildirilmiştir (Waitkus ve ark., 2016). HIF-1α, hipoksiyle indüklenen onkogenik bir transkripsiyon faktörüdür. VEGF da dahil olmak üzere oksijenasyon ve vaskülarizasyon da rol oynayan birçok modülatör genlerin ekspresyonunu düzenler.

Doğal olarak, IDH-mutant hastaların, IDH mutant olmayan hastalara göre daha kötü prognoz göstermesi beklenir. Ancak, IDH-mutasyonlu hastaların genellikle IDH mutant olmayanlara göre daha iyi sonuçlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu fenomen henüz daha tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat IDH mutasyonu sonucunda, α-KG'in 2-HG dönüşümü için NADPH kullanılır, hücrelerde NADPH seviyesi azalır ve hücreler serbest radikaller ve ROS yoluyla strese daha duyarlı hale gelir. Ayrıca 2-HG, ATP sentetaza bağlanarak doğrudan onu inhibe eder ve kanser hücrelerinde istenmeyen durumlara yol açar. NADPH beyin dokusunun ana kaynağı olup, IDH1 tarafından, izositratın oksidatif dekarboksilasyonu yoluyla üretilen NAPDH, oksitlenmiş glutatyon ve tiyoredoksini azaltarak hücreleerde lipid peroksidasyonuna ve oksidatif DNA hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, normal hücrelerde, IDH1 ve IDH2, oksidatif stresin regülasyonunda önemli roller oynamaktadır (Waitkus ve ark.,

2016). Dolayısıyla IDH-mutasyonlu hastaların daha iyi sonuçlar sergilemesinin IDH mutasyonu sonucu hücre içerisindeki metabolik yolakların inbisyonuna bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (Maus ve Peters, 2017). Bununla birlikte, en son verilere göre, IDH mutantı olan GBM'li hastaların IDH yabani tipindekilerden daha fazla bir sağkalım oranına sahip olması ve mutasyon sonucu oluşan 2-HG ürününün gliomagenezdeki metabolik rolü henüz açıklanmamıştır ve açıklığa kavuşturmak için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

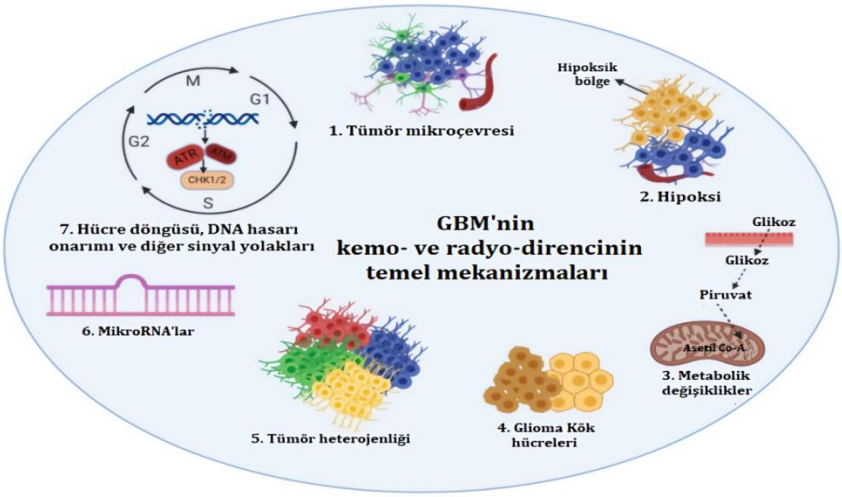
2.4. Klinik başvuru ve Semptomları

Glioblastomlu hastalar, tümörün büyüklüğüne ve yerine bağlı olarak spesifik (odak) veya spesifik olmayan (genel) belirti ve semptomlarıyla kliniğe başvururlar. Genel semptomlar, GBM dışındaki birçok beyin tümörü ve diğer hastalık tipinde de ortaya çıkma eğilimindedir. En sık görülen genel semptomlar arasında baş ağrısı, artan kafa içi basıncı (ICP), bilişsel bozukluk, ataksi, bulantı/kusma, hafıza kaybı ve diğer normal fonksiyonlarda azalma sayılabilir (Metcalfe, 2000; Faivre ve ark., 2015).

Hasta belirtileri ve semptomlarının kesin bir standardı olmadığından bazı durumlarda genel ve odak belirtiler karıştırılabilir. Odak semptomlar tümörün konumu ve büyüklüğüne bağlı olarak ciddi bir şekilde ortaya çıkar ve sıklıkla hastaları direk etkiler. Örneğin, tümör beynin konuşma bölgesinde ise, hastanın konuşması ve konuşmayı anlamasıyla ilgili ciddi sorunlara sebep olmaktadır. Motor konuşma bozuklukları dışındaki diğer odak semptomları arasında nöbetler, kas güçsüzlüğü ve görsel değişiklikler yer almaktadır (Panayiotopoulos, 2010). Böyle belirti ve semptomlara bağlı olarak duyulan şüphe durumunda, MRI taraması yapılması gerekmektedir (Batash ve ark., 2017).

2.5. GBM Tedavi Yaklaşımları

Günümüzdeki GBM tedavi yaklaşımları, cerrahi rezeksiyon ve sonrasında uygulanan adjuvant radyoterapi ve seçilmiş olgularda eklenmiş kemoterapinin kombinasyonlarına dayanmaktadır (Karlsson ve ark., 2004; Davis, 2016). Yine de günümüzde hastaların sağkalım oranları, GBM'in yüksek oranda direnç geliştirme yeteneğinden dolayı hala sınırlı kalmaktadır. Ancak bunun kazanılmasında hangi yolak ve mekanizmayı kullanarak başarabildiği konusunda bilgiler çelişkili ve eksik kalmaktadır (Şekil 5) (Sestito ve ark., 2018; Auffinger ve ark., 2015; Chien ve ark., 2021).



Şekil 5. GBM'nin kemo- ve radyo direncinde tanımlanmış mühtemel mekanizmaları (Ali ve ark., 2020).

2.5.1. Cerrahi (cerrahi rezeksiyon)

Cerrahi rezeksiyonu tüm gliomlar için kritik ve birincil tedavi yöntemi olmaya devam etmektedir (Black, 1998; Keles ve ark., 1999; Yasargil ve ark., 2004). GBM hastalarına cerrahi rezeksiyon yapılmasının genel amacı, klinik semptomların hafifletilmesi için nörolojik defisit oluşturmayacak düzeyde fazla tümörün çıkartılması, sağkalımın arttırılmasıdır (Metcalfe ve Grant, 2001; Manrique-Guzmán ve ark., 2017).

Malign gliomlu hastaların tedavisinde doğru patolojik tanı önemli bir öncelik olmaya devam etmektedir, ancak gliomaların tek bir tümör içinde bile belirgin bir heterojenliğe sahip olabileceğinden, patologlar arasında bu malign gliomların karakterizasyonu ve derecelendirilmesi konusunda önemli tutarsızlıkları kapsayan sınırlamalar mevcuttur (Laws ve ark., 2003).

GBM hastalarının prognozunu, yaş, Karnofsky Performans Statüsü (KPS)'ne göre preoperatif performans durumu, nörolojik semptomların bulunması ve tümörün yeri gibi çeşitli prognosik faktör değişkenleri cerrahiyi etkiler (Li ve ark., 2009; Marina ve ark., 2011; Zinn ve ark., 2012). Hastalara rezeksiyon ya da biyopsi modalitesinin seçiminde cerrahi karar vermeyi etkileyen bariz faktörlerin olmasına rağmen, mümkün olduğunca sistematik karar alınmasının klinik önem taşıdığı iyi bilinmektedir. Biyopsi, daha ileri tedaviye rehberlik etmek için kullanılabilecek minimum riskle histolojik bir tanı koymaya çalışır. Rezeksiyon ise, daha sonra semptomatik rahatlama ve artmış sağkalım ile tümörlerin çoğunu çıkarmayı amaçlamaktadır (Hart ve ark., 2000; Almenawer ve

ark., 2015). Tümörün rezeksiyon derecesi, sağkalımın artması ve steroid kullanımına olan ihtiyacın azalması için anahtar bir faktördür (Lacroix ve ark., 2001; Sanai ve Berger, 2008). Bununla birlikte, cerrahi işlemler bazı semptomları iyileştirebilirken, aynı zamanda ameliyat sonrası bazı yeni semptomlara yol açabilir. Ne yazık ki, ameliyat sonrası neredeyse tüm GBM'ler tekrarlanır, bu nedenle tek başına cerrahi rezeksiyonu yetersizdir ve kombinasyon tedavilerin uygulanmasını gerektirir (Young ve ark., 2015).

2.5.2. Radyasyon tedavisi

Radyasyon tedavisi, DNA çift zincirinde hasar oluşturarak hücrelerin apoptoza gitmesini indükleyen tedavi yöntemidir. Radyoterapi, uzun süredir glioblastom için standart adjuvan yaklaşım olmuştur ve hala cerrahi ile birlikte GBM tedavisinin temel taşı olmaya devam etmektedir (Gzell ve ark., 2017; Batash ve ark., 2017). Çok sayıda çalışma, yeni teşhis edilen glioblastomlu hastalarda radyasyon tedavisinin yararını göstermiştir (Barani ve Larson, 2014; Hau ve ark., 2016). Ancak radyasyon, yeni teşhis edilen glioblastoma hastaları için standart tedavinin kritik bir parçası olmasına rağmen, tekrarlayan GBM hastalarında daha sınırlı kalmaktadır. Bu tekrarlayan glioblastomlu hastalar için tekrar ameliyat, sistemik kemoterapi, yeniden ışınlama veya bunların bir kombinasyonunu içeren çeşitli tedavi seçenekleri önerilebilir, ancak belli bir standart tedavi yoktur (Barney ve ark., 2017; Shah ve ark., 2017).

Glioblastomdaki uzun süreli ve yüksek doz radyasyon alımı sonucunda beynin ışınlanmış bölgelerinde nüks gelişebilmektedir (Minniti ve ark., 2010; Barney ve ark., 2017). Uzun vadeli riskleri arasında ise radyasyon nekrozu, nörokognitif düşüş ve nöroendokrin disfonksiyon yer alır (Ghia, 2018). Genellikle glioblastomlu hastaların genel sağkalımını arttırmak için uygulanan radyasyon bazlı tedaviler, kemoterapi ve immünoterapi kombinasyonlarına dayanmaktadır. Bundan dolayı, GBM tedavisinde radyasyon uygulamasının sorunsuz ve sürekli kullanılabilmesi için, etkili iyonize dozunun belirlenmesine, toksisitesinin ve diğer yan etkilerinin azaltılmasına ve geliştirmesine yönelik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Her ne kadar GBM'lar tipik olarak radyoterapi ile tedavi edilirse de, klinik açıdan radyasyon direnci göstererek büyük sorunlar yaratabilir (Han ve ark., 2017).

2.5.3. İmmünoterapi

İmmünoterapi, glioblastom dahil çeşitli kanser türlerinde tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için konakçının kendi bağışıklık mekanizmalarının gücünü kullanmaya

odaklanan bir tedavi stratejisidir. Ayrıca glioblastomlar, immünosüpresif bir mikroçevre sağlamasını ve immün kaçışının kolaylaştırmasını hedefleyen karmaşık sinyal yolaklarıyla karakterize son derece heterojen tümörleri temsil eder (Weiss ve ark., 2015; Huang ve ark., 2017). Glioblastomaya özgü immünoterapideki temel zorluklar arasında, tümör mikroçevresindeki çeşitli düzenleyici ve uyarıcı faktörlerin anlaşılması zor immünojenisite sergilemesi, belirli klinik çalışmalara katılmaya uygun sınırlı sayıda GBM hastasının olması ve tümörün immünosüpresif mikroçevreye sahip olması gibi birçok neden bulunmaktadır (Tivnan ve ark., 2016). GBM hücreleri, mikroglia, periferik makrofajlar, miyeloid türevi baskılayıcı hücreler (MDSC), lökositler, CD4+ T hücreleri ve Treg gibi bir dizi bağışıklık hücrelerin infiltrasyonunu destekleyen çok sayıda kemokin, sitokin ve büyüme faktörü salgılar (Fecci ve ark., 2006; Lohr ve ark., 2011; Alexiou ve ark., 2013; Wainwright ve ark., 2013). Bu yüzden, klinik çalışmalarda melanom, prostat kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi çaşitli kanserlerde birçok FDA onaylı aşı ve kontrol noktaları inhibitörleri kullanımı yeni bir antineoplastik rejim halini almışken, GBM tedavisinde klinik kullanım için hiçbir immünoterapi yaklaşımı onaylanmamıştır (Kong ve ark., 2017; McGranahan ve ark., 2019). GBM'de yapılan transkriptom çalışmaları sonucunda genel olarak immünoterapinin ana oyuncuları olarak varsayılan çok fazla belirteç tanımlansa da, şu anda hastalığın tedavisini kolaylaştıran hastalığa özgü herhangi bir öngörücü biyobelirteci mevcut değildir (Gieryng ve ark., 2017). GBM'de araştırılmakta olan immünoterapötik stratejiler arasında sitokin terapileri, uyarlamalı T hücresi immünoterapisi, bağışıklık kontrol noktası blokajı, çeşitli aşılama yöntemleri, monoklonal antikorlar, viral ve dendritik hücreler immünoterapisi yer almaktadır (Rolle ve ark., 2010; Farber ve ark., 2017). Ancak mevcut preklinik ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler, genel olarak glioblastomalarda güçlü bir antitümör immün yanıt oluştuğunu ve immünoterapinin iyi tolere edildiğini ortaya koymuştur (Calinescu ve ark., 2015; McGranahan ve ark., 2019).

2.5.4. Sistemik kemoterapi

Günümüzde GBM hücrelerinde invazyon ve metastaz yapma gibi tümöre özgü karakteristik aktivitelerin baskılanmasında etkili çeşitli kemoterapik ilaçlar tanımlanmıştır. Bunlardan temizolomide (TMZ), fotemustin (FM), carmustine (BCNU) ve lomustine (CCNU) gibi alkilleyici ajanlar etkinliği açısından test edilerek bazı

avantajlar göstermiştir (Curado ve ark., 2007; Iacob ve Dinca, 2009; De Felice ve ark., 2013). Bunlar in vitro olarak etkili olmalarına rağmen ciddi hematolojik toksisiteye neden olma riskinden dolayı birçoğu devamlı olarak klinikte GBM hastalarının standart tedavisinde yaygın kullanılamamaktadır (Kondo ve ark., 1998; Lesniak ve ark., 2005; Zhan ve ark., 2010). Kurkumin monoterapisi, glioma kök hücre aktivitesi ile ilişkili yolaklar dahil olmak üzere glioblastomun agresiflik ve ilaca direnç gibi özellikleri kazanmasında yer alan çoklu sinyal yolaklarını hedefleyebilen antikanser etkinliğini destekleyen çok fazla kanıtların olmasına rağmen, klinik yararını belirten raporlar hala sınırlıdır. Fakat kurkuminin (CUM) temozolomid (TMZ) ile kombinasyonu GBM tedavisinde sinerjik etki göstermiştir (Shahcheraghi ve ark., 2019). Ancak GBM tedavisinde ilk şeçenek olarak etkin kemoteropötik ajanlardan olan temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır (Reardon ve Wen, 2006; Xie ve ark., 2014).

2.5.4.1. Temozolomid

DNA alkilleyici madde temozolomid, oral olarak radyoterapiyle birlikte ve ardından bir adjuvan rotası (sınıf I, seviye B) izleyen şekilde uygulanarak tekrarlayan glioma tedavisinde önde gelen etkili ajan olarak antitümör aktivite göstermiştir (Stupp ve ark., 2005). Stupp ve ark. yaptığı çalışmasında, yeni tanı almış ve TMZ ile tedavi edilen GBM hastalarının sağkalım oranında ortalama 2,5 aylık bir artışın olduğunu bildirmişlerdir (Stupp ve ark., 2005). Başka bir çalışmada ise, TMZ tedavisinden sonra hastaların yaklaşık %20'sinde klinik toksisite ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Chamberlain, 2010). TMZ, alkilatör bazında olan diğer kemoterapötik ajanlara kıyasla daha az toksik olduğu, fakat yine de glioma hastalarının tedavisini etkileyecek biçimde toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Lee, 2017). GBM hastalarında temozolomide karşı tümör direnci kademeli olarak gelişir ve buna bağlı olarak tümörde yeniden büyüme veya nüks çok sık görülür (Paw ve ark., 2015). Bununla birlikte, GBM hücreleri, TMZ'nin neden olduğu sitotoksisiteye karşı dirençli hale gelir ve direnç gelişimi TMZ'nin etkinliğini kısıtlar. Bu yüzden, TMZ'nin glioblastomların tedavisinde yararını arttırmak ve glioblastom hücrelerini TMZ'ye duyarlı hale getirmek için etkili kombinasyon stratejilerine veya yeni etkili terapotiklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

2.5.5. Alternatif Elektrik Alan Terapisi

Kan beyin bariyeri (KBB), beyin tümörleri için terapötikler geliştirmede özellikle zorlu bir mücadeledir (Zhao ve ark., 2020). Odaklanmış ultrason (FUS), beyin tümörlü

hastalar için yaşam kalitesini iyileştirme ve tedavi maliyetini azaltma potansiyeline sahip olmasına rağmen, genellikle hastalığı erken aşamada tedavi edebilmek için tasarlanmış bir teknolojidir. Klinikteki bu yöntemin, KBB'yini aşmak ve kemoterapinin penetrasyonunu artırmaya yönelik kullanılmaktadır (Curley ve ark., 2020). Fakat GBM gibi çok agressif (Evre IV) hastalar için belirli sınırlamaları ve zorlukları mevcuttur. Buna rağmen glioma hastalarının tedavisi için nispeten yeni bir teknik olan FUS'un kemoterapiye kıyasla daha düşük toksisite ve gelişmiş yaşam kalitesi sergilediğini belirtilmiştir (Stupp ve ark., 2012). Tekrarlayan veya refrakter GBM hastaları tedavisindeki etkinliği ve güvenirliğinden dolayı Tümör Tedavi Alanlarının (TTF veya Optune) kullanımı, ilk olarak 2011 yılında Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Burri ve ark., 2017; Fabian ve ark., 2019). Randomize faz III çalışması, yeni tanı alan GBM hastalarında TTF ve standart kemoterapi (temozolomid) kombinasyonunun (EF-14 denemesi) genel sağkalımı iyileştirdiği kanıtlanmıştır (Stupp ve ark., 2014, 2017). Yine de agressif GBM hücrelerinin çeşitli mekanizmalar ve yolakları kullanarak kazandığı direnç, GBM tedavisindeki zorluklara ve sınırlamalara yol açmaktadır.

2.6. RNA Etkileşimlerin Keşfi ve Türleri

Son zamanlarda yoğun araştırma konusu halini almış olan RNA etkileşimi (RNAi) teknolojisinin; tek başına veya kombinasyonel uygulamalarının GBM tedavisinde ümüt verici potansiyelinin olabileceğine işaret etmektedir.

RNA girişimini (RNA interferans veya RNAi), 1998'de Amerikalı bilim adamları Andrew Fire ve Craig Mello canlı organizmada gen ekspresyonunun düzenlenmesi açısından büyük önem taşıyan bir mekanizma olarak keşfetmişerdir (Zamore, 2006; Watts, 2006). Bu keşiflerinden dolayı 2006 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülüne layık görülmüştür. mikroRNA (miRNA) ve küçük müdahaleci RNA (siRNA) bu tür mekanizmanın merkezinde yer almaktadır. RNA molekülleri hücrede bir dizi işlenme süreci sonucunda hedef genin (mRNA) susturulmasına veya parçalanmasına sebep olur (Agrawal ve ark., 2003; Kim ve Rossi, 2008). Böylelikle hücrede gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alır. Günümüzde interferans RNA'lar, moleküler biyoloji alanında genlerin işlevini incelemek için yaygın olarak kullanılmakta olup, gelecekte yeni tedavide kullanılabilecek potansiyele sahiptirler.

2.6.1. miRNA'lar

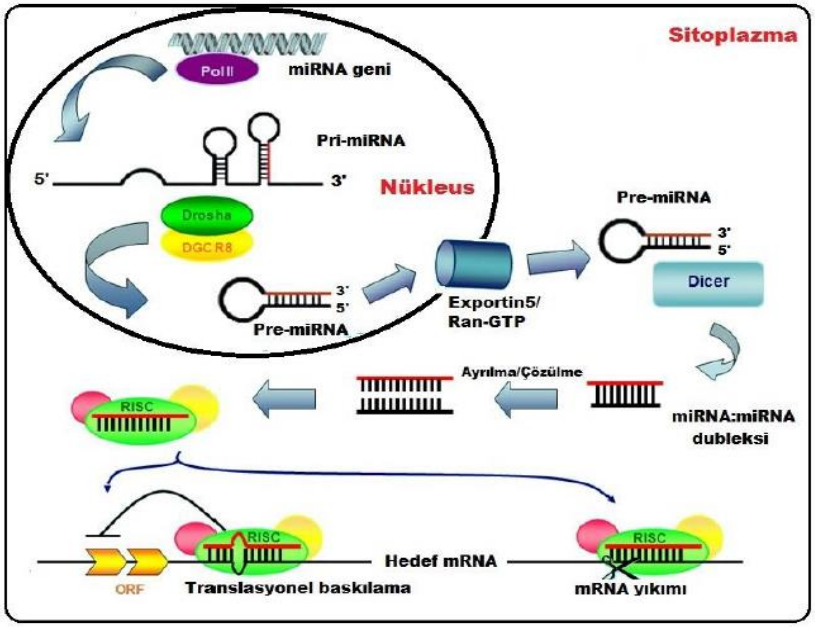
İnsan genomunun büyük bir kısmı çeşitli fonksyonları düzenleyen, kodlamayan RNA'lara (miRNA, siRNA ve lncRNA, vb.) kopyalanmaktadır. mikro-RNA (miRNA)'lar, gen ekspresyonunu düzenleyen, 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlanmayan endojen RNA moleküllerinin geniş bir sınıfını oluştururlar (Lin ve Gregory, 2015; Yao ve ark., 2019). İlk 1993 yılında C.elegans'da yapılan iki bağımsız çalışma sonucunda gen ekspresyonun önemli post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak keşfedilmiştir (Lee ve ark., 1993; Wightman ve ark., 1993). Daha sonra, hayvanlarda, bitkilerde ve virüslerde yüzlerce mikroRNA (miRNA) geni bulunmuştur, bu da miRNA genlerini en büyük gen ailelerinden biri haline getirmiştir (Bartel, 2004; Pfeffer ve ark, 2004). Güncel miRNA veritabanı üzerinde 206 canlı türünde yaklaşık 24521 hairpin prekürsörü ve 30424 olgun miRNA bulunmaktadır (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2013).

Gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol alan miRNA'lar, hedefi olan mRNA'ların 3'-kodlanmayan bölgelerine (3'-UTR) komplementer olarak bağlanarak translasyonun engellerler (Lin ve Gregory, 2015; Yao ve ark., 2019). Ayrıca, tek bir miRNA birçok farklı mRNA hedefleyebilir ve bunları düzenleyebilir, tersine birkaç farklı miRNA, tek bir mRNA'yı hedef alabilir ve birlikte kontrol edebilir. mikroRNA'lar aracılığıyla gerçekleşen gen regülasyonu çeşitli hücresel süreçlerde homeostazisi sağlama açısından son derece önemlidir. Dolayısıyla, mikroRNA'lar çeşitli hücresel mRNA'ları hedef alarak gelişim sürecinin değişik dönemlerinde hücre sinyal iletim yolaklarının aktivasyonunda ya da represyonunda rol almaktadır (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2010; Lin ve Gregory, 2015; Yao ve ark., 2019). Mevcut çabalar miRNA'ların düzenleyici işlevine odaklanırken, bu olağandışı genlerin kendilerinin nasıl düzenlendiği hakkında çok az şey bilinmektedir.

2.6.1.1. miRNA biogenezi

miRNA'ların gen düzenleme mekanizmasını anlamak için, miRNA transkripsiyonu için temel makinelerin tanımlanması gerekmektedir. Geleneksel miRNA biyogenezi, olgun mikroRNA'yı oluşturmak için bir dizi nükleer ve sitoplazmik işlenme olaylarına maruz kalan kapsamlı bir süreci izler (Şekil 6). Tanımlanmış miRNA genlerinin yaklaşık yarısı genomda kümeler halinde bulunur ve polisistronik RNA transkriptleri olarak kopyalanır (Griffiths-Jones ve ark., 2008; Ha ve Kim, 2014). Bir kısım miRNA genleri, başka bir

genin içine yerleştirildikleri ve aynı transkripsiyonel yönlendirmeye sahip oldukları için intrajenik olarak kabul edilmektedir. Bu intrajenik miRNA'ların yaklaşık %40'ı intronik bölgelerde ve %10'u eksonik bölgelerde bulunmaktadır. İntronlarda bulunuan miRNA'lar mirtronlar olarak bilinir (Westholm ve Lai, 2011). Nispeten az sayıdaki geri kalanlar kısmı ise intergeniktir, bir konakçı genden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir (Kim ve Kim, 2007; de Rie ve ark., 2017). miRNA'nın ekspresyonu, çeşitli endojen ve eksojen uyaranlara yanıt olarak transkripsiyon faktörleri ve farklı epigenetik mekanizmalar tarafından pozitif veya negatif olarak düzenlenerek kontrol edilir (Woods ve ark., 2007; Davis-Dusenbery ve Hata, 2010). Bazı miRNA'ların transkripsiyonel olarak geri besleme yoluyla kendi ekspresyonlarını aşağı veya yukarı regüle ettiği bildirilmiştir (Martinez ve ark., 2008; Cho ve ark., 2015).



Şekil 6. miRNA biogenezi modeli (Calore ve Fabbri, 2011).

2.6.1.2. miRNA'nın nükleer işlenmesi

miRNA'ların kendi promotörleri tarafından veya konakçı genlerinin promotörlerini paylaşarak RNA polimeraz II (pol II) veya III (pol III) tarafından birincil miRNA transkriptlerine (pri-miRNA) kopyalandıktan sonra ilk işlenme süreci çekirdekte başlar (Lee ve ark., 2002; Ha ve Kim, 2014). Genel olarak çoğu miRNA genlerinin RNA polimeraz II tarafından hem başlıklı (cap) hem de poliadenilatlı (poliA) mRNA

özelliklerini koruyan birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) olarak kopyalandığını ve Pol II'nın miRNA transkripsiyonundan sorumlu büyük ve mühtemel tek aracısı olduğu ileri sürülmektedir (Lee ve ark., 2004). Bununla birlikte, Alu tekrarları ile ilişkili sınırlı sayıdaki bir miRNA gen grubu üyelerinin ise Pol III tarafından kopyalandığı bildirilmiştir (Borchert ve ark., 2006; Gu ve ark., 2009). Transkripsiyonu yapılan pri-miRNA transkriptleri 60-100 nükleotid uzunluğunda küçük bir saç tokası şeklindeki pre-miRNA oluşturmak üzere, ilk olarak Drosha/DGCR8 nükleer heterodimeri tarafından kesilir. DGCR8, miRNA biyogenezinin ilk adımında yer alan bir RNA bağlayıcı protein olarak işlev gören mikroişlemci kompleksinin temel bileşenidir. DGCR8, pri-miRNA saç tokası yapısının yaklaşık 10 bp'lık N6-metiladenosin modifikasyonu içeren bölgesini tanıyan ve RNase III enzimi Drosha'nın katalitik bölgelerini konumlandıran çift zincirli bir RNA bağlayıcı proteindir (Yeom ve ark., 2006).

2.6.1.3. pre-miRNA'ların nükleustan sitoplazmaya taşınması

Pri-miRNA transkriptlerinin Drosha tarafından işlenmesinden sonra, olgunlaşması için sitoplazmaya taşınması gerekir. Saç tokası şeklindeki pre-miRNA'lar, GTP'ye bağlanan nükleer protein RAN-GTP ve onları sitoplazmaya taşıyan nükleer ihracat faktörü Exportin-5 (EXP-5)'e bağlanarak bir üçlü kompleks yapısı oluşur (Yi, 2003; Bohnsack, 2004; Lund ve ark., 2004). EXP-5, üçlü kompleksin fonksiyonel olarak nükleer por kompleksine bağlanma yeteneği arttırır ve sitoplazmaya taşınmasını sağlar (Wang ve ark., 2011). Kompleksin bir nükleer por kompleksi aracılığıyla sitoplazmaya translokasyonunu takiben, Ran-GTP'nin Ran-GDP'ye sitoplazmik hidrolizi sonucunda meydana gelen konformasyonel değişiklik, pre-miRNA'nın kompleksten ayrılarak sitoplazmaya salınmasına neden olur (Yi, 2003; Kim, 2004).

2.6.1.4. Sitoplazmik pre-miRNA'nın olgunlaşması

Sitoplazmada pre-miRNA'nın olgunlaşması, Dicer olarak adlandırılan RNaz III enzimi tarafından gerçekleştirilir (Hutvagner ve ark., 2001; Ketting ve ark., 2001). Dicer ailesi üyeleri sadece miRNA'ları değil, aynı zamanda çeşitli diğer küçük RNA türlerinin de üretimine katılacağından, Drosha'ya göre daha geniş bir substrat spektrumuna sahiptir (Treiber ve ark., 2018). Bundan dolayı, Dicer proteini, korunmuş bir helikaz alanı, bir veya iki cift iplikli RNA (dsRNA) bağlayıcı alanı ve iki RNaz tip III alanı içermektedir (Bernstein ve ark., 2001; Grishok ve ark., 2001). Dicer, etkili miRNA işlemesi için

kritik öneme sahip olan protein kinaz RNA aktivatörü (PACT) ve transaktivasyon yanıtı RNA bağlama proteini (TRBP) proteinleriyle etkileşerek sitoplazmik RNA'nın indüklediği susturma (RISC) kompleksini oluşturur (Redfern ve ark., 2013). pre-miRNA'nın terminal ilmeği Dicer enzimi ile kesilir ve, ~20-bç'lık olgun miRNA dupleksine dönüşür (Cai X., 2004; Lee ve ark., 2006). Ancak Dicer, kendisi ürettiği bu miRNA dupleksinin Argonaute-2'ye transferini kolaylaştırmak için Argonaute-2 (Ago-2) ile birleşerek RISC yükleme komplekisin (RLC) meydana getirir (Schwarz ve ark., 2003; Khvorova ve ark., 2003; Chendrimada ve ark., 2005; Wang ve ark., 2009). İnsan genomu, her yerde ifade edilen dört Argonaute (hAgo1-4) proteinlerini kodlar, ancak bunlardan sadece Argonaute-2 (hAgo-2) endonükleolitik olarak aktiftir (Sasaki ve ark., 2003; Liu ve ark., 2004; Meister ve ark., 2004). Ek olarak, Ago-2 proteini miRNA dupleksinin hangi ipliğinin işlev göreceğini belirler. Böylelikle, ~22-nt'lik miRNA dupleksinin bir ipliği (rehber iplik veya miRNA) olgun bir miRNA olarak Ago-2'de kalır, diğer kalan ipliği (yolcu ipliği) ise enzimatik olarak degrede edilir. Argonaute-2'ye bağlı rehber miRNA ipliği, RISC'yi, kendi 3'-UTR bölgelerinin tamamlayıcı dizisine sahip olan hedef mRNA'lara yönlendirir (Bartel, 2009). Hedef mRNA'ların etkili bir şekilde bozunması miRNA aracılı deadenilasyon aracılığıyla yapılır. Bu işlem RISC, 182 kDa glisin-triptofan proteini (GW182) proteinlerinin PABP ve deadenilazlarla etkileşimlerini gerektirir (Zekri ve ark., 2009; Huntzinger ve ark., 2012).

2.8. Mikro-RNA (miRNA) ve Kanser

MikroRNA (miRNA)'lar protein kodlamayan (non-coding), 18-22 nüklotid uzunluğunda fonksiyonel RNA dizileri olarak tanımlanır ve miRNA'lar genomun kodlanan (ekson) ve kodlanmayan (intron) bölgeleri olmak üzere genomun çeşitli bölgelerinden kodlanırlar (Peng ve ark., 2016; Amorim ve ark., 2016; O'Bryan ve ark., 2017). miRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer olan hedef mRNA'ları tanıma özelliğine sahiptirler. Böylece, miRNA'lar baz çiftleşme özelliği ile hedefi olan mRNA'lara bağlanır, sonrasında bağlandığı mRNA'lardan protein sentezlenmesinin baskılanmasına veya bağlandıkları mRNA'ların yıkılmasına neden olurlar (Peng ve ark, 2016; Hemmatzadeh ve ark., 2016). miRNA'ların sayısı genlerin sayısıyla kıyaslandığı zaman, miRNA miktarı az olmasına rağmen, bir miRNA birden fazla çok sayıda mRNA'nın hatta 100'ün üzerinde mRNA'nın düzenlenmesinde görev alır (Peng ve ark., 2016). Bu nedenle miRNA'lar, hücre farklılaşması, proliferasyon ve apopitozu içeren

birçok normal biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (Amorim ve ark., 2016).

Hücrede miRNA'ların fonksiyonlarındaki veya ekspresyon seviyelerindeki bozukluklar başta kanser olmak üzere birçok hastalık gelişiminde anahtar rol oynarlar (Peng ve ark., 2016; Amorim ve ark., 2016; Hemmatzadeh ve ark., 2016). miRNA'ların düzenlenmesindeki bozukluklar, nokta mutasyonları, amplfikasyon ve delesyonları içeren genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkar. Hatta insan miRNA'ların yaklaşık %50'si genomun frajil bölgeleri olarak bilinen alanlarda bulunur ve bu frajil bölgeler kanserle işkili olan yerlerdir. Bu yüzden miRNA'lar çeşitli kanserlerin birçok basamağında görev alırlar (Amorim ve ark., 2016).

Kanser hücrelerinde, miRNA'lar hedefledikleri mRNA'lara bağlı olarak tümör süpresör ve onkogen olarak fonksiyon gösterebilirler. Hatta bulundukları şartlara bağlı olarak bazı miRNA'lar ise hem tümör süpresör hemde onkogen karakter gösterebilirler. Bir onkogenin ekspresyonunu kontrol eden miRNA'lar tümör süpressör miRNA'lar olarak bilinmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Tümör supressör mikroRNA'lar onkoprotein kodlayan mRNA'ları hedefleyip bu miRNA'lardan onkogenik proteinlerin sentezlenmelerini durdurdukları için, bu mikroRNA'ların ekspresyon düzeyleri azalınca, hücre yaşam süresini uzatan ve proliferasyonu arttıran onkoproteinlerin sentezinin artmasına neden olmaktadırlar. Bunun tersi olarak, onkogen olan ve onko-mir olarak ifade edilen miRNA'ların ise kanser gelişimini arttırdığı görülmektedir. Çünkü, onkogen mikroRNAlar, tümör supresör proteinleri kodlayan mRNA'ları hedefler ve böylece bu mRNA'lardan proteinlerin sentezlenmesini baskılayarak, hücre proliferasyonunu arttırırlar (Amorim ve ark., 2016; O'Bryan ve ark., 2017). Sonuç olarak mikroRNA'lar, onkogen ve tümör süpresör mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görüp, fonksiyonlarını bu mRNA'lar üzerinden gösterirler (Peng ve ark., 2016; Hemmatzadeh ve ark., 2016; Khordadmehr ve ark., 2019).

Düzenlenmesi/fonksiyonu bozulmuş miRNA'ların, kanserin başlamasının yanısıra progresyonunda, invazyonuunda ve metatazında da rol oynadığı gösterilmiştir (Lin ve Gregory, 2015). Meme kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda da normal hücresel miRNA'ların fonksiyonlarında ve ekpresyon seviyelerindeki bozuklukların kanserin başlamasında ve ilerlemesinde etkili rol oynadığı rapor edilmiştir.

2.8.1. miR-484

Kanser hücrelerinde birçok miRNA tanımlanmış olup, bu miRNA'ların kanser hücrelerinde proliferasyon, invazyon, metastaz, apoptoz ve ilaç dirençliliği gibi birçok hücresel aktiviteleri düzenlediği bildirilmiştir. Bazı kanser hücrelerinde bu yolakların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan biri de miR-484 olarak gösterilmiştir (Li ve ark, 2017; Hu ve ark, 2017; Zhang ve ark, 2018). miR-484, kromozom-6 üzerinde lokalizedir ve kanser tiplerine göre ekspresyonunda düzensizliklerin olduğu tespit edilmiştir. Bazı kanserlerde miR-484'ün yüksek oranda eksprese edilerek onkogenik rol oynadığı, buna karşılık bazı kanserlerde miR-484'ün ekspresyonun düşük olduğu ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Hu ve ark, 2017; Zare ve ark, 2018; Lu ve Lu, 2015; Li ve ark, 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013). Örneğin, meme kanser hastalarının klinik örneklerinde miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu, hücrelerde proliferasyonu, kemorezistansı arttırdığı bildirilmiş ve onkogenik miRNA olarak davrandığı gösterilmiştir (Ye ve ark, 2015; Zearo ve ark, 2014). Benzer şekilde, hepatosellüer karsinomada, yumurtalık kanserlerinde ve renal karsinomlarda da miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu ve hastalığın progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013). Yine küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin (NSCLC) ksenograft fare modellerinde, miR-484'ün ekspreyonu artmasının tümör büyümesini arttırdığı, böylece NSCLC'nin ilerlemesini teşvik etmek için bir onkogen olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Li ve ark., 2017). Buna karşılık, gastrik ve kolerektal kanserlerde miR-484'ün ekspresyonun düşük olduğu ve tümör supressör olarak davrandığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018; Lu ve Lu, 2015). Benzer şekilde, servikal kanser hücrelerinde de miR-484'ün aşırı ekspresyonunun, hücre çoğalmasını, göçünü, istilasını ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'i önemli ölçüde inhibe ettiği ve tümör supressör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Hu ve ark., 2017). Dolayısıyla miR-484'ün kanserlerdeki rolü ile ilgili sınırlı sayıda yapılan çalışmaların bulguları birbiriyle çelişmektedir.

GBM'lerde de invazyon, metastaz ve ilaç dirençliliği gibi hücresel aktivitelerin düzenlenmesinde etkili olan çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2019b; Mercatelli ve ark., 2017; Luo ve ark., 2015). Ancak GBM'lerde miR-484'ün rolü henüz araştırılmamış olup, sadece bir çalışmada gliom kök hücrelerinde miR-484'ün rolü

araştırılmış ve glioma tümörlerini başlatan özellikleri arttırdığı bildirilmiştir (Yi ve ark., 2018).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışması; ERÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) TDK-2019-9172 nolu proje ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı 119S935 nolu projesi 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 Cihaz ve Sarf Malzemeleri

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihaz ve Markası	**Kullanım amacı**
Laminar Akım Kabini (Clean Air, Class II), Esco Airstream	Hücre kültürü için
CO_2'li İnkübatör (MCO-19 A/C (UV)), Panasonic	Hücrelerin çoğaltılması için
Santrifüj (Soğutmalı), Beckman Counter	Hücrelerin santrifüjleme işleminde
Hassas Terazi, Sonyo	Tartma işleminde
Su banyosu, Sanyo	Hücre kültürü çalışmalarında
Çalkalayıcı, Heidolph	Tamponların hazırlanmasında
-20°C Derin Dondurucusu, Uğur	Sarf malzeme ve kimyasalların muhafaza edilmesi
Buzdolabı +4°C, Siemens	Sarf malzeme ve kimyasalların muhafaza edilmesi
İnvert Mikroskop, Leica	Hücre sayımı ve hücrelerin takibi ve görüntülerinin alınması için
Otoklav (CL-40M), Alp	Sterilizasyon yapılmasında
Pipet Tabancası, Gilson	Hücre kültürü çalışmalarında
Mikropipet seti, Gilson	Hücre kültürü çalışmalarında
Vorteks, Heidolph	Hücre kültür çalışmalarında
Manyetik Karıştırıcı, Heidolph	Tamponların hazırlanmasında
Biorad Western Görüntüleme Cihazı (ChemiDoc MP), BioRad	Western blot çalışmasında protein görüntülemesi için
SDS PAGE Sistemi, BioRad	Western blot analizinde proteinlerin yürütülmesi
ELISA Algılama Sistemi, Promega	Hücre cnalılık testi, MTS ve protein konsantrasyon ölçümü için

Thoma Lamı, Neubauer	Hücre sayımında
Doku parçalayıcı veya homojenizatör, Scilogex	Total RNA izolasyonunda doku parçalanması için
Thermal Cycler PCR cihazı, Sensoquest	cDNA Sentezi için
Roche Light Cycler® 480 II Real Time PCR Cihazı, Roche	RT-PCR Analizi için
Plakalı santrifüj PerfectSpin P, PeqLab	PCR plakasının spin edilmesi için
BioSpec-nano Yaşam Bilimi (DNA/RNA/protein) Spektrofotometresi, Shimadzu-Biotech	RNA konsantrasyonu ve saflığının ölçülmesi için

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf Malzemeler ve Markası	**Kullanım amacı**
DMEM/F-12 Besiyeri, BI	Besiyeri hazırlanması
Fetal Bovine Serum (FBS), Gibco	Besiyeri hazırlanması
L-Glutamine, Gibco	Besiyeri hazırlanması
Penisilin-Streptomisin, Gibco	Besiyeri hazırlanması
Tripsin-EDTA (%0,05), Gibco	Hücre pasajlanması
5 ml, 10 ml, 25ml'lik Serolojik Pipet, Greiner	Hücre kültür çalışmaları
Steril 6, 24, 96 Kuyucuklu Kaplar, Greiner	MTS, klonojenik ve migrasyon (yara kapanması) deneyleri
Pipet uçları (0,5-10, 10-100, 200-1000 µl), Greiner	Hücre kültür çalışmaları
$25cm^2$ ve $75cm^2$'lik Hücre Kültür Kapları, Greiner	Hücrelerin çoğaldığı kültür kapları
Steril Cryo Tüp, Isolab	Hücrelerin dondurulması
Fosfat Buffer Saline (PBS), Biochrom	Hücre kültürü çalışmaları
Metanol, Merck	Western blot analizi ve Kristal viyole (%10) çalışma tamponu hazırlanması
Dimetilsülfoksit (DMSO), Merck	Hücrelerin dondurulması
Blotting Grade Blocker, BioRad	Western blot analizi
Tween 20, BioRad	Western blot analizi
Glycine, Sigma	Western blot analizi
Tris, Merck-Millipore	Western blot analizi
Immun Blot PVDF Membran, BioRad	Western blot analizi
Jel (Mini-Protean TGX, Precast Gel), BioRad	Western blot analizi
Filtre Kağıdı (BioRad Thick Blot Paper), BioRad	Western blot analizi
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), Gibco Invitrogen	Hücre kültürü çalışmaları
Mutlak etanol ve 70% Etanol, Merck	Hücre kültürü çalışmaları
miRNA mimik (hsa-miR-484 MC10379), Sigma-Aldrich	U87-mutant ve mutant olmayan GBM hücrelerinde miR-484'ün ekspresyonunu indüklemek için
miRNA inhibitor (hsa-miR-484 MH10379), Sigma-Aldrich	U87-mutant ve mutant olmayan GBM hücrelerinde miR-484'ün

	ekspresyonunu baskılamak için
Hyperfect transfeksyon ajanı, Qiagen	miRNA'ların hücrelere transfeksyonu
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS Reagent powder), Promega	Hücre canlılık (MTS) testi
Phenazine methosulfate (PMS), Sigma	Hücre canlılık (MTS) testi
Fosfataz inhibitör kokteyl, Sigma	Protein izolasyonu
Proteaz inhibitör kokteyl, Sigma	Protein izolasyonu
Kristal Viyole (violet) Çözeltisi (%10), Sigma	Hücreleri boyamak için
İnsert, 24 well format, 8.0 µm, Corning	İnvazyon analizi
Matrigel Basement Membrane Matrix, Corning	İnvazyon analizi
PureZol isolation reagent, Ambion	Doku ve hücre örneklerinden total RNA izolasyonunda
Kloroform, Merck	Total RNA izolasyonu
İzoproponol, Merck	Total RNA izolasyonu
%70 Etanol, Merck	Total RNA izolasyonu
Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit 20 reaksiyon, Takara	cDNA sentezi
Mir-X™ miRNA qRT-PCR TB Green® Kit 200 reaksiyon, Takara	miRNA'nın kantitatif PCR'ı (qPCR)
hsa-miR-484 primeri, 5'- TCA GGC TCA GTC CCC TCC CGA T-3', IDT	hsa-miR-484'ün ekspresyonu
Nükleaz Free Water, Qiagen	Primerlerin sulandırması ve RNA izolasyonu için
1,5 ml ve 2 ml'lik ependorf tüp, Greiner	PCR testi için karışımın hazırlanması
Light Cycler PCR Multiwell plate, Roche	miR-484'ün ekspresyon seviyesinin belirlenmesi

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Tamponu

- 1 ml Hücre lizis tamponu
- 10 µl Proteaz inhibitör kokteyl
- 10 µl Fosfataz inhibitör kokteyl
- 4 µl NaF

Yürütme ve Transfer Solüsyonu 1L (10X)

- 30 gr Tris-Base
- 144 gr Glisin

Yürütme Solüsyonu 1L (1X)

- 100 ml 10X Yürütme Solüsyonu

- 890 ml dH_2O
- 10 ml %10 SDS

Transfer Solüsyonu 1L (1X)

- 100 ml 10X Transfer Solüsyonu
- 200 ml Metanol
- 700 ml dH_2O

Tris Buffered Saline 1L (TBS) (10X)

- 31.5 gr Tris-HCl
- 80 gr NaCl

TBS-Tween 20 (TBS-T) Çalışma Solüsyonu (1L)

- 100 ml 10X TBS Tamponu
- 898 ml dH_2O
- 2 ml Tween-20

Non- Fat Dry Milk Solüsyonu

- 350 mg non-fat dry milk
- 7 ml TBS-T

Kristal Viyole Boya Solüsyonu

- 0,2 gr Kristal Viyole
- 40 ml Metanol

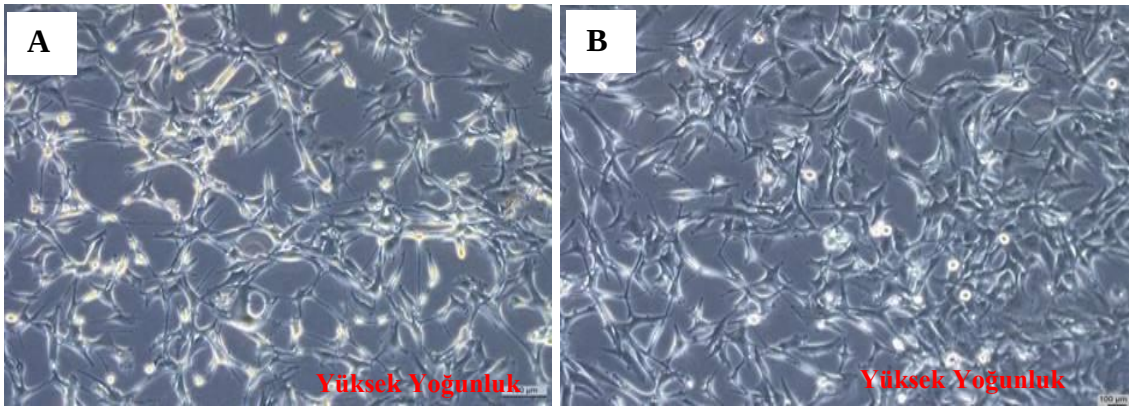
3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre kültürü

Çalışmamızda kullanılan hücreler, steril şartlar altında uygun büyüme besiyeri (medya) kullanılarak önce %5 CO_2 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.

3.2.1.1. Kullanılan hücre hatları

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



Şekil 7. U-87 mutant ve mutant olmayan hücre hatları: A) U-87 MG (IDH mutant olmayan) hücre hatı mikroskobik görüntüsü (Hamurcu Laboratuvar çekimi/Erişim tarihi: 2.11.2020). **B)** IDH1 Mutant U-87 İzojenik hücre hatı mikroskobik görüntüsü **(**ATCC/Erişim tarihi: 2.11.2020).

3.2.1.2. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

Deney süresince tüm hücre kültürü aşamaları, çalışma 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 üstünde erimeye bırakıldı. Çözünen hücreler 15 ml'lik steril falkon tüpe alındı ve üzerine 9 ml FBS (+) besiyeri eklendi ve 1500 rpm +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1ml FBS (+) besiyeri eklenerek, pipetaj yapıldı. Hücre kültürü için pelletin büyüklüğüne göre 25 cm^2 ya da 75 cm^2'lik flask tercih edildi. Tercihe göre, 25 cm^2'lik flask içerisine 4 ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 10 ml FBS (+) besiyeri eklendi. Besiyeri içerisine hücreler eklendi ve 37°C %5 CO_2'li inkabatörde inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

Bu süreç içerisinde hücreler inverted mikroskopta incelendi. Hücrelerin flasklardaki yoğunluğu %80-90'lara ulaştığı zaman (konfluense) flask içerisindeki ölü hücreleri ve artıkları uzaklaştırmak için besiyeri atıldı ve flask tabanına tutunan hücreleri kaldırmak amacıyla 75 cm^2'lik flask'a 3 ml, 25 cm^2'lik flask'a 2 ml %0.05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C %5 CO_2'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

aktarıldı ve 1500 rpm +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, supernatant kısmı atıldı, kalan pellet medyumla çözdürüldü ve medyum içeren yeni flasklara transfer edildi vee hücrelerin bu şekilde pasajlanması ile hücrelerin sürekli çoğaltılması sağlandı.

3.2.1.3. Besiyeri Hazırlanması

DMEM/F12 medyum ortamına, inaktive edilmiş FBS (%5), L-glutamin (%1) ve Penisilin/Streptomisin (%1) ilave edilerek hücrelerin çoğalması için uygun besiyeri hazırlandı. Hazırlanan medyum kullanıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi, kullanmadan önce çıkartılarak su banyosunda 37 °C'ye getirildi, daha sonra çalışmalarda kullanıldı.

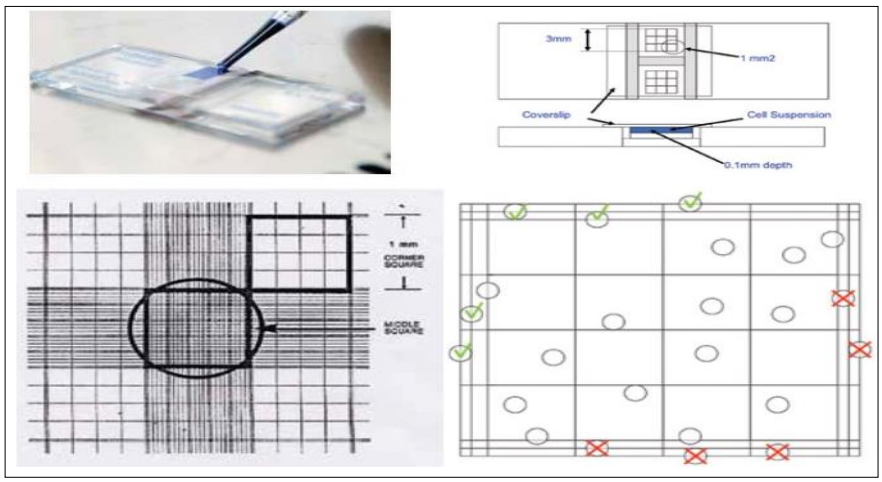
3.2.1.4. Hücrelerin dondurulması

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

3.2.1.5. Hücrelerin sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, Thoma lamı kullanıldı. Santrifüj edilerek toplanmış hücre pelleti taze medyum içerisinde çözdürülerek süspanse edildi. Sonra bu hücre süspansiyonundan 10µl alınarak Thoma lamına konuldu ve üzeri lamelle kapatıldı. Daha sonra invert mikroskop kullanılarak 40x büyütmede uygun karelerde yer alan canlı hücreler sayıldı ve ortalaması alındı (Şekil 8). Falkondaki hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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



Şekil 8. Thoma lamının sayım yapılan kareleri (Toplam görüş sahası) (Freshney ve ark., 2000).

3.2.1.6. Kullanılan mikroRNA (miRNA) 'lar ve hazırlanması

Çalışmamızda GBM hücrelerinde mir-484'ün bir onkogen mi olarak yoksa tümör süpressör olarak mı görev yaptığını tespit etmek için, mir-484'ün ekspresyonun baskılayacak inhibitör-mir-484 ve mir-484'ün ekspresyonunu artıracak mimik-mir-484 kullanıldı. Ayrıca tüm deneylerimizde negatif kontrol olarak (herhangi bir genin ekspresyonunu etkilemeyen) kontrol-miRNA kullanıldı. Bu miRNA'lar son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde nukleaz-free su ile laminar hava akımlı kabinde hazırlandı. Amacımıza uygun miRNA'lar, SASI_Hs numaralarına göre Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

3.2.1.7. Hücrelerin miRNA ile Transfeksyonu

Hücrelerin miRNA ile transfeksiyonu için transfeksiyon ajanı olarak hiperfekt kullanıldı. Tüm deneylerimizde hücrelerin çoğaltıldığı kültür ortamına son konsantrasyonu 50 nM olacak şeklide miRNA'lar eklendi ve tüm deneylerimizde hücrelerin 72 saat miRNA'larla transfekte edilmesi sağlandı. Bunun için, deneyin amacına uygun şeklide hücreler kültür kapların ekildi ve 37°C'de CO_2'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan 24 saat sonra hücrelerin çoğaldıkları kültür ortamına miRNA'lar eklendi ve 72 saat boyunca 37°C'de CO_2'li etüvde tranfeksiyonu sağlandı. 72 saat dolunca kültür sonlandırıldı ve deneyin amacına uygun testler yapıldı. Tüm işlemler steril şartlarda laminar air flow kabinde yapıldı.

3.2.2. Hücre Proliferasyon/Büyüme Analizi

Hücrelerin proliferasyon/canlılık oranını analiz etmek için MTS analizi kullanılır. Bu analiz için, çalışmamızda kullanılan U87 mutant ve U87 mutant olmayan hücreler uygun sayıda (1000 hücre/100 µl) 96'lık kaplara ekildi ve 37°C'de CO_2'li etüvde inkübe edildi. Bir kısım hücreler inkübasyonlarının 24.saatinde inhibitör-mir-484 ve mimik-mir-484 ile transfekte edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücrelere ise kontrol-miRNA ile transfekte edildi ve bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. Kültür süreleri dolunca kültür sonlandırılarak hücreler MTS/PMS solüsyonu ile muamele edildi. Bunun için; MTS/PMS (phenazine methosulfate) solüsyonundan (1000:50) her kuyucuğa 20 µl eklenerek yaklaşık 2-3 saat etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.1. Klonojenik Tespiti

Kanserli hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma düzeylerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bunun için hücre tipine uygun medya bulunan 6'lık kaplara uygun miktarlarda U87 mutant ve U87 mutant olmayan hücrelerin ekimi yapıldı. İnkübasyonlarının 48. saatinde bir kısım hücreler inhibitör-miR-484 ve mimik-mir-484 ile transfekte edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücreler kontrol-miRNA ile transfekte edildi ve bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. Transfeksiyon sonrası 10-12 gün boyunca 37°C'de inkübasyona tabii tutularak bu hücrelerdeki klon oluşumu incelendi. Uygulama yapılmayan hücrelerde yeteri kadar klon oluşumu tespit edildiğinde (kabın tabanı tamamen dolduğunda) kültür sonlandırıldı. Hücrelerin bulunduğu ortamdan medya uzaklaştırıldı ve metanolle hazırlanmış %10'luk kristal-viyole ile hücrelerin boyanması sağlandı. Daha sonra kaplar oda ısısında kurutulunca hücre kolonileri sayılarak analiz edildi.

3.2.2.2. Migrasyon tespiti (Wound healing assay)

Kanser hücrelerinin migrasyon düzeyini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. miRNA (inhibitör-miR-484 ve mimik-mir-484)'ların GBM hücre hatlarının migrasyon kapasitesi üzerindeki etkilerini görmek için migrasyon (yara iyileşme) deneyi yapıldı. Bunun için hücre tipine uygun medya bulunan 6'lık kaplara uygun miktarlarda hücreler ekildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde bir kısım hücreler inhibitör-miR-484 ve mimik-mir-484 ile transfekte edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücreler kontrol-miRNA ile transfekte edildi ve bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. İnkübasyonun 72. saatinde hücreler inkübatörden çıkartıldı ve laminar air flow kabinde

hücrelerde steril pipet ucu kullanılarak yara oluşturuldu. Daha sonra her kuyunun görüntü koordinatları her çekim gününde aynı saatte olacak şekilde oluşturulan yara boşluklarının 0., 24. ve 48. saat mesafelerinin görüntülenmesi kamera ataçmanlı mikroskop kullanılarak yapıldı ve bu hücreler tekrar inkübatöre konuldu. Yara oluşumunun tüm saatlerde yara mesafesinin ölçümüiçin kaplar inkübatörden alınıp ortamdan medya uzaklaştırıldı ve hücrelerin PBS ile yıkaması yapıldı. Yara kapanması kontrol olarak kullandığımız hücreler kontrol-miRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde takip edildi, bu hücrelerde 48. saatinde yara tamamen kapandığı için kültür sonlandırıldı. Görüntülenme sonrası yara kapanma oranı ImageJ programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.2.3. İnvazyon tespiti

10 ml medyum içeren kültür flasklarına 350.000 hücre ekildi ve inkübasyonun 24. saatinde hücrelerin bulunduğu ortama (U87 ve IDH1-mutant-U87) son konsantrasyonları 50 nM olacak şekilde inhbitör-miR-484, mimik-miR-484 ve konrol miRNA'lar ilave edilierek hücrelerin transfeksiyonu sağlandı. miRNA transfeksiyonun 72. saatinde hücreler toplandı. Sonra hücreler toma lamında sayıldı ve tüm hücreler eşit miktarda (70.000 hücre/100 µl medyum) önceden hazırlanmış matriks jel içeren insert'lere (8.0µm) transfer edildi ve 24 saat inkübe edilerek invazyonu sağlandı. 24 saat sonra kültür sonlandırıldı. Ortamdaki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler fikse edilerek boyandı. Sonra boyanmış olan insertler kesildi ve lama yerleştirildi, preparat hazırlandı. Daha sonra kamera ataçmanlı mikroskop kullanılarak preparatların görüntüsü alındı ve matriks jelin bir tarafından diğer tarafına geçen hücreler sayılarak invazyon yapan hücre oranı hesaplandı (Hamurcu ve ark., 2016, 2018; 2019). Bu deney 3 kez tekrar edildi.

İnsertlerin hazırlanması; Matriks jelin (Corning), laminar-air flow kabin içerisinde buz üzerinde erimesi sağlandı. Sonra 200 µl jel ve 3 ml serum free medyumdan oluşan bir miks hazırlandı. Daha sonra 24'lük kapların içerisine yerleştirilmiş insertlerin üzerine bu karışımdan 100 µl eklendi ve jel donuncaya kadar 1-2 saat laminar-air flov kabinde bekletildi. Jel donduktan sonra üste kalan medyum pipet yardımı ile alındı ve 24'lük kabın kapağı kapatılarak alimünyum folya ile sarıldı, +4 °C'de bir gece bekletildi ve daha sonra hücreler inavzyon analizi için hazır hale getirildi.

3.2.2.4. Western Blot Analizi

Hücrelerin lizis edilmesi ve protein izolasyonu

Western blot analizi hücrede hedefe yönelik spesifik protein seviyelerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. İnhibitör-miR-484 ve mimik-mir-484 ile transfekte edilen IDH-mutant ve IDH-mutant olmayan GBM hücrelerinde hedef proteinlerin (proliferasyon, klonojenik, migrasyon ve apoptoza direncinde rol alan, Src, Fak, İntegrin-β1, Siklin-D1, FOXM1, eF2K, kaspaz-3, kaspaz-9, kaspaz-8) ekspresyon seviyelerini belirlemek için Western blot analizi yapıldı. Bunun için, uygun sayıda hücreler önce T-25'lik flasklara ekildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde bir kısım hücreler inhibitör-miR-484 ve mimik-mir-484 ile transfekte edildi. Kontrol olarak kullandığımız bir kısım hücreler kontrol-miRNA ile transfekte edildi ve bir kısım hücrelere de hiçbir uygulama yapılmadı. İnkübasyonun 72. saatinde kültür sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Hücrelerin toplanması için; hücrelerin bulunduğu ortamdaki medya uzaklaştırıldı ve üzerine 2 ml tripsin ilave edilip, 3 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flaskın tabanından kalkması sağlandı. Sonrasında ortama tripsin miktarının 2 katı kadar medya eklendi ve sonrasında elde edilen hücre süspansiyonu falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 1 ml PBS eklenip süspanse edildi. Ependorf tüpe alınan süspansiyon 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve dipte kalan hücreler lizis edildi. Hücrelerin lizisi ve protein izolasyonu için; pellet miktarına bağlı olarak üzerine lizis buffer ilave edildi ve sonrasında buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Ardından hücreler seri bir şekilde 30 saniye vortekslenerek 15 dakika yine buz üzerinde inkübe edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Vorteks basamakları sonrasında hücreler 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Sonrasında, içerisinde protein bulunan süpernatant temiz ependorf tüpe alındı. Daha sonra izole edilen proteinleri konsantrasyonları hesaplandı. Protein konsantrasyonlarının hesaplanması için; yeni ependorflara izole edilen proteinlerden 2 µl alınarak üzerine 12 µl distile su (dH_2O) ilave edildi. Sonra, 96 kuyucuklu plakalara hazırlanan protein standartlarından ve seyreltilen protein karışımından 5'er µl eklendi. Her standart ve protein örnekleri ikili çalışıldı. Protein örneklerinin ve standartların üzerine Reagent A + Reagent S karışımından 20 µl ilave edildi. Ardından herbirine 175 µl Reagent B eklendi ve 3 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra Eliza okuyucuda 750 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ölçüm sonrası protein standartlarının

değerleri kullanılarak bir standart eğri elde edildi. Protein konsantrasyonu hesaplandı ve western blot analizinde jele yüklenecek protein miktarları belirlendi.

Proteinlerin Jele yüklenmesi

750 nm dalga boyunda elde edilen absorbans sonuçlarına göre protein konsantrasyonu 40 µg olacak şekilde örneklerden alınacak miktar hesaplandı ve ependorflara hesaplanan miktarlarda protein ve 17 µl loading buffer eklendi. Son hacim 52 µl olacak şekilde dH_2O eklendi. Isıtıcıda 5 dk 99°C'de inkübe edildi. Western tankının içerisine running buffer eklendi ve uygun bölmeye jel yerleştirildi. Jeldeki kuyucuklara protein markerdan 10 µl, örneklerden 40 µl yüklendi. Güç kaynağı 50 volt'a ayarlanarak yaklaşık 2-3 saat proteinlerin jelde ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı.

Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Jelin büyüklüğüne göre membran ve filtre kağıtları kesildi. Membranın sağ üst köşesi etiketlendi. Membran önce methanol, sonra dH_2O'da bir süre bekletildi. Filtre kağıtları ve sünger transfer buffer içerisinde ıslatıldı. Yürütülen jel çıkartıldı ve sandviç modeline gore transfer aparatına yerleştirildi. Bu modele göre sırayla; sünger, filtre kağıdı, membran, jel, filtre kağıdı, sünger şeklinde yerleştirildi. Sonrasında transfer aparatı, transfer solusyonu içeren transfer tankına yerleştirildi. Daha sonra, +4 °C'de buz aküleri ile desteklenen transfer solüsyonu içerisinde 24 mA akımda bütün gece bekletilip proteinlerin jelden polivinilidin membran (PVDF) membrana aktarılması sağlandı. Transferin sonunda membran, 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu içeren solüsyonu ile bloklandı ve sonrasında membran 3 kez 5'er dakika periyotlarla çalkalayıcı üzerinde TBS-T solüsyonunda yıkandı. Daha sonra hedeflediğimiz proteinlerin ekspresyonunu belirlemek için Src (Proteintech, 11097-1-AP), Fak (Proteintech, 12636-1-AP)**,** İntegrin β1 (Proteintech, 12594-1-IG), Siklin-D1 (Proteintech, 60186-1-IG), FOXM1 (Cell Signalling, 5436S), eF2K (Proteintech, 13510-1-AP)**,** kaspaz-3 (Proteintech, 19677-1-AP), kaspaz-9 (Proteintech, 10380-1-AP), kaspaz-8 (Cell Signalling, 9746S) antikorları ile membran bütün gece +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra Horseradish Peroxidase (HRP) ile işaretlenmiş sekonder antikor ile muamele edildi. Sonrasında yıkamalar yapıldı ve hedef protein eskpresyonlarını belirlemek için standart Enhanced chemiluminescence (ECL) metodu kullanılarak membran BioRad kemolümünesan cihazında görüntüleme yapıldı. Yükleme kontrolü olarak β-aktin (Proteintech, 60008-1-IG) kullanıldı. ImageJ programı

kullanılarak hedef proteinlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

3.2.2.5. Gen Ekspresyonunun Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile Analizi

3.2.2.5.1. Örneklerin toplanması ve hasta gruplarının oluşturulması

Mevcut tez çalışmasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi polikliniğine başvuran, GBM ön tanısı almış ve cerrahi müdahale kararı verilmiş, onamı alınmış 18 yaş üstü gönüllü erkek ve kadın toplam 37 hastanın tümör doku örnekleri alındı. Çalışmanın yapılabilmesi için 03.04.2019 tarihli Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Yerel Etik Kurulundan izin alındı (Karar no: 2019/247). Doku örneği alınan 37 hastadan bir tanesi patoloji sonuç raporuna göre menengiom, diğeri ise anaplastik ependinom tanısı aldığı için çalışmamızdan çıkartıldı. İki hastanın ise nüksettikten sonraki 2. cerrahi doku örneği alınmış olup, primer (ilk cerrahi) doku örneği alınmamıştır. Bu nedenlerden dolayı, patolji sonuç raporuna göre GBM ön tanısı almış 33 hastanın doku örneği çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamız için etik kurul onayı alındıktan hemen sonra hastalardan örnekler toplanmaya başlandı. Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğretim Üyesi Halil Ulutabanca'tarafından yapılan ameliyatlar sırasında hastalardan alınan doku örnekleri cryo tüp içerisinde buz üzerinde hızlı bir şekilde Betül Ziya Genom ve Kök Hücre Merkezine transfer edildi. Doku örnekleri çalışılıncaya kadar nitrojen tankında depolandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, histolojik dereceleri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmaya dahil edilen glioma hastalarının özellikleri

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Histolojik derecesi	IDH1
MT	65	E	IV	-
SK	40	E	II	+
AD	34	E	II	-
TA	52	E	IV	-
CA	57	E	IV	-
HMG	57	E	IV	-
TD	37	K	II	-
FD	54	K	IV	-
PS	72	K	IV	-
FŞ	40	K	II	+
HK	54	E	IV	-
HSS	60	K	IV	-
MC	62	E	IV	-
PA	55	K	III	+
KC	53	K	IV	-
KD	65	K	IV	-
SÇ	59	K	IV	-
Mİ	66	E	IV	-
MK	54	K	IV	+
KÇ	48	E	IV	-
EÇ	46	K	II	+
İEA	28	E	IV	-
HÖ	53	K	IV	-
AOC	45	E	IV	+
İÖ	38	E	IV	-
MA	55	E	IV	-
SK	26	K	IV	-
AK	42	E	IV	-
BA	58	E	IV	-
AA	33	E	II	+
SD	43	K	III	-
SS	33	E	III	+
MH	26	K	III	+

IDH1: İzositrat dehidrogenez 1 geni, +: mutasyon var, -: mutasyon yok

Çalışmamıza dahil edilen hastalardan 15'ü kadın ve 18'ü erkek hastadır. DSÖ derecelendirmesine göre: bu hastalardan derece-II (6 hasta), derece-III (4 hasta), derece-IV (23 hasta), IDH (+) (9 hasta) ve IDH1 (-) (24 hasta) (Tablo 6).

Tablo 6. Doku örnekleri çalışılan hastaların özellikleri

	Daha once tedavi görmemiş glioma hastalar (n)
Hasta sayısı (n)	33
Yaş ortalamaları (yıl)	48.79 ± 12.36
Cinsiyet	
Kadın	15
Erkek	18
Histolojik derece	
I	-
II	6
III	4
IV	23
IDH mutasyon durumu	
Yabanıl tip (IDH -)	24
Mutant (IDH +)	9

3.2.2.5.2. Total RNA İzolasyonu

Doku örneklerinden total RNA izolasyonu: Ameliyat sırasında hastalardan alınan taze doku örnekleri buz üzerinde hızlıca Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezine transfer edilidi, çalışılıncaya kadar nitrojen takında depolandı. Çalışma yapılacağı zaman doku örnekleri nitrojen tankından çıkatılarak buz üzerinde erimesi sağlandı. Sonra hemen örneklere 300 µl PureZol ilave edildi ve doku örnekleri PureZol içerisinde doku parçalayıcısında homojenize edildi. Daha sonra homojenize edilen dokuların üzerine 300 µl daha PureZol eklendi ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi.

Hücre hatlarından total RNA izolasyonu: Hücreler 2 ml medyum içerisinde 500.000 hücre olacak şekilde 6'lı kaplara ekildi ve 37 °C'lik CO_2'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde IDH-mutant olmayan U-87 ve IDH-mutant-U-87 hücrelerin bir kısmı kontrol miRNA, bir kısmı inhibitör-miR-484, bir kısmı mimik-miR-484 ile 72 saat transfekte edildi, bir kısmına ise hiçbir uygulama yapılmadı (bazal seviyede miR-484 ekspresyonunu belirlemek için). Daha sonra hücrelerin inkübasyon süreleri tamamlanınca, bu hücrelerin üzerine 1000 µl PureZol ilave edildi pipetaj yapılarak hücreler homojenize edildi ve homojenize hücreler 6'lı kaplardan epondorf tüplere transfer edildi.

Bu aşamadan sonra total RNA izolasyonu için hem doku örneklerine hem de hücrelere aynı işlemler uygulandı: Homojenize olan doku örnekleri ve hücrelerin üzerine 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye vortekslenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 12000 g'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj edildi ve aköz faz yeni ependorf tüpe alındı. Üzerine 500 µl izopropanol eklendi (aköz faz miktarına bağlı olarak) ve tüp birkaç kez alt üst edildi. Daha sonra -20°C'de bir saat inkübe edildikten sonra 12000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı, üzerine 1 ml %75 etanol eklendi, alt-üst edildi. 7500 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atıldı. Sonrasında 5-10 dakika oda ısısında kurutularak üzerine 50 µl Nuclease-Free su ilaveedildi ve pellet resüspanse edildi. Resüspanse edildikten sonra +4°C buzdolabında 10-15 dakika bekletildi. Elde edilen RNA örneğinin Nanodrop cihazında ölçümü yapıldıktan sonra ve çalışılıncaya kadar RNA örnekleri -80 °C ye kaldırıldı.

3.2.2.5.3. cDNA Sentezi

Hem doku örneklerinden hem de tüm hücre gruplarından izole edilen total RNA örnekleri komplementar DNA (cDNA)'ya çevrildi.

cDNA izolasyonu için aşağıda belirtilen miktarlarda her bir örnek için reaksiyon karışımı hazırlandı.

cDNA Reaksiyonun Hazırlanması

İçerik	Her bir örnek için
mRQ Buffer(2x)	5 µl
PCR Grade Water	0,75 µl
RNA örneği	3 µl
mRQ Enzyme	1.25 µl

Daha sonra her bir tüpün üzerine 3'er µl RNA örnekleri eklendi ve 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu süre sonunda her bir tüpe 1,25 µl mRQ enzimi eklendi. Ardından da cDNA sentezi için aşağıda belirtilen reaksiyon şartlarında PCR yapıldı.

PCR programı

37 °C	**60 dakika**
95 °C	5 dakika
4 °C	∞

3.2.2.5.4. RT-PCR ile miRNA ekspresyon çalışması

Tümörlü doku örneklerinde ve mimik-484, inhibitör-mir-484, kontol miR-484 ve muamelesiz hücre gruplarında miR-484 ekspresyon profilini belirlemek için miR-484'e spesifik primer dizayn edildi. İnternal kontrol olarak U6 ve SNORD61 (small nuclear RNA) primerleri kullanıldı. miR'lerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için LightCycler 480 II Real-Time PCR cihazı kullanıldı.

mir-484 ekspresyon ve internal kontrol olarak U6 ve SNORD61 çalışması için, elde edilen cDNA örnekleri Nükleaz Free su ile 1/50 oranında seyreltildi ve aşağıda belirtildiği şekilde 2 µl cDNA örneği içeren reaksiyon miksi hazırlandı ve 96'lık kabın her bir kuyucuğuna total 20 µl karışım ilave edildi.

miR-484 ekspresyon çalışması için hazırlanan karışım

İçerik	**Her bir örnek için**
TB Green Advantage qPCR Premix (2X)	10 µl
hsa-miR-484	0,5 µl
mRQ 3' primer	0,5 µl
NFW	7 µl
cDNA	2 µl

House-keeping miRNA (RNU6) ekspresyon çalışması için hazırlanan karışım

İçerik	**Her bir örnek için**
TB Green Advantage qPCR Premix (2X)	10 µl
U6 forward	0,5 µl
U6 reverse	0,5 µl
NFW	7 µl
cDNA	2 µl

Daha sonra ekspresyon çalışması için hazırlanan kaplar (plate) Roche Light Cycler 480 II Real-Time PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdak belirtilen programa göre PCR yapılıdı.

miRNA ekspresyon çalışması için kullanılan PCR programı.

95 °C	**15 dakika**	
94 °C	15 saniye	45 döngü
55 °C	30 saniye	
70 ° C	30 saniye	
60 °C	15 saniye	

Daha sonra elde edilen veriler 2^(-ΔΔCt) metodu kullanılarak normalize edildi. Bütün örnekler 3 tekrar çalışıldı.

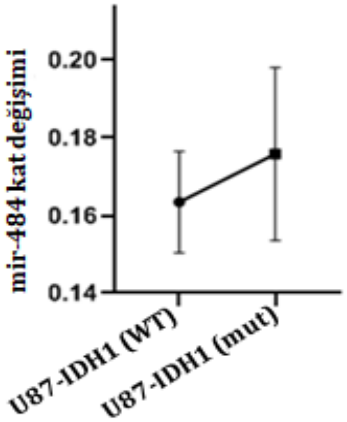
3.2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm deneyler en az üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Grupların karşılaştırılması için ANOVA, iki gurubun karşılaştırılması için *non-parametrik Student-t* testi kullanıldı ve P değerinin 0.05'ten küçük olduğu veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler ve grafikler GraphPad Prism 8.2.1 programı kullanılarak yapıldı.

4.BULGULAR

4.1. IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan hücrelerde miR-484'ün ekspresyon profili

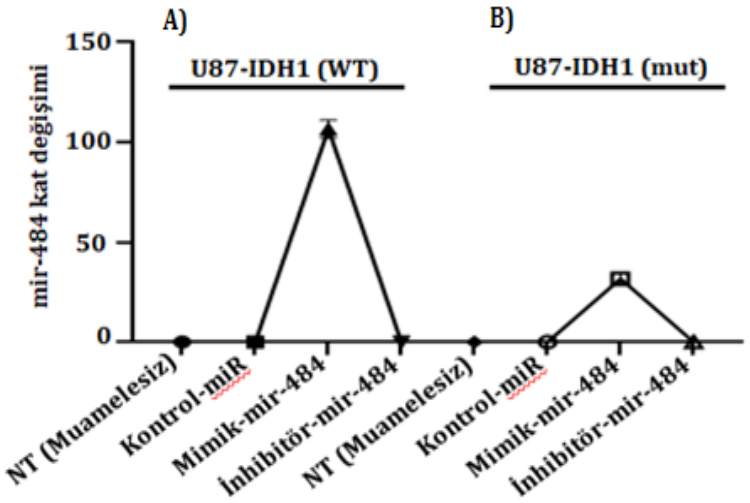
Çalışmamızda, IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde bazal seviyede miR-484'ün ekspresyon profili analiz edildi ve miR-484 ekspresyon profili açısında IDH1-mutant olmayan U-87-MG hücreleri ve IDH-1-mutant U-87 hücreleri arasında fark olmadığı bulundu (Şekil 9, $p>0.05$).



Şekil 9. IDH1 mutant olan ve IDH1 mutant olmayan hücrelerde mir-484 ekspresyon profili. IDH1 mutant olmayan U-87-MG hücreleri ve IDH1 mutant U-87 hücrelerinde bazal seviyede mir-484 ekpresyonu açısından istatistiksel bir fark bulunmadı.

Daha sonra U-87-MG hücreleri ve U-87-IDH1-mutant hücreleri kontrol-mir, inhibitör miR-484 ve mimik-miR-484 ile transfekte edlidi, sonrasında bu hücrelerde miR-484 ekspresyon profili analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre, hiçbir muamalenin yapılmadığı hücrlerle kontrol-miR ile transfekte edilen hücreler arasında miR-484 ekspresyonu açısından fark olmadığı bulundu (Şekil 10). Kontrol-miR ve inhibitör-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerin miR-484 ekspresyon seviyeleri arasında fark

olmadığı bulundu. Kontrol-miR ile transfekte edilen hücrelerle mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücreler miR-484 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında, miR-484 ekspresyonun mimik-miR484 ile transfekte edilen U87-MG hücrelerinde 100 kat (Şekil 10, A), U87-IDH1-mutant hücrelerinde 30 kat arttığı bulundu (Şekil 10, B).



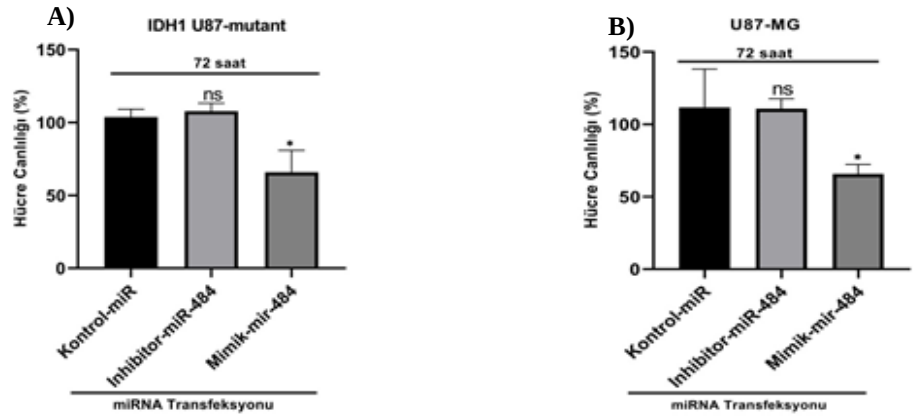
Şekil 10. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan hücrelerde miR-484'ün ekspresyon profili. Kontrol-miR ile transfekte edilen hücrelerle mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücreler miR-484 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında, miR-484 ekspresyonun mimik-miR484 ile transfekte edilen U-87-MG hücrelerinde 100 kat (A), U-87-IDH1-mutant hücrelerinde 30 kat (B) artış gösterdiği bulundu.

Tüm bu sonuçlarımız, kullandığımız inhibitör-miR-484'ün miR-484 ekspresyonunu belirgin bir şekilde baskıladığını, mimik-miR-484'ün ise miR-484 ekspreyonununu önemli oranda uyardığını açıkça gösterdi ve seçtiğimiz mimik-miR-484 ile inhibitör-miR-484'ün yapacağımız in-vitro deneyler için uygun olduğuna karar verildi ve deneylerimize başlandı.

4.2. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde proliferasyon/canlık oranı

U87-MG (IDH mutant olmayan, U87-WT) ve IDH1 mutant U87 (U87-mut) hücreler, hücre sayısına uygun olacak şekilde mimik-miR-484, inhibitör-miR-484 ve kontrol miRNA ile 72 saat transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası, mir-484'ün GBM hücrelerin proliferasyon/canlılığındaki rolünü analiz etmek için MTS analizi yapıldı. Yapılan

analiz sonuçlarımıza göre, kontrol miRNA ile transfekte edilen hücrelerle inhibitör-miR-484 ve mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerin proliferasyon/canlılık oranları karşılaştırıldığında; inhibitör miR-484 ile transfekte edilen hücreler ile kontrol miR-RNA ile transfete edilen hücreler arasında canlılık oranında bir fark olmadığı bulunurken (Şekil 11A ve 11B, $p>0.05$), mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerin canlılık/proliferasyon oranında istatistiksel olarak önemli oranda azalma azalma olduğu bulundu (Şekil 11A ve 11B, $p<0.05$).



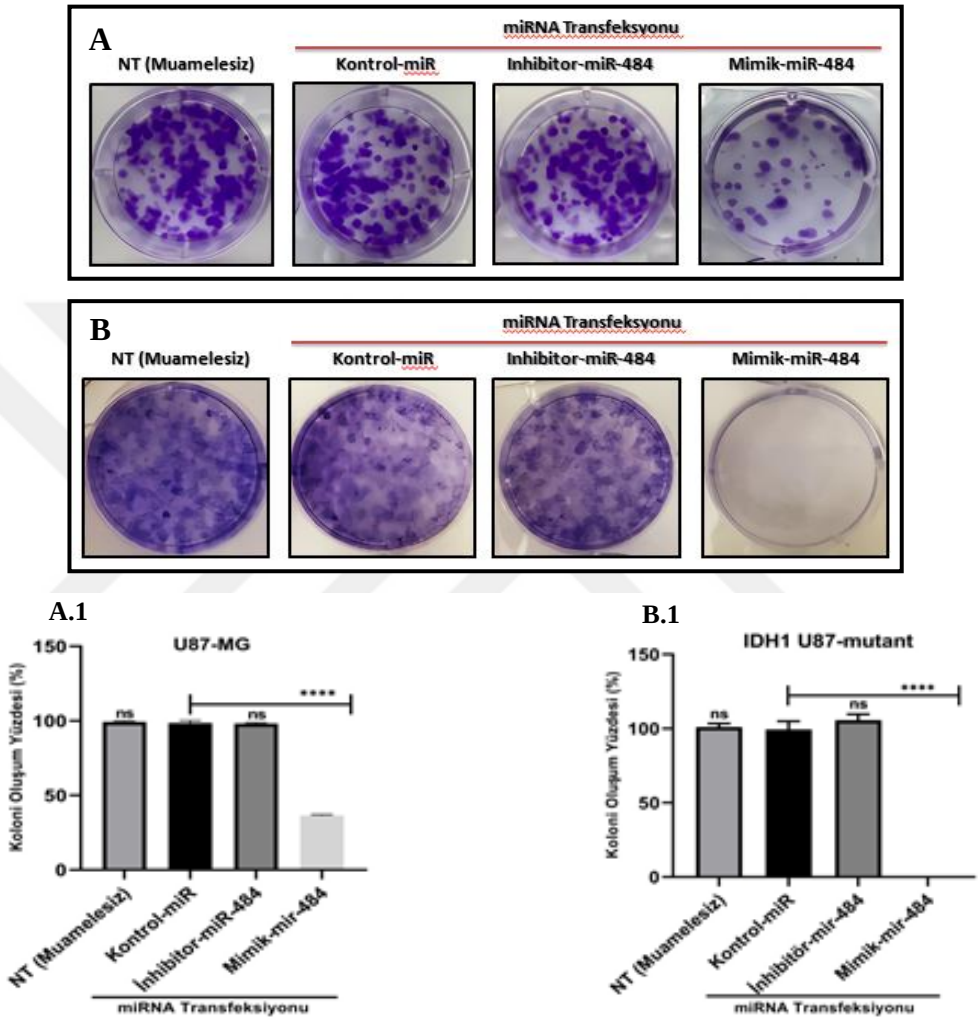
Şekil 11. U87-WT ve U87-mut GBM hücrelerinde miR-484'ün proliferasyona etkisi.

mimik miR-484 ile transfekte edilen U87-WT (A) ve IDH1 U87-mutant (B) hücrelerinde proliferasyon oranı kontrol hücrelerine göre önemli oranda azaldı (ns:non-significant, anlamsız, *$p<0.05$).

4.3. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde klon oluşumu

6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen U87-WT ve U87-mut GBM hücreleri inkübasyonlarının 48. saatinde miRNA'lar (mimik miR-484, inhibitör miR-484, kontrol miR) ile transfekte edildi. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz). Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca mir-484'ün GBM hücrelerinin koloni oluşturma özelliklerin üzerine etkisini analiz etmek için klonojenik analiz yapıldı. Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, kontrol miRNA ile transfekte edilen hücrelerle inhibitör-miR-484 ve mimik-miR-484 ile transfekte hücrelerde klon oranları karşılaştırıldığında; inhibitör miR-484 ile transfekte edilen hücreler ile kontrol miR-RNA ile transfete edilen hücreler arasında klon sayısı açısından bir fark olmadığı bulunurken (Şekil 12, A-B, $p>0.05$**),** mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerin

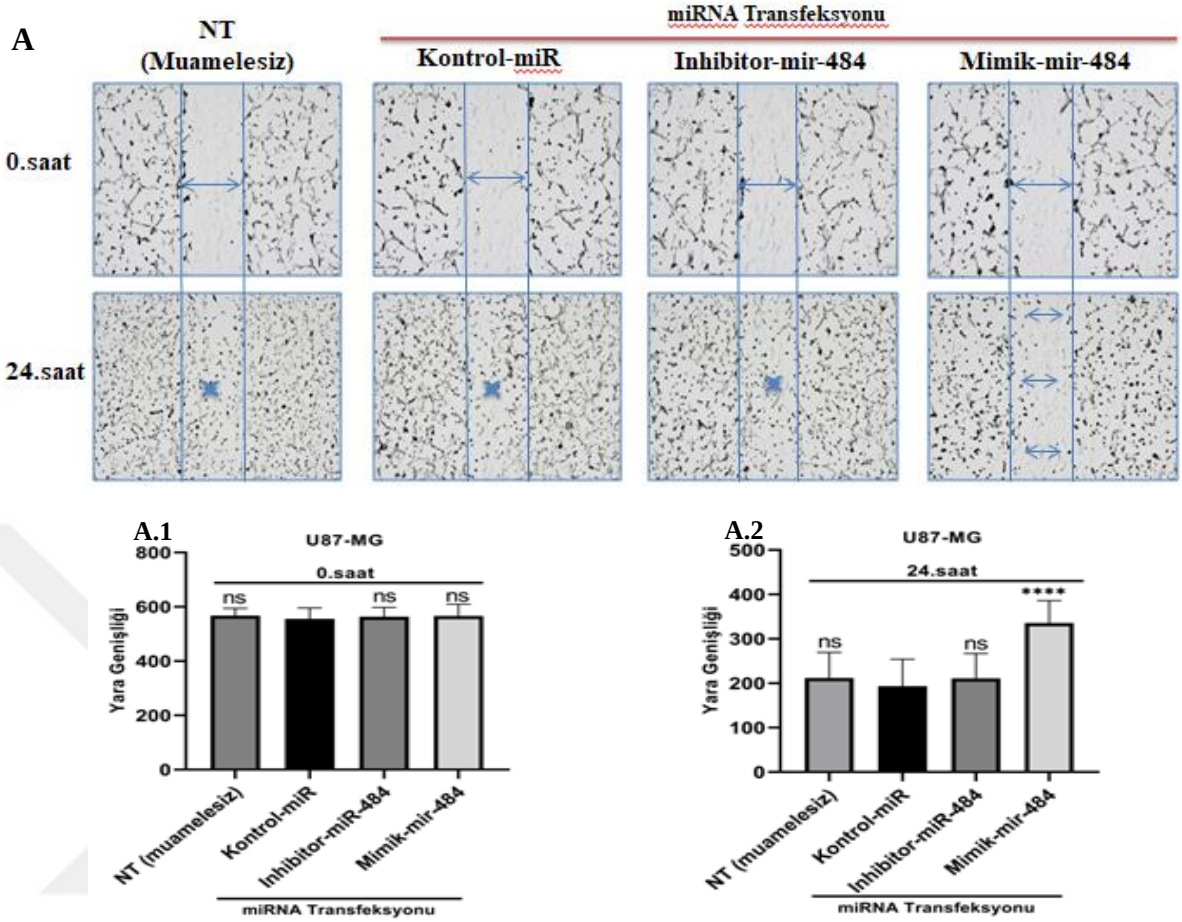
klon sayısında istatistiksel olarak önemli oranda azalma azalma olduğu bulundu (Şekil 12, A-B, $p<0.05$). Ayrıca kontrol miRNA ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler (nt: muamelesiz) arasında hücre koloni sayısı açısından fark bulunmadı (Şekil 12, A.1-B.1).

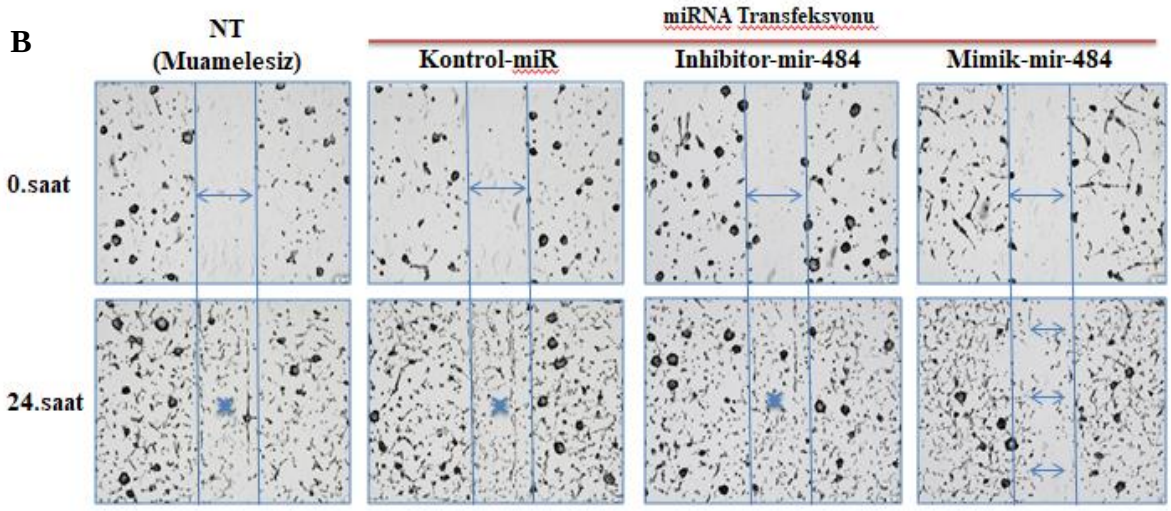


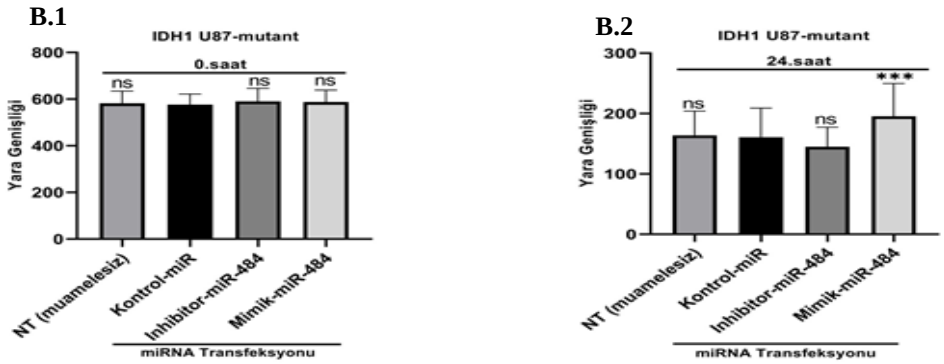
Şekil 12. U87-WT ve U87-mut GBM hücrelerinde miR-484'ün klon oluşumuna etkisi. miRNA'lar (mimik-miR-484, inhibitör-miR-484, kontrol-miR) ile tranfekte edilen U87-WT ve U87-mut hücrelerin hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri ve grafikleri (A ve B). mimik miR-484 ile transfekte edilen U87-WT (A) ve IDH1 U87-mutant (B) hücrelerinde klon sayısı kontrol hücrelerine göre önemli oranda azaldı (ns:non-significant, anlamsız, *$p<0.05$, ****$p<0.0001$).

4.4. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde migrasyon oranı

6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen U87-WT ve U87-mut hücreleri 24. saatinde mimik miR-484, inhibitör miR-484 ve kontrol-miR ile transfekte edildi, bir kısım hücrelere ise hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz). Hücrelerin inkübasyon süreleri dolduğunda iki farklı GBM hücre hatında mir-484'ün transfeksiyonunun hücre göçüne olan etkisini analiz etmek amacıyla, 20µl'lik steril bir pipet ucu kullanılarak her kuyucukta tek tabakada bir çizik oluşturuldu. Daha sonra kalkan hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuklar medya ile yıkandı ve yeni medya eklendi. Çizilen alandaki hücrelerin, mikroskop kullanılarak 0. ve 24. saatlerde görüntüleri alındı ve her bir zaman noktasında yaranın ön kenarındaki hücreler tarafından kat edilen mesafe ölçüldü. Yapılan analiz sonuçlarımıza göre; yara oluşturulduktan 24 saat sonra, kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında, inhibitör-miR484 ile tranfekte edilen hücrelerle kontrol hücreleri arasında göç eden hücreler arasında bir farkın olmadığı (Şekil 13, A ve B), mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrlerde göç eden hücre sayısının kontrol hücreler göre önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 13, A ve B).


A
NT
(Muamelesiz)
miRNA Transfeksyonu
Kontrol-miR
Inhibitor-mir-484
Mimik-mir-484
0.saat
24.saat
A.1
U87-MG
0.saat
Yara Genişliği
800
600
400
200
0
ns
ns
ns
NT (muamelesiz)
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA Transfeksyonu
A.2
U87-MG
24.saat
Yara Genişliği
500
400
300
200
100
0
ns
ns
****
NT (muamelesiz)
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA Transfeksyonu


B
NT
(Muamelesiz)
miRNA Transfeksyonu
Kontrol-miR
Inhibitor-mir-484
Mimik-mir-484
0.saat
24.saat

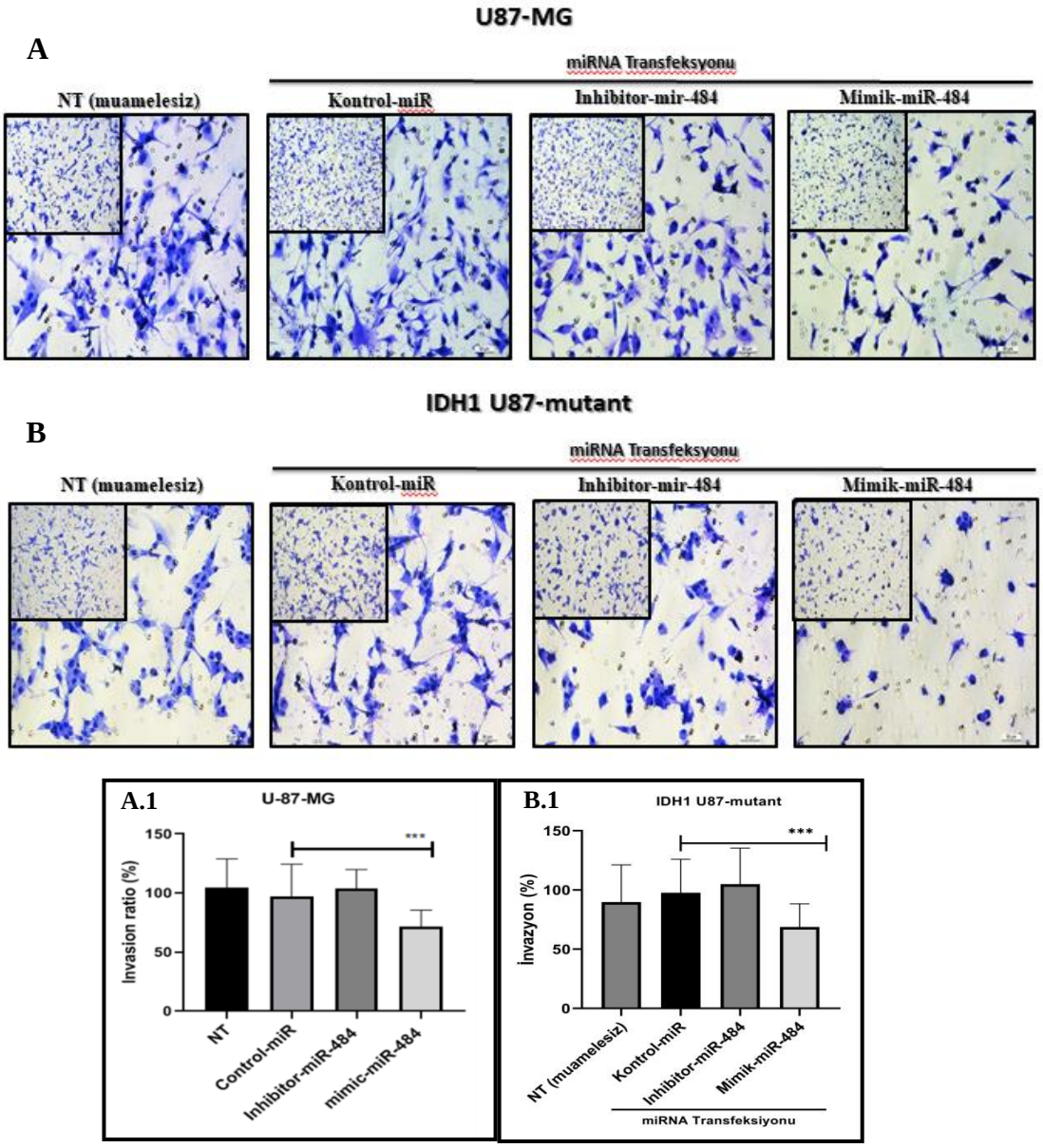


Şekil 13. U87-WT ve U87-mut GBM hücrelerinde miR-484'ün hücre migrasyonuna etkisi. miRNA'lar (miR-484-mimik ve miR-484-inhibitör) ile tranfekte edilen U87-WT ve IDH1 U87-mut hücrelerin migrasyon görüntüleri (A ve B). mimik miR-484 ile transfekte edilen U87-WT (A) ve IDH1 U87-mutant (B) hücrelerinde göç eden hücre sayısı kontrol hücrelerine göre önemli oranda azaldı (ns:non-significant, anlamsız, *p<0.05, ****p<0.0001).

4.5.mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde invazyon oranı

Çalışmamızda, miR-484'ün GBM hücrelerinin invazyonunda/agresiflik kazanmasında bir role sahip olup olmadığını araştırmak amacıyla; U87-WT ve U87-mut hücreleri kontrol miRNA, mimik-miR-484 ve inhibitör-miR-484 ile transfekte edildi. miRNA'larla 72 saatlik transfeksiyondan sonra matriks jel invazyon analizi yapıldı.

Analiz sonuçlarımıza göre, hiçbir uygulamanın yapılmadığı U-87 MG ve U-87-IDH1 mutant hücrelerle kontrol miRNA ile transfekte edilen U87-MG ve U87-IDH1 mutant hücrelerin invazyon oranları arasında fark olmadığı bulundu (Şekil 14, A-A1; B-B1, p>0.05). Kontrol miRNA ile transfekte edilen U87-WT ve U87-mut hücre grubu ile inhibitör-miR-484 ve mimik-miR-484 ile transfekte hücre gruplarının invazyon oranları karşılaştırıldığında; inhibitör miR-484 ile transfekte edilen U87-WT ve U87-mut hücrelerinin invazyon oranında fark olmadığı bulunurken (Şekil 14, A-A1; B-B1, p>0.05), mimik-miR-484 ile transfekte edilen U87-WT ve U87-mut hücrelerin invazyon oranında istatistiksel olarak önemli seviyede azalma olduğu bulundu (Şekil 14, A-A1; B-B1, p<0.001).



Şekil 14. U87-MG (A) ve U87-IDH1 mutant (B) hücrelerinde miR-484'ün invazyona etkisi. Uygulama yapılmayan hücreler (NT: non-treatment), kontrol miRNA ile ve inhibitör-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerin invazyon oranında fark bulunmazken, mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerde invazyon oranı önemli oranda azaldı (Şekil 14, A1 ve B1; *** $p<0.001$).

4.6. mimik-miR-484, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen IDH1-mutant ve IDH1-mutant olmayan GBM hücrelerinde hücre çoğalması, migrasyonu ve invasyonunda medyatör olarak görev yapan proteinlerin ekspresyon profili

miR-484'ün etkili olduğu yolakları DIANA TOOLS - mirPath v.3 analizi kullanarak belirlendi. KEGG analizine göre $p<0.05$ anlamlılık derecesinde etkili olduğu yolaklar

Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. KEGG yolak analizi

miR-484	
Yolak	**p değeri**
Fatty acid metabolism (hsa01212)	0.000476824920364
Adherens junction (hsa04520)	0.000526830659824
Lysine degradation (hsa00310)	0.00187272890897
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	0.00911655261096
Focal adhesion (hsa04510)	0.0145751527598
Cell cycle (hsa04110)	0.0192201990111
Glioma (hsa05214)	0.0282005869051
Central carbon metabolism in cancer (hsa05230)	0.0282005869051

KEGG analizine göre miR-484'ün kanser ilişkili birçok yolakta rol alan genlerle ilişkili olduğu özellikle de Glioma ile ilişkili genlerle bağlantılı olduğu bulundu.

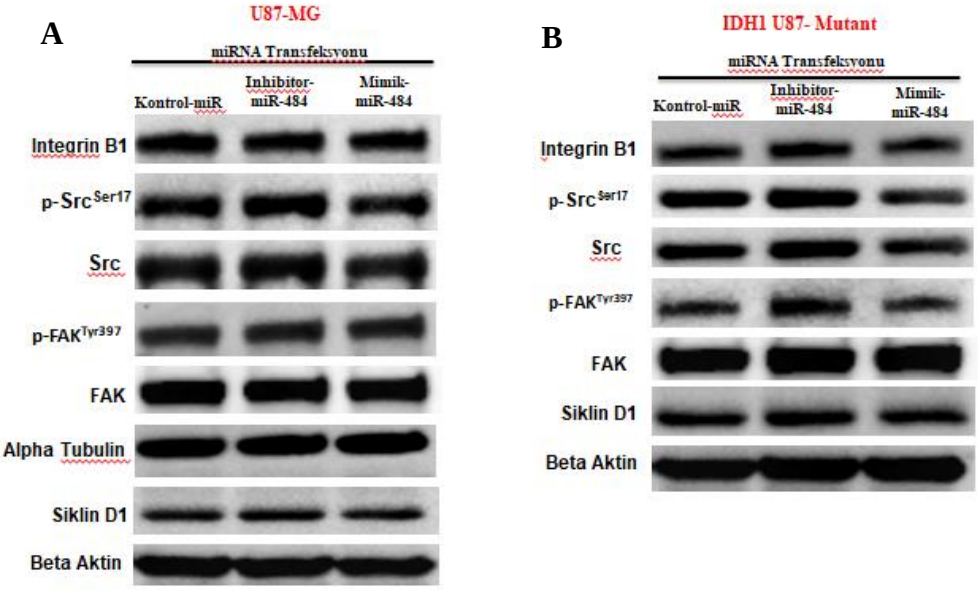
Tablo 8. GO yolak analizi

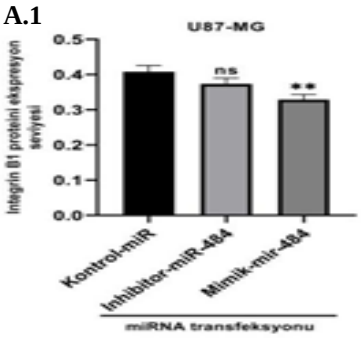
miR-484	
Yolak	**p değeri**
Protein targeting (GO:0006605)	0.000113759444878
Carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	0.000113897955354
Nitric oxide metabolic process (GO:0046209)	0.000129263721781
Activation of signaling protein activity involved in unfolded protein response (GO:0006987)	0.000129900864231
Fc-epsilon receptor signaling pathway (GO:0038095)	0.00017770347544
Transcription initiation from RNA polymerase II promoter (GO:0006367)	0.000265546081001
translational termination (GO:0006415)	0.000374904934063
Immune system process (GO:0002376)	0.000377722535744
Microtubule organizing center (GO:0005815)	0.000552321439372
Chromatin organization (GO:0006325)	0.000593065877661
Mitotic nuclear envelope disassembly (GO:0007077)	0.000893844049834
Fibroblast growth factor receptor signaling pathway (GO:0008543)	0.000903011610744
DNA metabolic process (GO:0006259)	0.000907865755697
Cell junction assembly (GO:0034329)	0.00093561066904
Nitric-oxide synthase regulator activity (GO:0030235)	0.00155612806649
Hexose transport (GO:0008645)	0.00169636947898
Glycosaminoglycan metabolic process (GO:0030203)	0.00183363024908
Extracellular matrix organization (GO:0030198)	0.00206893550886
Platelet degranulation (GO:0002576)	0.00263359230327
Cell junction organization (GO:0034330)	0.00322297399671
Cellular component disassembly involved in execution phase of apoptosis (GO:0006921)	0.00332642916027
Endocytic vesicle lumen (GO:0071682)	0.00377794042687
Cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	0.00396701151036
Regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060338)	0.00446058376114
Innate immune response (GO:0045087)	0.00469003262702
Nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay (GO:0000184)	0.00517708865957
Endosome (GO:0005768)	0.00534820310017
Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis (GO:0038096)	0.00624399839145
Chondroitin sulfate metabolic process (GO:0030204)	0.00764454425598
Protein N-linked glycosylation via asparagine (GO:001827	0.00812274006606
DNA duplex unwinding (GO:0032508)	0.00812274006606

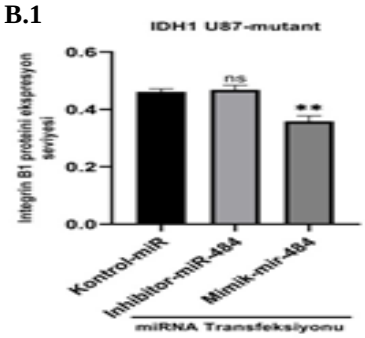
Translational elongation (GO:0006414)	0.00812274006606
Cytoskeletal protein binding (GO:0008092)	0.00812274006606
Nucleic acid binding transcription factor activity (GO:0001071)	0.00978856465719
Cellular component movement (GO:0006928)	0.0104697507154
Cellular metabolic process (GO:0044237)	0.0114219803947
Cell cycle (GO:0007049)	0.0121382336134
RNA splicing (GO:00083	0.0121823578786
Generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	0.0126124275703
Extracellular matrix disassembly (GO:0022617)	0.0130213303647
Regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway (GO:0060334)	0.0141400971057
Negative regulation of Schwann cell proliferation (GO:0010626)	0.0144572399368
Collagen fibril organization (GO:0030199)	0.0174881125216
Transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway (GO:0007185)	0.0186255827167
Endoplasmic reticulum unfolded protein response (GO:0030968)	0.0243496896237
Helicase activity (GO:0004386)	0.0244269683528
Vesicle (GO:0031982)	0.0271651531005
Transcription, DNA-templated (GO:0006351)	0.0284819907058
COPI coating of Golgi vesicle (GO:0048205)	0.035237907341
Positive regulation of macroautophagy (GO:0016239)	0.0358538633858
Leukocyte migration (GO:0050900)	0.0358538633858
Water-soluble vitamin metabolic process (GO:0006767)	0.0371452200166
Termination of RNA polymerase II transcription (GO:0006369)	0.03750285091
mRNA splicing, via spliceosome (GO:0000398)	0.03750285091
Translational initiation (GO:0006413)	0.0391488521947
GAIT complex (GO:0097452)	0.0398602543557
Histone methyltransferase complex (GO:0035097)	0.0423784870293
mRNA processing (GO:0006397)	0.0423784870293
Intracellular transport of virus (GO:0075733)	0.0460111717788
Small conjugating protein binding (GO:0032182)	0.0460111717788
Regulation of glucose transport (GO:0010827)	0.0462992782362
Cell motility (GO:0048870)	0.0462992782362
Positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors (GO:1902043)	0.0466927791834
Cofactor metabolic process (GO:0051186)	0.0469233494007
Cytoskeleton organization (GO:0007010)	0.0480155956493
DNA strand elongation involved in DNA replication (GO:0006271)	0.0489757599322
Actin filament depolymerization (GO:0030042)	0.0489757599322

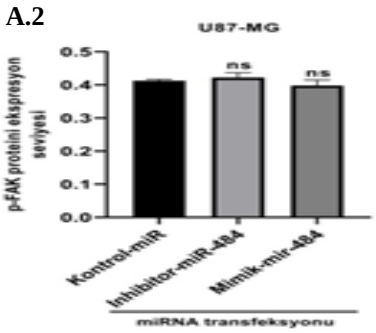
Daha sonra yine DIANA TOOLS - mirPath v.3 programını kullanarak yapılan GO analizine göre, miR-484'ün kanser ilişkili birçok yolakta rol alan genlerle ilişkili olduğu bulundu.

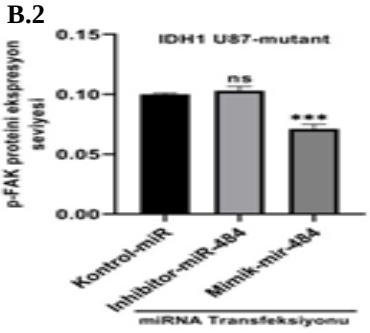
Bu analiz sonuçlarımızdan hareketle, mimik-miR-484, inhibitör-miR-484 ve kontrol mir ile transfekte edilen hücrelerde bu yolaklarda medyatör olarak görev alan proteinlerin ekspresyonları western blot yöntemi kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre; hücrelerin adezyonunda dolayısıyla hücrelerin proliferasyonu, mobilitesi ve invazyonunda rol oynayan Integrin-β1 ve aşağı hedefi olan p-SRC, SRC, p-FAK, FAK, hücre döngüsünde görev alan Siklin-D proteinlerin ekspresyon seviyesi, mimik-miR484 ile tranfekte edilen hücrelerde kontrol hücrelerine göre azalırken, inhibitör miR-484 ile transfekte edilen hücrelerle kontrol hücreleri arasında farklı olmadığı bulundu (Şekil 15, A ve B). Beklenildiği gibi total SRC ve total FAK proteinlerinin tüm hücrelerde benzer eskpresyon profili sergilediği bulundu (Şekil 15, A ve B).

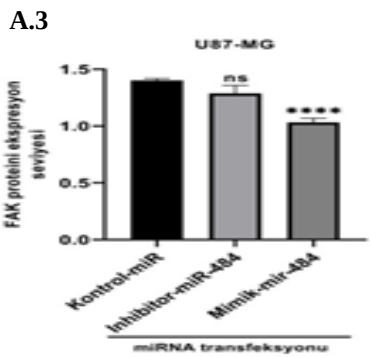

A
U87-MG
miRNA Transfeksyonu
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-miR-484
Integrin B1
p-Src Ser17
Src
p-FAK Tyr397
FAK
Alpha Tubulin
Siklin D1
Beta Aktin
B
IDH1 U87- Mutant
miRNA Transfeksyonu
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-miR-484
Integrin B1
p-Src Ser17
Src
p-FAK Tyr397
FAK
Siklin D1
Beta Aktin

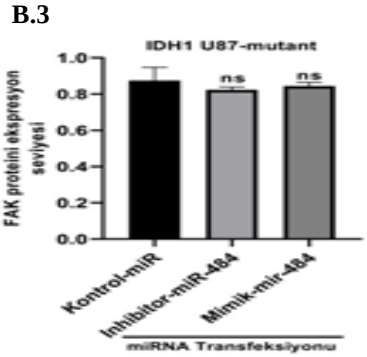

A.1
U87-MG
Integrin B1 proteini ekspresyon seviyesi
ns
**
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA transfeksyonu

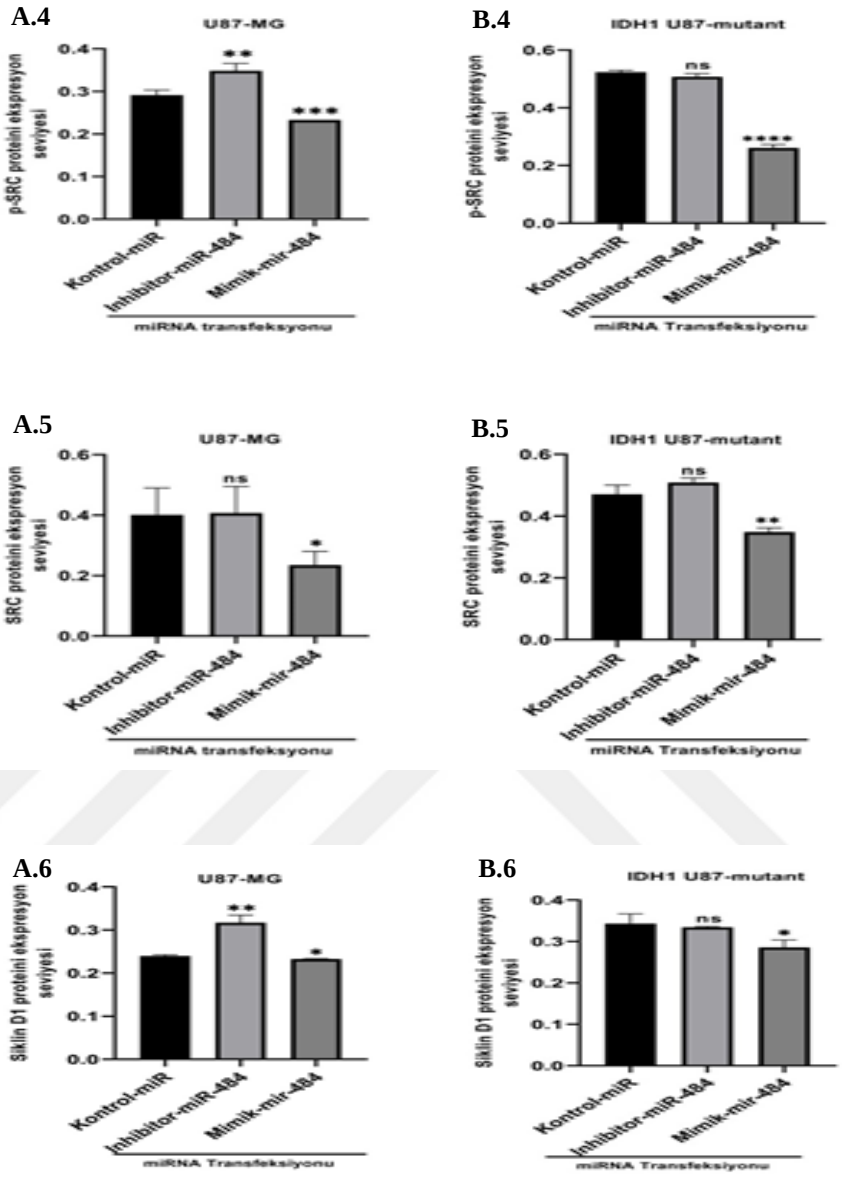

B.1
IDH1 U87-mutant
Integrin B1 proteini ekspresyon seviyesi
ns
**
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA Transfeksiyonu


A.2
U87-MG
p-FAK proteini ekspresyon seviyesi
ns
ns
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA transfeksyonu


B.2
IDH1 U87-mutant
p-FAK proteini ekspresyon seviyesi
ns
***
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA Transfeksiyonu


A.3
U87-MG
FAK proteini ekspresyon seviyesi
ns
****
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA transfeksyonu


B.3
IDH1 U87-mutant
FAK proteini ekspresyon seviyesi
ns
ns
Kontrol-miR
Inhibitor-miR-484
Mimik-mir-484
miRNA Transfeksiyonu



Şekil 15. miR-484 ile transfekte edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde İntegrin/FAK/Src sinyal yolağında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. miRNA'lar (miR-484-mimik ve miR-484-inhibitör) ile tranfekte edilen U87-WT ve IDH1 U87-mut hücrelerinde İntegrin/FAK/Src sinyalinde görev alan proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri ve grafikleri (A ve B). Mimik-miR-484 ile transfekte edilen U87-WT (A) ve IDH1 U87-mutant (B) hücrelerinde İntegrin, p-FAK, p-SRC ve Siklin-D proteinlerinin ekpresyon seviyesi hücre sayısı kontrol hücrelerine göre önemli oranda azaldı. Total FAK ve Total SRC proteinlerinin ekspresyon profili tüm hücrelerde benzer bulundu. (ns:non-significant, anlamsız, *p <0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ***p<0.0001).

4.7. Glioma hasta doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili

Çalışmamızda glioma tanısı almış 33 hastanın doku örneklerinde mir-484'ün ekspresyon profili analiz edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Glioma hastalarının doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili.

Hasta	**Histolojik derece**	**mir-484 ekspresyonu (fold change)**
MT	IV	2,642059112
SK	II	0,518229391
AD	II	0,764009639
TA	IV	0,400996832
CA	IV	0,633608127
HMG	IV	8,291670260
TD	II	0,243444151
FD	IV	0,707922211
PS	IV	0,555424509
FŞ	II	1,435608873
HK	IV	0,830275910
HSS	IV	0,295588643
MC	IV	2,087335847
PA	III	1,961099513
KC	IV	0,540236397
KD	IV	0,674393598
SÇ	IV	0,555424509
Mİ	IV	0,392744437
MK	IV	0,674393598
KÇ	IV	0,248559430
EÇ	II	0,575011512
İEA	IV	0,555424509
HÖ	IV	0,483525119
AOC	IV	0,532798803
İÖ	IV	1,080472793
MA	IV	1,215595084
SK	IV	3,120252422
AK	IV	0,859555527
BA	IV	1,150023024
AA	II	6,154589971
SD	III	1,817131397
SS	III	6,972435798
MH	III	2,364709144

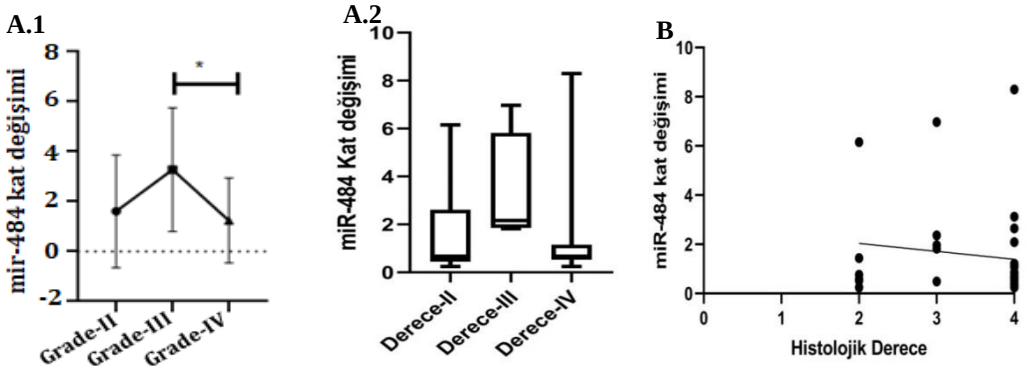
WHO sınıflandırmasına göre histolojik dereceleri ve IDH geninin durumuna göre glioma hastalarının miRNA ekspresyon seviyelerinin ortalamaları Tablo 10'de gösterildi.

Tablo 10. Glioma hastalarının özelliklerine göre miR-484 ekspresyon profili

Glioma hastalarının özellikleri	**n**	**miR-484 ekspresyon profili (Ort ± SD)**
Histolojik Derece-II	6	1.615 ± 2.260
Histolojik Derece-III	4	3.279 ± 2.473
Histolojik Derece-IV	23	1.240 ± 1.704
IDH (-)	24	1.256± 1,676
IDH (+)	9	2.354 ± 2.486

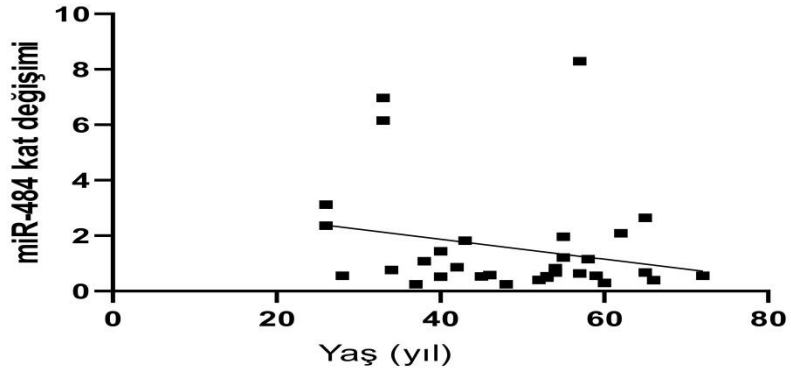
Ort: Ortalama, SD: Standart hata

Histolojik derecelerine göre miR-484'ün ekspresyon profili karşılaştırıldığında, histolojik dereceleri IV olan hastalarda miR-484 ekpsresyon profilinin kısmen azaldığı bulunmasına rağmen (Şekil 16A.1), hastaların histoljik derecelerine göre Derece-II, Derece-III ve Derece-IV arasında miR-484 ekspresyon profili açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı (Şekil 16A.2, $p>0.05$) ve hastaların histolojik dereceleri ile miR-484 ekspresyon profili arasında da bir korelasyon olmadığı bulundu (Şekil 16B, $r= -0.1316$, $p>0.05$).



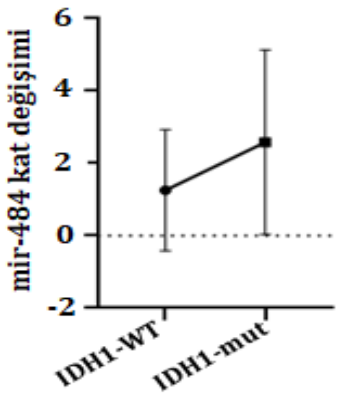
Şekil 16. Giloma hastalarının histolojik derecelerine göre miR-484 ekspresyon profili. Hastaların histolojik derecelerine göre miR-484 ekspresyon profili açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı bulundu (Şekil 16A.2). Hastaların histolojik dereceleri ile miR-484 ekspresyon profili arasında bir korelasyon olmadığı bulundu (Şekil 16B).

Hastaların yaş dağılımı ile miR-484 ekspresyon profili arasında bir korelasyon olmadığı bulundu (Şekil 17, r= -0. 2282, p>0.05).



Şekil 17. Giloma hastalarının yaşları ile miR-484 ekspresyon profili arasındaki ilişki. Hastaların yaş dağılımı ile miR-484 ekspresyon profili arasında bir korelasyon olmadığı bulundu.

IDH geni açısından mutasyon taşıyan IDH (+) ve mutasyon taşımayan IDH (-) hastaların miR-484 ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında, IDH (+) olan hastalarda mir-484 ekspresyon seviyesi artmış gibi görünse de, IDH (-) ve IDH (+) olan glioma hastaları arasında miR-484 ekspresyon profili açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 18, p>0.05).



Şekil 18. Glioma hastalarının IDH gen durumuna göre mir-484 ekspresyon profili. IDH geninde mutasyon taşıyan (IDH (+)) ve taşımayan hastaların (IDH (-)) miR484 ekspresyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Gliomlar, beyin ve omurilikteki sinir hücrelerini çevreleyen ve onların işlev görmesine yardımcı olan glial hücrelerde ortaya çıkan merkezi sinir sisteminin kötü huylu tümörleridir. Glioblastoma multiforme (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. GBM hastaları için geleneksel tedavi stratejileri, cerrahi, radyasyon, kemoterapi ve bunların kombinasyonlarına 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 immünoterapileri kapsayan 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 ark., 2017; Fabian ve ark., 2019). Bu nedenle, GBM'ler için yeni hedeflerin ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir.

Kanser hücrelerinde birçok miRNA tanımlanmış olup, bu miRNA'ların proliferasyon, invazyon, metastaz, apoptoz ve ilaç dirençliliği gibi birçok hücresel aktiviteleri düzenlediği bildirilmiştir. Bazı kanser hücrelerinde bu yolakların düzenlenmesinde rol alan miRNA'lardan biri de miR-484 olarak gösterilmiştir (Li ve ark., 2017; Hu ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018). Örneğin, östrojen reseptör (ER+) meme kanser hücrelerinde miR-484'ün tümör süpressör olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Wei ve ark., 2021). Bununla birlikte, meme kanser hastalarının klinik örneklerinde miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu, hücrelerde proliferasyonu, kemorezistansı arttırdığı bildirilmiş ve onkogenik miRNA olarak davrandığı gösterilmiştir (Ye ve ark., 2015; Zearo ve ark., 2014). Benzer şekilde, hepatosellüer karsinomada, yumurtalık kanserlerinde ve renal karsinomlarda da miR-484'ün ekspresyonunun yüksek olduğu ve hastalığın progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2017; Merhautova ve ark., 2015; Yang ve ark., 2016; Vecchione ve ark., 2013). Yine küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin (NSCLC) ksenograft fare modellerinde, miR-484'ün ekspreyonunun

artmasının tümör büyümesini arttırdığı, böylece NSCLC'nin ilerlemesini teşvik etmek için bir onkogen olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Li vee ark., 2017). Yine prostat kanserlerinde mir-484'ün hücre haraketini artıran bir onkogen olarak davarandığı gösterilmiştir (Lee ve ark., 2020). Buna karşılık, gastrik ve kolerektal kanserlerde miR-484'ün ekspresyonun düşük olduğu ve hatta miR-484 ekspresyon kaybının hastalığın ilerlemesinde ve metastazında etkili olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2017; Zare ve ark., 2018, Lu ve Lu, 2015, Shen ve ark., 2020). Yine gastrik kanserlerde mir-484 ekspresyonunun azaldığı ve hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla miR-484'ün over-ekspresyonun hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, invazyonunu ve tümörojeniteyi baskıladığı gösterilmiştir (Liu ve Li, 2020, Li ve ark., 2020). Benzer şekilde, servikal kanser hücrelerinde de miR-484'ün aşırı ekspresyonunun, hücre çoğalmasını, göçünü, istilasını ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'i önemli ölçüde inhibe ettiği ve tümör supressör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Hu ve ark., 2017). Dolayısıyla miR-484'ün kanserlerdeki rolü ile ilgili sınırlı sayıda yapılan çalışmaların bulguları birbiriyle çelişmekte olup, bazı kanserlerde miR-484'ün yüksek oranda eksprese edilerek onkogenik rol oynadığı, buna karşılık bazı kanserlerde miR-484'ün ekspresyonun düşük olduğu ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı rapor edilmiştir.

GBM'lerde ise miR484'ün rolü henüz araştırılmamış olup sadece bir çalışmada gliom kök hücrelerinde miR-484'ün glioma tümörlerini başlatan özellikleri arttırdığı bildirilmiştir (Yi ve ark., 2018). İki çalışmada, GBM hastalarının serum örneklerinden elde edilen eksozomlarda (Manterola ve ark., 2014) ve periferal kan örneklerinde (Roth ve ark., 2011) miR-484 ekspresyonunda sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu tespit edilmiş ancak görevi tanımlanmamıştır. Bu yüzden sunulan proje önerisinde GBM hücrelerinin agresiflik kazanmasında miR-484'ün yer alabileceği hipotezlendi ve GBM hücre hatlarında miR-484'ün rolünün araştırılması amaçlandı. Bu amacımız için GBM hücre hattı olan U-87-MG hücreleri hem inhibitör miR-484 ile transfekte edilerek mir-484'ün ekspresyonun baskılanması hem de mimik-miR-484 ile transfekte edilerek miR-484'ün over-ekspresyonu sağlandı ve hücrelerin invazyon oranları analiz edildi. Çalışma sonuçlarımıza göre, mimik-miR-484 ile miR-484'ün ekspresyonu uyarıldığında GBM hücreleride inavazyonunun önemli oranda inhibe olduğu bulundu. Daha önce gliom kök hücrelerinde onkogen olarak gösterilen miR-484'ün rolünün aksine, bizim sonuçlarımız literatürde ilk kez miR-484'ün GBM hücrelerinde bir tümör süpressör olarak rol oynadığını gösterdi.

IDH (izositrat dehidrojenaz), izositratın alfa-ketoglutatata (α-KG) oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder ve bu yolla oksidatif dekarboksilasyonun ana oyuncusu olarak rol oynar (Han ve Batchelor, 2017). Bununla birlikte, GBM dahil tüm kanser hücresi gelişiminde Krebs döngüsündeki bu metabolik enzimlerin altta yatan onkojenik aktivitesi belirsizliğini korumaktadır. 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü GBM'leri IDH geninde görülen mutasyona bağlı olarak IDH geninde mutasyon taşıyan (IDH(+)) ve taşımayan (IDH (-)) GBM'ler olarak iki sınıfa ayırmıştır (Louis ve ark., 2016; Gargini ve ark., 2020). Histolojik olarak birbirleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, IDH1 (+) tümörlerin, IDH1 (-) tümörlere kıyasla prognozunun daha iyi olduğu ve daha uzun genel sağkalıma sahip olduğu gösterilmiştir (Sonoda Y, 2020, Mirchia ve Richardson, 2020). Bu yüzden, sunulan tez çalışmasında, bu farklılıkta miR-484'ün bir rolünün olabileceği hipotezlendi. Bu hipotezimizi test etmek için satın alınan CRISPR/cas-9 ile IDH1 geni modifiye edilmiş IDH1-mutant U-87 hücreleri ile mutant olmayan yabani tip U87-MG GBM hücreleri, inhibitör-miR-484 ve mimik-miR-484 ile transfekte edildi ve sonrasında bu hücrelerin ekspresyon profilleri, hücre proliferasyonu, klon oluşumu, migrasyon ve invazyon özellikleri analiz edildi. Sonuçlarımıza göre miR-484'ün ekspreyonun uyarıldığı mimik-miR-484 ile tranfekte edilmiş IDH1-mutant -U-87 hücrelerde proliferasyon, klon oluşumu, migrasyon ve invazyon oranın önemli oranda baskılandığı bulundu. Bu sonuçlarımız yine literetürde ilk kez IDH1-mutant-U-87 hücrelerinde mir-484'ün tümör supressör olarak davrandığını gösterdi. Ayrıca sonuçlarımız, IDH1-mutant olmayan ve IDH1-mutant olan hücreler arasında miR-484'ün ekspresyon profili açısından fark olmadığı ve mir-R484'ün her iki hücre tipinde de benzer fonksiyona sahip olduğunu ve IDH1-mutantasyonu taşıyan glioma hücrelerin daha iyi prognoza sahip olmasında miR-484'ün bir etkinliğinin olmadığını açığa çıkarttı.

Yapılan çalışmalar, SRC aktivitesinin/fosforilasyonunun normal dokuya kıyasla GBM doku örneklerinde ve T98G, U87 kanser hücre hatlarında arttığını göstermişlerdir (Du ve ark., 2009; Stettner ve ark., 2005). Ancak bu GBM'deki artmış SRC aktivitesinin, SRC kinazlar ailesi (SFK) genlerinin amplifikasyonu veya mutasyonunu ile ilişkili olmadığını kapsamlı Kanser Genomu Atlas Araştırma Ağının ekspresyon çalışmaları ortaya koymuştur (TCGA, Nature, 2008). Bu nedenle, GBM'lerde artan SRC aktivitesi, Src ailesi kinazlarları aktive eden hücre yüzeyi büyüme faktörü reseptörlerinin ve integrinlerin artan aktivasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. KEGG-pathway

analiz sonuçlarımızda miR-484'ün İntegrinin aracılık ettiği fokal adezyon yolağında yer aldığını göstermiştir. Sunulan çalışmada, mimik-miR-484 ile transfekte edilen hücrelerde CyclinD1/Integrin β1/FAK/Src yolağı baskılandığı bulundu. Son çalışmalar, CyclinD1/Integrin β1/FAK/Src ekseninin birçok tümör hücresinde aşırı aktive olduğunu ve tümör büyümesine, göçüne/invazyona ve metastaza yol açtığını göstermiştir (Hamurcu ve ark, 2017). Sunulan çalışma sonuçlarımız, GBM'de miR-484'ün CyclinD1/Integrin β1/FAK/Src aksının regülasyonunda rol oynadığını ve *in vitro* şartlarda indüklenmiş miR-484 ekspresyonunun CyclinD1/Integrin β1/FAK/Src baskılaması, miR-484'ün tümör süpressör-miR olarak fonksiyon yaptığını göstermiştir.

Ayrıca mevcut tez çalışmamızda, glioma ön tanısı almış hastaların doku örneklerinde, miR-484'ün ekspresyon seviyesi ile glioma tümörlerinin histolojik dereceleri arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırıldı. Çalışmamız için alınan 33 hastadan, WHO glioma sınıflandırmasına göre 6 hasta derece-II, 4 hasta derece-III, 23 hasta derece-IV (GBM) olarak sınıflandırılmıştır. Bu hastaların doku örneklerinde mir-484'ün ekspresyon profili incelendiğinde, hastaların histolojik deceleri ile miR-484 ekspresyon profili arasında bir fark olmadığı, artan histoljik derece ile mir-484 ekspresyon profilinin ilişkili olmadığı bulundu. Mevcut çalışmada ayrıca, IDH1-mutant olmayan IDH1(-) ve IDH1-mutant olan IDH (+) glioma tümör tanısı alan hastaların doku örneklerinde miR-484 ekspresyon seviyesi açısından bir farklılığın olup olmadığı araştırıldı ve IDH (-) ve IDH (+) glioma hastalarının tümör doku örneklerinde miR-484 ekspresyon profili açısından bir farkın olmadığı bulundu. Benzer şekilde, in vitro şartlarda IDH1 mutant olmayan U-87-MG ve IDH1-mutant-U-87 hücreleri arasında da miR-484 ekspresyon seviyesi açısından bir farkın olmadığı bulundu. Literatürde bizim verilerimizi karşılaştıracağımız veya tartışacağımız henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak biz, IDH mutasyonu taşıyan ve taşımayan hastalar arasındaki farklılıkta, IDH mutasyonlu hastaların daha iyi sağkalım sergilemesi ve daha az agresif özellik göstermesinde miR-484'ün bir fonksiyonun olmadığını düşünüyoruz.

IDH geninde mutasyon keşfedildiğinden beri, IDH mutasyonlarının kanser hücrelerindeki rolü bir bulmaca olup henüz çözülememiştir (Reitman and Yan, 2010). Alfa ketoglutarat (α-KG) enerji üretimi sırasında krebs döngüsü içinde üretilen bir bileşiktir. IDH enzimleri, enerji üretimi sırasında NADPH oluşturmak için bir kofaktör olarak NADP+'yi kullanarak krebs döngüsü içinde alfa ketoglutarat (α-KG) oluşturmak

için substratı izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder. Mutasyon sonucu fonksiyonu değişen IDH1/2 enzimleri KG'nın bir başka ara bileşik olan alfa hidroksiglutarik asite (2-HG) dönüşmesine neden olur. Vücutta 2-HG birikmesi hücresel döngüler için önemli olan enzimlerin fonksiyonlarını bozarak hücresel metabolizmayı ve epigenetik düzenlemeleri değiştirir, DNA onarım mekanizmasını bloke ederek tümör oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca histon ve DNA'dan metil gruplarının uzaklaştırılmasını sağlayan demetilaz enzimlerinin etkisini durdurmakta ve hücre farklılaşma döngüsünü bozmaktadır. Bunun yanında tümör oluşumuna katkıda bulunan yeni damar oluşumunu hızlandırmakta ve hücrelerin az oksijenli ortamda yaşamalarını destekleyecek genleri aktif hale getirmektedir (Clark ve ark., 2016). Doğal olarak, IDH-mutant hastaların, IDH mutant olmayan hastalara göre daha kötü prognoz göstermesi beklenir. Ancak, IDH-mutasyonlu gliom hastaların genellikle daha iyi sağkalım gösterdiği bildirilmektedir (Liu ve ark.,2020, Waitkus ve ark., 2021). Ancak, bu fenomen henüz daha tam olarak anlaşılamamış ve birçok görüş ileri sürülmüştür. Bir görüşe göre, IDH mutasyonu sonucunda, α-KG'nın 2-HG dönüşümü için NADPH kullanılır, hücrelerde NADPH seviyesi azalır ve hücreler serbest radikaller ve ROS yoluyla strese daha duyarlı hale gelir. Ayrıca 2-HG, ATP sentaza bağlanarak doğrudan onu inhibe eder ve dolyısıyla kanser hücrelerinde istenmeyen durumlara yol açar (Tabei ve ark., 2020). Başka bir görüşe göre, IDH-mutasyonlu hastaların daha iyi sonuçlar sergilemesinin IDH mutasyonu sonucu hücre içerindeki metabolik yolakların inbisyonuna bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (Maus ve Peters, 2017). Diğer bir görüşe gore de, IDH mutasyonlarının neden olduğu epigenetik değişimler, hücrelerin mikroçevresinde farklılaşmaya yol açarak gliomaların progresyonunu değiştirdiği ileri sürülmektedir (Gargini ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda, IDH1-mutasyonu taşıyan ve IDH1-mutasyonu taşımayan GBM hücrelerinde epigenetik düzenlemede rol oyanayan mir-484 ekspresyon seviyesinin benzer olduğu ve mir-484'ün IDH1-mutasyonlu hastaların daha iyi prognoz sergilmesinde bir katkısının olmadığını işaret etti. Dolayısıyla, diğer görüşlerden farklı olarak, çalışma sonuçlarımız, IDH-mutasyonlu hastaların daha iyi prognoz sergilemesinde epigenetik düzenlemenin tek başına etkili olmayacağnı düşündürttü. Bu yüzden, IDH-1-mutasyonlu hastalarla IDH1-mutasyonu olmayan hastalar arasındaki farklılıkta etkili moleküler mekanizmayı açıklığa kavuşturmak için çok sayıda araştırmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

Özetle mevcut çalışmadaki sonuçlar, mir-484'nin, GBM hücrelerinin proliferasyonu,

klon oluşumu, invazyonu ve migrasyonu gibi temel kanserojenik özelliklerini önemli ölçüde baskıladığını, tümör sinyal iletiminden sorumlu Cyclin D1/Integrin β1/FAK/SRC yolağını inhibe ettiğini, böylelikle GBM hücrelerinde tümör süpresör olarak rol oynadığını, GBM'lerin tedavisinde mir-484'nin potansiyel teröpatik bir hedef olarak kullanılabilirliğini literatürde ilk kez göstermiştir. Sonuç olarak, mir-484, GBM'nin tedavisi için etkili anti-kanser hedef olabilir.

6. KAYNAKLAR

Abrigo JM, Fountain DM, Provenzale JM, Law EK, Kwong JS, Hart MG, Tam WW. Magnetic resonance perfusion for differentiating low-grade from high-grade gliomas at first presentation. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2018.

Adams H, Chaichana KL, Avendano J, Liu B, Raza SM, Quinones-Hinojosa A. Adult cerebellar glioblastoma: Understanding survival and prognostic factors using a population-based database from 1973–2009. World Neurosurg. 2013; 80(6):e237–e243.

Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003; 67(4): 657–685.

Alexiou GA, Vartholomatos G, Karamoutsios A, Batistatou A, Kyritsis AP, Voulgaris S. Circulating progenitor cells: a comparison of patients with glioblastoma or meningioma. Acta Neurol Belg 2013; 113:7–11.

Ali MY, Oliva CR, Noman ASM, Allen BG, Goswami PC, Zakharia Y, Monga V, Spitz DR, Buatti JM, Griguer CE. Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. Cancers, 2020; 12(9): 2511.

Al-Khallaf H. Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. Cell & Bioscience, 2017; 7(1): 21-27.

Almenawer SA, Badhiwala JH, Alhazzani W, Greenspoon J, Farrokhyar F, Yarascavitch B, Murty NK. Biopsy versus partial versus gross total resection in older patients with high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. Neuro-Oncology, 2015; 17(6): 868–881.

Amorim M, Salta S, Henrique R, Jerónimo C. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. Journal of Translational Medicine, 2016; 14(1): 17-21

Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. Expert Review of Neurotherapeutics, 2015; 15(7):741–752.

Barani IJ, Larson DA. Radiation Therapy of Glioblastoma. Current Understanding and Treatment of Gliomas, 2014; 49–73.

Barney C, Shukla G, Bhamidipati D, Palmer JD. Re-irradiation for Recurrent Glioblastoma Multiforme. Review Chin Clin Oncol, Aug 2017; 6 (4): 36-39.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Review. Cell. 2004; Jan 23; 116(2):281-97.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009; 136:215–33.

Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. Current Medicinal Chemistry, 2017; 24(27): 11-17.

Bazzoni R, Bentivegna A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. Review. Cancers, 2019; 11: 292-399.

Benson VS, Pirie K, Schüz J, Reeves G.K., Beral V, Green J. Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study. International Journal of Epidemiology, 2013; 42(3): 792–802.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference . Nature, 2001; 409(6818), 363–366.

Black P. Management of malignant glioma: Role of surgery in relation to multimodality therapy. J Neurovirol, 1998; 4:227–236.

Bohnsack MT. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA, 2004; 10(2): 185–191.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nature Structural & Molecular Biology, 2006; 13(12): 1097–1101.

Boutzen H, Saland E, Larrue C, de Toni F, Gales L, Castelli FA, Sarry JE. Isocitrate dehydrogenase 1 mutations prime the all-trans retinoic acid myeloid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. The Journal of Experimental Medicine, 2016; 213(4): 483–497.

Brenner AV, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, Inskip PD. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults, International Journal of Cancer, 2002; 99(2):252–259.

Burri SH, Gondi V, Brown PD, Mehta MP. The Evolving Role of Tumor Treating Fields in Managing Glioblastoma. American Journal of Clinical Oncology, 2017; 1: 21-27.

Burton E, Ugiliweneza B, Woo S, Skirboll S, Boaky M. A Surveillance, Epidemiology and End Results-Medicare Data Analysis of Elderly Patients with Glioblastoma Multiforme: Treatment Patterns, Outcomes and Cost. Mol. Clin. Oncol. 2015; 3:971–978.

Cai X. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA, 2004; 10(12), 1957–1966.

Calinescu AA, Kamran N, Baker G, Mineharu Y, Lowenstein PR, Castro MG. Overview of current immunotherapeutic strategies for glioma. Immunotherapy, 2015; 7(10): 1073–1104.

Calore F, Fabbri M. MicroRNAs and Cancer. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. August 2011.

Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. EMBO Molecular Medicine, 2014; 6(11): 1359–1370.

Ceccarelli C, Grodsky NB, Ariyaratne N, Colman RF, Bahnson BJ. Crystal structure of porcine mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn2+ and isocitrate. Insights into the enzyme mechanism. J Biol Chem. 2002; 277(45):43454–43462.

Chamberlain MC. Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas. Expert Rev Neurother. 2010; 10:1537-1544.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhatter R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature. 2005; 436 (7051): 740–744.

Chien CH, Hsueh WT, Chuang JY, Chang KY. Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. J Biomed Sci, 2021; 28: 18-23.

Cho CY, Huang JS, Shiah SG, Chung SY, Lay JD, Yang YY, Chuang SE. Negative feedback regulation of AXL by miR-34a modulates apoptosis in lung cancer cells. RNA, 2015; 22(2): 303–315.

Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. Clinical Cancer Research, 2016; 22(8): 1837–1842.

Cobbs CS. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. Herpesviridae. 2011; Oct 26; 2(1):10.

Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2013; 13(5). 11-17.

Curado MP, Edwards B, Shin HR. Cancer Incidence in Five Countries Volume IX. IARC Scientific Publications, 2007; 160: 21-27.

Curley CT, Mead BP, Negron K, Kim N, Garrison WJ, Miller GW, et al. Augmentation of brain tumor interstitial flow via focused ultrasound promotes brain-penetrating nanoparticle dispersion and transfection. Science Advances, 2020; 6(18): 1344-1348.

D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. Cancers, 2019; 11(4): 469-475.

Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. Trends in Molecular Medicine, 2010; 16(9): 387–397.

Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature, 2009; 462(7274): 739–744.

Davis ME. Epidemiology and Overview of Gliomas. Semin Oncol Nurs. 2018; 34(5):420-429.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clinical Journal of Oncology Nursing, 2016; 20(5): 2–8.

Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. J. Biochem. 2010; 148, 381–392.

De Felice F, Bulzonetti N, Musio D, D'Elia A, Salvati M, Tombolini V. Low-dose fotemustine as second-line chemotherapy for recurrent glioblastoma multiforme. Anticancer Res. 2013; Sep; 33(9):4013-4016.

De Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. Nat Biotechnol. 2017;

35:872–8.

Deltour I, Auvinen A, Feychting M, Johansen C, Klaeboe L, Sankila R, Schüz J. Mobile phone use and incidence of glioma in the Nordic countries 1979–2008: Consistency check. Epidemiology. 2012; 23(2):301–7.

Du J, Bernasconi P, Clauser KR, Mani DR, Finn SP, Beroukhim R, et al. Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. Nat Biotechnol. 2009 Jan; 27(1):77-83.

Engelhard HH, Villano JL, Porter KR, Stewart AK, Barua M, Barker FG, Newton HB. Clinical presentation, histology, and treatment in 430 patients with primary tumors of the spinal cord, spinal meninges, or cauda equine. J Neurosurg Spine. 2010;13:67–77.

Escamilla-Ramírez A, Castillo-Rodríguez RA, Zavala-Vega S, Jimenez-Farfan D, Anaya-Rubio I, Briseño E, Trejo-Solís C. Autophagy as a Potential Therapy for Malignant Glioma, Pharmaceuticals, 2020; 13(7): 156-162.

Fabian D, Guillermo Prieto Eibl M, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Puduvalli V, Palmer J. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. Cancers, 2019; 11(2): 174-179.

Faivre G, Pentsova E, Demopoulos A, Taillibert S, Rosenblum M, Omuro A. Clinical Reasoning: Worsening neurologic symptoms in a brain tumor patient. Neurology, 2015; 85(7): e57–e61.

Farber SH, Elsamadicy AA, Atik AF, Suryadevara CM, Chongsathidkiet P, Fecci PE, Sampson JH. The Safety of available immunotherapy for the treatment of glioblastoma. Expert Opinion on Drug Safety, 2017; 16(3): 277–287.

Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, Xie W, Friedman AH, Archer GE, et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. Cancer Res 2006; 66:3294–3302.

Ferreira LMR. Cancer metabolism: The Warburg effect today. Experimental and Molecular Pathology, 2010; 89(3): 372–380.

Ferroli P, Acerb F, Finocchiaro G. From Standard Treatment to Personalized Medicine: Role of IDH1 Mutations in Low-Grade Glioma Evolution and Treatment, World Neurosurgery, 2010; 73 (4): 231-238 p.

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), 1622-1629.

Ghia AJ. Fractionated Radiotherapy of Intracranial Gliomas. Progress in Neurological Surgery, 2018; 3: 38–47.

Gieryng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. Laboratory Investigation, 2017; 97(5): 498–518.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res. 2008 Jan; 36 (Database issue): D154-8.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing. Cell 2001; 106: 23–34.

Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, Mak TW. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. The Journal of Experimental Medicine, 2010; 207(2): 339–344.

Gu TJ, Yi X, Zhao XW, Zhao Y, Yin JQ. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. BMC Genomics. 2009; Nov 30; 10():563.

Gupta R, Webb-Myers R, Flanagan S, Buckland ME. Isocitrate dehydrogenase mutations in diffuse gliomas: clinical and aetiological implications. Journal of Clinical Pathology, 2011; 64(10): 835–844.

Gzell C, Back M, Wheeler H, Bailey D, Foote M. Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. Clinical Oncology, 2017; 29(1): 15–25.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014; 15(8): 509–524.

Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, Ozpolat B. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorgenesis of human triple negative breast cancer cells. Oncotarget. 2016; 7: 16619-16635.

Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF, Dönmez-Altuntaş H, Özkul Y, Ozpolat B. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2018; 144(3): 415–430.

Hamurcu Z, Delibaşı N, Nalbantoglu U, Sener EF, Nurdinov N, Tascı B, Taheri S, Özkul Y, Donmez-Altuntas H, Canatan H, Ozpolat B. FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple-negative breast cancer cells. J Mol Med (Berl), 2019; 97(4):491-508.

Hamurcu Z, Kahraman N, Ashour A, Ozpolat B. FOXM1 transcriptionally regulates expression of integrin β1 in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2017 Jun;163(3):485-493.

Han CH, Batchelor TT. Isocitrate dehydrogenase mutation as a therapeutic target in gliomas. Chin Clin Oncol. 2017 Jun;6(3):33-39.

Han X, Xue X, Zhou H, Zhang G. A molecular view of the radioresistance of gliomas. Oncotarget. 2017; 8:100931-100941.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 2011; 144(5): 646–674.

Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Saima M Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2017; 18 (1): 3-9.

Hart MG, Metcalfe SE, Grant R. Biopsy versus resection for high grade glioma. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2000.

Hau E, Shen H, Clark C, Graham PH, Koh ES, L. McDonald K. The evolving roles and controversies of radiotherapy in the treatment of glioblastoma. Journal of Medical Radiation Sciences, 2016; 63(2): 114–123.

Hemmatzadeh M, Mohammadi H, Karimi M, Musavishenas MH, Baradaran B. Differential role of microRNAs in the pathogenesis and treatment of Esophageal cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016; 82: 509–519.

Hermanek P. "Grading" and "staging". Significance for clinical oncology. Fortschr Med. 1978; Mar 16;96(10):520-4.

Hochberg F, Toniolo P, Cole P. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. Journal of Neuro-Oncology, 1990; 8(1): 21-27.

Hu Y, Xie H, Liu Y, Liu W, Liu M, Tang H. miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells. Cancer Cell International, 2017; 17(1): 11-19.

Huang B, Zhang H, Gu L, Ye B, Jian Z, Stary C, Xiong X. Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. Journal of Immunology Research, 2017; 2: 1–11.

Huntzinger E, Kuzuoğlu-Öztürk D, Braun JE, Eulalio A, Wohlbold L, Izaurralde E. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. Nucleic Acids Research, 2012; 41(2): 978–994.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, B´alint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 2001; 293:834–38.

Iacob G, Dinca EB. Current Data and Strategy in Glioblastoma Multiforme. Review. J Med Life. 2009; 2(4): 386–393.

Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE. Cellular-telephone use and brain tumors. N Engl J Med, 2001; 344: 79-86.

Janisch W, Haas JF, Schreiber D, Gerlach H. Primary central nervous system tumors in stillborns and infants. Epidemiological considerations. J Neurooncol 1984; 2(2): 113–116.

Jones CC, Bradford Y, Amos CI, Blot WJ, Chanock SJ, Harris CC, Aldrich MC. Cross-cancer pleiotropic associations with lung cancer risk in African Americans, Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2019; 3:21-27.

Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010; 19: 2421-27.

Kanderi T, Gupta V. Glioblastoma Multiforme, In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020; 6: 13-17.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Adamson C. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. Clinical Medicine. Oncology, 2009; 3: 4-11.

Karlsson UL, Leibel SA, Wallner K, Davis LW, Brady LW. Brain. İn: Principles and Practice of radiation oncology. (eds): Perez C.A, Brady L.W. J.B Lippincott Company, Philadelphia 2004; 28:791-838.

Keles GE, Anderson B, Berger MS. The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. Surg Neurol, 1999; 52:371–379.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in the synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. Elegans. Genes Dev, 2001; 15:2654–5269.

Khordadmehr M, Shahbazi R, Ezzati H, Jigari-Asl F, Sadreddini S, Baradaran B. Key microRNAs in the biology of breast cancer; emerging evidence in the last decade. Journal of Cellular Physiology, 2019; 4: 89-93.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 2003; 115(2):209–216.

Kim DH, Rossi JJ. RNAi mechanisms and applications. BioTechniques, 2008; 44(5): 613–616.

Kim VN. MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export. Trends Cell Biol. 2004; 14:156–59.

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. EMBO J. 2007; 26:775–783.

Kleihues P, Cavenee WK. WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: IARC Press; 2000.

Komori T. Pathology and Genetics of Diffuse Gliomas in Adults. Neurologia Medico-Chirurgica, 2015; 55(1), 28–37.

Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, Haqqi T, Barna BP, Cowell JK. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. Oncogene. 1998; Apr 30; 16(17):2243-2248.

Kong Z, Wang Y, Ma W. Vaccination in the immunotherapy of glioblastoma. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2017; 14(2): 255–268.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic acids research, 2013; 42: 68-73.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Research, 2010; 39: D152–D157.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. Cancer Cell, 2008; 13(6): 472–482.

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J. Neurosurg., 2001; 95(2): 190-198.

Laurenti G, Tennant DA. Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? Biochemical Society Transactions, 2016; 44(4): 1111–1116.

Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, et al. Glioma Outcomes Investigators. Glioma Outcomes Investigators. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. J. Neurosurg., 2003; 99(3): 467-473.

Lee CH, Jung KW, Yoo H, Park S, Lee SH. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea, Journal of Korean Neurosurgical Society, 2010; 48(2):145-152.

Lee CY. Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. Onco Targets Ther, Jan 2017; 9;10:265-270.

Lee D, Tang W, Dorsey TH, Ambs S. miR-484 is associated with disease recurrence and promotes migration in prostate cancer. Biosci Rep. 2020 May 29;40(5):204-209.

Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN. Drosha in Primary MicroRNA Processing. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2006; 71(1): 51–57.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J. 2002; 21:4663–4670.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. The EMBO Journal, 2004; 23(20): 4051-4060.

Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. Anticancer Res. 2005; 25: 3825- 31.

Li SW, Qiu XG, Chen BS, Zhang W, Ren H, Wang ZC, Jiang T. Prognostic factors influencing clinical outcomes of glioblastoma multiforme. Chin Med J (Engl). 2009; 122(11):1245-1249.

Li T, Ding ZL, Zheng YL, Wang W. MiR-484 promotes nonsmall-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis. Biomed Pharmacother 2017; 96:153–164.

Li Y, Liu Y, Yao J, Li R, Fan X. Downregulation of miR-484 is associated with poor prognosis and tumor progression of gastric cancer. Diagnostic Pathology, 2020; 15(1): 17-21.

Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nature Reviews Cancer, 2015; 15(6): 321–333.

Liu H, Li S, Jiang W, Li Y. miR-484 Protects Rat Myocardial Cells from Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Caspase-3 and Caspase-9 during Apoptosis. Korean Circ J. 2020;50(3):250-263.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute-2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science. 2004; 305: 1437-1441.

Liu J, Li SM. MiR-484 suppressed proliferation, migration, invasion and induced apoptosis of gastric cancer via targeting CCL-18. International Journal of Experimental Pathology. 2020; 17: 36-42.

Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, et al. Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumorderived TGF-β. Clin Cancer Res 2011; 17:4296–4308.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007; 114(2):97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathologica, 2016; 131(6): 803–820.

Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. J Neuropathol Exp Neurol, 1993; 52(1):31-8.

Lu X, Lu J. The significance of detection of serum miR-423-5p and miR-484 for diagnosis of colorectal cancer. Clin Lab. 2015; 61(1-2):187-90.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science 2004; 303: 95–98.

Luo JW, Wang X, Yang Y, Mao Q. Role of micro-RNA (miRNA) in the pathogenesis of glioblastoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015; 19(9):1630-1639.

Lütgendorf-Caucig C, Freyschlag C, Masel EK, Marosi C. Guiding Treatment Choices for Elderly Patients with Glioblastoma by a Comprehensive Geriatric Assessment, Current Oncology Reports, 2020; 22(9): 41-47.

Mahvash M, Hugo HH, Maslehaty H, Mehdorn HM, Stark AM. Glioblastoma multiforme in children: report of 13 cases and review of the literature. Pediatr Neurol 2011; 45: 178-80.

Manrique-Guzmán S, Herrada-Pineda T, Revilla-Pacheco F. Surgical Management of Glioblastoma. In book: Glioblastoma. Chapter 12. September 2017; 3: 11-16.

Manterola L, Guruceaga E, Pérez-Larraya JG, González-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, et al. A small non-coding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. Neuro-Oncology, 2014; 16(4): 520–527.

Marie SKN, Shinjo SMO. Metabolism and brain cancer. Clinics, 2011; 66: 33–43.

Marina O, Suh JH, Reddy CA, Barnett GH, Vogelbaum MA, Peereboom DM, Chao ST. Treatment outcomes for patients with glioblastoma multiforme and a low Karnofsky Performance Scale score on presentation to a tertiary care institution. Journal of Neurosurgery, 2011; 115(2): 220–229.

Marquez J, Flores J, Kim AH, Nyamaa B, Nguyen ATT, Park N, Han J. Rescue of TCA Cycle Dysfunction for Cancer Therapy. Journal of Clinical Medicine, 2019; 8(12): 2161-2169.

Martinez NJ, Ow MC, Barrasa MI, Hammell M, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Walhout AJ. C.elegans genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. Genes & Development, 2008; 22(18): 2535–2549.

Maus A, Peters GJ. Glutamate and α-ketoglutarate: key players in glioma metabolism. Amino Acids, 2017; 49(1): 21–32.

McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. Current Treatment Options in Oncology, 2019; 20(3): 17-23.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute-2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol. Cell. 2004; 15: 185-197.

Mercatelli N, Galardi S, Ciafrè SA. MicroRNAs as Multifaceted Players in Glioblastoma Multiforme. International Review of Cell and Molecular Biology, 2017; 3: 269–323.

Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Kovarikova A, Radova L, Svoboda M, et al. miR-155 and miR-484 are associated with time to progression in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib, BioMed Res. Int. 2015; 3: 1–5.

Metcalfe SE, Grant R. Biopsy Versus Resection for Malignant Glioma. Review. Cochrane Database Syst Rev. 2001; (3): 2034-2039.

Metcalfe SE. Biopsy Versus Resection for Malignant Glioma. Cochrane Database Syst Rev. 2000; (2): 2034-2039.

Minniti G, Amelio D, Amichetti M, Salvati M, Muni R, Bozzao A, et al. Patterns of failure and comparison of different target volume delineations in patients with glioblastoma treated with conformal radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. Radiother Oncol. 2010; 97(3):377-381.

Mirchia K, Richardson TE. Beyond IDH-Mutation: Emerging Molecular Diagnostic and Prognostic Features in Adult Diffuse Gliomas. Cancers, 2020; 12(7), 1817-1823.

Nelson JS, Burchfiel CM, Fekedulegn D, Andrew M.E. Potential risk factors for incident glioblastoma multiforme: the Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study. Journal of Neuro-Oncology, 2012; 109(2): 315–321.

Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. FEBS Journal, 2015; 282(15): 2796-2805.

O'Bryan S, Dong S, Mathis JM, Alahari SK. The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer. European Journal of Cancer, 2017; 72: 1–11.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res 2004; 64:6892– 6899.

Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol 2005; 109: 93-108.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol 2007; 170:1445–53.

Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. Clinical Cancer Research, 2012; 19(4): 764–772.

Ostrom Q, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumours Diagnosed in the United States in 2009–2013. Neuro-Oncology.

2016;18:v1–v75.

Panayiotopoulos CP. Symptomatic and cryptogenic (probably symptomatic) focal epilepsies. A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and Their Treatment, 2010; 3: 435–496.

Pandey JP. Genetic and Viral Etiology of Glioblastoma--a Unifying Hypothesis. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2011; 20(6): 1061–1063.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, Kinzler KW. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. Science, 2008; 321(5): 1807–1812.

Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. Cancer Letters, 2015; 362(1): 1–7.

Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2017; 2: 17040-17048.

Peiffer J, Kleihues P. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), Pioneer in Glioma Research. Brain Pathology, 2006; 9(2): 241–245.

Pellerino A, Franchino F, Soffietti R, Rudà R. Overview on current treatment standards in high-grade gliomas. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2018; Sep; 62(3):225-238.

Pelosi E, Castelli G, Testa U. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Human Cancers: Physiopathologic Mechanisms and Therapeutic Targeting. Journal of Exploratory Research in Pharmacology. 2016; 1:1-8.

Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2016; 1(1): 89-96.

Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. Science. 2004; Apr 30; 304(5671):734-736.

Powers BE, Hoopes PJ, Ehrhart EJ. Tumor diagnosis, grading, and staging. Semin Vet Med Surg (Small Anim). 1995; 10(3):158-67.

Ramachandran N, Colman RF. Chemical characterization of distinct subunits of pig heart DPN-specific isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem. 1980; 255(18):8859-64.

Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. Oncologist, 2006; 11: 52-164.

Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, Leedman PJ. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013; 110(16): 6536–6541.

Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. J Natl Cancer Inst. 2010; 102:932–941.

Rolle CE, Sengupta S, Lesniak MS. Challenges in clinical design of immunotherapy trials for malignant glioma. Neurosurg Clin N Am. Review. 2010; 21(1):201-14. 639–646.

Rolle K. miRNA Multiplayers in glioma. From bench to bedside. Acta Biochimica Polonica, 2015; 62(3): 353–365.

Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M, Keller A. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. J Neurochem. 2011 Aug;118(3):449-457.

Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. Neurosurgery, 2008, 62(4): 753-764.

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. Genomics. 2003; 82: 323-330.

Schmidt C, Sciacovelli M, Frezza C. Fumarate hydratase in cancer: A multifaceted tumour suppressor. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2019; 4: 11-17.

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. Nature Clinical Practice Neurology, 2006; 2(9): 494–503.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. Cell, 2003; 115(2): 199–208.

Sestito S, Runfola M, Tonelli M, Chiellini G, Rapposelli S. New Multitarget Approaches in the War Against Glioblastoma: A Mini-Perspective. Frontiers in Pharmacology, 2018; 9: 56-63.

Shah JL, Li G, Shaffer JL, Azoulay MI, Gibbs IC, Nagpal S, Soltys SG. Stereotactic Radiosurgery and Hypofractionated Radiotherapy for Glioblastoma. Neurosurgery, 2017; 82(1): 24–34.

Shahcheraghi SH, Zangui M, Lotfi M, Ghayour-Mobarhan M, Ghorbani A, Jaliani HZ, Sadeghnia HR, Sahebkar A. Therapeutic Potential of Curcumin in the Treatment of Glioblastoma Multiforme. Curr Pharm Des. 2019; 25(3): 333-342.

Shen Y, Qi L, Li Y, Zhang Y, Gao X, Zhu Y, Wang K. The Downregulation of lncRNA PGM5-AS1 Inhibits the Proliferation and Metastasis Via Increasing miR-484 Expression in Colorectal Cancer. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 2020.

Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. Pharmacological Reviews, 2018; 70(3): 412–445.

Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Kapczuk P, Fabiańska M, Gutowska I, Machoy-Mokrzyńska A, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Epidemiology of Anthropometric Factors in Glioblastoma Multiforme—Literature Review. Brain Sciences, 2021; 11(1), 116-119.

Smith AC, Robinson AJ. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modeling diseases of the tricarboxylic acid cycle. BMC Systems Biology, 2011; 5(1): 102-119.

Sonoda Y. Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. International Journal of Clinical Oncology. 2020.

Stander M, Peraud A, Leroch B, Kreth FW. Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis. Cancer. 2004; 101:1028–1035.

Stettner MR, Wang W, Nabors LB, Bharara S, Flynn DC, Grammer JR, et al. Lyn kinase activity is the predominant cellular SRC kinase activity in glioblastoma tumor cells. Cancer Res, 2005; 65(13):5535-5543.

Stoddard BL, Dean A, Koshland DE Jr. Structure of isocitrate dehydrogenase with isocitrate, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, and calcium at 2.5-A resolution: a pseudo-Michaelis ternary complex. Biochemistry. 1993; 32 (36): 9310-9316.

Stoyanov GS, Petkova L, Dzhenkov DL. Hans Joachim Scherer and His Impact on the Diagnostic, Clinical, and Modern Research Aspects of Glial Tumors. Review. Cureus, 2019 Nov 13; 11 (11), e6148-6154.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N. Engl. J. Med. 2005; 352(10): 987–996.

Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2017; 318(23):2306-2316.

Stupp R, Wong E, Scott C. Taillibert S, Kanner A, Kesari S, Ram Z. NT-40 Interim analysis of the EF-14 Trial: A prospective, multi-center trial of NovoTTF-100A together with temozolomide compared to temozolomide alone in patients with newly diagnosed GBM. Neuro-Oncology, 2014; 16: v167-v172.

Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomized phase III trial of a novel treatment modality. Eur. J. Cancer, 2012; 48:2192-2202.

Sudarshan S, Linehan WM, Neckers L. HIF and fumarate hydratase in renal cancer. British Journal of Cancer, 2007; 96(3): 403–407.

Suri V, Jha P, Srivastava A, Sharma V, Pathak P, Sharma M, Kakkar A. Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. Neurology India, 2011; 59(2): 254-261.

Tabei Y, Kobayashi K, Saito K, Shimizu S, Suzuki K, Sasaki N, Nagane M. Survival in patients with glioblastoma at a first progression does not correlate with isocitrate dehydrogenase (IDH)1 gene mutation status. Japanese Journal of Clinical Oncology. 2020; 3: 17-21.

Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In Glioblastoma; Codon Publications: Singapore, 2017; 3:143–153.

TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 2008 Oct 23; 455(7216):1061-1068.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2014; 23(10): 1985–1996.

Thien N, Tran N. The Distribution and Significance of IDH Mutations in Gliomas. Central Nervous System Tumors. Book. January 2022;19: 52-59.

Tivnan A, Heilinger T, Lavelle EC, Prehn JHM. Advances in immunotherapy for the treatment of glioblastoma. Journal of Neuro-Oncology, 2016; 131(1): 1–9.

Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018.

Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Nelson S.F. Distinct Transcription Profiles of Primary and Secondary Glioblastoma Subgroups. Cancer Research, 2006; 66(1): 159–167.

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme – an overview, Współczesna Onkologia, 2014; 5: 307–312.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 2009; 324: 1029–1033.

Vecchione A, Belletti B, Lovat F, Volinia S, Chiappetta G, Giglio S, Sonego M, et al. A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110:9845–9850.

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Hayes DN. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell, 2010; 17(1): 98–110.

Wainwright DA, Dey M, Chang A, Lesniak MS. Targeting tregs in malignant brain cancer: overcoming IDO. Front Immunol 2013; 4:116-121.

Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. Neuro-Oncology, 2016; 18(1), 16–26.

Waitkus MS, Yan H. Targeting isocitrate dehydrogenase mutations in cancer: emerging evidence and diverging strategies. Clin Cancer Res. 2021; 27(2):383-388.

Walenkamp A, Crespo G, Fierro Maya F, Fossmark R, Igaz P, Rinke A, Meyer T. Hallmarks of gastrointestinal neuroendocrine tumors: implications for treatment. Endocrine-Related Cancer, 2014; 21(6): R445–R460.

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; 3: 17-25.

Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. Nature Structural & Molecular Biology. 2009; 16 (11): 1148–1153.

Wang K, Long B, Jiao JQ, Wang JX, Liu JP, Li Q, Li PF. miR- 484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1. Nat Commun 2012; 3:781-790.

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. The Journal of Biochemistry. 2019; 3:87-93.

Wang X, Xu X, Ma Z, Huo Y, Xiao Z, Li Y, Wang Y. Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. RNA, 2011; 17(8): 1511–1528.

Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. Cancer Cell 2012; 21: 297–308.

Watts G. Work on RNA interference brings Nobel triumph. BMJ, 2006; 333(7571): 717.721.

Wei Y, Li H, Qu Q. miR-484 suppresses endocrine therapy-resistant cells by inhibiting KLF4-induced cancer stem cells in estrogen receptor-positive cancers. Breast Cancer. 2021; 3: 98-103.

Weiss C, Zeng Y, Huang J, Sobocka MB, Rushbrook JI. Bovine NAD+-Dependent Isocitrate Dehydrogenase: Alternative Splicing and Tissue-Dependent Expression of Subunit 1. Biochemistry, 2000; 39(7): 1807–1816.

Weiss T, Weller M, Roth P. Immunotherapy for glioblastoma. Current Opinion in Neurology, 2015; 28(6): 639–646.

Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. Biochimie, 2011; 93(11): 1897–1904.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell, 1993; 75: 855-862.

Willander K, Falk I, Chaireti R, Paul E, Hermansson M, Gréen H, Söderkvist P. Mutations in the isocitrate dehydrogenase 2 gene and IDH1 SNP 105C > T have a prognostic value in acute myeloid leukemia. Biomarker Research, 2014; 2(1):18-23.

Winters JL, Wilson D, Davis DG. Congenital glioblastoma multiforme: a report of three cases and a review of the literature. J Neurol Sci 2001; 1: 13-19.

Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. Gliomas, 2016; 3: 381–397.

Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. J. Biol. Chem., 2007; 282, 2130-2134.

Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion, Neuro-Oncol. 2014;16: 1575–1584.

Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, Ding J. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279 (32): 33946–33957.

Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, Ding J. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. J Biol Chem. 2004; 279(32):33946–33957.

Yang Y, Lin X, Lu X, Luo G, Zeng T, Tang J, et al. Interferon-microRNA signaling drives liver precancerous lesion formation and hepatocarcinogenesis. Gut. 2016; 65(7):1186–1201.

Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. Current Opinion in Chemical Biology, 2019; 51: 11–17.

Yasargil MG, Kadri PA, Yasargil DC. Microsurgery for malignant gliomas. J Neurooncol, 2004; 69:67–81.

Yasutake Y, Watanabe S, Yao M, Takada Y, Fukunaga N, Tanaka I. Structure of the Monomeric Isocitrate Dehydrogenase. Structure, 2002; 10(12): 1637–1648.

Ye FG, Song CG, Cao ZG, Xia C, Chen DN, Chen L, et al. Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. Cancer Research, 2015; 75(7): 1504–1515.

Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. Oncogene, 2010; 29:6409–6417.

Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. Nucleic Acids Res. 2006; 34:4622–4629.

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.

Yi R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes & Development, 2003; 17(24), 3011–3016.

Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. Ann Transl Med. 2015 Jun; 3(9): 121.

Zamore PD. RNA Interference: Big Applause for Silencing in Stockholm. Cell, 2006; 127(6): 1083–1086.

Zanders ED, Svensson F, Bailey DS. Therapy for glioblastoma: is it working? Drug Discovery Today 2019.

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;3:89-94.

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(1):200-208.

Zekri L, Huntzinger E, Heimstädt S, Izaurralde E. The silencing domain of GW182 interacts with PABP to promote translational repression and degradation of miRNA targets and is required for target release. Mol. Cell. Biol, 2009; 29:6220–6231.

Zhan C, Gu B, Xie C, Li J, Liu Y, Lu W. Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect. J Control Release. 2010; Apr 2; 143(1):136-42.

Zhang Q, Li X, Li X, Li X, Chen Z. LncRNA H19 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) by targeting miR-484 in human lung cancer cells. Journal of Cellular Biochemistry, 2018; 119(6): 4447–4457.

Zhang Y, Lv W, Li Q, Wang Q, Ru Y, Xiong X, et al. IDH2 compensates for IDH1 mutation to maintain cell survival under hypoxic conditions in IDH1‑mutant tumor cells. Molecular Medicine Reports. June 2019; 20(2): p1893-1900.

Zhao M, van Straten D, Broekman MLD, Préat V, Schiffelers RM. Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. Theranostics, January, 2020; 10(3):1355-1372.

Zinn PO, Sathyan P, Mahajan B, Bruyere J, Hegi M, Majumder S, Colen RR. A Novel Volume-Age-KPS (VAK) Glioblastoma Classification Identifies a Prognostic Cognate microRNA-Gene Signature. PLoS ONE, 2012; 7(8): e41522-e41529.

Etik Kurul Kararı

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 96681246/
Konu :

06.04.2019

Sayın Doç. Dr. Zühal Hamurcu
Tıbbi Biyoloji

Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 03.04.2019 tarihinde yapılan toplantıda çalışmanız ile ilgili alınan Etik Kurul Kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

Eki: ..... adet

38039 Melikgazi-KAYSERİ
Tel: 0 352 437 49 10 – 11 **Faks:** 0 352 437 52 85 **e-mail:**tipdekanlik@erciyes.edu.tr

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastomanın Agresifliğinde miR-484`ün Rolünün Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ		
	ETİK KURULUN ADI	ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11
	FAKS	0 352 437 52 85
	E-POSTA	sukriye@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ					
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Doç.Dr.Zuhal Hamurcu			
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri			
	VARSA İDARİ SORUMLU ÜNVANI/ ADI SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Doç.Dr.Zuhal Hamurcu			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1			
		FAZ 2			
		FAZ 3			
		FAZ 4			
		Gözlemsel ilaç çalışması			
		Tıbbi cihaz klinik araştırması			
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları			
		İlaç dışı klinik araştırma			
		Diğer ise belirtiniz	Bireysel Araştırma Projesi		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ [x]	ÇOKMERKEZ [ ]	ULUSAL [x]	ULUSLARARASI [ ]

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastomanın Agresifliğinde miR-484`ün Rolünün Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
SİGORTA	[ ]	
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	[ ]	
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	[ ]	
İLAN	[ ]	
YILLIK BİLDİRİM	[ ]	
SONUÇ RAPORU	[ ]	
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	[ ]	
DİĞER	[ ]	

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2019/247 Tarih : 03.04.2019

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Sema Kader KÖSE

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki		Katılım
Prof. Dr. Sema Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı.	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Prof.Dr.Murat SİPAHİOĞLU	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Prof.Dr.Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç. Dr. Yusuf SEVİM	Genel Cerrahi	Kayseri Eğitim Hast.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek.Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç. Dr. Mehmet DOLANBAY	Kadın Hast. ve Doğum	E.Ü. Tıp Fak..	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak..	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak..	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç.Dr.Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Dr.Öğr.Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [x]
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E [x]	K [ ]	E [ ]	H [x]	E [ ]
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [x]
Sevtap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E [ ]	K [x]	E [ ]	H [x]	E [ ]

*: Toplantıda Bulunma

Çalışma İzin Belgesi

GEN KÖK
Genom ve Kök Hücre Merkezi
Genome and Stem Cell Center

Sayı: 68742022- 604.01.02-056 16/04/2019
Konu: Değerlendirme ve Onay

Sayın; Doç.Dr. Zuhal HAMURCU

"Izositrat dehidrogenaz (IDH) geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan glioblastomalarda miR-484 ' ün rolünün araştırılması" başlıklı projenizin Merkezimiz Genom Biriminde yapılması uygun bulunmuştur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi
Erciyes Üniversitesi Merkez Kampüsü / 38039 Kayseri / TÜRKİYE Telefon: +90 352 207 66 66 / 13 600 Telefon: +90 352 437 93 15
Faks: +90 352 437 93 16 E-mail: info@genkok.com E-mail: genkok@erciyes.edu.tr Web: www.genkok.com

Benzerlik Oranı Sonuç Raporu

IZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMALARDA MİR-484'ÜN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%8	%1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%7
2	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
3	Yujie Zhong, Chengni Jin, Jiahui Han, Jiachang Zhu, Qi Liu, Dianjun Sun, Xiaodong Xia, Yu Zhang, Xiaoli Peng. " Diosgenin Protects Against Kidney Injury and Mitochondrial Apoptosis Induced by 3-MCPD Through the Regulation of ER Stress, Ca Homeostasis and Bcl2 Expression ", Molecular Nutrition & Food Research, 2021 Yayın	<%1
4	repositorium.sdum.uminho.pt İnternet Kaynağı	<%1
5	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nursultan NURDINOV

Uyruğu: Kazakistan

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Sultanbek Kocanov Ilköğretim ve Ortaöğretim Okulu. Kazakistan, Kızılorda, Canakorgan ilçesi, Birlik	2010
Lisans	Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Kazak - Türk Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı. Türkistan şehri, Kazakistan	2014
Yüksek Lisans	Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Kazak - Türk Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı. Türkistan şehri, Kazakistan	2016
Doktora	ERÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Kayseri, Türkiye	Devam etmektedir

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2016-2017	Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Kazak - Türk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Laboratuar disiplinleri bölümü, Türkistan şehri, Kazakistan	Tıbbi biyoloji ve Genetik dersi Öğretmeni

YABANCI DİL

Türkçe, İngilizce, Rusça

YAYINLAR

1. Hamurcu Z, Delibaşı N, Nalbantoglu U, Sener EF, Nurdinov N, Tascı B, Taheri S, Özkul Y, Donmez-Altuntas H, Canatan H, Ozpolat B7,8. FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple-negative breast cancer cells. J Mol Med (Berl). 2019 Feb 7. doi: 10.1007/s00109-019-01750-8.

2. Nesrin Delibaşı, Zuhal Hamurcu, Venhar Çınar, Nursultan Nurdinov, Ahsen Güler, Bülent Özpolat. Yumurtalık Kanser Hücrelerinde Otofajik Aktivitenin Rolü. 7. Moleküler Kanser Araştırma ve 1. Temel Onkoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 11-14 Ekim 2018, İzmir, Türkiye. (Poster)

3. Bayram Taşçı, Zuhal Hamurcu, Nesrin Delibaşı**,** Nursultan Nurdinov, Prof. Dr. Yusuf Özkul, Dr. Bülent Özpolat. Otofaji İnhibitörü olan Bafilomycin A1'in Agresif Meme Kanser Hücrelerinde Hücre Canlılığına ve Hücre Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi. Uluslararası Katılımlı Gevher Nesibe Tıp Günleri. Geleneksel Gevher Nesibe Araştırma Teşvik Ödülü öğrenci kategorisi üçüncülük ödülü Erciyes Üniversitesi-Kayseri, 14 Mart 2018 (Sözlü bildiri).

4. Tuba Dilay Ünal, Zuhal Hamurcu, Nesrin Delibaşı, Venhar Çınar, Ahsen Güler, Sevda Gökçe, Nursultan Nurdinov, Bulent Ozpolat. Thymoquinone Inhibits Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cells by Suppressing Autophagy and Beclin-1 and LC3. Anticancer Agents Med Chem. 2020 Aug 7. DOI: 10.2174/1871520620666200807221047.

5. Gur FM, Timurkaan S, Taskin E, Guven C, Gur HE, Senturk M, Dastan S, Nurdinov N, Unalan A, Cankut S, Tatyuz I. Thymoquinone improves testicular damage and sperm quality in experimentally varicocele-induced adolescent rats. Andrologia. 2021 Mar 4:e14033. doi: 10.1111/and.14033.

6. Nurdinov N, Çınar V, Güler A, Yılmaz SG, Delibaşı Kökçü N, Hamurcu Z. LC3 and Beclin-1 as Markers of Autophagic Activity in Breast Cancer. Erciyes Med J 2020; DOI: 10.14744/etd.2020.99997

7. Venhar Cınar, Zuhal Hamurcu, Ahsen Guler, Nursultan Nurdinov, Bulent Ozpolat. 2022. "Serotonin 5-HT7 receptor is a biomarker poor prognostic factor and induces proliferation of triple-negative breast cancer cells through FOXM1", Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. JOCR-D-21-03939. PREPRINT.

8. Serhat Albayrak, Ahsen Güler, Nursultan Nurdinov, Arş. Gör. Venhar Çınar, Berkay Arslan, İrem Metin, Berfin Uğur, Sena Özkul, Prof. Dr. Zuhal Hamurcu, Dr. Öğr. Üyesi Halil Ulutabanca. Glioblastoma hücrelerinde temozolomid ve mir-484 kombinasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. 7. Uluslararası Erciyes Bilimsel Araştırmalar Kongresi. 9-10 mart 2022, Kayseri.