

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMALI OLGULARDA MUTASYON VE METİLASYON**  
**PATERNLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**RASİME KALKAN**

**DANIŞMAN**

**YRD. DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR**

**EYLÜL-2011**

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMALI OLGULARDA MUTASYON VE METİLASYON  
PATERNLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

RASİME KALKAN

DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR

Proje no: 201011034

**KABUL ve ONAY SAYFASI**

Rasime KALKAN' ın Doktora tezi olarak hazırladığı "*Glioblastomalı Olgularda Mutasyon ve Metilasyon Paternlerindeki Değişikliklerin Araştırılması*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih: 14.09.2011

Üye: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

Üye: Prof. Dr. Ali ARSLANTAŞ

Üye: Prof. Dr. Sibel BERKER

Üye: Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR (Danışman)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.09.2011 tarih ve 887/4115. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Glioblastoma Multiforme beyin tümörleri içerisinde en sık rastlanan histolojik tiptir. Yetişkinlerde en çok görülen primer beyin tümörü olup, tüm gliomaların %50-60'ını oluşturmaktadır. Her yaşta görülebilir, ancak olgular sıklıkla 45-75 yaş arasında olup ortalama sağ kalım süresi 12-18 aydır.

Çalışmamızda son yıllarda GBM hastalarında prognozun belirlenmesinde etkisi olduğu bildirilen ve üzerinde çalışılan genlerden IDH1 geninin dizi analizi ile mutasyon taraması ve MS-HRM ile MGMT gen metilasyon durumunun belirlenmesi ve olguların klinik özellikleriyle ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalına başvuran ve histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı almış olan 40 olgu çalışmaya alınmıştır.

Literatürde MGMT geninin metilasyon frekansı %24-86 gibi çok geniş bir aralıkta bildirilmiştir. Çalışmamızda MGMT metilasyonu %32,5 olarak bulunmuştur. Metile MGMT'li olguların yaş ortalaması  $58\pm 13$  ve ortalama sağ kalım süresi 19 ay, unmetile MGMT'li olguların yaş ortalaması  $55\pm 15$  ve ortalama sağ kalım süresi ise 15 ay olarak saptanmıştır. RT+KT alan olguların sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde 17 ay, sadece RT alan olguların sağ kalım süreleri ise 14 ay olarak saptanmıştır.

Literatürde IDH1 mutasyon frekansı primer GBM'lerde %3-56 arasında değişirken, sekonder GBM'lerde ise %44-88, primer ve sekonder ayırımı yapılmadan ise mutasyon oranı %12-20 gibi geniş bir yelpaze içerisinde belirtilmiştir. Çalışmamıza olgular primer ve sekonder GBM ayırımı yapılmadan dahil edilmiş olup IDH1 mutasyonu %12,5 olarak bulunmuştur. IDH1 mutasyonu ile olguların yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. IDH1 mutasyonu taşıyan GBM'lerin yaş ortalamasının  $41\pm 5.06$ , mutasyon taşımayanların yaş ortalamasının ise  $57\pm 2.29$

olduğu saptanmıştır. Mutasyon taşıyan olguların ortalama sağ kalım sũresi 19 ay iken mutasyon taşımayan olguların sağ kalım sũresi 16 ay olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızın bu yũnde yapılacak çalışmalara yol gũsterici bilgiler vereceği dũřũncesindeyiz. Çalışmamız, Tũrk popũlasyonunda IDH1 mutasyonunun ve MGMT metilasyonunun birlikte incelendiği ilk çalışma olma ũzelliđini taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** GBM, IDH1, MGMT, Metilasyon, Dizi Analizi.

## SUMMARY

Glioblastoma Multiforme is the most common histological type in brain tumors and the most common primary brain tumor in adults. GBM forms the %50-60 of all gliomas and it may occur at any age, but cases are between the ages 45-75 with an overall survival time of 12-18 months.

The aim of the study is to screen the mutations in IDH1 with sequence analysis and methylation status of MGMT by MS-HRM and the data obtained were compared with patient clinical information. This genes was mostly studied in resent years and we have known that they affect the prognosis.

40 patients with diagnose as “Glioblastoma Multiforme” by histopathologically, admitted to the Neurosurgery Department in Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine had been included to the study.

In the literature MGMT methylation frequency seen in a broad frequency range 24% - 86%. In our study the MGMT methylation frequency was found 32,5%. In our study the median age  $58\pm 13$  and survival time was 19 months in methylated MGMT and in unmethylated MGMT tumors median age was  $55\pm 15$  and median survival time was found as 15 months. In our study the median survival time of our patients was analysed by treatment modality and in RT+KT group median survival time was 17 months and in RT group median survival time was 14 months.

In the literature the mutation frequency of IDH1 seen in a broad frequency range and in primary GBM 3%-56%, 44%-88% in secondary GBM and 12%-20% without making a separation between the primary and secondary GBM. The patients in our study without making a distinction between the primary and the secondary GBM and the IDH1 mutation was found 12,5%. Statistically association was detected between IDH1 mutation and patients age. In IDH1 mutant tumors the median age is  $41\pm 5.06$  and

## PDF Eraser Free

in wild-IDH1 tumors the median age is  $57\pm 2.29$ . In our study the median survival time was 19 months in IDH1 mutant tumors and 16 months in wild-IDH1 tumors. Our study is important due to being the first study analyzing this mutation on GBM patients in Turkish population.

As a result we think that our study will provide information to the other studies which will be done about this subject. Our study is important due to being the first study to analyzing IDH1 mutations and MGMT methylations on GBM patients in Turkish population.

**Key Words:** GBM, IDH, MGMT, Methylation, Sequence Analysis.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Beyin Tümörleri.....	4
2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması .....	6
2.2.1. WHO Sınıflandırması.....	9
2.3. Glioblastoma Multiforme (GBM) .....	10
2.3.1. Epidemiyoloji.....	10
2.3.2. Moleküler Patogenez.....	11
2.3.2.1. Primer Glioblastoma Multiformedeki Genetik Özellikler.....	13
2.3.2.2. Sekonder Glioblastoma Multiformedeki Genetik Özellikler.....	14
2.3.3. IDH1.....	17
2.3.3.1. IDH1 mutasyonunun fonksiyonel özellikleri.....	18
2.3.3.1.1. $\alpha$ -Ketoglutarat .....	20
2.3.3.1.2. NADPH.....	20



<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)</b>	<b>Sayfa</b>
2.3.3.1.3. 2-Hidroksi Glutarat.....	21
2.3.3.1.4. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör (HIF1 $\alpha$ ).....	21
2.3.3.2. Mutasyon Sıklığı.....	24
2.3.3.3. Diğer Genetik Değişiklikler ile İlişkisi.....	25
2.3.3.4. Yaş ile ilişkisi.....	26
2.3.3.5. Prognoz ile ilişkisi.....	26
2.3.3.6. Araştırma ve Klinik Uygulamaya Faydası.....	27
2.3.4. Glioblastoma Multiforme ve DNA Metilasyonu.....	27
2.3.4.1. MGMT.....	28
2.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analiz Yöntemi.....	33
2.4.1. DNA'nın Tm Derecesi.....	35
2.4.2. MS-HRM.....	35
2.4.3. Bisüfit Modifikasyon.....	36
2.5. Dizi Analizi Yöntemi.....	37
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>39</b>
3.1. Gereçler.....	39
3.1.1. Materyal seçimi.....	39
3.1.2. Kullanılan gereçler.....	40
3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	41
3.2. Yöntemler .....	42

**İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)**

**Sayfa**

3.2.1. Magna Pure Compact DNA ekstraksiyon robotu ile dokudan DNA elde etme protokolü.....	42
3.2.2. Bisülfite Modifikasyon.....	44
3.2.3. Modifiye Örneklerin MS-HRM Analizine Hazırlanması.....	46
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	48
3.2.4.1. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile İncelenmesi.....	50
3.2.4.2. PCR Ürününün Saflaştırılması.....	51
3.2.4.3. Otomatik DNA Dizi Analizi.....	52
3.2.4.4. Sekans Reaksiyonu Sonrası Pürifikasyon.....	52
3.3. İstatistiksel Analizler.....	53
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>54</b>
4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri.....	55
4.2. Araştırma Grubu Bireylerin MS-HRM Bulguları.....	55
4.3. MGMT Geninin Kantitatif Metilasyon Analizine Ait Bulgular.....	62
4.4. Glioblastomalı Olgularda Saptanan MGMT Metilasyonu ile Prognoz ve Tedaviye Yanıt Bulgularının Değerlendirilmesi.....	63
4.5. Araştırma Grubu Bireylerin Dizi-Analizi Bulguları.....	66
4.6. MGMT Metilasyonu ve IDH1 Mutasyonun Birlikte Değerlendirilmesine Ait Bulgular.....	70
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>71</b>

<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)</b>	<b>Sayfa</b>
<b>5.1. MS-HRM Yöntemi İle MGMT Metilasyonu İçin Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması</b> .....	<b>71</b>
<b>5.2. Glioblastomalı Olgularda Saptanan MGMT Metilasyonu ile Prognoz ve Tedaviye Yanıtlarının Literatür Verileri İle Karşılaştırılması</b> .....	<b>82</b>
<b>5.3. Dizi Analizi Yöntemi İle IDH1 Mutasyonu İçin Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması</b> .....	<b>85</b>
<b>5.4. MGMT Metilasyonu ve IDH1 mutasyonun Birlikte Değerlendirilmesi ve Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması</b> .....	<b>93</b>
<b>6.SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	<b>96</b>
<b>7.KAYNAKLAR DİZİNİ</b> .....	<b>97</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>111</b>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Astrositik tümörlerde moleküler değişim.....	13
Şekil 2.2: Normal ve kanser hücresinde izositrat metabolizması.....	22
Şekil 2.3: TCA Döngüsü ve IDH genleri.....	24
Şekil 2.4: DNA metilasyonu ardından, metil grup O <sup>6</sup> -metilguanozinden MGMT' nin aktif bölgesine transfer edilmesi.....	31
Şekil 2.5: MGMT tamiri ve transisyon mutasyonunun oluşumu.....	32
Şekil 2.6: Bisülfid Modifikasyon.....	37
Şekil 3.1: Örnek DNA'lara ait %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 3.2: IDH1 ekson 4 bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	51
Şekil 4.1: Unmetile ve metile kontrol DNA pik görüntüsü.....	58
Şekil 4.2: Unmetile ve metile metilasyon paternine sahip incelenen bir grup olgunun Tm derecelerine ait pik görüntüsü.....	59
Şekil 4.3: %75 ve %50 metile olgulara ait kontrol DNA'ları ile uyumlu pik görüntüleri.....	60
Şekil 4.4: Metile kontrol DNA ile uyumlu %100 metile bir olguya ait pik görüntüsü...61	
Şekil 4.5: Unmetile kontrol DNA ile uyumlu olan unmetile bir olguya ait pik görüntüsü.....	61
Şekil 4.6: Normal bir olguya ait dizi analizi görüntüsü.....	69
Şekil 4.7: IDH1 R132H mutasyonlu (CGT>CAT) bir olguya ait dizi görüntüsü.....	69
Şekil 4.8: IDH1 R132H mutasyonlu (CGT>CAT) bir olguya ait dizi görüntüsü.....	69

**TABLolar DİZİNİ**

**Sayfa**

<b>Tablo 2.1:</b> WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırması.....	8
<b>Tablo 4.1:</b> Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları.....	55
<b>Tablo 4.2:</b> GBM tümör örneklerindeki MGMT geninin metilasyon oranları ve sağkalım süreleri ile ortalama yaşları.....	56
<b>Tablo 4.3:</b> Metile ve unmetile MGMT’li olguların sağkalım sürelerinin yığılım tablosu.....	57
<b>Tablo.4.4:</b> Olgu grubumuzun metilasyon oranlarına göre sağkalım tablosu.....	62
<b>Tablo 4.5:</b> Olguların metilasyon ve tedavi durumuna göre dağılımı.....	63
<b>Tablo 4.6:</b> RT+KT alan olgular ile adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu .....	64
<b>Tablo 4.7:</b> RT alan olgular ile adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu.....	65
<b>Tablo 4.8:</b> Tedavi tiplerine göre olguların sağ kalım sürelerinin tablosu.....	66
<b>Tablo 4.9:</b> GBM tümör örneklerindeki IDH1 geninin mutasyon oranları ve sağ kalım süreleri ile ortalama yaşları.....	67
<b>Tablo 4.10:</b> IDH1 mutasyonu taşıyan ve taşımayan olguların: sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu.....	68
<b>Tablo 5.1:</b> MGMT geni için çalışmamızda saptadığımız metilasyon oranı ve sağ kalım sürelerinin literatür verileri ile karşılaştırılması.....	81

**TABLULAR DİZİNİ(devam ediyor)**

**Sayfa**

**Tablo 5.2:** IDH1 geni için çalışmamızda saptadığımız mutasyon oranı, hasta yaşı ve sağ kalım sürelerinin literatür verileri ile karşılaştırılması.....93

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b><math>\alpha</math>-KG:</b>	$\alpha$ -ketoglutarat
<b>CBTRUS:</b>	Birleşik Devletler Merkezi Tümör Kayıt Dairesi
<b>ddNTP:</b>	Dideoksi ribonükleik asit tri fosfat
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP:</b>	Deoksiribonükleik asit tri fosfat
<b>GBM:</b>	Glioblastoma Multiforme
<b>HIF:</b>	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
<b>IDH:</b>	İzositrat Dehidrogenaz
<b>LOH:</b>	Heterozigosite Kaybı
<b>MGMT:</b>	O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
<b>MSP:</b>	Metilasyon Spesifik PCR
<b>MS-HRM:</b>	Metilasyon Spesifik High Resolution Melting
<b>MSS:</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>NCBI:</b>	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>NCI:</b>	Ulusal Kanser Enstitüsü
<b>OS:</b>	Genel Sağ Kalım
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PFS:</b>	Progresyonsuz Sağ Kalım
<b>SEER:</b>	Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar Programı
<b>SSCP:</b>	Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm Analizi

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>TBE:</b>	Tris-Borik EDTA
<b>TCA:</b>	Trikarboksilik Asit
<b>TCGA:</b>	Kanser Genom Atlas Araştırma Ağı
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>µg:</b>	Mikrogram



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Primer beyin tümörleri tüm kanserlerin %1,5'inden ve kansere bağlı ölümlerin %2'sinden sorumludur (9,56). Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi 2004-2006 verilerine göre beyin tümörlerinin erkeklerde görülen kanserler arasında 8. sırada, kadınlarda görülen kanserler arasında ise 10. sırada yer aldığı bildirilmektedir (83).

Tümör genomunun moleküler profili ile ilgili son zamanlarda büyük çalışmalar yapılmaktadır. Kolorektal ve meme kanserinin tüm genom sekanslama analizleri ve son olarak da pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) ve GBM'in sekans analizleri yapılmıştır. Bu mutasyonel çalışmalar tümörögenizde daha önce bilinmeyen yeni somatik mutasyonların tanımlanmasına yol açmıştır. GBM'in mutasyonel taramasında IDH1 (İzositrat Dehidrogenaz 1) geninin %12 somatik mutasyonu tespit edilmiş ve IDH1 mutasyonunun baskın olarak sekonder GBM ve genç kişilerde bulunduğu bildirilmiştir. Özellikle gliomagenezin erken dönemlerinde gerçekleştiği savunulmakta ve bu nedenle ileri derece tümörlerde sık gözlenmesi beklenmektedir (7).

IDH1 ile ilgili biyokimyasal çalışmalarda mutasyonun glioma patogenezinin altında yatan mekanizmaya ve metabolik yolağa ışık tuttuğu bildirilmiştir. IDH mutasyonu glioma patogenezinde ve glial tümörlerin spesifik subtiplerinin tanımlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Yapılan analizler de IDH1 mutasyonunun tümör evresi, yaş, MGMT metilasyon durumu, genomik profil ve tedavi için prognostik marker olduğunu doğrulamıştır (104).

IDH1 mutasyonu gliomalarda ilk olarak sekonder GBM'lerle çalışılmış ve sekonder GBM'ler için moleküler bir marker olduğu bildirilmiştir. İlk analizler IDH

mutasyonunu taşıyan tümörlerin yabancı tip IDH'lılara göre daha iyi bir prognoza sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum derece II ve IV gliomalar ve oligodendroglial gliomalarda doğrulanmıştır. Son veriler IDH1 mutasyonunun prognostik etkisinin, anaplastik astositomalar ve primer GBM'lerde güçlü olduğunu ve WHO (World Health Organization) klasifikasyonunu ve bu tümörlerin evrelendirilmesini değiştirdiğini göstermektedir (99).

Geçerli WHO klasifikasyonunun tanı sisteminde IDH'm durumu:

- Astrositoma veya oligodendroglionun diffuz tümör infiltrasyonunu belirlemek;
- Reaktif astrositosisi difuz tümör infiltrasyonundan ayırt etmek;
- WHO grade I astrositomaları diffuz astrositomalardan ayırt etmek;
- Astrositik ve oligodendroglial tümörleri ependimomalardan ayırt etmek;
- Oligodendroglionları diğer berrak hücre morfolojisi olan glionöronal tümörlerden ayırt etmek;
- Grade II-IV gliomalarda prognostik bilgi edinmek için yardımcı olacaktır (99).

Son yıllarda herhangi bir gen mutasyonu olmamasına rağmen ilgili genlerin ürün oluşturmaması ya da gerekenden fazla ürün sentezlenmesine neden olan metilasyon, asetilasyon ve mikroRNA gibi epigenetik mekanizmaların karsinogenezis sürecindeki rolleri detaylı olarak ortaya konmaktadır. GBM olgularında da birçok genin epigenetik değişimi gerçekleşmektedir. Moleküler marker olarak MGMT temozolomid gibi alkile edici ajanlarla tedavi de prediktif bir değere sahiptir (79). Kolon kanseri, pankreatik karsinoma ve akciğer kanserinde yüksek MGMT aktivitesi varken, beyin tümörleri ve malign melanomada MGMT aktivitesi daha düşük düzeydedir. Over kanserinde MGMT ekspresyonu sınıflandırma ve evreleme ile ilişkilendirilmiş, glioblastomalarda ise rekürrensde artış olduğu gözlenmiştir (42). MGMT'nin hipermetilasyon ile epigenetik olarak sessizleştirilmesi primer glioblastomalarda %40, sekonder glioblastomalarda %70'ten fazladır (79).

## PDF Eraser Free

Yaptığımız çalışmada,

- GBM'li olgularda MGMT metilasyonu ve IDH1 mutasyonunun frekansını belirleyip, hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek,
- Türk toplumunda GBM hastalarının MGMT metilasyon ve IDH1 mutasyon frekansını hesaplamak ve ortalama sağ kalım sürelerini ortaya koyabilmek,
- GBM için ileride yapılacak çalışmalara ışık tutmak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Beyin Tümörleri

Primer beyin tümörleri modern tıbbın en agresif hastalıklarından biridir. Diğer kanserlerle karşılaştırıldıklarında daha nadir görülmektedirler (65). ABD’de (Amerika Birleşik Devletleri) yılda 13000 kişi primer beyin tümöründen öldüğü bildirilmektedir ve malign beyin tümörleri kanser ilişkili ölümler listesinde ilk 10’un içerisinde yer almaktadır (65). Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi 2004-2006 yılları arasında 901 erkek olgunun ve 714 kadın olgunun beyin ve sinir sistemi tümörü olarak rapor edildiğini bildirmişlerdir (83).

Beyin tümörleri üzerine tanımlayıcı verinin klasik kaynağı Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından desteklenen Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER) programıdır. Bu program Birleşik Devletler nüfusunun yaklaşık %26’sı üzerinden popülasyona dayalı kanser verilerini; kanser insidansı ve sağ kalım üzerine ulusal yatkınlığı ölçmek için toplamakta olup sadece malign tümörleri içermektedir. Amerika Beyin Tümörü Kayıt Merkezi ise (Central Brain Tumor Registry Of The United States, CBTRUS) hem malign hem de malign olmayan beyin tümörlerini dahil etmektedir. 1992 yılında kurulan CBTRUS, ülkenin en büyük primer beyin tümörlerinin popülasyona dayalı kayıt dairesidir, ondört eyaletteki kanser kayıt dairelerinden bilgileri derlemektedir (11).

Amerikan Kanser Derneği Birleşik Devletler’de 2005 yılında malign primer merkezi sinir sistemi tümörü tanısı alan yaklaşık 18500 yeni olgu olduğunu hesaplamıştır. Aynı yıl için, CBTRUS hem malign hem de malign olmayan yeni primer merkezi sinir sistemi tümörü olgu sayısını yaklaşık 43800 olarak hesaplamıştır. 1998-2002 yılları arasında tüm ırklarda, malign beyin tümörleri için yıllık insidans oranı her 100000 kişide 7,4’tür; aynı insidans oranı (7,4/100000 kişi/yıl) primer malign olmayan

beyin tümörleri için de bildirilmiştir (11). CBTRUS'un 2008 yılında yayınladığı rapora göre ise primer beyin tümörü (benign ve malign) insidansı yüzbinde 11,4 ve 23,5 arasında değişmektedir.

Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2006 yılında kanser kayıtlarında öncelik verilecek illeri: Ankara, Antalya, Samsun, Erzurum, Trabzon, İzmir, Edirne, Eskişehir olarak belirlemiştir (32). Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi 2004-2006 verilerine göre beyin ve sinir sistemi tümörleri erkeklerde görülen kanserler arasında 8. sırada, kadınlarda görülen kanserler arasında ise 10. sırada yer aldığı bildirilmektedir. 2004 yılında 266 erkek ve 205 kadın olgu, 2005 yılında 323 erkek ve 242 kadın olgu, 2006 yılında ise 312 erkek ve 267 kadın olguda beyin ve sinir sistemi tümörü rapor edilmiştir (83). Türk Tabipler Birliği 2006 verilerine göre ise Türkiye'de beyin tümörleri tüm kanser olguları içerisinde kadınlarda %3.99, erkeklerde ise %3.77 oranında görülmektedir (32).

Araştırmalar, yıllar içinde santral sinir sistemi tümörlerinin sıklığında hızlı bir artış olduğunu göstermektedir (9,54). Böyle bir sonucun ortaya çıkmasında, kansere neden olan faktörlerin artmasının yanı sıra (9) beyin tümörlerinin tanısını kolaylaştıracak gelişmelerin (bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi) yaygınlaşmasının rol oynayabileceği belirtilmiştir (54,58).

Primer beyin tümörlerinin 5 yıllık sağ kalım oranı tüm kanser tipleri arasında (sırasıyla, pankreas, karaciğer, özefagus, akciğer, mide ve multipl miyelom) 7. sırada ve en düşük olanıdır (1995-2001 yılları arasında %33). Beş yıllık sağ kalım oranları ana hatları ile histolojik subtiplere göre değişkenlik göstermektedir, bu değerlerin anaplastik astrozitoma için %29,4 ve glioblastoma multiforme için %3,3 olduğu bildirilmiştir (11).

Malign merkezi sinir sistemi tümörlerinin insidansında çok az bir erkek üstünlüğü vardır (kadınlar için yılda 4,6/100000 kişi, erkeklerde yılda 6,4/100000 kişi). Buna rağmen, malign olmayan ve malign merkezi sinir sistemi tümör tipleri birlikte

değerlendirildiğinde, cinsiyetler arası eşitsizlik daha azdır (kadınlar için yılda 15,1/100000 kişi, erkeklerde yılda 14,5/100000 kişi). Malign beyin tümörlerinin beyazlar ve siyahlar arasındaki insidansı karşılaştırıldığında; beyaz ırk her iki cinsiyet için siyah ırka göre daha yüksek bir insidansa sahiptir. Beyaz erkekler de insidans, 4,0/100000 kişi/yıl iken, siyah erkeklerde bu oran 7,0/100000 kişi/yıl olarak bildirilmiştir. Beyaz kadınlar ve siyah kadınlarda insidans 2,8/100000 kişi/yıl'a 5,0/100000 kişi/yıl olarak bildirilmiştir (11).

### 2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Santral sinir sistemi tümörleri belirgin bir çeşitlilik göstermektedir. Günümüzde sınıflama hemen hemen tamamen patolojiye dayanmaktadır.

Merkezi sinir sistemi histolojisiyle ilgili sistematik çalışmalara bakıldığında sınıflandırmalar, 20. yüzyıl başında Cajal ve Hortega, daha sonra Bielschowsky ve Bodian'ın bulduğu ve geliştirdiği nörohistokimya yöntemleriyle başlar. İlk yaygın kabul gören sınıflandırma Bailey ve Cushing (1926) ile başlayıp, Cox (1933), Kernohan (1949) ve Ringertz (1950) ile sürmüştür (59).

Beyin tümörlerinin bugünkü sınıflamasının temelini Virchow atmıştır. 1860'da beynin hücrelerarası matriksi olarak nöroglia'yı tariflenmiştir. Yine Virchow tarafından tümörlerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve "glioma" tarifinide ilk kez yapmıştır (4).

1926 yılında Bailey tarafından fibriler astrositik tümörler; astrositom, astroblastom ve spongioblastom (Glioblastoma Multiforme) olarak sınıflandırılmıştır (59).

Kernohan ve arkadaşları 1949 yılında dörtlü derece sistemini geliştirmiş, Broders Mayo Klinik de bu sınıflandırmayı kullanmıştır. İyi diferansiye astrositolar derece I, daha sellüler ve anaplastik olanlar derece II, çok anaplastik olanlar derece III ve IV olarak kabul edilmiştir. Derece III ve IV arasındaki ayırıcı tanıda mitotik figür sayısı, malign astrositlerin yüzdesi, nekroz, vasküler proliferasyon ve pleomorfizm dereceleri gibi histopatolojik parametreler kriter alınmıştır (59).

Ringertz 1950'de, astrositik tümörleri; astrositom, intermediate lezyon ve glioblastoma multiforme olarak sınıflandırmıştır (59). Anaplastik astrositom ve glioblastoma multiformenin ayırıcı tanısında en önemli faktör nekroz olarak kabul edilmiştir (12).

Daumuos Duport tarafından 1988'de oluşturulan Saint Anne-Mayo sistemi ile Kernohan'ın modeli modifiye edilmiştir. Histolojik parametreler; nükleer atipi, mitoz, endotelyal proliferasyon ve nekrozdur. Her bir kriterin olması lezyonun bir sonraki dereceye atlaması için yeterlidir (12). Bu özelliklerden hiçbirini içermeyen tümörler derece I, bir tanesini içerenler derece II, iki özelliği içerenler derece III, üç veya dört özelliği içerenler ise derece IV olarak kabul edilmiştir (20,23).

WHO (World Health Organisation) 1993'de tümörlerin sınıflandırmasını yayınlamış ve tümörleri benignenden maligne doğru sınıflandırmıştır (45). Bu sınıflama histopatolojik özellikler kadar yaşam süresi verilerine de dayanmaktadır. Bugün için en sık kullanılan sistem ise 1979, 1993, 2000 ve son olarak 2007 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan WHO sınıflandırmasıdır (Tablo 2.1.) (46, 87).

**Tablo 2.1.**WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırması, 2007 (60).

<b>1. Nöroepitelial doku tümörleri</b>	Ekstraventriküler nörositom
<b>Astrositik Tümörler</b>	Serebellar liponörositom
Pilositik astrositom	Papiller glionöronal tümör
Pilomiksoid astrositom	Paragangliom
Subependimal dev hücreli astrositom	4. ventrikülün glionöral tümörü
Pleomorfik ksantoastrositom	<b>Pineal bölge tümörleri</b>
Diffüz astrositom	Pineositoma
Fibriler astrositom	Pineoblastoma
Gemistositik astrositom	İntermediyer farklılık gösteren pineal tm
Protoplasmik astrositom	Pineal bölge papiller tümörü
Anaplastik astrositom	<b>Embriyonal tümörler</b>
Glioblastoma	Medulloblastom
Dev hücreli glioblastom	Desmoplastik/nodüler medulloblastom
Gliosarkom	Anaplastik medulloblastom
Gliomatosis serebri	Dev hücreli medulloblastom
<b>Oligodendrogial tümörler</b>	Primitif nöroektodermal tümör
Oligodendroglioma	Atipik teratoid/rabdoid tümör
Anaplastik oligodendrogliom	Nöroblastom
<b>Oligoastrositik tümörler</b>	Ganglioneuroblastoma
Oligoastrositom	Medulloepitelyom
Anaplastik oligoastrositom	Ependymoblastom
<b>Ependimal tümörler</b>	<b>2.Kranial ve paraspinal sinir tümörleri</b>
Subependimoma	Scwannom
Miksoapiller ependimom	Nörofibrom
Ependimoma	Perinörom
Sellüler	Malign periferel sinir kılıfı tümörleri
Papiller	<b>3.Meninklerin tümörleri</b>
Clear cell	Meningoepitelial hücre tümörleri
Tanositik	Mezenkimal tümörler
Anaplastik ependimom	Primer melanositik lezyonlar
<b>Koroid pleksus tümörleri</b>	Histogenezi bilinmeyen tümörler
Koroid pleksus papillomu	<b>4.Lenfoma ve hematopoetik tümörler</b>
Atipik koroid pleksus papillomu	<b>5.Germ hücreli tümörler</b>
Koroid pleksus karsinomu	Germinom
<b>Diğer nöroepitelial tümörler</b>	Embriyonal karsinom
Astroblastom	Yolk sak tümörü
3.ventrikülün kordoid glioması	Koryokarsinom
Angiosentrik glioma	Teratom
<b>Nörönal ve miks nörönal-gliyal tümörler</b>	Mikst germ hücre tümörleri
Serebellum displastik gangliositoması	<b>6.Sellar bölge tümörleri</b>
Desmoplastik infantil astrositom/ Ganglioglioma	Kraniofarengiom
Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör	Granüler hücreli tümör
Gangliositom	Pituisitoma
Ganglioglioma	Adenohipofiz onkositoması
Anaplastik gangliogliom	<b>7.Metastatik tümörler</b>
Santral nörositom	



## 2.2.1. WHO Sınıflandırması

Histolojik derecelendirme ile amaçlanan, tümörün biyolojik davranışlarının önceden kestirilmesini sağlamaktır. Klinik uygulamalarda tümör derecesi seçilecek tedavi şeklinin belirlenmesinde, özellikle adjuvan radyoterapi ve özel kemoterapotiklerin seçilmesinde önem arz etmektedir. WHO'nun tümör sınıflandırmasında derecelendirme, çok çeşitli histolojik özelliğe sahip tümörlerin malignansi ölçütüdür.

- **Derece 1:** Düşük proliferasyon (çoğalma) potansiyeline sahip ve cerrahi olarak çıkarılmasını takiben kür şansı bulunan tümörlerdir.
- **Derece 2:** Genel olarak infiltratif (yayılma) özellikte ve düşük proliferatif potansiyele sahip olmasına karşın sıklıkla tekrarlayan tümörlerdir. Yüksek dereceli tümörlere dönüşme eğilimi vardır örneğin düşük dereceli astrositom, anaplastik astrositoma ve glioblastoma multiformeye dönüşebilmektedir.
- **Derece 3:** Genellikle histolojik olarak malignansi bulguları gösteren lezyonlar için kullanılır (nükleer atipi, aktif bir mitotik aktivite). Çoğunlukla derece 3 tümörlü hastalar adjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi görmektedirler.
- **Derece 4:** Sitolojik olarak malign, mitotik olarak aktif, nekroz eğilimi olan neoplazilerdir. Tipik olarak hızlı bir preoperatif ve postoperatif hastalık gelişimi söz konusudur ve ölümcül bir seyir gösterirler (89).

## 2.3. Glioblastoma Multiforme (GBM)

### 2.3.1. Epidemiyoloji

Glioblastoma multiforme beyin tümörleri içerisinde en sık rastlanan histolojik tiptir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki insidansı, yılda 100000 kişide 296 yeni olgu olarak rapor edilmiştir (70).

GBM yetişkinlerde en çok görülen primer beyin tümörü olup (68) primer beyin tümörlerinin %22,6-27'sini, tüm gliomaların %50-60'ını (22), tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %50-60'ını oluşturmaktadır (38, 56, 86).

Her yaşta görülebilir, ancak olgular sıklıkla 45-75 yaş arasındadır. Çocukluk yaşlarında ise nadir görülmektedir (36, 68). Erkeklerde, kadınlarla karşılaştırıldığında biraz daha fazla gözlenmektedir (1,59/1). Ortalama tanı yaşı 47 ile 61 arasında değişmektedir (22).

Dünya Sağlık Örgütü ve St. Anne-Mayo sınıflamasına göre derece 4 olarak kabul edilmekte ve histolojik olarak; pleomorfik, belirgin nükleer atipi ve mitotik aktivite yanında mikrovasküler proliferasyon ve nekroz içermektedir (22, 36). Belirgin mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz esas tanısal işaretlerdir (38).

Virchow tarafından 1863 yılında glioblastoma multiforme glial orjinli tümör olarak belirlenmiştir. 1914 yılında Mallory tarafından spongioblastoma multiforme terimi kullanılmıştır. 1929 yılında Bailey ve Cushing bu terimi glioblastoma multiforme olarak değiştirmiştir. Daha ayrıntılı tanım Zülch, Russell ve Rubinstein tarafından verilmiştir. Günümüzde glioblastom, glioblastoma multiforme ile eşanlamli kullanılmaktadır (46). İsimlendirmedeki "Multiforme" klasifikasyondaki

problemlerden ve tümör derecelendirmesinden kaynaklanır. Bu tümörler oldukça heterojendir (100).

GBM gelişimine neden olan risk faktörü veya faktörleri radyasyon haricinde tam olarak belli değildir. Ancak genel olarak GBM etkenleri arasında sigara, elektromanyetik dalgalar, alerji, viral enfeksiyon (51) ve genetik yatkınlık gösterilmektedir (9). Ayrıca, ailesel bir takım hastalıkların (nörofibratozis, tüberoz skleroz, Turkot sendromu, Li-Fraumeni sendromu) GBM'le birliktelik gösterdiği belirtilmiştir (1,9).

### 2.3.2. Moleküler Patogenez

Glioblastomalar günümüzde moleküler temelde primer ve sekonder olarak iki subgruba ayrılmaktadır (24). Primer ve sekonder glioblastoma terimi ilk kez 1940 yılında kullanılmış (46) ve bu ayrımı ilk olarak Alman nöropatolojist Hans-Joachim Scherer yapmıştır (70). “Biyolojik ve klinik açıdan astrositomlardan gelişen sekonder glioblastomları primer glioblastomdan ayırt etmek gerekir. Bunlar muhtemelen uzun klinik süre ile uyumlu glioblastomlardır” diyerek glioblastomaları klinik ve histopatolojik bulgulara göre iki subgruba ayıran ilk kişidir (24).

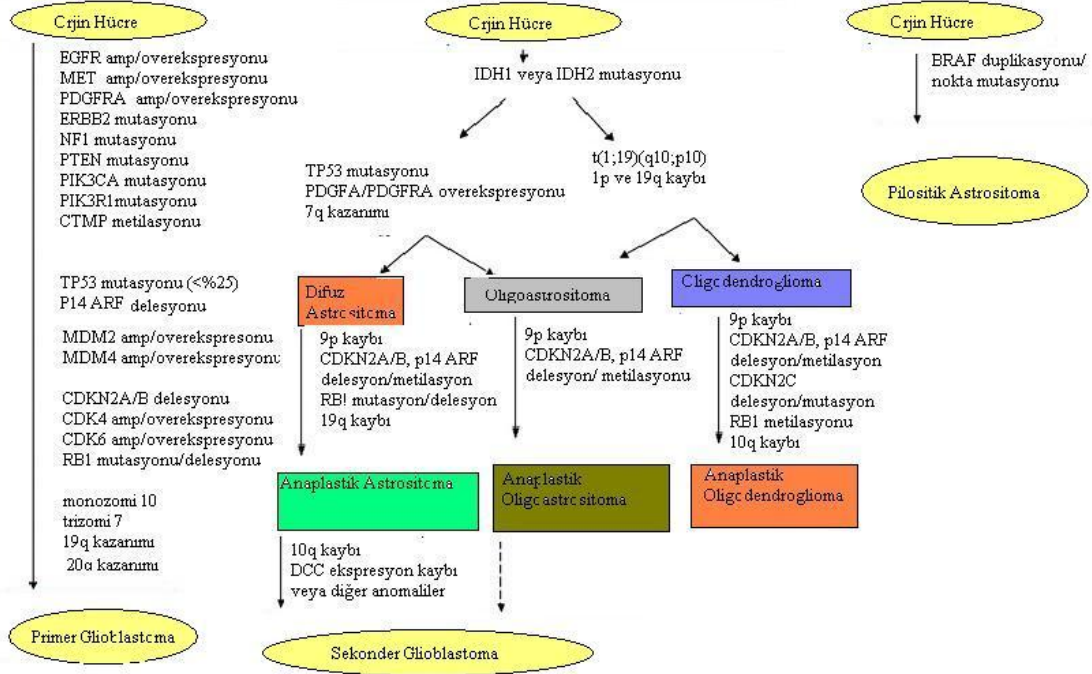
Popülasyon seviyesinde primer glioblastoma erkeklerde daha sık gelişirken, sekonder glioblastoma ise dişilerde daha sıktır. Primer ve sekonder glioblastoma farklı hastalık subtiplerini oluşturmaktadır. Kişiler farklı yaşlarda etkilenmekte ve farklı genetik yollarla oluşmaktadır (70). Primer ve sekonder GBM dokuları arasında klinik ve sitogenetik farklılık vardır (86) (Şekil 2.1.).

Vakaların majör grubunu (>%90) primer glioblastoma oluşturmakta, hızlı ve de novo gelişmekte ve malign prekürsör lezyonlara göre klinik ve histolojik belirtileri bulunmamaktadır (70). Genellikle yaşlı kişilerde (60 yaş) gözlenen ve ilk histopatolojik

incelemede glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti vermekte (24) ve ortalama sağ kalım süresi 4,7 ay olarak bildirilmektedir. Tek basamak transformasyon önerilmemiştir ve diğer neoplazmlar gibi birçok genetik anomali kazanımı sonucu oluşmaktadır. 10q kaybı (%70), EGFR amplifikasyonu (%36), P16<sup>INK4A</sup> delesyonu (%31) ve PTEN mutasyonu (%25) ile karakterize edilmektedir (70).

Sekonder glioblastoma, düşük grade diffuz astrositoma veya anaplastik astrositomadan yavaş progresyonla gelişmektedir (70). Düşük dereceli astrositomların GBM'e dönüşmesi için geçmesi gereken süre ortalama 4-5 yıldır (48). Sekonder GBM'in görülme yaşı 30-40'lı yaşlardır (24) ve olguların ortalama sağ kalım süresi 7.8 aydır. Sekonder glioblastoma tanısı klinik veya histolojik bulgu gerektirmektedir. Genetik temelinde, TP53 mutasyonuna sıklıkla rastlanmakta ve bu anomalinin erken dönemde saptanabildiği ifade edilmektedir (70,71). Primer ve sekonder GBM, morfolojik olarak ayırt edilemez, her ikisi de hasta yaşı dikkate alınmadığında kötü prognoza sahiptir (85).

Tüm kanserlerde olduğu gibi GBM dokusuna ait tümör hücrelerinde de yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, anjiyogenez, kontrolsüz çoğalma, doku invazyonu yapabilme ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir (48,85). Bu süreçler normalde kompleks sinyal yolları ile regüle edilmektedir. Sinyal yolları diğer birçok malignansi ile benzerdir, saptanan anomaliler aktive (onkogen) veya patolojik olarak baskılanan (tümör süpressör gen) sinyal yollarını içermektedir. Büyüme faktörleri, hormonlar, büyüme faktör reseptörleri, sinir sistemi hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasından sorumlu integrinler ve mikroçevre stimülasyonunu (pH, oksijen seviyesi vs.) içermektedir (14).



**Şekil 2.1.** Astrostitik tümörlerde moleküler değişim (Riemenschneider ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.) (80).

### 2.3.2.1. Primer Glioblastoma Multiformedeki Genetik Özellikler

Primer GBM'de epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A) genlerindeki mutasyonlar ve kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı en sık saptanan genetik değişikliklerdir. MDM2 proteininin aşırı ekspresyonu, primer GBM'lerin %50'sinden fazlasında görülmektedir. Kromozom 10q23'te meydana gelen heterozigosite kaybı (LOH) olguların %60-80'inde meydana gelmekte ve bu bölgede bir tümör baskılayıcı gen olan fosfat ve tensin homolog (PTEN) geni bulunmaktadır (48).

EGFR ailesi üyeleri ve ligandları merkezi sinir sistemi (MSS) hücre göçü, proliferasyonu, farklılaşması ve sağ kalımını içeren MSS gelişmesinde ve idamesinde kritik role sahiptir (14). Primer glioblastoma gelişiminde anahtar bir sinyal ileti sistemidir (70) ve gliomagenizde merkezi role sahiptir (43). GBM'de EGFR gen amplifikasyonu (%40-80) ve EGFR overekspresyonu (%10-%60) görülmektedir (14). EGFR amplifikasyonu ve overekspresyonu primer GBM'de sık görülürken sekonder GBM'de ise daha nadirdir. EGFR gen amplifikasyonu genin yapısal değişiklikleri ile ilişkilidir. EGFR geninin yedi majör mutant varyantı tanımlanmıştır, en çok gözlenen varyant III ( EGFRvIII), de2-7EGFR veya pEGFR olarak da adlandırılmaktadır. Ekzon 2-7'deki delesyon sonucunda EGFRvIII oluşur, genomik seviyede anormal transkript ekspresyonu ve protein meydana gelmektedir. Bu genomik delesyon sonucunda ekstraselüler ligand bağlama bölgesinin eksikliğine neden olmakta ve reseptör yapısal olarak otofosforillenmekte, tümör büyümesi, proliferasyonu, migrasyonu ve tümör neovaskülarizasyonu da artmaktadır. Bu etkilenmiş reseptör, kemoterapi direncinden sorumlu tutulmaktadır (43).

P16<sup>INK4A</sup>/RB1 yolağı primer ve sekonder glioblastomanın her ikisinde de önemli bir yolaktır. Homozigot P16<sup>INK4</sup> delesyonu primer GBM'de sekonder GBM'e göre daha sık bulunmaktadır. Son TCGA pilot projesinde RB1 sinyal yolağı anomalilerinin %78 görüldüğü bildirilmiş ve bu anomalileri; P16<sup>INK4A</sup> homozigot delesyonu (%52), P15<sup>INK4B</sup> homozigot delesyonu (%47), P18<sup>INK4c</sup> homozigot delesyonu (%2), CDK4 amplifikasyonu (%18), siklin D2 (CCD2) amplifikasyonu (%2), CDK6 amplifikasyonu (%1), RB1 mutasyonu veya homozigot delesyonu (%11) olarak listelemişlerdir (70).

### 2.3.2.2. Sekonder Glioblastoma Multiformedeki Genetik Özellikler

Sekonder GBM'de platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA), PDGFRA ligandı ve tümör baskılayıcı protein 53 (TP53) genlerinde çeşitli genetik değişiklikler bulunmaktadır. Ayrıca, p16<sup>INK4A</sup>, pRB1 genlerinde mutasyonlar, siklin

bağımlı kinaz 4/6 (CDK) ve murine double minute 2 (MDM2) genlerinin amplifikasyonu, kromozom 10 delesyonları sekonder GBM'de saptanmış genetik değişikliklerdir (85,86).

TP53 yolağı sekonder glioblastomanın gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. TP53 geni 17p31.1'de lokalize (70) ve hücre siklusu, DNA hasarına hücrel yanıt, hücre ölümü ve hücre farklılaşmasını içeren birçok hücrel süreçte önemli rolü olan bir protein kodlamaktadır (70,71). Sekonder GBM'lerde p53 mutasyonları yüksek bir insidansa sahiptir (>%65). Sekonder GBM'lerde mutasyon %57 oranında 2 hotspot bölge olan kodon 248 ve 273'de lokalize iken, primer GBM'lerde mutasyonların (%10) tüm ekzonlara eşit oranda dağıldıkları gözlenmektedir (43).

p14<sup>ARF</sup> ekspresyon kaybı GBM'lerde sık gözlenmekte (%76) ve bu homozigot delesyonu veya p14<sup>ARF</sup> promotor metilasyonu ile korelasyon göstermektedir. p14<sup>ARF</sup> değişikliklerinin görülme sıklığı primer ve sekonder GBM'de farklılık göstermez, fakat p14<sup>ARF</sup> promotor metilasyonu sekonder GBM'lerde daha sık gözlenmektedir (43).

RB LOH veya nokta mutasyonu GBM'de %30-40 sıklıkta bulunmaktadır (14). RB1 promotor metilasyonu sekonder GBM'de (% 43) primer GBM'e göre (% 14) daha sık gözlenmektedir (70).

Glioblastoma progresyonu sırasında, tüm bu anomalilere ek olarak kromozom 10 kaybı (70) ve tümör baskılayıcı PTEN gen delesyonunda primer ve sekonder GBM'de saptanan ortak genetik değişikliklerdir. Ancak bu sınıflandırmanın kesin sınırları yoktur. Bu nedenle, her iki tip GBM'de de TP53 mutasyonu ve CDK4 amplifikasyonu gibi genetik değişikliklere rastlanabilir (85, 86).

10q heterozigosite kaybı primer ve sekonder glioblastomada benzer sıklıkta, 10q25-qter, gözlenen genetik anomalidir (%60-80) (70). Birçok LOH çalışması 3 benzer lokusun delesyonunu tanımlamıştır. 10p14-p15, 10q23-24 (PTEN) ve 10q25-

qter ve birçok tümör süpressör genin glioblastoma patogenezinde önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır (48, 70).

GBM hücrelerinde saptanan ve canlılığı tetikleyen diğer önemli yolak fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağıdır. Çeşitli tirozin kinaz reseptörlerinin (EGFR, PDGFR gibi) büyüme faktörleriyle aktivasyonu sonucu PI3K/Protein Kinaz B (PKB, AKT) yolağı aktifleşir ve nükleer faktör  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) aracılığıyla yaşamı ve proliferasyonu düzenleyen genlerin aktivasyonu sağlanır. PTEN bu yolağı bloke edebilir ancak GBM'de saptanan PTEN mutasyonunun bu yolağı inaktive etmediği belirtilmektedir. Tirozin kinazların aktivasyonu sonucu tetiklenen diğer bir yol ise RAS onkogeni aracılığıyla mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu yolağın aktivasyonu da, glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikler. GBM'de bu sinyallerin aktivasyonuna neden olan tirozin kinaz reseptörlerinde mutasyon meydana gelmesi sinyal yolaklarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır (48).

LOH 22q sekonder GBM'de (%82) primer GBM'e göre (%41) daha siktir. 22q delesyonu primer GBM'de 2 delesyonlu bölge ile karakterize edilmektedir, bunlar 22q12.3 ve 22q13.31'dir (70).

Kromozom 19q'daki LOH sıklıkla oligodendrogliomda (%70) gözlenirken, düşük dereceli astrositomların, AA (Anaplastik Astrositom) ve GBM'e dönüşümünde rol aldığı da düşünülmektedir. Kromozom 19q da LOH; diffüz astrositomda ~ %15, AA'da ~ %45 ve sekonder GBM'de %54 gözlenirken, primer GBM'de ancak %6 düzeyinde gözlenmiştir. Bu da, 19q da olan LOH'un düşük dereceli astrositomların malign formlara dönüşümünde rol aldığını göstermektedir (24).

Sitogenetik yapı bakımından GBM oldukça karışıktır. Sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler sık görülmektedir. Translokasyonlardan t(15;19) ve t(10;19), kayıplardan 9p, 10p, 10q, 13q, 17p ve 19q bölgelerindeki kayıplar sık saptanan



kromozomal anomalilerdir. GBM'de genel olarak kromozomal kayıpların, kromozomal kazanımlardan daha fazla olduğu belirtilmektedir (24).

2008'de 22 glioblastoma multiforme örneğinde yapılan geniş çaplı genom analizinde daha önce tanımlanmamış (66) ve hücreyi oksidatif strese karşı korumada görevli izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geninde çeşitli mutasyonların var olduğu tanımlanmıştır (48).

### 2.3.3. IDH1

IDH1 genindeki mutasyon ilk olarak Sjöblom ve arkadaşları tarafından 2006 yılında kolorektal kanserde tanımlanmıştır. Daha sonra ise 2008 yılında tüm genom mutasyon analizleri ile Parsons ve arkadaşları tarafından glioblastomalarda tanımlanmıştır (77).

Kanserlerde elde edilen veriler anormal metabolizmanın karsinogenezde önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir (77). John Hopkins ve Duke Üniversitesinde yapılan ve yeni ufuklar açan çalışmada, primer ve sekonder glioblastoma olgularında 20000'den fazla gen sekanslanmış ve birçok gende mutasyon olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Bu genler arasında sürpriz olarak metabolizma ile ilişkili izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geninin de mutant olduğu bulunmuş ve metabolik genlerdeki mutasyon glioblastomada ilk kez rapor edilmiştir (77).

İnsan genomu 3 farklı IDH enzimi (IDH1, IDH2, IDH3) kodlayan 5 IDH genine sahip olup bunlar; IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B ve IDH3G genleridir. IDH1 sitoplazma ve peroksizomda, IDH2 ve IDH3 ise mitokondri de lokalizedir. IDH'lar izositratın  $\alpha$ -ketoglutarata ( $\alpha$ -KG) oksidatif dekarboksilasyonunu ve  $\text{NAD(P)}^+$ 'nın  $\text{NAD(P)H}$ 'a indirgenmesini katalizlemektedir (47, 55).

IDH'lar hücrel metabolizmada önemli role sahiptir. IDH1 lipid metabolizması ve glikoz toleransında, IDH2 oksidatif solunumun regülasyonunda ve IDH3 trikarboksilik asit (TCA) siklusunda aerobik enerji üretiminde görev almaktadır. Normal hücrel metabolizmadaki rollerine ek olarak oksidatif hasara hücrel yanıtta rol oynamaktadırlar (55).

Yabancıl tip IDH1  $\alpha$ -ketoglutaratın NADPH'a oksidatif dekarboksilasyonunu katalizlemektedir. IDH1 mutasyonu tümör spesifiktir ve çeşitli glioma tiplerinde özellikle histolojik olarak sınıflandırılmış düşük derece gliomalar ve sekonder glioblastomalarda, akut myeloid lösemi (8), B-akut lenfoblastik lösemi, kolorektal kanser ve prostat karsinomunda, en son çalışmalarda tiroid kanseri ve foliküler tiroid kanserinde iki yeni homozigot IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir (55).

IDH1'in mutasyon profili; evrimsel olarak korunmuş tek rezidüyülü etkilemektedir (arjinin R132), arjinin izoenzimin substrat bağlanma bölgesinde lokalizedir (8), diğer IDH mutasyonları R132V (%0.1) hariç, komşu baz değişimi sonucunda arjininin sisteine (%4.7), glisine (%2.1), serine (%1.7) ve lösine (%0.8) dönüşebilmektedir. %90'dan fazla IDH1 mutasyonu R132H şeklindedir (47). Neredeyse rapor edilen tüm olgulardaki mutasyon heterozigottur ve inaktive edici değişiklikler çerçeve kayması, delesyon ve non-sense mutasyonlar bu genlerde tanımlanmamıştır (78). Genetik perspektif açısından IDH1 mutasyonunun fonksiyon kazandırma (onkogenlerdeki gibi) özelliğinde olduğu bildirilmektedir (8).

### **2.3.3.1. IDH1 mutasyonunun fonksiyonel özellikleri**

Mutasyon IDH1'in standart enzimatik aktivitesini inaktive etmektedir. Sonuçta IDH1 mutant olduğu zaman  $\alpha$ -ketoglutarat seviyesi yarıya inmektedir. Sitoplazmadaki  $\alpha$ -ketoglutarat HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen bağımlı degradasyonunu başlatmaktadır.  $\alpha$ -ketoglutarat'ın sitoplazmadaki seviyesinin azalması HIF-1 $\alpha$ 'nın seviyesinin artmasına

ve HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$ 'yı içeren HIF-1 heterodimerinin transkripsiyonel aktivite için nukleusa taşınmasına neden olmaktadır (8).

HIF-1 düşük oksijen basıncına adaptasyonda anahtar role sahip olmakla birlikte anjiyogenezi, hücre motilitesi, invazyon ve enerji metabolizmasını düzenleyen genlerin transkripsiyonunu da indüklemektedir (8).

Tümörlerde IDH1 R132 mutasyonu NADPH üretimini etkilemekte, NADPH detoksifikasyon prosesi ve oksijen radikallerinin temizlenmesinde önemli role sahip olup kanser hücrelerini kemoterapi ve radyoterapi sırasındaki stresten korumaktadır (8).

Nükleik asit sentezinde, IDH1 pentoz fosfataz yolağında elektron alıcısı NADP<sup>+</sup> ile rekabet etmektedir. IDH1'in overekspresyonu sonucunda reaktif oksijen türlerine, bunun yanı sıra radyasyona karşı koruma artarken, IDH1 inhibisyonu sonucunda hassasiyet artmaktadır. IDH1 mutasyonları hücrel göç ve hipoksiye hücrel yanıtta rol oynamaktadır. Örneğin, sistolik IDH1 inhibisyonu glioma hücrelerinin göçünü teşvik eden laktatın üretimini artırdığı rapor edilmiştir (47). IDH1 mutasyonunun tümör büyümesi ve anjiyogenezi artırdığı öne sürülmektedir (93).

IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının keşfinden bugüne, mutasyonların kanserdeki fonksiyonel önemi sıralanarak kalmıştır. Mutasyonun IDH1'de fonksiyon kaybına neden olduğu rapor edilmiş ve HIF-1 $\alpha$  düzeyinin mutasyonlu tümörlerde mutasyon olmayanlara göre yüksek seviyede olduğunu dolayısı ile bu genin tümör süpressör gen olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat IDH1 mutasyonlu tümörlerde tek bir metabolit, 2-hidroksiglutarat (2-HG), yüksek seviyede bulunmuştur. Bu verilere göre in-vivo birikmiş 2-HG gliomaların malign progresyonuna ve formasyonuna katkıda bulunmaktadır. Mutant IDH'in metabolitleri;  $\alpha$ -KG, NADPH, 2-HG ve HIF-1 $\alpha$ 'dır (55, 78).

## 2.3.3.1.1. $\alpha$ -Ketoglutarat

IDH1 mutasyonu enzimin substrata olan afinitesini bozmakta ve yabanıl tip IDH1'in normal fonksiyonu olan izositratı  $\alpha$ -KG'a çevirmesini inhibe etmektedir. Mutasyon sonucu inaktif katalitik heterodimer formasyonu oluşmakta ve isositrattan  $\alpha$ -ketoglutarat dönüşümü inhibe olmaktadır. İleri çalışmalar mutasyona uğramış IDH1 ve IDH2'nin NADPH'den NADP dönüşümü esnasında  $\alpha$ -ketoglutarattan D-2-HG'ın düşüşüne neden olduğu belirtilmiştir (55,107).

## 2.3.3.1.2. NADPH

NADPH üretimi apoptozisin baskılanması ve hücreye büyüme ve hayatta kalma avantajı sağlamakla bağlantılıdır. NADPH glutatyon sentezi için de gereklidir, glutatyon hücreleri redoks stresten korumakta ve apoptozise karşı dayanıklılığı artırmaktadır. Ayrıca sitozolik NADPH membran ilişkili NADPH oksidaz için substrat, aynı zamanda tirozin fosfataz proteinini inhibe eden hidrojen peroksit üretmektedir. Dolayısıyla kinaz aktivasyonunu, bununla birlikte otonom hücre sağkalımı ve mitojenik sinyal sistemini kolaylaştırmada yer alır. Bu süreçte IDH1 ve daha az oranda IDH2 hücrel NADPH'ın önemli bir bölümünü sağlamaktadırlar. Glioblastomada total NADPH üretim kapasitesinin %65'i IDH aktivitesi ile sağlanmakta ve IDH1 R132 mutasyonunun oluşması ile bu kapasite %38'lere inmektedir. Dolayısı ile IDH1 mutasyonu NADPH üretimi için engel teşkil etmektedir. Mutant IDH'lı gliomalardaki NADPH seviyesi hala bir soru olarak ileri çalışmalarla desteklenmeyi beklemektedir (55).

### 2.3.3.1.3. 2-Hidroksi Glutarat

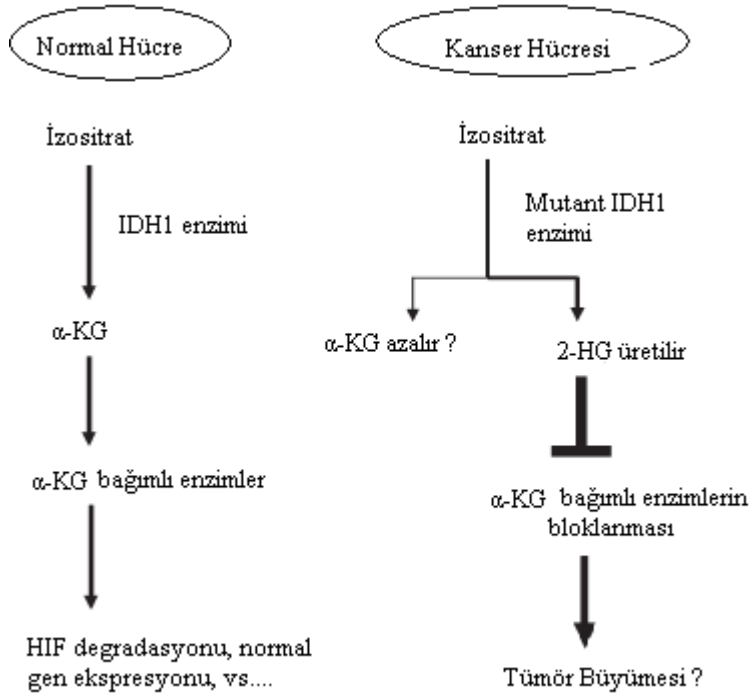
2-HG'in normal metabolik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. 2-HG NADPH bağımlı  $\alpha$ -KG indirgenmesinin direkt ürünüdür. Genel olarak  $\alpha$ -KG redüktaz enzimi için spesifik olup 2-HG dehidrogenaz ile tekrar  $\alpha$ -KG'a oksidize edilmektedir. IDH1 R132 ve IDH2 R172 mutasyonları ile yeni enzimatik aktivite kazanımı sonucu gliomalarda 2-HG üretimi görülmekte ve NADPH'a bağlı  $\alpha$ -KG redüksiyonunun direkt ürünü 2-HG oluşmaktadır. Deneyler IDH1 mutasyonlu kanserli hücrelerin kanserli olmayanlara göre 2-HG seviyesinin 100 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Kanserli hücrelerde biriken bu metabolit 2-HG 2 enantiomer olarak var olmaktadır. 1-2 HG ve D-2-HG (biri diğerinin ayna izdüşümüdür) her ikisinin de ilgili enzim ile dönüşümü hücreler için defektifdir. 2-HG enantiomerlerinin klinik açıdan değerlendirilmesi sonucu patolojik olarak L-2-HG birikimi progresif nöronal defektler ve gliomaları içeren beyin tümörleri için artmış riske neden olduğu sonucuna varılmıştır (55). Beyinde 2-HG artması sonucu ROS (Reaktif oksijen türleri) seviyesinde artış olmakta bu da potansiyel olarak kanser gelişimi riskinde de artışa neden olmaktadır. 2-HG hücreler için toksik olup bunu glutamat ve  $\alpha$ -KG kullanan enzimlerin inhibisyonunu yaparak gerçekleştirmektedir (27,54). 2-HG, dioksijenazlar olarak bilinen histon demetilaz ailesinde görev almakta ve metil gruplarını histonlar üzerinden çıkararak gen ekspresyonunu düzenlemektedir. 2-HG tümör mikro-çevresinde ve mitokondri hasarında rol almaktadır. Böylelikle yeniden hücre programlanmasına ve hücreleri anaerobik glikolizise girmeye zorlamaktadır (Warburg Etkisi). Birçok kanser hücresinde enerji, baskın olarak sitozolde aerobik glikozis ile üretilir. Normal hücreler ise mitokondride piruvatın oksidasyonu ile bunu gerçekleştirir. Metabolizmadaki bu değişim kanserin temel nedenidir (47,55).

### 2.3.3.1.4. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör (HIF-1 $\alpha$ )

HIF, düşük oksijen seviyelerinde aktif hale geçen ana regülatör genlerden biridir ve glikoz metabolizması, anjiyogenez, hücre hareketinde, invazyon ve tümör

büyümesinde kritik rolü olan sinyal yolları ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (55) (Şekil 2.2).

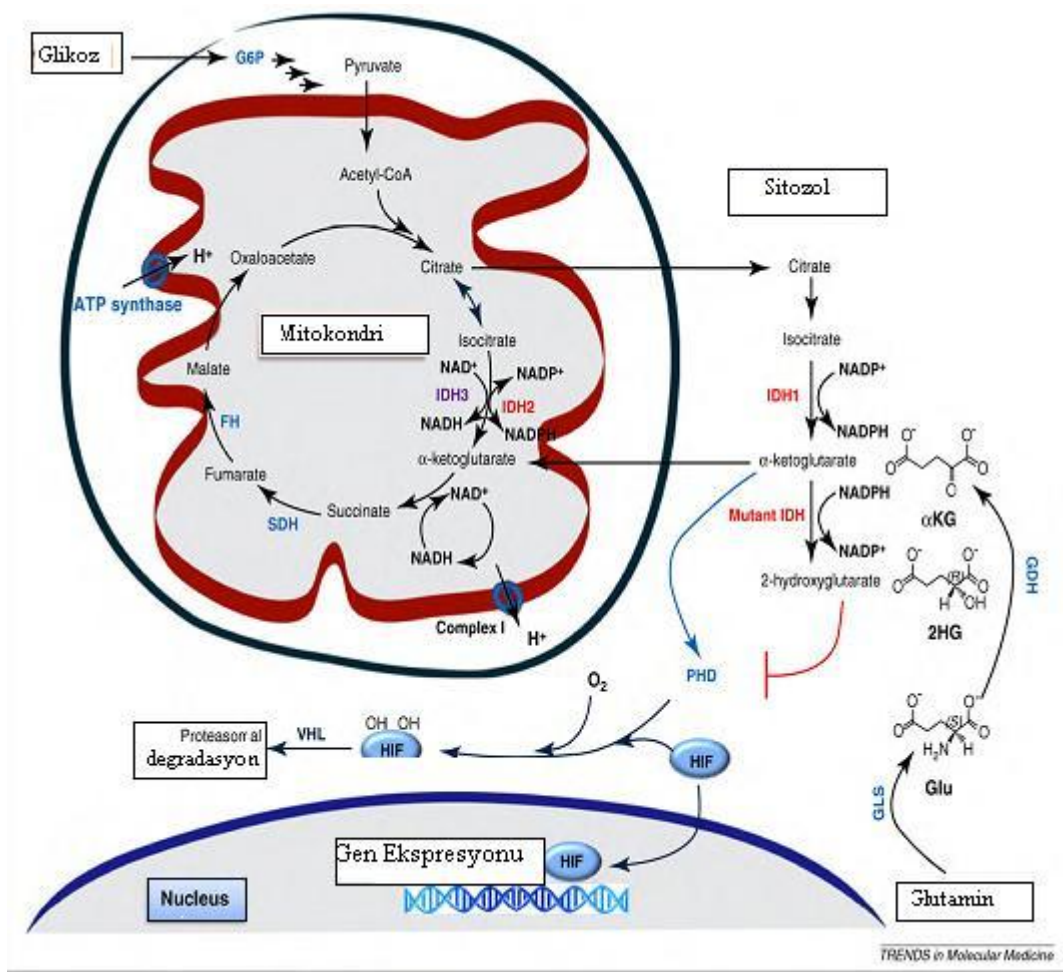
PDH (Prolyl hydroxylase)  $\alpha$ -KG'ı HIF-1 $\alpha$  degradasyonu için substrat olarak kullanmaktadır. TCA (Tri karboksilik asit) siklusunun diğer iki enziminin aktivitesinin kaybı, suksinat dehidrogenaz (SDH) veya fumarat hidrataz (FH), tümörogenezi suksinat veya fumaratı artırarak sağlamaktadır. Bu substratlar  $\alpha$ -KG'ın kosubstratı ile PHD'ı inhibe etmekte ve HIF transkripsiyon faktörü aktivasyonuna ve HIF-1 $\alpha$  seviyesinin artmasına neden olmaktadır (Şekil 2.3). Deneylerde IDH1 mutasyonlu gliomalarda, mutasyonsuz olanlara göre HIF-1 $\alpha$  düzeyi daha yüksek olarak gözlenmiş ve yüksek düzeydeki HIF-1 $\alpha$  transkripsiyonel aktivite için nükleusa taşınmaktadır (55).



Şekil 2.2. Normal ve kanser hücresinde izositrat metabolizması (Garber ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.) (28).

Mutant IDH'lar  $\alpha$ -KG'ı kullanarak düşük hücresele seviyeye ve böylece PHD inaktivasyonuna yol açabilirler. Alternatif olarak, 2-HG mutant IDH'lar tarafından üretilmekte, PHD'lar enzimin  $\alpha$ -KG bağlanma bölgesini işgal ederek inhibe etmek için yarışmaktadırlar (55).

Metabolik reaksiyonlar IDH ailesi tarafından katalizlenmektedir. IDH1 peroksizom ve sitoplazmada izositratın  $\alpha$ -KG'a NADP+ bağımlı dekarboksilasyonunu katalizlemekte, IDH2 aynı reaksiyonu mitokondride gerçekleştirmektedir. Mitokondriyal bölmede heterotetramerik IDH3 izositratın  $\alpha$ -KG'a çevrilmesini NADP+ bağımlı olarak katalizlemektedir. IDH1 ve IDH2'deki mutasyonlar bu enzimlerin  $\alpha$ -KG'ın 2-HG'a çevirme yeteneğini azaltarak etki etmektedir. Bu iki metabolit arasındaki kimyasal benzerliğin temeli, IDH1 ve IDH2 mutasyonlarını barındıran tümörlerde  $\alpha$ -KG bağımlı enzimlerin aktivitesi ile 2HG'ın seviyesinin yükseltilmesini mümkün kılmaktadır (18, 107).



**Şekil 2.3.** TCA döngüsü ve IDH genleri. TCA siklusundaki enzimler mitokondride ve mutant IDH sitozolde gösterilmiştir. Mutant IDH tarafından 2HG nasıl üretildiği HIF-1 $\alpha$  birikimi aracılığı ile PHD (prolyl hidroksilaz) inhibisyonunun kanser gelişimini etkilemesi şematik olarak gösterilmiştir. Kısaltmalar: FH, fumarat hidrataz; SDH, suksinat dehidrogenaz; PHD, prolyl hidroksilaz; GLS, glutaminaz; GDH, glutamat dehidrogenaz; G6P glikoz 6-phospat (Dang ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.)(18).

### 2.3.3.2. Mutasyon Sıklığı

IDH1 mutasyonu neredeyse tüm glioma subtiplerinde, primer glioblastoma hariç, %50'den %80'e değişen oranda gözlenmektedir. IDH1 diffüz astrositoma ve anaplastik astrositomada ortak olan birkaç genden biridir. IDH1 mutasyonunun prevalansı primer glioblastomalarda (%5) sekonder glioblastomalara (%75) oranla daha azdır. IDH1



mutasyonu diffüz astrositoma ve anaplastik astrositomada benzer oranda gözlenirken pilositik astrositomada nadir gözlenmektedir (47).

### 2.3.3.3. Diğer genetik değişiklikler ile ilişkisi

Hücre siklusunu düzenleyen p53 tümör süpressör geninin kodladığı p53 tümör proteini (TP53), apoptoz, DNA tamir, genom stabilitesi ve bu yolaktaki mutasyonlar kanser gelişimine neden olmaktadır. TP53 mutasyonları astrositoma gelişiminde erken gözlenen değişikliklerden olup evre II ve III astrositomalar ve sekonder glioblastomalarda ortak gözlenen bir anomalidir. Yapılan çalışmalarda IDH1 mutasyonu ile TP53 mutasyonu arasında korelasyon olduğu gösterilmiş ancak bu durumu istatistiksel olarak anlamlı bulmayan çalışmalarda vardır. 1p/19q kodelesyonu, oligodendrogial tümörlerde sıklıkla gözlenmektedir. Geniş bir seriyi baz alan bir çalışmada ise tüm tümörlerde 1p/19q kodelesyonu ve mutant IDH1 veya IDH2 geni birarada bulunmuştur (55).

O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT), kemoterapötik ajanların indüklediği alkil lezyonlarının çıkarılmasında görev alan bir DNA tamir enzimidir. Metillenmesi sonucunda MGMT proteininin azalmış ekspresyonu ile DNA tamir aktivitesi de azalmaya başlamakta ve temozolomid gibi alkile edici ajanlara karşı hassasiyet artmaktadır. 404 glioblastomadan oluşan bir seride IDH1 mutasyonunun 1p/19q kodelesyonu ve MGMT metilasyonu ile arasında sıkı bir ilişki olduğu bulunmuştur (55, 84).

Bu genetik değişiklikler yüksek derece tümör progresyonu sırasında olmaktadır. Disekte edilen birçok biyopside IDH1 mutasyonunun TP53 veya 1p/19q kodelesyonundan önce meydana geldiği saptanmış ve bu yüzden IDH1 mutasyonunun gliomagenезin çok erken evrelerinde olduğu ve ortak bir glial prekürsör hücre popülasyonundan etkilenilmiş olunabileceği düşünülmektedir (55).

## 2.3.3.4. Yaş ile ilişkisi

IDH1 ve IDH2 mutasyonları çocuklar hariç genç kişilerde sık gözlenmektedir. IDH1 mutasyonu genellikle genç GBM’li kişilerde meydana gelmekte ve mutant IDH1’li kişilerin ortalama yaşı 33 iken, yabancıl tip IDH1’li kişilerde ortalama yaş 53 (P <0.001) olarak rapor edilmiş ve mutasyonlu kişilerin mutasyon taşımayanlara göre daha genç oldukları ifade edilmiştir (55, 73).

IDH1 mutasyonunun yaş ile ilişkisi yüksek maligniteye sahip kişilerde daha sık görülmekte, fakat bunun doğru olup olmadığını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. IDH1 ve IDH2 mutasyonu nadir olarak pediatrik glioblastomalarda tespit edilmiş ve mutant IDH1 ve IDH2’li çocukların mutasyon taşımayan çocuklara göre yaşça daha büyük olduğu belirtilmiştir (Normal IDH1 ve IDH2’li çocuklarda ortalama yaş 16 iken, mutant IDH1 ve IDH2’li çocuklarda ortalama yaş 7) (55).

## 2.3.3.5. Prognoz ile ilişkisi

Bugüne kadar sadece iki moleküler aberasyonun klinik önemi prospektif klinik çalışmalarla ortaya konmuştur. 1p/19q kodelesyonu radyoterapi veya radyoterapi ile kemoterapi alan oligodendrogial tümörlerde ve oligoastroitik ve anaplastik gliomalarda iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (55).

MGMT promotor hipermetilasyonu nitrozüre veya temozolamid gibi alkile edici ajanlarla tedavi edilmiş glioblastomalı kişilerde uzun progresyonsuz sağ kalım (PFS) ve genel sağ kalım (OS) ile ilişkilendirilmiştir (25, 33, 35).

Sonuçlanan analizlerin verilerine göre IDH1 ve IDH2 mutasyonlu gliomalı kişiler mutasyonsuzlara göre daha uzun süre hayatta kalmakta ve IDH1 mutasyonu gliomalarda yeni prognostik marker olarak değerlendirilmektedir (54, 55, 73, 105).

### 2.3.3.6. Araştırma ve klinik uygulamaya faydası

IDH gen profilinin belirlenmesi ölümcül kanser gruplarının klinik değerlendirmesi için bir kılavuz görevi görmektedir. Birçok tümör tipi için kurtarıcı bir prognostik faktördür. Bu nedenle IDH1 ve IDH2'nin mutasyonel durumu klinik-preklinik çalışmaların dizaynı için gelecekte kullanılabilir (55). Onkogenik sinyal moleküllerine zıt olarak metabolik enzimin aktif bölgesi muhtemelen sorumlu hedeflerdir. IDH1 ve IDH2 mutasyonları kanser gelişiminde diğer genetik değişikliklerden erken meydana gelmekte ve göreceli olarak farklılaşmamış hücrelerden meydana gelen kanserlerde bulunmaktadır. Bunun temelinde bu mutasyonların hücre farklılaşmanın bloklanması aracılığıyla, karsinogeneze yol açtığı yönünde spekülasyonlar vardır. Eğer bunlar doğruysa, tedavi stratejilerinin hedefi hücre farklılaşma yolunu modüle etmek ve bu kanserlerde tedaviyi sağlamak olacaktır (78).

IDH1 ve IDH2 mutasyon çalışmaları halen tamamlanmamış ve tartışmalı olmasına rağmen, çalışmalar diagnostik ve terapötik uygulamalara ışık tutmaktadır. IDH1 ve IDH2 mutasyonlarının tek bir amino asit lokalizasyonuna sahip olması, bu genetik değişimin diagnostik amaçlar için kullanımını kolaylaştırır. IDH1 ve IDH2 mutasyonları glioma patogenezinde ve spesifik glioma alt tiplerinin tanımlanmasında merkezi bir rol almaktadır. IDH1 mutasyonu iyi prognosis için kuvvetli bir gösterge olup sekonder glioblastomayı primer glioblastomadan ayırt etmek için spesifik bir biyomarkerdir. Bu durum histopatolojik analiz için materyalin yetersiz olduğu olgular için yararlı olabilir (55).

### 2.3.4. Glioblastoma Multiforme ve DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA'yı doğrudan etkileyen epigenetik bir mekanizmadır. DNA metilasyonu, embriyogenez ve genomik baskılanma, yaşlanma, X kromozomunun transkripsiyonel inaktivasyonu, kanser gibi biyolojik süreçlerde önemlidir (10). DNA

metilasyonunun, kanser sürecine önemli katkı sağladığı gözlenmiştir. Tümör hücrelerinde hipometilasyon, genomun tekrarlayan bölgelerinden metilasyonun kaybına ve genlerin yeniden aktivasyonuna neden olur. Genomik metilasyonun kaybı, kanserde sık ve erken gözlenen bir olaydır. Bu kayıp pek çok tümör çeşitinde metastatik potansiyel ve hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (30,82). Promotor bölgelerinde hatalı sitozin birimlerinin hipermetilasyonu ise, tümör supressör genlerin transkripsiyonel sessizleşmesine, gen ekspresyonunda değişikliğe ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna neden olmaktadır (10,19). Bu iki özelliğe tümör hücrelerinin gelişimi için büyük bir avantaj kazandırmaktadır.

Kanserde, DNA hipermetilasyonuna uğrayan sayısız gen bildirilmiştir. Bu genler, hücre döngüsünü düzenleyen genler ( $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4a}$ , Rb,  $p14^{ARF}$ ), DNA tamir mekanizması ile ilişkili olan genler (BRCA1, MGMT), apoptoz genleri (DAPK, TMS1), ilaç direnci, detoksifikasyon, farklılaşma, anjiyogenez ve metastazla ilgili genlerdir (19).

GBM'de de birçok genin epigenetik olarak inaktivasyonu saptanmıştır. GBM'in sağ kalım yolağında disregülasyona neden olan carboxyl-terminal modilatör protein (CTMP) geni (76) ve PTEN promotor metilasyonu; hücre siklusu gibi hücre fonksiyonlarda anahtar rolü olan  $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$  genleri hipermetile olmaktadır. Aynı zamanda tümör supressör genler; RB1, VHL, EMP3, RASSF1A, BLU (62), BEX1 ve BEX2 (76), DNA tamiri ve genom bütünlüğü ile ilgili genler MGMT ve MLH1; tümör invazyonu ve apoptozis ile ilgili genler DAPK, TIMP3, CDH1, PCDH-gamma-A11 ve TMS1/ASC'da da hipermetilasyon görülmektedir (62).

### 2.3.4.1. MGMT

Gıda, ilaç, kozmetik, tekstil ve daha birçok sanayi ürünü ile birlikte hayatımıza giren çeşitli kimyasal maddelerin kansere yol açtığı uzun süredir bilinmektedir. Bu

kimyasalların en önemli gruplarından biri olan alkilleyici maddeler nükleik asitlerle ve diğer hücrel moleküllerle etkileşerek onlara alkil grubu aktarırlar. Transfer edilen alkil grupları hücrenin biyolojik etkilerini değiştirmektedirler (21).

Alkilleyici maddeler DNA üzerinde çeşitli bölgelerle etkileşebilirler. Özellikle DNA bazlarının halka üzerindeki azot atomları, halka yapısındaki oksijen atomları ve nükleotidler arasındaki fosfatların 5'-3' fosfodiester bağında yer almayan oksijen atomları DNA üzerinde en fazla alkilenen bölgelerdir (21).

Alkilleyici ajanlar ultraviyole radyasyona benzeyen bir DNA hasarına (genellikle DNA'daki O<sup>6</sup>-G (Guanin), O<sup>4</sup>-T (Timin) ve O<sup>2</sup>-T pozisyonları) neden olurlar. Bu ajanlar tarafından değiştirilen bazlar öncelikle pürinler olup oluşan ürün spektrumu kullanılan ajana bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Memeli hücrelerinde bu gibi yanlış kodlanan alkilasyon lezyonlarını düzeltmek amacıyla DNA tamir mekanizmaları bulunmaktadır. Bu ürünlerin en mutajenik olanı, modifiye edilen zincir duplike olduğu zaman sitozin yerine timin ile eşleşme olasılığı en yüksek olan O<sup>6</sup>-MeG (O<sup>6</sup>-metilguanin)'dir (94). DNA polimeraz O<sup>6</sup> MeG'ni yeni sentezlenen kolda sitozin veya timin ile eşleştirir. Eğer O<sup>6</sup> MeG timin ile eşleşirse G:C → A:T transisyon mutasyonu ortaya çıkacaktır (21). O<sup>6</sup>-MeG, reaktif hücrel katabolitler tarafından küçük miktarlarda endojen olarak üretilir (94).

Memeli hücrelerinde, alkilasyonun ve oksidatif DNA hasarının tamiri için kullanılan direkt mekanizma, DNA tamir proteini olan ve DNA'daki alkil gruplarını uzaklaştıran MGMT'yi (O<sup>6</sup>-Metilguanin-DNA metiltransferaz) içermektedir.

İnsan hücreleri sadece bir tip MGMT içerir ve bu MGMT geni 5 ekzon ve 1 intron içermektedir. Yaklaşık 145 bp uzunluğunda ve 10q26'da lokalizedir. Bu gen 866 nükleotidlik bir mRNA, bu ise 207 amino asit içeren 24kDa'lık bir protein kodlamaktadır. MGMT nispeten stabil bir proteindir, yarılanma ömrü 24 saatten uzundur (42).

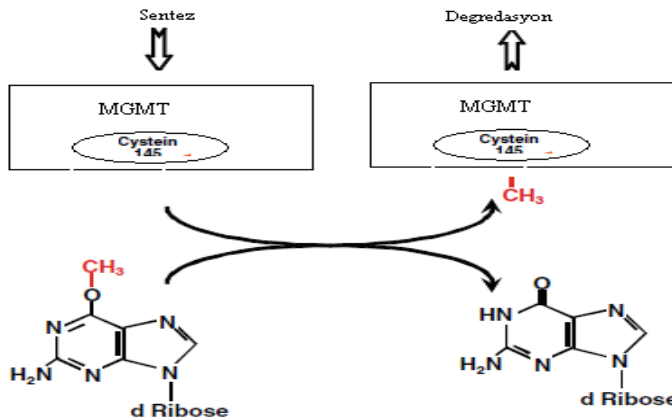
MGMT'nin DNA'da tamir edilecek bölgeyi nasıl tespit ettiği tam olarak bilinmemektedir. Genel olarak, alkil eklentisinin DNA'da yapısal bir değişikliğe yol açtığı ve bunun da tanınmaya yardımcı olduğu belirtilmektedir (92). Ayrıca, bu konuya ilişkin sunulan bazı öneriler de bulunmaktadır. Bunlardan ilki, MGMT'nin DNA boyunca hareket ettiği ve yapısal olarak dışa doğru çıkıntı yapmış O6-MeG'yi saptadığı yönündedir. Diğer bir öneri de MGMT'nin Watson-Crick modeli dışında kalan ve stabil olmayan baz çiftlerini tanıdığıdır. Bu tamir mekanizmasında, MGMT'nin dizi spesifik bağlanma için heliks-turn-heliks yapısıyla DNA'nın majör oluşuyla etkileşime geçtiği belirtilmektedir. Bu etkileşimin ardından MGMT DNA'nın minör oluşuna bağlanmakta ve alkilasyon alanındaki alkil grubu, MGMT proteinin aktif bölgesinin 145. pozisyonunda yer alan sistein aminoasidi üzerine taşınmaktadır (61,91). MGMT proteinin 145. pozisyonunda ki sistein amino asidinin bulunduğu bölge evrimsel açıdan korunmuş bir bölgedir (91). MGMT'nin O6-MeG ile etkileşiminin ardından oluşan alkilenen formu tekrar tamir enzimi olarak fonksiyon göremez. Çünkü alkilenen MGMT ubiquitinlenir ve ardından ubiquitin/proteozomal sistem aracılığıyla parçalanır. MGMT proteini, kendisinin parçalanmasıyla sonuçlanan fonksiyonu nedeniyle "intihar eden" enzim olarak tanımlanır (26, 39, 91). Bir MGMT molekülü sadece bir alkil eklentisi tamir edebilir, dolayısı ile hücrelerin tamir kapasitesi toplam MGMT molekül sayısına bağlıdır (41). Hücre içerisinde, MGMT aracılı tamirin devamı için yeni MGMT proteinleri sentezlenir. MGMT'nin aktivitesi substrattaki yapısal değişikliklere ve MGMT miktarına bağlıdır. Hücre ne kadar çok MGMT sentezlerse tamir oranı o düzeyde fazla olur. MGMT tamir hızı alkil grubunun çeşidine göre değişmektedir. Moleküler büyüklüğü nedeniyle metil (CH<sub>3</sub>) eklentilerini etil (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) ve propil (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) eklentilerine göre daha hızlı tamir etmektedir (41).

MGMT bir takım özellikleri nedeniyle diğer tamir enzimlerinden farklıdır. Bu özellikleri;

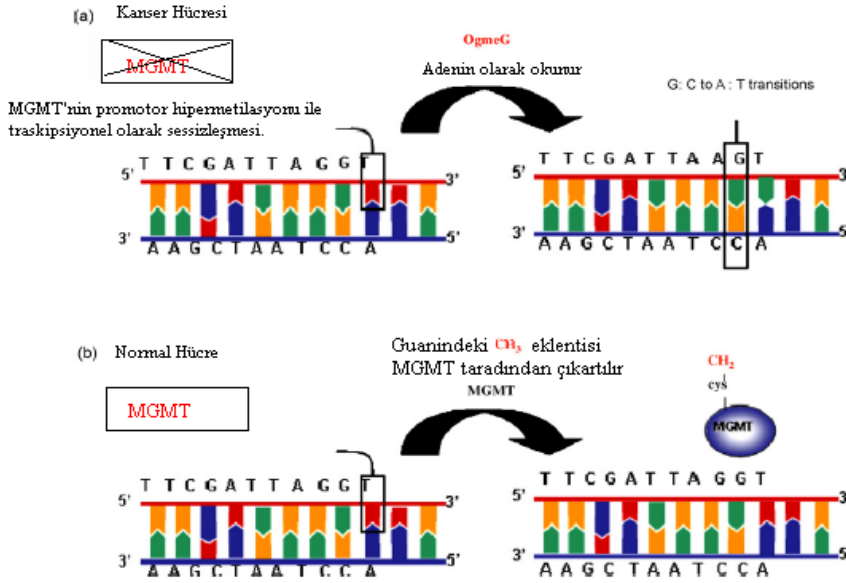
- a) Herhangi bir protein veya kofaktör olmadan tek başına etki gösterir;

- b) Alkil grubunu proteinin internal sistein rezidüellerine transfer eder, transferaz ve alkil grup akseptörü olarak rol oynar;
- c) Guaninden alkil grubunu aldıktan sonra inaktifleşir, intihar proteinidir;
- d) Sitokiyometrik bir tamir sürecini kontrol eder. Bu özellikler MGMT'yi ilaç direncinde önemli bir faktör ve ilaç direncinin biyokimyasal modülasyonunda ideal hedef yapmaktadır (57).

MGMT molekülü, sitotoksik alkilleyici bileşiklere maruz kalan hücrelerde alkil eklentilerini kendi üzerindeki sistein amino asidine transfer ederek alkilasyonun mutajenik etkisini ortadan kaldırmaktadır (Şekil 2.4.)(26,42). Böylece, MGMT, monofonksiyonel alkilleyici ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamir ederek bu moleküllere karşı gelişen direnç mekanizmalarından birini oluşturmaktadır (61). Bu tamir mekanizması sağlıklı hücreleri alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkilerinden korurken kanser hücrelerinde de alkilasyon ajanlarının tedavi etkilerine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır (2,41). Alkilleyiciler tarafından oluşturulan O<sup>6</sup> DNA eklentileri ve özellikle guaninin O<sup>6</sup> pozisyonundan alkilasyonu, transisyon mutasyonlarının oluşmasına ve kanserin indüklenmesine neden olmaktadır (Şekil 2.5.) (61).



**Şekil 2.4.** DNA metilasyonu ardından, metil grubun O<sup>6</sup>-metilguanozinden MGMT' nin aktif bölgesine transfer edilmesi (Kaina ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.) (42).



**Şekil 2.5.** MGMT tamiri ve transisyon mutasyonunun oluşumu a. MGMT'nin metilasyon ile sessizleştirilmesi sonucu transisyon mutasyonu oluşumu, b. MGMT, hücresel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruması (Jacinto ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.) (39).

MGMT'nin aktivitesi çeşitli normal ve tümör dokularında (beyin, kolon, over, testis ve meme) tanımlanmıştır. Normal dokularda MGMT ekspresyonu doku ve hücre-tipine göre regüle olmaktadır. Tümör dokularında ekspresyonu oldukça değişkenlik göstermektedir. Kolon kanseri, pankreatik karsinoma ve akciğer kanserinde yüksek seviyede MGMT aktivitesi varken, beyin tümörleri ve malign melanomada düşük MGMT aktivitesi gözlenmektedir (42).

MGMT aktivitesi tümörde onu çevreleyen normal dokulara göre daha yüksektir. Over kanserinde MGMT ekspresyonu sınıflandırma ve evrelendirme ile ilişkilendirilmiş, glioblastomalarda ise rekkürrens aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir (42). Malign gliomalarda MGMT, kemoterapotik ajanların indüklediği alkil lezyonlarının çıkarılmasında görev almakta ve metillenmesi sonucunda MGMT proteininin azalmış ekspresyonu, DNA tamir aktivitesinde azalmaya ve nitrozüre ve



temozolomid gibi alkile edici ajanlara karşı hassasiyet artmaktadır (55). Bu özelliğinden dolayı da gliomalı kişilerde “kemosensitivite sensör”ü olarak da adlandırılmaktadır (50).

Glioblastomaların yarısında MGMT konsantrasyonu azalmıştır, bu sayede tümörler temozolomid etkisine karşı duyarlı hale gelmektedir. Kanserlerde MGMT geni mutasyon veya delesyona uğramaz, MGMT fonksiyon kaybı spesifik olarak promotor bölge metilasyonu ile olmaktadır (75). MGMT ekspresyonundaki azalmada etkili olan esas mekanizma MGMT promotor metilasyonudur (40).

MGMT'nin hipermetilasyon ile epigenetik olarak sessizleştirilmesi primer glioblastomalarda % 40, sekonder glioblastomalarda ise % 70'den fazladır. MGMT promotor metilasyonu diffuz ve anaplastik astrositomaların yarısında, oligodendrogial ve mix tümörlerin üçte ikisinde bulunmaktadır (66,79).

Glioblastomalı kişilerde MGMT promotor metilasyon analizi geniş prospektif klinik çalışma gerektirmekte ve kombine radyo/kemoterapi tedavisi ile metile MGMT promotoru olan tümörlü kişiler MGMT promotor metilasyonu olmayanlara göre daha uzun yaşamaktadır. MGMT hipermetilasyonu net olarak glioblastoma multiformede nitrozüre ile alkile kemoterapiye, temozolamid veya her ikisinin kombinasyonuna yanıtta prediktif bir marker olduğu tanımlanmıştır (66).

#### **2.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analiz (HRM) Yöntemi**

HRM (High Resolution Melting Curve) analizi, real-time PCR'nin kullanıma girmesi ile birlikte 1997'de geliştirilen bir yöntemdir. Mutasyon taraması ve genotiplendirme başta olmak üzere genetik haritalama, asosiyasyon çalışmaları, aday gen taraması, DNA metilasyon analizi gibi birçok çalışmada kullanılabilir. Uygulaması kolay ve hızlı bir yöntemdir (53,74). Yöntemi uygularken, standart PCR

bileşenlerine ve çift zincirli DNA'nın varlığında floresan sinyal veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü bu boyaların yardımıyla DNA denatürasyonu takip edilebilmektedir. Artan sıcaklığa karşılık, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması ile floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelmektedir. Florometrik cihazlar, sıcaklık artışına bağlı olarak değişen bu sinyal şiddetini görüntüleyecek şekilde tasarlanmıştır. HRM'nin gücü, cihazın sıcaklık kontrolüne, sıcaklık ve floresan ölçümüne, floresan boyalara ve PCR ürününün saflığına bağlıdır. Cihazın sözü edilen faktörlerden kaynaklanan yüksek çözünürlük kapasitesi, hassas ölçüm sağlamaktadır. Hassas ölçüm, artan her 0,1-1,0 derece (°C) sıcaklığın neden olduğu floresan sinyal şiddeti değişiminin kayıt edilebildiğini ifade etmektedir. Bu durum, DNA denatürasyonunun çok iyi takip edildiğinin bir göstergesidir (53).

HRM analizinin diğer gen tarama yöntemlerine göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Yöntem, "kapalı tüp sistemi" olarak adlandırılmaktadır (74). Bunun temel nedeni, PCR'nin tamamlanmasından sonra, HRM'nin PCR ile aynı tüpte gerçekleştirilmesidir. Bu durum, kısmi otomasyon yarattığı için kolaylık sağlamaktadır. PCR ürünlerinden gelebilecek laboratuvar kontaminasyon riskini ve analiz süresini azaltmaktadır. Çünkü HRM için veri eldesi ve analizi PCR'den sonra 10-15 dk içinde gerçekleşmektedir. Veri eldesi, 2 sn'deki 0,1-1,0°C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesi ile elde edilir. Artan her 0,1°C için ölçüm alınabilmektedir. Bu nedenle çözünürlük yüksektir (53).

HRM analizinde, çift zincirli DNA'yı tek zincirli DNA'dan floresan sinyal şiddetindeki değişimle ayırt etmemize olanak veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır (53). HRM analizi için SYBR Green gibi ikinci nesil boyalar, LC Green, Eva Green ve SYTO9 adı verilen üçüncü nesil boyalar kullanılmaktadır (53).

## 2.4.1. DNA' nın Tm derecesi

DNA, birbirine 3'-5' fosfodiester bağlarıyla bağlı dört deoksिनुकлеотидин meydana getirdiği iki komplementer нуклеик асит zincirinden oluşан çift zincirli bir moleküdür. İki zincir birbirine adenin (A) ve timin (T) arasındaki iki (A=T), guanin (G) ile sitozin (C) arasındaki üç (G=C) hidrojen bağı ile bağlanmaktadır. Hidrojen bağlarını kıran fiziksel ve kimyasal etkenlerle DNA çift zinciri denatürasyona uğrayabilmektedir. DNA çift zincirinin %50'sinin birbirinden ayrılması için gerekli olan sıcaklık derecesi, DNA "Tm derecesi" olarak tanımlanmaktadır. DNA çift zincirinin tamamen açılmasına ise "denatürasyon" denmektedir (53).

DNA boyutu ve GC içeriği, DNA'nın kararlılığını belirleyen en önemli faktörlerdir. DNA'nın denatürasyon sıcaklığı, kararlılığına bağlı olduğu için bu faktörlerden etkilenmektedir. GC arasındaki hidrojen bağı sayısı AT arasındakinden fazla olduğu için, GC'den zengin bir DNA'nın Tm derecesi, AT'den zengin DNA'nın Tm derecesinden yüksektir. Başka bir ifadeyle, GC içeriğinin fazla olması DNA'nın denatürasyon sıcaklığını ve kararlılığını arttırmaktadır. DNA baz dizisinde meydana gelen değişiklikler, DNA çift sarmalının kararlılığını değiştirir. Bu durumdan, DNA Tm derecesi de etkilenmektedir. DNA'daki mutasyona, metilasyona bağlı olarak normal DNA dizisine göre Tm derecesi artabilmekte ya da azalabilmektedir (53).

## 2.4.2. MS-HRM

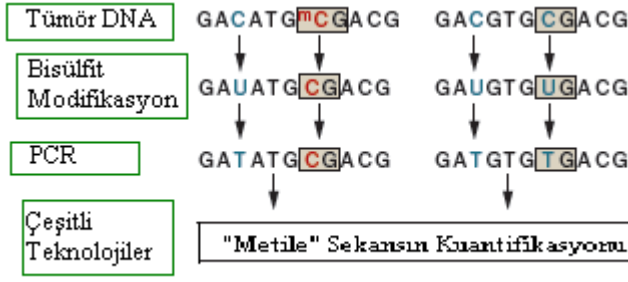
MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melting Curve) ilk olarak 2007 yılında tanımlanmıştır. Bu metod HRM'i temel almakta (106) ve çift zincirli DNA'ya bağlanabilme yeteneğine sahip floresan boyalar kullanılmaktadır (101). Metilasyon spesifik HRM protokolünde metilasyon profili bilinmeyen örnek DNA'nın bisülfid modifikasyonunun ardından, metile ve unmetile alleller arasındaki Tm farklılıklarından faydalanılarak anormal DNA metilasyonu saptanabilmektedir (106). Erime real-time

PCR cihazında gerçekleştirilerek yüksek çözünürlüklü erime görüntülenir ve HRM analizi için geliştirilmiş yazılım kullanılır. Erime basamağı sırasında, çift zincirli DNA tek zincirli DNA'ya denatüre olur ve boya tek zincirli DNA'dan ayrılarak floresan ışımaya durur. Floresanın azalması erime eğrisi olarak ölçülür ve kayıt edilir (102,103).

MS-HRM lokus spesifik DNA metilasyonunu saptamaya uygun bir teknik olup bisülfite ile modifiye edilmiş ilgili bölgenin hem metile hem unmetile primerler ile PCR amplifikasyonunu içermektedir. Bu yöntemde PCR reaksiyonunun ardından analiz ampikonunun metile veya unmetile template DNA'dan orijin almasına göre yapılır. Metilasyonun derecesini belirlemek için metile ve unmetile DNA'lardan oluşan kontrol setleri kullanılır (52). Yüksek sensitiviteli ve hızlı çalışılabilen bir yöntemdir (102). Unmetile DNA arka planındaki %1'lik metile DNA'yı saptayabilmektedir (52).

### 2.4.3. Bisülfite Modifikasyon

Bisülfite modifikasyonu, genomda bulunan tüm metile ve metile olmayan CpG adalarını saptamak için kullanılır. Sodyum bisülfite, tek iplik DNA'da lokalize olan sitozini deamine eder. Bu reaksiyonda DNA, önce denatürasyon ile tek zincirli forma geçer. Ardından sırasıyla; sitozinin bisülfite reaksiyonu ile sitozin sülfonata, hidrolitik deaminasyon ile urasil sülfonata ve alkali desülfonasyon ile urasile dönüşümü gerçekleşir. Böylece tüm sitozinler urasile dönüşür, ancak "metile sitozin", sitozin olarak kalır. DNA'daki metilasyon durumu en iyi şekilde sodyum bisülfite kullanılarak tespit edilebilir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Bisülfıt Modifikasyon (Weller ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.) (98).

## 2.5. Dizi Analizi Yöntemi

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Temel olarak DNA dizilenmesi konusunda iki teknik vardır: Bunlar Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemleridir.

**Maxam-Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi:** Bu yöntemde floresan veya başka bir yöntemle işaretlenmiş bir DNA bölgesi belli bir baza spesifik kimyasal reaksiyonlarla parçalanarak fragmanlara ayrılır. Her spesifik reaksiyon için ayrı bir kuyu kullanılarak poliakrilamit jelde yürütülür ve görüntülenerek baz dizisi belirlenir.

**Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi:** Bu yöntemde in-vitro ortamda DNA sentezi sırasında sentezi durdurucu ddNTP moleküllerinin ortama eklenmesi ile sentezin durdurulması amaçlanır. ddNTP'ler normalde DNA sentezi sırasında zincirin uzaması için bağ sağlayan 3' oksijen molekülüne sahip değildir. İşaretli primerler veya ddNTPler varlığında DNA dizisi 4 farklı reaksiyon yapılarak (her reaksiyon için bir ddNTP) poliakrilamit jelde veya her ddNTP(ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) farklı floresan boyalarla işaretlenerek otomatik kapiler elektroforez sistemlerinde bütün baz dizisi elde edilebilir (63).

Deneysel olarak DNA'nın dizilenmesi dört aşamadan oluşur:

**1. PCR:** Dizi spesifik primerler, DNA polimeraz enzimi ve serbest nükleotitler varlığında in vitro ortamda dizilenecek bölge sınırlandırılır ve milyonlarca kez çoğaltılır. Reaksiyonun gerçekleştiği ısı döngüleyici aletin uygulayacağı program, çalışılan bölgenin özelliklerine göre ayarlanmaktadır.

**2. PCR sonrası pürifikasyon:** PCR sonrası ortamda bazı artık ürünler (primer artıkları, dNTPs ve enzim) bulunabilir. Bunlar sonraki aşamalar için problem oluşturabileceğinden ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. İşlem sonunda saf halde çift sarmallı PCR ürünü elde edilir.

**3. Döngü dizileme:** Döngü dizileme durdurucu nükleotitlerin (ddNTPs) eklenmesi için yapılan asimetrik bir PCR'dır. Standart PCR'dan farklı olarak tek bir primer ve durdurucu nükleotitler ortama eklenir ve rutin denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları ile floresan işaretli ddNTPs bağlanması sağlanır. Böylece otomatik dizi analizi sisteminin okuması için hazır fragmanlar oluşturulmuş olur.

**4. Döngü dizileme ürünlerinin pürifikasyonu ve otomatik dizi analizi sistemine yüklenmesi:** Döngü dizileme sonrası ortamda artıklar bulunmaktadır. Bu artıklar otomatik dizi analizi sisteminde sorun oluşturacağı için temizlenmesi gerekmektedir. Bu işlem için standart olarak sodyum asetat-alkol yöntemi kullanılabilir. Ancak daha hızlı ve verimli sonuç verebilen ticari olarak üretilmiş sefadeks içeren spin-kolonları kullanmak da mümkündür. Bu temizleme işleminin ardından ürünler otomatik dizi analizi cihazına yüklenerek floresan işaretli fragmanların bir kamera yardımı ile okunması ve bir program ile analizi sonucu DNA dizisi elde edilir (63).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada GBM tanısı almış 40 olgunun IDH1 gen mutasyonu ve MGMT gen metilasyon paternleri açısından değerlendirilmesi, klinopatolojik özelliklerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. IDH1 geni dizi analizi ile ve MGMT gen metilasyon paterni Methylation Sensitive High Resolution Melting Curve (MS-HRM) tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bulgular, olguların klinik ve histopatolojik özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

### 3.1. Gereçler

Çalışmada moleküler yöntemlerde kullanılan gereçler ve kimyasal malzemeler aşağıda liste halinde verilmiştir.

#### 3.1.1. Materyal seçimi

Yaptığımız çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'na başvuran ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek "Glioblastoma Multiforme" tanısı alan 40 olgu dahil edilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait dokular ESOGÜ Nöroşirurji Anabilim Dalı'nca operasyon esnasında alınan numunelerden oluşmaktadır.

## 3.1.2. Kullanılan gereçler

Mikro Pipet takımı ve uçları (2–20–100–1000 µl) (Gilson)

Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (Strip tüpü ve kapağı, 0.2 ml) (Perkin Elmer)

Kapaklı santrifüj tüpleri (1,5 ml)

Çalkalamalı su banyosu (Nüve)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Vorteks (Heidolph)

Deep-freeze (Arçelik)

Buzdolabı (Arçelik)

Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Spektrofotometre (NanoDrop)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Real-time PCR System (LightCycler480 Roche)

LightCycler 480 Multiwell Plate 96, colorless (50 plates/kutu) (Roche)

Kapiller Elektroferez Cihazı (ABI Prizm 3130)

3130 için 96 Well Plate Septa

3130 için 96' lık well reaction plate

3130x3100 series plate base 96 well

3130x3100 series plate retainer 96 well

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)



# PDF Eraser Free

Elektroforez aleti (Consort E844)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

### 3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

Doku Parçalayıcı Tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer)

Proteinase K, Recombinant, PCR grade (100mg liyofilize) (Roche)

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I- Large Volume) (Roche)

EpiTect Bisülfid (48) modifikasyon kiti

CpGenome Universal Methylated DNA (10µg / 100µl)

CpGenome Universal Unmethylated DNA (5µg / 50µl)X 2 vials (Millipore-Chemicon  
® International)

LightCycler ® 480 High Resolution Melting Master kiti (5ml / 500 reaksiyon) (Roche)

dNTP seti (Fermentas)

MgCl<sub>2</sub> (PCR için) (Fermentas)

10XPCR buffer (Fermentas)

Taq DNA polimeraz (Fermentas)

Distile Su

Moleküler Weight Marker (Promega, GibcoBRL)

6X Jel yükleme tamponu (Sigma)

Agaroz (Sigma)

Etidyum Bromid (Sigma)

ExoSAP-IT<sup>®</sup> PCR clean-up buffer (USB/ Affymetrix)

BigDye<sup>®</sup> Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit

Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)

DyeEx (Qiagen)

## 3.2. Yöntemler

GBM tanısı alıp çalışmaya dahil edilen tüm olguların tümör dokularından elde edilen DNA örneklerinde; dizi analizi yöntemi ile IDH1 mutasyonu taranmış ve MS-HRM yöntemi ile MGMT metilasyon paterni belirlenmiştir.

### 3.2.1. Magna Pure Compact DNA ekstraksiyon robotu ile dokudan DNA elde etme protokolü

1. Patoloji Anabilim Dalı tarafından GBM tümör tanısı konmuş ve tümör içeren bölgelerden alınan doku örneğinden 4-5 mm'lik kesitler alınır ve petri kabı içerisine konulur.çjh
2. Petri kabına aktarılan tümör örneğinin üzerine 2 ml PBS eklenerek 2 kez yıkanır. (PBS: 500 ml distile su içine 4g NaCl, 0.1g KCl, 0.57g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklenerek oluşturulan tampon solusyonu)
3. Alınan doku parçaları petri kabında mekanik olarak bistüri ile kıyılarak parçalanır.
4. Doku parçası 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır.

5. Üzerine 200µl MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer + 20 µl Proteinaz K konularak vorteks yapılır ve Proteinaz K aktivitesi için 56<sup>0</sup>C'de çalkalamalı su banyosunda iki saat bekletilir.
6. Tüpler her yarım saatte bir su banyosundan alınarak homojenizasyon için vortekslenir.
7. Süre sonunda homojenize sıvı haline gelmiş dokuların üzerine 280 µl PBS eklenerek total volume 500 µl olacak şekilde Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu'na uygun ekstraksiyon protokolü ayarlanarak yüklenir.
8. Elde edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi ve DNA örneklerinin saflığı OD260/280 oranı kullanılarak nanogram cinsinden spektrofotometrede ölçülmüştür (Şekil 3.1.).

Robotik sistem; proteinaz K, yıkama solüsyonları ve DNA'yı tutmak için manyetik parçacıkların ve pipetaj için boş kuyucukların bulunduğu bir kartuş sistemidir. Pipet uçlarının yerleştirilmesi için tip trayler, örnek ve elüsyon tüpleri için bir rak bulunmaktadır. Robotik sisteme kartuş ve tip trayler yerleştirilip örnek ve elüsyon tüpleri koyulduktan sonra bütün işlemleri otomatik gerçekleştirmektedir. İşlem yaklaşık 25 dakika sürmekte ve elde edilen DNA örnekleri dizi analizi ve bisülfid modifikasyonu yapılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.



**Şekil 3.1.** Örnek DNA'lara ait %1'lik agaroz jel görüntüsü (Soldan sıra ile 123 bp'lik marker ve olgulara ait 3 DNA örneği)

### 3.2.2. Bisülfite modifikasyon

Elde edilen DNA ürünlerinin bisülfite modifikasyonu işlemi için EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit (48) (Qiagen) kullanılmıştır.

1. Modifiye edilecek DNA ürünleri - 20 °C'den çıkarılarak çözünmeye bırakılır.
2. Bisülfite karışım çıkarılarak her tüp (8 örnek modifiye etmek üzere hazırlanan kit içeriği) içerisine 800 µl RNase free su eklenir ve 5 dakika vorteksenerek karıştırılır.
3. Bisülfite modifikasyon işlemi için örnek DNA'lar "EpiTect Bisulfite Handbook" kullanım kılavuzunda belirtilen "Sodium Bisulfite Conversion of

Unmethylated Cytosines in DNA from Low-Concentration Solutions”  
protokolü doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanır:

DNA solüsyonu (1–500 ng)	Değişken* (maximum 40 µl)
RNase-free water	Değişken*
Bisulfit Mix	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
<hr/>	
Total volum	140 µl

Bisülfit Modifikasyon İçin Termal Cykler Koşulları:

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Denatürasyon	95°C	5 dk.
İnkübasyon	60°C	25 dk.
Denatürasyon	95°C	5 dk.
İnkübasyon	60°C	85 dk.
Denatürasyon	95°C	5 dk.
İnkübasyon	60°C	175dk.
	20°C	∞

Bisülfit Modifiye DNA'nın Temizlenmesi:

1. Bisülfit reaksiyonun ardından PCR tüplerindeki ürünler yıkanarak temizlenme aşamalarına geçilmek üzere 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarılır.

2. Üzerine taze hazırlanmış 10 µg/ml taşıyıcı (carrier) RNA içeren 560 µl Buffer BL eklenir. Vortekslenir ve Epiject Spin kolonlara aktarılarak maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
3. Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine 500 µl Buffer BW eklenerek maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
4. Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine 500 µl Buffer BD eklenerek 15 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır, ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
5. Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine 500 µl Buffer BW eklenerek maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir, bu işlem 2 kez tekrarlanır.
6. Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine bir şey eklenmeden tekrar santrifüj edilir.
7. Spin tüpleri temiz ependorf tüplerine alınarak daha önce 56–60 ° C sıcaklığa getirilmiş olan ısıtıcı blok üzerine ağızları açık olarak bırakılmıştır. 5 dakika inkübe edilerek kalan sıvıların buharlaşarak uzaklaştırılması sağlanmıştır.
8. Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve spin tüplere iki kere 40 µl EB buffer eklenerek 80 µl toplam hacimli dönüştürülmüş ürün elde edilmiştir. Her örneğe iki kere bisülfid modifikasyon işlemi uygulanarak toplam 160 µl ürünle HRM metilasyon aşamasına geçilmiştir.
9. Spin kolon atılarak modifiye DNA -20°C'de MS-HRM analizi yapılana kadar saklanır.

- HRM aşamasında kullanılacak olan pozitif/metile kontrol örneği CpGenome™Universal Methylated DNA (Millipore-Chemicon® International) ve negatif/unmetile kontrol örneği CpGenome™Universal Unmethylated DNA (Millipore-Chemicon® International) bu aşamada modifiye edilmiştir.

### 3.2.3. Modifiye örneklerin MS-HRM analizine hazırlanması

Bu aşamadaki işlemler LightCycler®480 real time PCR (Roche) cihazında uygulanmıştır. MGMT promotor metilasyonu analizi için bisülfite modifiye edilmiş DNA örneklerinden LightCycler®480 High Resolution Melting Master kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde bir karışım hazırlanır:

Su, PCR-grade (vial 2)	3 µl
Primer-probe mix 10× conc.	2 µl
LightCycler® 480 Probes Master, 2× conc. (vial 1)	10 µl
<hr/>	
Toplam volum	15 µl

LightCycler Probe Master Mix kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde reaksiyon programı real-time PCR cihazına girilir:

Program				
Program İsmi	Döngü Sayı	Analiz Mod u		
Pr- İnkübasyon	1	None		
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon		
Soğuma	1	None		
Hedef Isı				
°C	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition (°C)
Pre-İnkübasyon				
95	None	00:05:00- 00:10:00	4.4	-
Amplifikasyon				
95	None	00:00:10	4.4	-
Primer Bağımlı	None	00:00:15- 00:00:50	2.2	-
72	Single	00:00:01	4.4	-
Soğuma				
40	None	00:00:10	1.5	-

### 3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

IDH1 genini çoğaltmak için uygulanan PCR reaksiyonları, 50 µl toplam hacimde, 4 µl DNA örneği kullanılarak ve aşağıda belirtilen PCR karışımı hazırlanarak gerçekleştirilir:



## PDF Eraser Free

Kalıp DNA	4 µl
10x reaksiyon tamponu	5 µl
2.5 mM dNTP	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
İleri primer	1 µl (10 pmol)
Ters primer	1 µl (10 pmol)
sdH <sub>2</sub> O	30.4 µl
Taq DNA polimeraz	0.6 µl (3 ünite)

---

Toplam : 50 µl PCR reaksiyon karışımı

Hazırlanan örnekler DNA çift zincirinin açılması, olası proteaz kontaminasyonunun önlenmesi ve ekzonükleaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 95°C`de 7 dakika denatüre edilir. Daha sonra sıcaklık, kullanılan primer çiftleri için uygun programlama yapılarak gerçekleştirilir:

94 °C	45 saniye	} 32 döngü
60 °C	45 saniye	
72 °C	45 saniye	

En sonunda 72 °C de 10 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanır.

## 3.2.4.1. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi

1. 6 gram agaroz tartılıp beher içinde 1xTBE solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlanır ve mikrodalga fırında %100'lük güçten %10'luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak berrak bir görüntü elde edilene kadar kaynatılır.
2. Agaroz jele, 0.5 µg/ml olacak şekilde hazırlanan etidyum bromür çözeltisi ilave edilir (15µl).
3. DNA yükleme kuyucukları oluşturmak amacıyla elektroforez jel dökme tablasına tarak yerleştirilir ve çözelti yaklaşık 50-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra jel tablasına dökülür.
4. 30 dakika jelin polimerleşmesi için beklenir. Jel polimerleştikten sonra üzerine, iyon hareketini sağlamak için kullanılan 1xTBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu ilave edilir.
5. 121 gr Tris (1M), 61.7 gr borik asit (1M) ve 7.44 gr EDTA( 20mM) tartılarak, 1000 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımı ile çözündürülerek 20x TBE Stok Solüsyonu hazırlanır.
6. Amplifikasyon ürünlerinden alınan 6 µl DNA örneği, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir ve 75 V'luk elektrik akımı verilir.
7. Boyanan jel, UV lambası altında gözlemlenerek, reaksiyon sonucu oluşan PCR bantları incelenir.

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonunun başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** IDH1 ekzon 4 bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (Sol Başta 123bp'lik marker ve sonrasında olgulara ait PCR ürünleri)

#### 3.2.4.2. PCR ürününün saflaştırılması

1. PCR ürününden 5 µl alınarak ayrı PCR tüpleri (strip) içine konulur. Üzerine 2 µl ExoSAP-IT eklenir.
2. Toplam miktarı 7 µl olan karışım thermal cycler cihazında;  

37°C	15 dakika
80°C	15 dakika inkübasyona bırakılır.
3. 30 dakikalık süre sonunda saflaştırılan ürünler cycle-sequencing için uygun duruma gelmiş olur.

### 3.2.4.3. Otomatik DNA Dizi Analizi

Saflaştırılmış olan PCR ürünlerinin otomatik DNA dizi analizi reaksiyonu, BigDye® Terminator V3.1 DNA dizi analizi kitinin belirttiği doğrultuda aşağıda belirtilen şekilde hazırlanır:

Sekans Karışımı:

Big Dye® reaksiyon karışımı (V3.1):	4µl
Primer (10 pmol/µl):	1µl
PCR ürünü:	2µl
sdH2O:	3µl
<hr/>	
Toplam:	10µl

BigDye® Cycle Sequencing PCR Reaksiyon Programı:

96°C	10 saniye	} 35 döngü
50°C	5 saniye	
60°C	4dakika	

### 3.2.4.4. Sekans reaksiyonu sonrası pürifikasyon

Sekans reaksiyonunun otomatik sekans aletinin kapiler elektroforez sisteminde yürütülmesinden önce son bir saflaştırma işlemi daha yapılır. Sekans sonrası saflaştırma işlemi, aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilir:

Thermal cycler içinden çıkan örnekler DyeEx protokolüne tabi tutulur.

1. DyeEx tüplerinin kapakları 45°C açılarak hafifçe vorteks yapılır ve altındaki emniyet çubuğu kırılarak toplama tüplerine yerleştirilir.
2. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek numaralandırılmış ependorflara aktarılır.
3. DyeEx tüplerinin kapakları açılarak üzerine cycle sequencing ürünlerinin tamamı jeli delmeyecek şekilde dyex tüplerine aktarılır.
4. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek ependorfıta toplanan örnekler ABI 3130 cihaz tüplerine aktarılır ve cihaza yüklenir.

### 3.3. İstatistiksel Analizler

Genetik değişimler (mutasyon), epigenetik değişimler (metilasyon) ve hasta yaşı arasındaki ilişki Ki-kare ve T-testi kullanılarak değerlendirildi. Olguların sağ kalım süreleri Kaplan-Meier metodu (Log-Rank Test) kullanılarak değerlendirildi. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık  $P < 0.05$  olarak alındı. Analizler "Statistical Package for the Social Services" (SPSS) yazılım programına taşınarak yapıldı.

## 4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı tarafından opere edilen ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı alan 40 olgunun tümör örnekleri çalışmaya alınmıştır. Olgulara ait tümör dokularından robot aracılığı ile DNA örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerden MGMT promotor metilasyonu MS-HRM, IDH1 mutasyonu da dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri, histopatolojik bilgileri, sağ kalım süreleri ve tedavi bilgileri hasta dosyalarından ve Nöroşirürji Anabilim Dalı’ndan temin edilmiştir.

Çalışmamızda MGMT geninin promotor metilasyonu MS-HRM yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada Real-time PCR Sistemine (LightCycler480 Roche) yüklenen örnekler, reaksiyon sonrasında “Tm Calling”, “Gene Scanning” ve “Difference Plot” yazılım programı ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Her üç programda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bulguların sunulmasında Tm Calling esas alınmıştır. Olgulara ilişkin PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri metile olmayanın metile olana oranının bilindiği kontrol PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen metile ve unmetile kontrol DNA pikleri hasta DNA’ları ile karşılaştırılarak her örneğin metilasyon paterni belirlenmiştir.

IDH1 mutasyonu dizi analizi yöntemi ile ABI Prizm 3130 cihazında çalışılmıştır. Analiz sonrasında elde edilen sonuçlar NCBI insan genomik veri tabanı ile karşılaştırılmış ve BioEdit V5 yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

## 4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri

Araştırma grubumuza dahil edilen hastaların 14'ü kadın, 26'sı erkek olup kadınların yaş ortalaması  $51,71 \pm 3,98$ , erkeklerin yaş ortalaması  $58,07 \pm 2,71$  olarak saptanmıştır. Hastaların yaş dağılımları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları.

Yaş	n	%
<39	3	%7.5
40-49	8	%20
50-59	15	%37.5
60-69	7	%17.5
70+	7	%17.5
<b>Toplam</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

## 4.2. Araştırma Grubu Bireylerin MS-HRM Bulguları:

Araştırma grubuna dahil edilen 40 olgunun tümör örneklerinden elde edilen DNA'da MGMT geninin metilasyon paterni incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 40 olgunun 13 tanesinde MGMT geni hipermetile olarak saptanmış ve MGMT metilasyon oranı %32,5 olarak belirlenmiştir.

Metile olguların yaş ortalamasının  $58\pm 13$ , unmetile olguların yaş ortalamasının ise  $55\pm 15$  olduğu saptanmıştır. MGMT metilasyonunun hasta yaşı ve cinsiyeti dikkate alınarak Ki-kare testi ve T-Testi ile değerlendirilmesi sonucu aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ( $P=0.480$ ,  $P=0.503$ ) (Tablo 4.2).

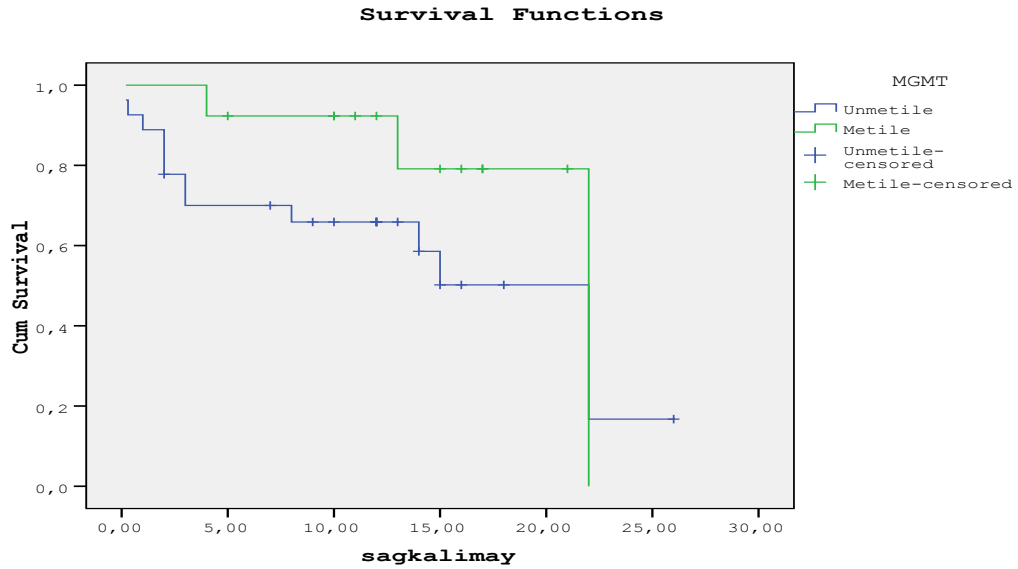
**Tablo 4.2.** GBM tümör örneklerindeki MGMT geninin metilasyon oranları ve sağkalım süreleri ile ortalama yaşları.

	Metile Olgular	Unmetile Olgular
<b>Olgu Sayısı (n)</b>	13	27
<b>Ortalama Sağ Kalım Süresi (Ay)</b>	19 ay	15 ay
<b>Ortalama Yaş (Yıl)</b>	$58\pm 13$	$55\pm 15$



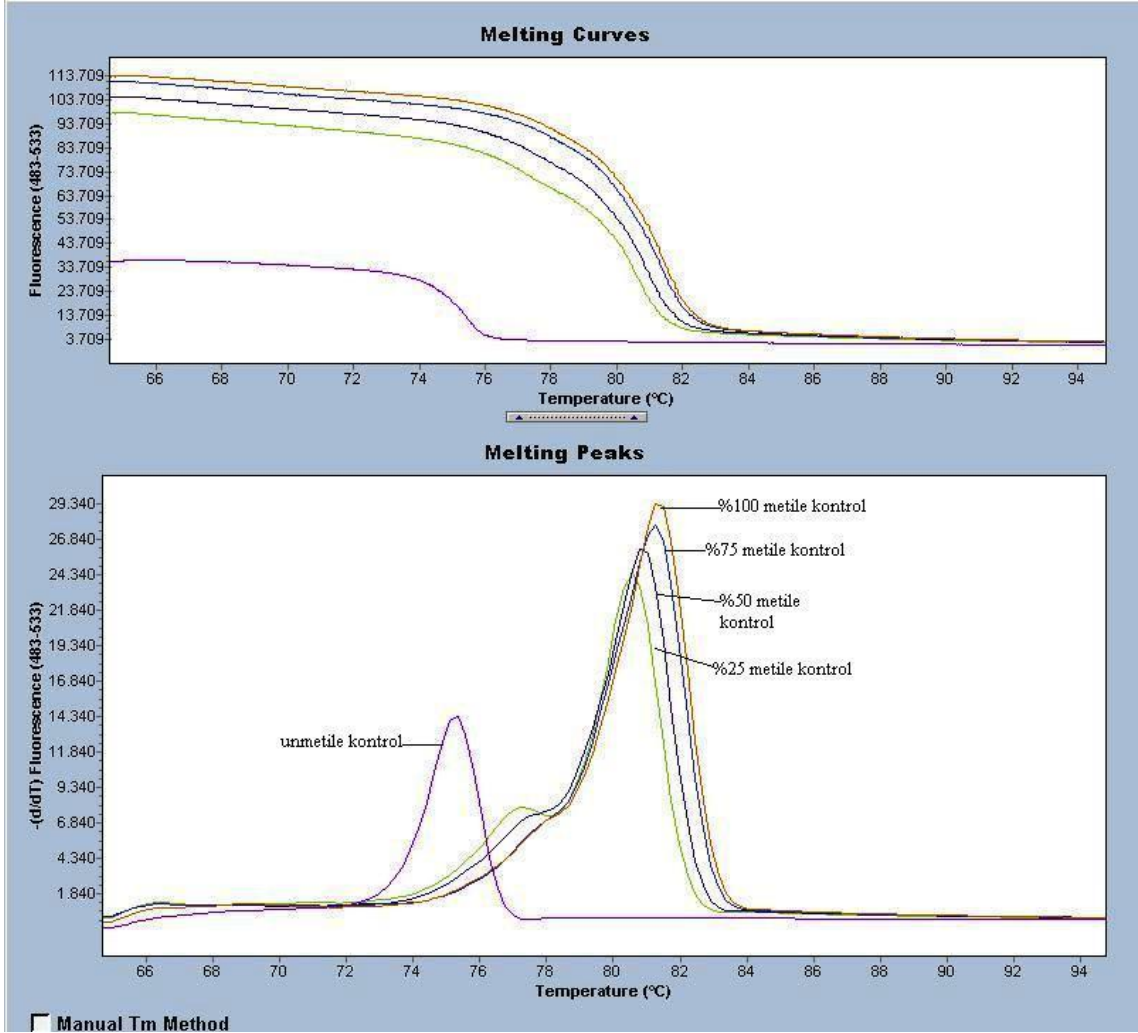
İstatistiksel olarak metile ve unmetile olguların ortalama sağ kalım süreleri Kaplan-Meier metodu (Log-Rank Test) ile değerlendirilmiştir. Metile olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay (%95 CI; 15,4 - 23,3 ) unmetile olguların ortalama sağ kalım süresi ise 15 ay (%95 CI; 10,8 - 18,8 ) olarak saptanmıştır (Log Rank  $P>0.05$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Metile ve unmetile MGMT'li olguların sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu.



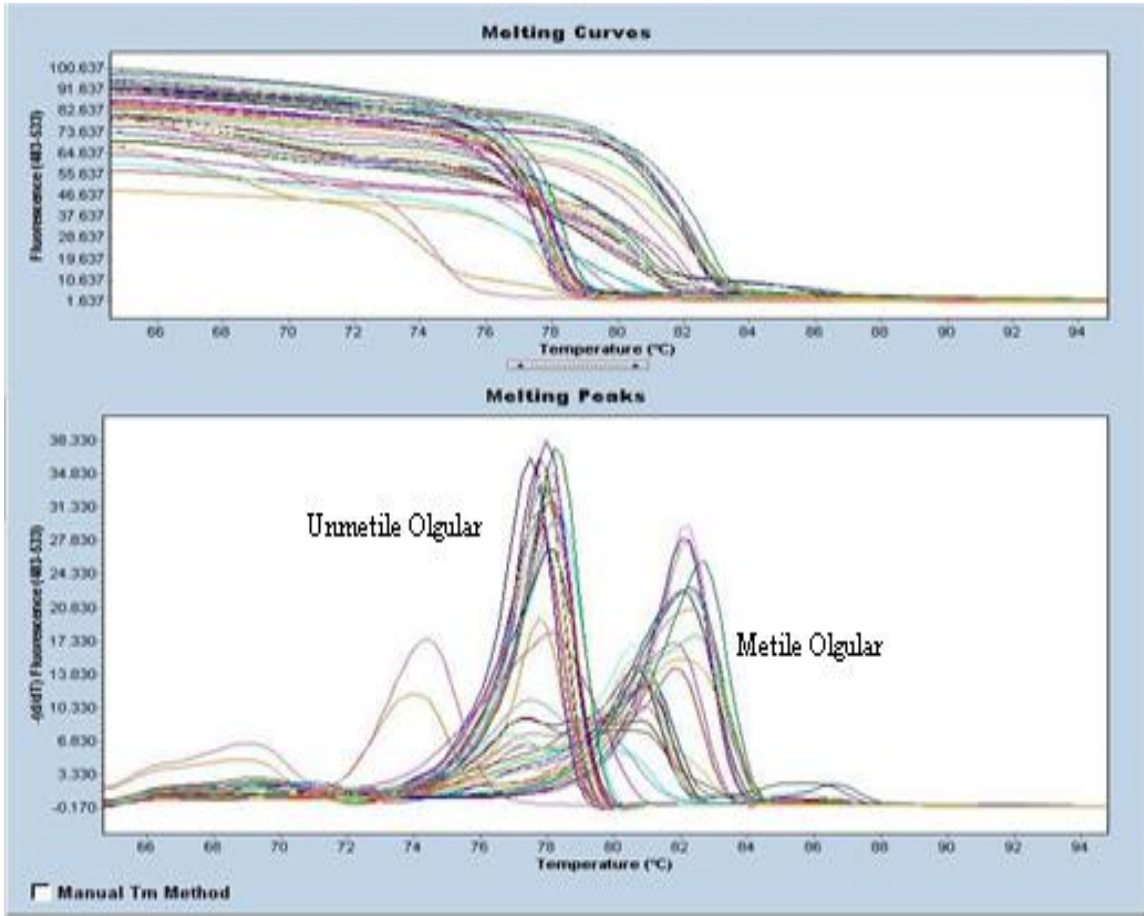
Yaptığımız çalışmada ticari olarak temin ettiğimiz metile ve unmetile kontrol DNA'ları ile %75, %50, %25 oranlarında seyreltilmiş metile kontrol DNA'ları kullanılmış olup bu kontrol DNA'larının MS-HRM görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Metilasyon oranlarına göre ısılarda da göreceli farklılıklar gözlenmektedir. Erime ısıları verileri "Tm calling" yazılım programına göre

değerlendirilmiştir. Olguların metile olup olmadıkları kullandığımız kontrol DNA'ları ile aynı  $T_m$  ısı vermelerine göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5).



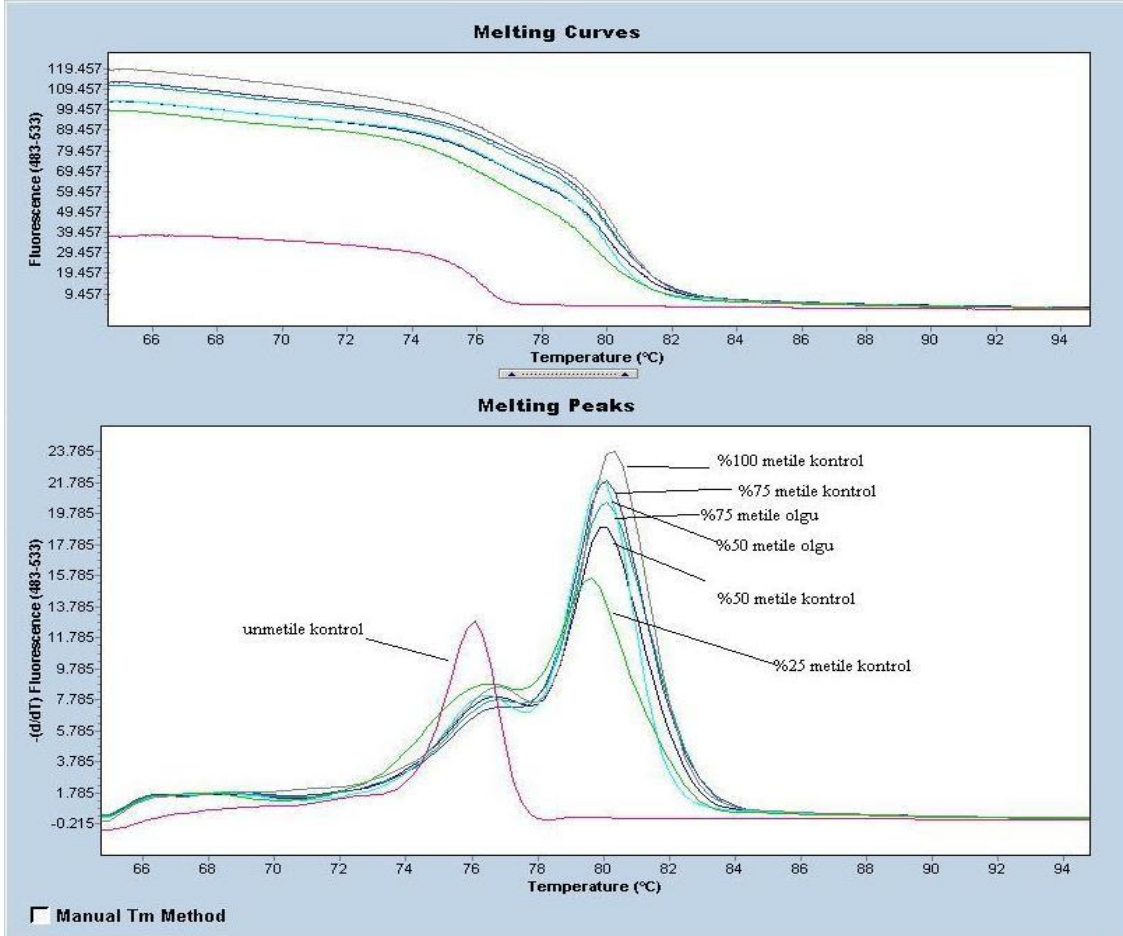
**Şekil 4.1.** Unmetile ve metile kontrol DNA pik görünütüsü (Metile kontrol, unmetile kontrol örnekleri ve metile kontrolün farklı konsantrasyonlardaki ara değer örneklerinin floresan piklerine göre erime eğrileri.)

Metile DNA'dan amplifiye olan ürünler ampliconda bulunan CpG dizileri nedeniyle daha yüksek Tm derecesine sahip iken metile olmayan sitozin nükleotidleri bisülfid modifikasyonu ile urasil nükleotidlerine dönüştürüldükleri için Tm dereceleri daha düşüktür (Şekil 4.2.).

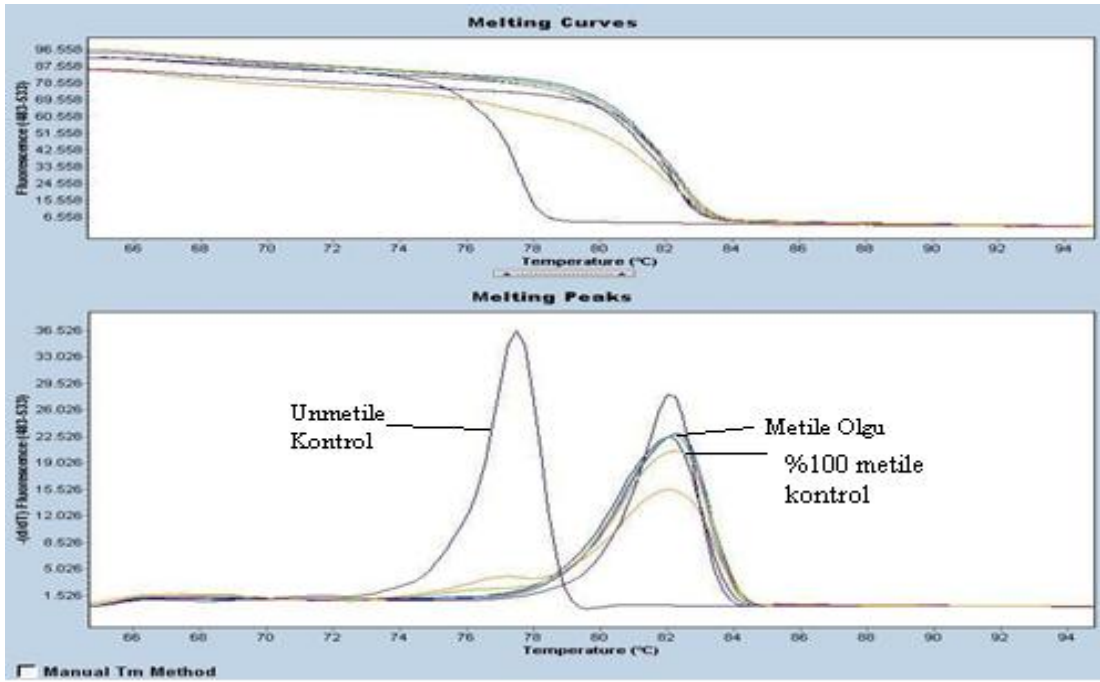


Şekil 4.2. Unmetile ve metile metilasyon paternine sahip incelenen bir grup olgunun Tm derecelerine ait pik görüntüsü.

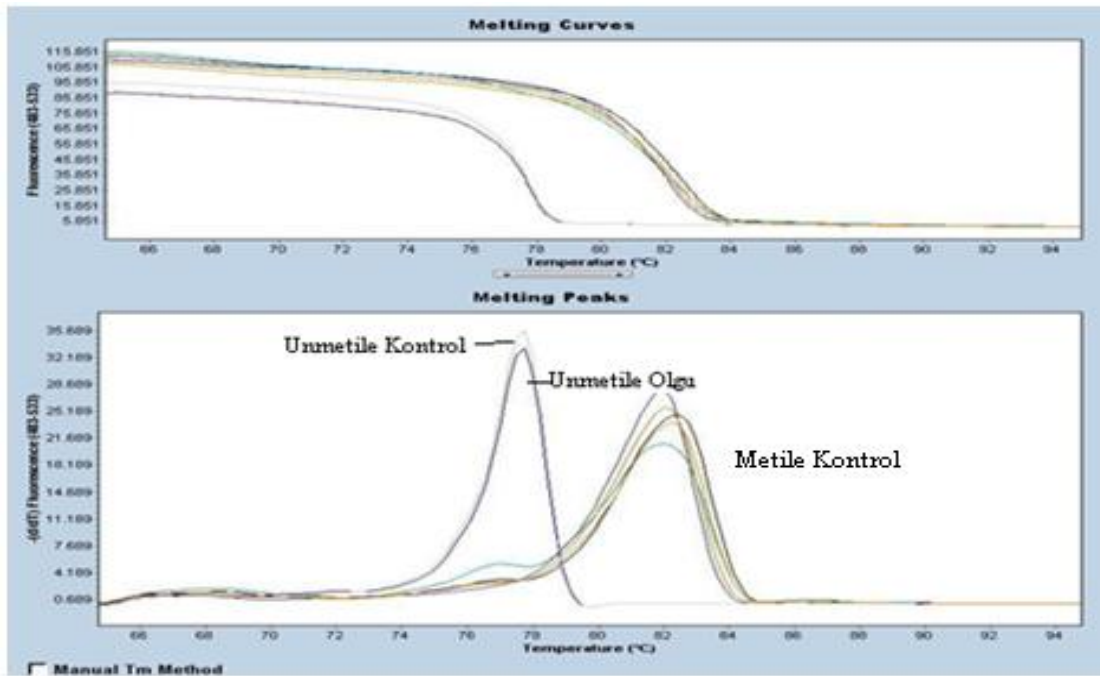
%50 ve %75 kontrol DNA'larına ait amplifikasyon pikleri ile uyumlu olgulara ait amplifikasyon pikleri Şekil 4.3.'de görülmektedir. Metilasyon oranlarına göre olguların ve kontrol DNA'larının erime ısılarında göreceli farklılıklar gözlenmektedir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. %75 ve %50 metile olgulara ait kontrol DNA'ları ile uyumlu pik görüntüleri.



Şekil 4.4. Metile kontrol DNA ile uyumlu %100 metile bir olguya ait pik görüntüsü.



Şekil 4.5. Unmetile kontrol DNA ile uyumlu olan unmetile bir olguya ait pik görüntüsü.

#### 4.3. MGMT Geninin Kantitatif Metilasyon Analizine Ait Bulgular:

Çalışmada MS-HRM yöntemini kullanırken plate kuyucuklarına olgulara ait bisülfid modifikasyonu yapılmış DNA örnekleri ile birlikte kantitatif olarak metilasyon durumlarını bildiğimiz metile kontrol DNA örneği CpGenome™ Universal Methylated DNA (Millipore-Chemicon® International) ile unmetile kontrol DNA örneği CpGenome™ Universal Unmethylated DNA (Millipore-Chemicon® International) ve bunların seyreltilmesi ile elde edilen %25, %50 ve %75 ara değerleri de yüklenmiştir.

Çalışmamızda olgu grubumuzun MGMT geni kantitatif metilasyon oranlarına (unmetile, %25, %50, %75, %100 oranında metile) göre sağ kalım süreleri Kaplan-Meier testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

MGMT geni 27 olguda unmetile, 2 olguda %25 metile, 3 olguda %50 metile, 1 olguda %75 metile ve 7 olguda %100 metile olarak saptanmıştır. Olgu sayımızın azlığı nedeniyle ile örnekler %50 altı metile, %50 üstü metile ve unmetile olarak üç gruba ayrılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmede olguların sağ kalım süreleri açısından %50'nin altı ve üstü metilasyona sahip gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık saptanamamıştır (Tablo 4.4.).

**Tablo 4.4.** Olgu grubumuzun metilasyon oranlarına göre sağkalım tablosu.

	Unmetile	<%50 metile	>%50metile
<b>Olgu Sayısı (n)</b>	27	5	8
<b>Ortalama Sağ Kalım Süresi</b>	15 ay	17 ay	13 ay
<b>İstatistiksel Anlamlılık</b>	P>0.05		

#### 4.4. Glioblastomalı Olgularda Saptanan MGMT Metilasyonu ile Prognoz ve Tedaviye Yanıt Bulgularının Değerlendirilmesi

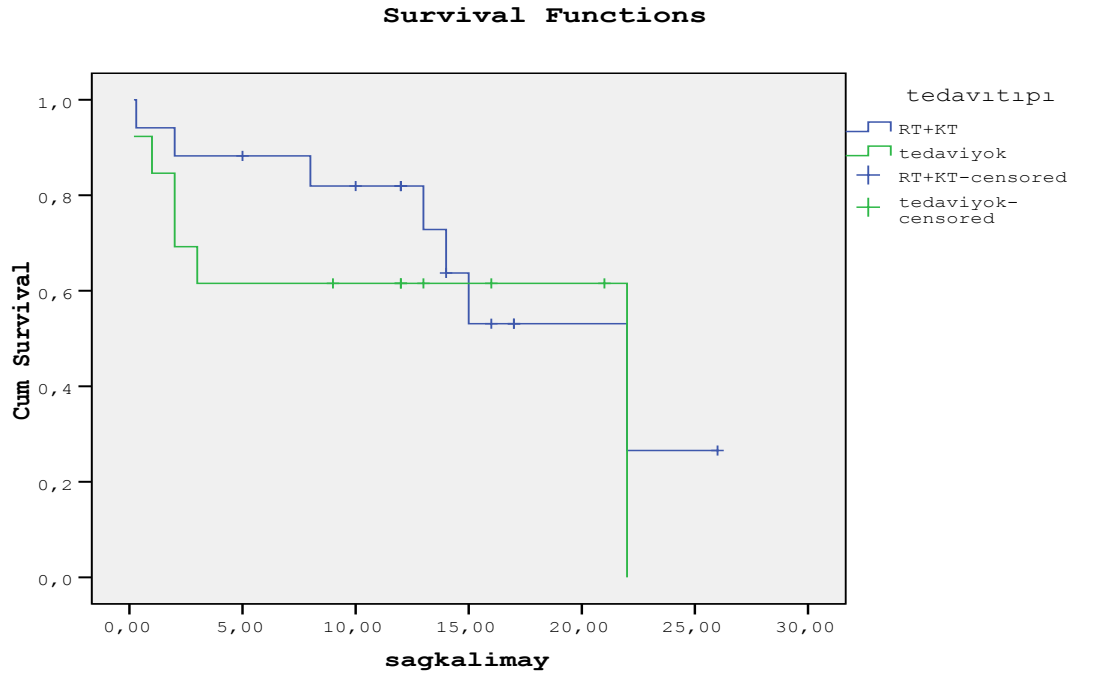
Çalışmamıza dahil ettiğimiz 40 olgunun 17 tanesi radyoterapi ile kombine edilmiş kemoterapi, 9 olgu radyoterapi, 1 olgu kemoterapi uygulanmış olup 13 olguda ise adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmamıştır. Olguların tedavi tipleri ve metilasyon durumları Tablo 4.5.'de verilmiştir. Olguların sağ kalım süreleri Kaplan-Meier Metodu (Log Rank) ile analiz edilmiştir.

**Tablo.4.5.** Olguların metilasyon ve tedavi durumuna göre dağılımı.

<b>Metilasyon Durumu</b>	<b>RT+KT (n)</b>	<b>RT (n)</b>	<b>KT (n)</b>	<b>ADJUVAN BİR TEDAVİ PROTOKOLÜ YOK (n)</b>
<b>Metile MGMT (n)</b>	6	5	-	2
<b>Unmetile MGMT (n)</b>	11	4	1	11
<b>Toplam (n)</b>	17	9	1	13

RT+KT alan olguların sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde 17 ay (%95 CI: 13-23), adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım süresi 14 ay (%95 CI: 8-20) olarak saptanmış ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Log Rank Test; P=0.480) (Tablo 4.6.).

**Tablo 4.6.** RT+KT alan olgular ile adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu.

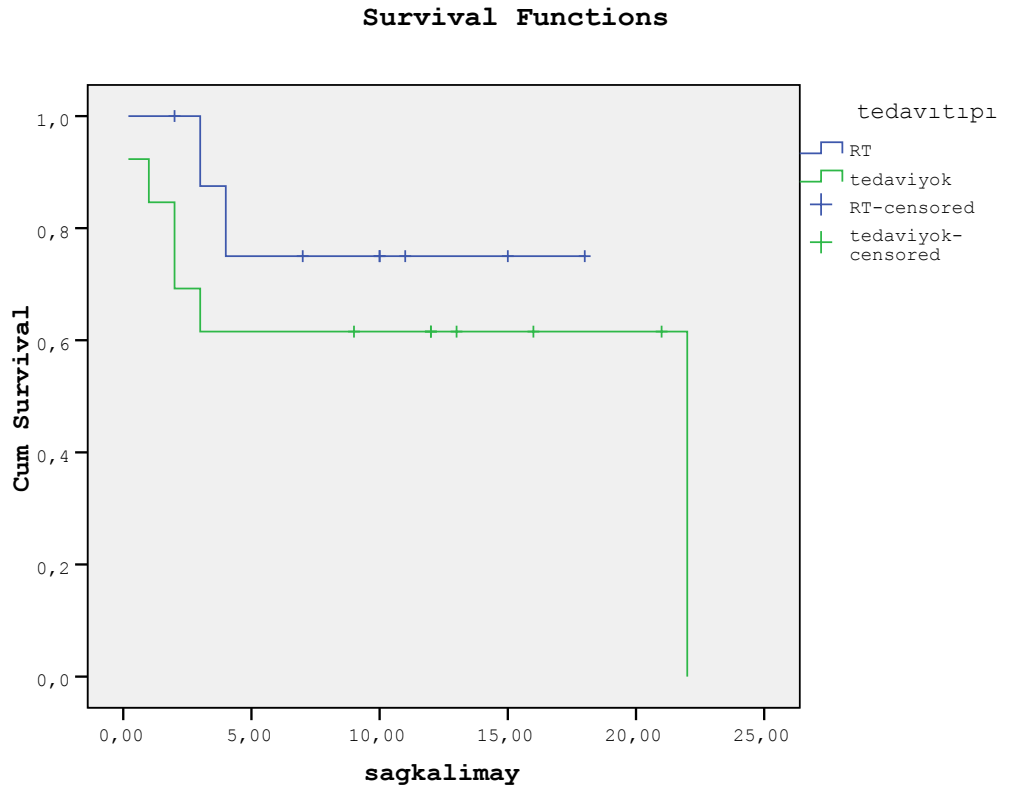


RT+KT alan olgular metilasyon durumlarına göre sağ kalım süreleri istatistiksel olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. MGMT geni metile olup RT+KT alan olguların sayısı 6 olduğu için istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Unmetile MGMT'li olguların sağ kalım süreleri 15 ay (%95 CI: 10-21), adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım süresi ise 13 ay (%95 CI: 6-19) olarak saptanmış ve istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır (Log Rank Test; P=0.569)



RT alan olguların sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde 14 ay (%95 CI: 10-19), adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım süreleri ise 14 ay (%95 CI: 8-20) olarak saptanmıştır (Tablo 4.7.). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Log-Rank Test P=0.376).

**Tablo 4.7.** RT alan olgular ile adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu.



Radyoterapi alan olgulara metile ve unmetile olarak ayrı ayrı bakıldığı zaman grupların olgu sayısı 7'nin altında olduğu için istatistiksel olarak sağ kalım süreleri değerlendirilememiştir. Aynı şekilde kemoterapi alan olgu sayısı da 1 olduğu için istatistiksel olarak sağ kalım süresi değerlendirilememiş olup tedavi tiplerine göre olguların sağ kalım süreleri Tablo 4.8.'de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Tedavi tiplerine göre olguların sağ kalım sürelerinin tablosu.

<b>Tedavi Tipi</b>	<b>RT+KT</b>	<b>ADJUVAN BİR TEDAVİ PROTOKOLÜ UYGULANMAYAN</b>	<b>RT</b>	<b>KT</b>
<b>Genel Sağ Kalım Süresi</b>	17 ay	14 ay	14 ay	Değerlendirilemedi
<b>MGMT metile Olguların Sağ Kalım Süresi</b>	Değerlendirilemedi	Değerlendirilemedi	Değerlendirilemedi	Değerlendirilemedi
<b>Unmetile MGMT'li Olguların Sağ Kalım Süresi</b>	15 ay	13 ay	Değerlendirilemedi	Değerlendirilemedi

#### **4.5.Araştırma Grubu Bireylerin Dizi-Analizi Bulguları:**

Araştırma grubuna dahil edilen 40 olgunun tümör örneklerinden elde edilen DNA'larda ekzon 4 IDH1 mutasyonu açısından incelenmiştir. Sonuçlar NCBI insan genomik veri tabanı ile karşılaştırılmış ve BioEdit V5 yazılım programı ile

değerlendirilmiştir. 40 olgunun 5 tanesinde heterozigot R132H (CGT>CAT) mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 4.9, Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8).

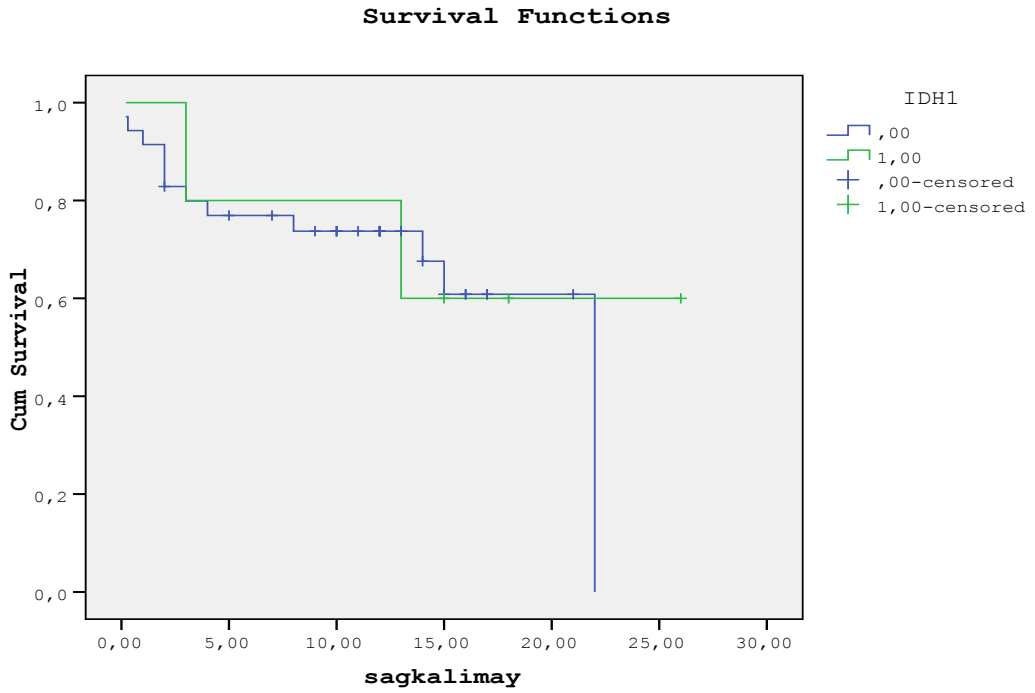
IDH1 mutasyonu olup olmaması ve hasta yaşı dikkate alınarak yapılan Ki-kare testi sonucunda IDH1 mutasyonu taşıyan hastaların yaş ortalaması ile mutasyon taşımayan hastaların yaş ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $t=2.659$ ,  $P=0.011$ ). IDH1 mutasyonu taşıyan olguların yaş ortalaması  $41\pm 5.06$  iken IDH1 mutasyonu saptanmayan olguların yaş ortalaması  $57\pm 2.29$  olarak saptanmıştır (Tablo 4.9).

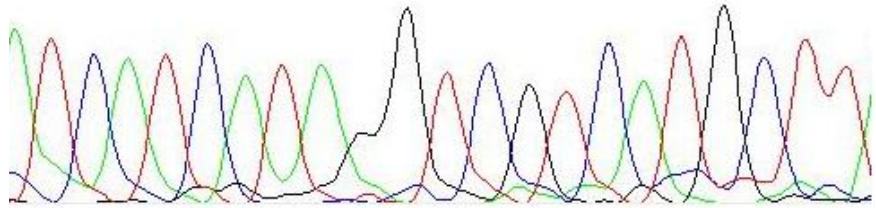
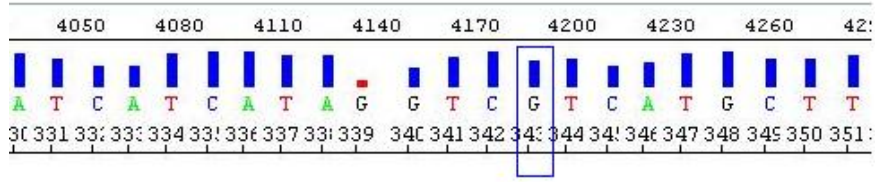
**Tablo 4.9.** GBM tümör örneklerindeki IDH1 geninin mutasyon oranları ve sağ kalım süreleri ile ortalama yaşları.

	<b>IDH1 Mutasyonu Olan Hasta</b>	<b>IDH1 Mutasyonu Olmayan Hasta</b>
<b>Olgu Sayısı (n)</b>	5	35
<b>Ortalama Sağ Kalım Süresi</b>	19 ay	16 ay
<b>Ortalama Yaş (Yıl)</b>	$41\pm 5.06$	$57\pm 2.29$

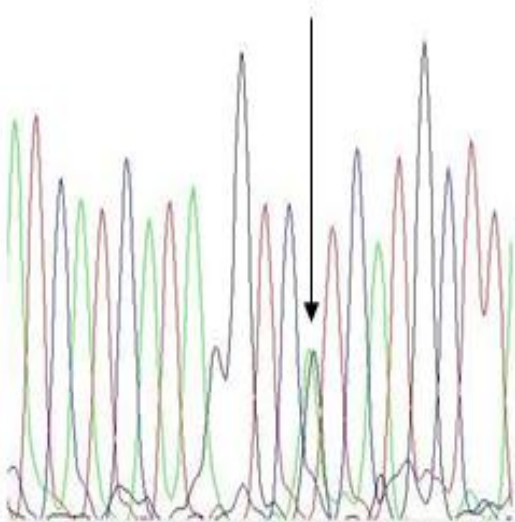
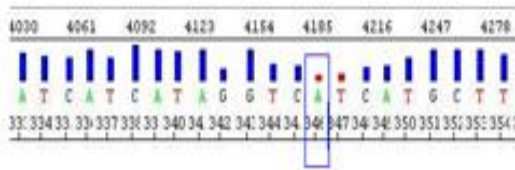
IDH1 mutasyonu taşıyan olgular ile taşımayan olguların sağ kalım süreleri Kaplan-Meier metodu ile (Log-Rank Test) değerlendirilmiştir. IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay (%95 CI; 10,5 - 27 ) mutasyon taşımayan olguların ortalama sağ kalım süresi ise 16 ay (%95 CI; 12,8 - 19) olarak saptanmıştır (Log Rank,  $P>0.05$ ) (Tablo 4.10).

**Tablo 4.10.** IDH1 mutasyonu taşıyan ve taşımayan olguların sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu.

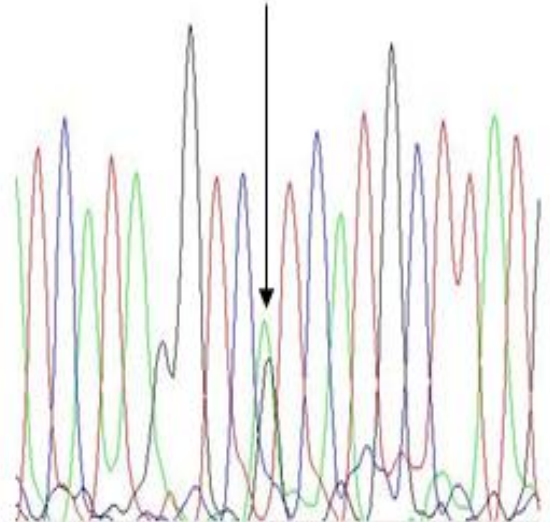
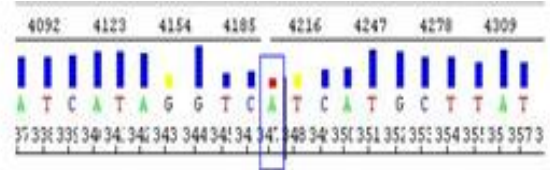




Şekil 4.6. Normal bir olguya ait dizi analizi görüntüsü.



Şekil 4.7. IDH1 R132H mutasyonlu (CGT>CAT) bir olguya ait dizi görüntüsü.



Şekil 4.8. IDH1 R132H mutasyonlu (CGT>CAT) bir olguya ait dizi görüntüsü

### **4.6. MGMT Metilasyonu ve IDH1 Mutasyonun Birlikte Değerlendirilmesine Ait Bulgular:**

Çalışmamızda MGMT metilasyonu 13 olguda ve IDH1 mutasyonu 5 olguda saptanmıştır. 4 olguda IDH1 mutasyonu unmetile MGMT ile beraber saptanmış olup sadece 1 olguda metile MGMT ve IDH1 mutasyonu birlikte değerlendirilebilmiştir. MGMT metilasyonu ile IDH1 mutasyonlu tümörler birlikte değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak bir ilişki saptanamamıştır ( $P>0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalına başvuran ve histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı alan 40 olgu alınmıştır. Olgulara ait tümör dokularından elde edilen DNA örneklerinde MGMT promotor metilasyonu MS-HRM yöntemi ile ve IDH1 mutasyonu ise dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamızda GBM hastalarında moleküler değişimler ile yaş ve ortalama sağ kalım süreleri arasındaki ilişkiler ve ayrıca MGMT metilasyon durumu ile olgulara uygulanan tedavilere göre sağ kalım süreleri araştırılmıştır. Çalışmamız GBM olgularında MGMT geninin metilasyon paterni ve IDH1 geninin mutasyon sıklığı için Türkiye’de yapılmış olan ilk çalışma özelliğindedir.

### 5.1. MS-HRM Yöntemi İle MGMT Metilasyonu İçin Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması

MGMT geni 10q26’da lokalize yaklaşık 145 bp uzunluğunda hücresel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruyan en önemli DNA tamir proteini (41). Bu gen 866 nükleotidlik bir mRNA, bu mRNA ise 207 amino asit içeren 24kDa’lık protein kodlar (42). MGMT nispeten stabil bir proteindir, yarılanma ömrü 24 saatten uzundur. Tamir tek basamaklı bir reaksiyonda gerçekleşir ve alkile bazın DNA’dan ekzisyonu yoktur, bunun yerine guaninin O<sup>6</sup> pozisyonundaki metil veya etil grubu MGMT molekülünün aktif bölgesi olan sistein rezidüllerine transfer edilir. Bunun sonucunda guanin eski haline döner ve MGMT geri dönüşümsüz olarak inaktive edilir. Bu nedenle MGMT “ intihar enzimi” olarak adlandırılır (42)

MGMT'nin hipermetilasyon ile epigenetik olarak sessizleştirilmesi primer glioblastomalarda % 40, sekonder glioblastomalarda ise %70'den fazladır. MGMT promotor metilasyonu diffuz ve anaplastik astrositomaların yarısında oligodendrogial ve mix tümörlerin üçte ikisinde bulunmaktadır (66, 79).

Literatürde MGMT metilasyonu genellikle MSP yöntemi ile çalışılmıştır (3, 4, 13, 16, 25, 29, 33, 34, 35, 44, 50, 64, 67, 72, 75, 96, 97). RT-PCR, IHC gibi yöntemlerle de yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (44,81). Yapılan çalışmalar MGMT promotor hipermetilasyonunu belirlemenin yanında bunu glioblastomalı kişilerde uzun progrosyonsuz sağkalım (PFS) ve genel sağkalım (OS) ile ilişkilendirmişlerdir. Bu yüzden MGMT metilasyonu GBM tedavisinde belirteç olarak gösterilmektedir.

Çalışmamızda MGMT promotor metilasyonunu belirlemek için MS-HRM yöntemi kullanılmıştır. MS-HRM yöntemi, unmetile DNA örneği içerisindeki % 0,1 oranındaki metile DNA'yı tespit edebilmesi açısından hassas, hızlı ve kolay bir yöntemdir. Çalışmamızda tüm GBM tümör örneklerinde MS-HRM yöntemi ile başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. MGMT metilasyonunu saptamada en çok kullanılan MS-PCR yöntemine göre MS-HRM yöntemi zaman, kolaylık ve güvenilirlik açısından daha uygun bir yöntemdir. Elde ettiğimiz veriler, literatürde benzer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır (Tablo 5.1.).

Nakamura ve arkadaşlarının (67) 2001 yılında yaptıkları çalışmada; 54 düşük grade astrositoma, 36 primer GBM ve 16 sekonder GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonu ve SSCP yöntemi ile de TP53 mutasyonunu incelemiştirler. 54 düşük-grade astrositomannın 26 tanesinde (%48), 36 primer GBM'li olgunun 13 tanesinde (%36) ve 16 sekonder GBM'li olgunun 12 tanesinde (%75) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. Metilasyon saptanan düşük grade astrositomaların hemen hepsinde (24/26, %92) ve metile sekonder GBM'lerin %92'sinde TP53 mutasyonunun bulunduğunu, fakat primer GBM'lerde TP53 mutasyonunun nadir görüldüğünü bildirmişlerdir. MGMT metilasyon sıklığının primer



GBM'li olgularda belirgin olarak düşük olduğunu ( $P=0,0155$ ) ve metilasyonun özellikle genç kişilerde ( $47\pm 13$  yaş) gözlendiğini bildirmişlerdir. Unmetile MGMT'li olguların yaş ortalamasının ise  $55\pm 13$  olduğunu bildirmişlerdir ( $P=0,0267$ ). Çalışmamızda 40 GBM'li olgunun tümör dokularından elde edilen DNA'da MGMT promotor metilasyonu MS-HRM yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmamızda 40 olgunun 13'ünde (%32,5) MGMT promotor metilasyonu tespit edilmiş ve MGMT metilasyonu ile yaş, cinsiyet gibi parametreler arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır ( $P=0.480$ ,  $P=0.503$ ). Çalışmamızdaki metile olguların yaş ortalaması  $58\pm 13$ , unmetile olguların yaş ortalamasının ise  $55\pm 15$  olduğu belirlenmiştir. Saptadığımız %32,5'lik metilasyon oranı Nakamura ve arkadaşlarının primer GBM'lerde saptadıkları oran ile benzer olduğu görülmektedir. Bunun nedeni olarak ise; olgu grubumuzun primer GBM'lerden oluşmasından kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Paz ve arkadaşlarının (75) 2004 yılında yaptıkları çalışmada; içerisinde 51 GBM'li olgunun da bulunduğu 92 glioma örneğinde MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişlerdir. Anaplastik oligodendrogliomada %21,5, anaplastik oligoastrositomada hiç, anaplastik astrositomada %7,1 ve GBM'li olgularda %71,4 oranında MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT metilasyon durumunu cinsiyet ( $P=0.820$ ), yaş ( $P=0.374$ ) veya histolojik tümör tipi ( $P=0.068$ ) ile ilişkili bulmadıklarını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda saptadığımız %32,5'lük metilasyon oranının literatürde verilen orandan oldukça düşük olduğu görülmekte olup bu farklılığın metodolojik farklılıkların yanı sıra olgu sayımızın azlığından da kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. Olgularımız primer GBM'lerden oluşmakta ve saptadığımız metilasyon oranı literatürde primer GBM'lerde bildirilen %40'lık metilasyon oranı ile uyumlu olarak bulunmuştur (66, 79). Paz ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da MGMT metilasyonu ile yaş, cinsiyet gibi parametreler arasında istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır ( $P=0.480$ ,  $P=0.503$ ). Çalışmanın bir ayağı olarak farklı evrelerde beyin tümörleri ve sekonder GBM'lerin de dahil olduğu daha geniş bir olgu serisi ile çalışma gerçekleştirmenin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Anselmo ve arkadaşlarının (3) 2006 yılında Brezilya popülasyonundaki beyin tümörlerinin epigenetik anomalilerini araştırdıkları çalışmaya GBM'li olguların da içerisinde bulunduğu 55 olguyu dahil etmişlerdir. Bu glioma serisi içerisinde yer alan 10 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT, DAPK, p14<sup>ARF</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, TP73, RB1 ve TIMP-3 genlerinin metilasyon durumunu incelemişlerdir. 10 olgunun 7 tanesinde (%70) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT ve P16<sup>INK4a</sup> hipermetilasyonunun beyin tümörü progresyonunda önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda 40 GBM'li olgunun 13'ünde (%32,5) MGMT promotor metilasyonu tespit edilmiştir. Metilasyon oranımızın literatürden düşük olmasını Anselmo ve arkadaşlarının GBM'li olgu sayısının azlığından ve metodolojik farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Blanc ve arkadaşlarının (6) 2004 yılında yaptıkları çalışmada; 44 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişler ve 44 olgunun 30 tanesinde (%68) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. Metile olguların ortalama sağ kalım süresini 9,9 ay (95% CI: 7.2–12.9), unmetile olguların ortalama sağ kalım süresini ise 8,1 ay (95% CI: 4.1– 14.2) olarak saptamışlar ve MGMT geni metilasyonu ile OS veya hastaliksız sağ kalım arasında belirgin bir ilişki saptamadıklarını ayrıca yaş (P =0.457) ve KPS (P =0.420) ile MGMT metilasyonu arasında istatistiksel bir ilişki gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Hegi ve arkadaşlarının (33) 2004 yılında yaptıkları çalışmada; 38 GBM'li olgu MSP yöntemi ile incelenmiş ve bu 38 olgunun 26 tanesine (%68) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT metilasyonunun uzun sağ kalım ile korelasyon gösterdiğini (P=0.0051, Log-rank test) fakat diğer yaş, cinsiyet, KPS (Karnofsky performans skoru) gibi prognostik faktörler ile korelasyon göstermediğini (P>0.7) belirtmişlerdir. Metile MGMT'li olguların (26 olgunun 16 tanesi) %62'sinin sağ kalımının 18 ay olduğunu bildirmişler ve MGMT promotor metilasyonu ile prognoz veya tedaviye yanıt arasında ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir.

Karayan-Tapon ve arkadaşlarının (44) 2010 yılında yaptıkları çalışmada; 81 GBM'li olguda MSP, SQ-MSP, Q-RT-PCR, ve IHC yöntemleri ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada farklı yöntemlerin PFS'ı saptamadaki prognostik değerlerini ortaya koymaya çalışmışlardır. MSP (P = 0.016), SQ-MSP (P<0.001) ve pyrosequencing (P = 0.002) ile değerlendirilen MGMT promotor metilasyonunun PFS ile belirgin bir korelasyon gösterdiğini fakat Q-RT-PCR ve IHC çalışmalarının PFS saptamada başarısız olduğunu ifade etmişlerdir. MSP yönteminin sonucuna göre 81 olgunun 55 tanesinde (%67,9) MGMT genini metile olarak saptamışlar ve metile MGMT'li olgular ve unmetile MGMT'li olgular arasında sağ kalım süresinin belirgin olarak farklılık gösterdiğini saptamışlardır (ortalama sağ kalım; 19 ay metile MGMT, 15 ay unmetile MGMT, P=0.005).

Esteller ve arkadaşlarının (25) 2000 yılında yaptıkları çalışmada ise 18 anaplastik astrozitoma ve 29 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişler ve toplam 47 tümörün 19 tanesinde (%49) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. GBM'leri ayrı olarak değerlendirdiklerinde 29 olgunun 12 tanesinde (%63) MGMT geni metile olarak saptanmış ve MGMT metilasyonunu hasta yaşı, KPS veya tümör grade'i ile ilişkilendirilememiş (P>0,3), fakat promotor metilasyonunun sağ kalım süresini artırdığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda MGMT promotor metilasyonu %32,5 olarak tespit edilmiş ve MGMT metilasyonu ile yaş, cinsiyet gibi parametreler arasında istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır (P=0.480, P=0.503). Metile olguların ortalama sağ kalım süresinin 19 ay, unmetile olguların ise 15 ay (Log Rank Test, P>0,05) olduğu saptanmıştır. Saptadığımız metilasyon oranının Blanc ve arkadaşları (6), Hegi ve arkadaşları (33), Karayan-Tapon ve arkadaşları (44) ile Esteller ve arkadaşlarının (25) bildirdikleri orana göre düşük olduğu görülmektedir. Karayan-Tapon ve arkadaşlarının (44) yaptıkları çalışma hariç diğer 3 çalışmada MSP yöntemi ile MGMT metilasyonu değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise MS-HRM yöntemi kullanılmıştır. Literatürler ile bizim oranımız arasındaki farklılığın metodolojik farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra olgularımız primer

GBM'lerden oluşmakta ve saptadığımız metilasyon oranının literatürde primer GBM'lerde bildirilen %40'luk metilasyon oranı ile uyumlu olduğu görülmektedir (66, 79). Karayan-Tapon ve arkadaşlarının (44) metile MGMT ve unmetile MGMT olgular için bildirdikleri sağ kalım süreleri ile bizim çalışmamızda saptadığımız sürelerin benzer olduğu görülmektedir. Fakat metile olgu sayımızın azlığı nedeni ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmamıştır.

Cao ve arkadaşlarının (13) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; MGMT metilasyonu ile ekspresyonu arasındaki korelasyonu belirleyebilmek amacı ile MGMT metilasyonunu MSP ile ve ekspresyonunu IHC ile çalışmışlardır. Olguların %50'sinde MSP ve IHC arasında korelasyon tespit edilmiş ve IHC ile kombine edilmiş MSP'nin prognostik bir faktör olarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir. 83 GBM'li olgunun 76 tanesinde MSP analizi için yeterli DNA elde edilebilmiştir. 76 olgunun 46 tanesinde (%60,5) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT promotor metilasyonunun artmış ortalama sağ kalım ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Metile MGMT'li olgularda sağ kalım süresini 19.8 ay (95% CI, 15.26–24.47 ay), unmetile MGMT'li olgularda ise sağ kalım süresinin 12,3 ay (95% CI, 9.83–14.77 ay) olduğunu saptamışlar ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu (P =0.014, Mantel-Cox log-rank test) bildirmişlerdir.

Gerstner ve arkadaşlarının (29) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 64 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu inceleyip ortalama sağ kalım sürelerini ortaya koymuşlardır. 64 olgunun 37 tanesinde (%57,8) MGMT genini metile olarak saptamışlar ve metile/unmetile olguların ortalama yaşının 74 olduğunu ifade etmişlerdir. MGMT geni metile olarak saptanan olguların ortalama sağ kalım süresinin 345 gün, MGMT geni unmetile olan olguların ortalama sağ kalım süresinin ise 223 gün (P=0,0178) olduğunu bildirilmişlerdir. GBM'li olgularda prognostik marker olarak kullanılabilceğini vurgulamışlardır.

Crinie're ve arkadaşlarının (17) 2007 yılında yaptıkları çalışmada; 219 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişlerdir. 219 olgunun

126 tanesinde (%57,5) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. Metile olguların ortalama sağ kalım süresini 14,4 ay, unmetile olguların ortalama sağ kalım süresinin ise 13,6 ay olduğunu bildirmişler ve MGMT metilasyonunun olguların sağ kalımına bir etkisi olmadığını aynı zamanda yaş, KPS ve tedavi ile de ilişkili olmadığını ifade etmişlerdir.

Park ve arkadaşlarının (72) 2008 yılında yaptıkları çalışmada; 77 GBM'li olgudan 50 tanesinde MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişler ve 48 olgunun MSP sonuçlarını yorumlayabilmişlerdir. 48 olgunun 26 tanesinde (%54,2) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT metile olguların yaş ortalamasının  $49.7 \pm 12.4$ , unmetile olguların ise  $48,5 \pm 13,2$  olduğunu bildirmişlerdir. Metile (17 ay) ve unmetile (17 ay) gruplar arasında ortalama sağ kalım açısından belirgin bir fark görülmediğini belirtmişlerdir.

Minniti ve arkadaşlarının (64) 2010 yılında yaptıkları çalışmada; 83 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişlerdir. 83 olgunun 42 tanesinde (%50,6) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT geni metile olan GBM'lerde ortalama sağ kalım süresinin 15.3 ay, unmetile GBM'lerde ise 10.2 ay olduğunu saptamışlar ( $P = 0.0001$ ) ve MGMT promotor metilasyonunun belirgin olarak OS ve PFS ( $P = 0.004$  ve  $P = 0.005$ ) ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır.

Costa ve arkadaşlarının (16) 2010 yılında yaptıkları çalışmada; 90 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT metilasyonunu incelemişlerdir. 90 olgunun 80 tanesinde MGMT'nin metilasyon durumunu analiz edebilmişler ve MGMT metilasyonunu 38 GBM'de (%47,5) tespit etmişlerdir. MGMT metile tümörlerde OS 16 ay (95% CI 12.2-19.8) iken, unmetile MGMT tümörlerde 13 ay (95% CI 13.3-18.7) olduğu saptanmıştır. MGMT metilasyonu ve OS arasında istatistiksel bir ilişki olmadığını ifade etmişlerdir ( $P > 0.05$ ).

Yaptığımız çalışmada MGMT metilasyon oranı %32,5 olarak tespit edilmiş ve MGMT metilasyonu ile yaş, cinsiyet gibi parametreler arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır ( $P=0.480$ ,  $P=0.503$ ). Çalışmamızdaki metile olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, unmetile olguların ise 15 ay olduğu bulunmuş ve metile olgular ile unmetile olgular arasında sağ kalım süresinin belirgin olarak farklılık göstermediği saptanmıştır (Log Rank Test,  $P>0,05$ ). Sonuçlarımız literatür ile uyumsuz olarak değerlendirilmiştir. Bu uyumsuzluğa çalışmaya dahil ettiğimiz olgu sayımızın 6 literatürde de bildirilenden az olmasının neden olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda primer GBM'lerde MGMT metilasyonunun %40'larda olduğu bildirilmiştir (66, 79). Yaptığımız çalışmada olgularımız primer GBM'lerden oluşmakta ve saptadığımız metilasyon oranı literatürde primer GBM'lerde bildirilen %40'lık metilasyon oranı ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Kreth ve arkadaşlarının (50) 2011 yılında yaptıkları çalışmada; 53 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT metilasyonunu ve qPCR ile MGMT mRNA ekspresyonunu incelemişlerdir. 53 olgunun 24 tanesinde (%45) MGMT metile olarak saptanmıştır. Düşük MGMT mRNA seviyesinin tedaviye yanıt ve uzun sağ kalım için prediktif olduğunu belirtmişlerdir.

Hegi ve arkadaşlarının (34) 2005 yılında yaptıkları çalışmada; 573 GBM'li tümör örneğinin 307 tanesinde MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu inceleyebilmişlerdir. 307 tümör örneğinin 206 tanesinde MGMT promotor metilasyonu değerlendirilebilmiştir. Bu 206 tümör örneğinin 92 tanesinde (%44,7) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. Metile MGMT'li olgularda ortalama sağ kalım 18,2 ay iken, unmetile olgularda 12,2 ay olduğunu bildirmişlerdir. MGMT metilasyonunun prognostik bir değeri olduğunu ifade etmişlerdir.

Weller ve arkadaşları (97) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 301 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişlerdir. MGMT genini %44 metile olarak saptamışlardır. MGMT metilasyonunu yaş ve KPS ile

ilişkilendirilemediğini fakat uzun PFS ( $P=0.028$ ) ve OS ( $P=0.10$ ) ile ilişkilendirildiğini belirtmişlerdir.

Herrlinger ve arkadaşlarının (35) 2006 yılında yaptıkları çalışmada; 23 GBM'li olguyu MSP ile incelemişler ve 19 olgunun sonucunu değerlendirebilmişlerdir. Değerlendirilen 19 olgunun 8 tanesinde (%42) MGMT'yi metile olarak saptamışlardır. PFS unmetile olgularda 6 ay iken metile olgularda 19 ay olduğunu ve metile MGMT'li olguların PFS ve mOS'ının (ortalama sağ kalım süresi) belirgin olarak uzun olduğunu saptamışlardır ( $P < 0.014$ ).

Weiler ve arkadaşlarının (96) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 41 GBM'li olguda MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemişler ve 39 tanesinde MGMT metilasyon analizini yapabilmışlerdir. Metilasyonu incelenen 39 olgunun 16 tanesinde (%41) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT geni metile olan olgularda PFS belirgin olarak uzunken ( $P=0,0002$ ) OS'da belirgin bir farklılık saptamadıklarını bildirmişlerdir ( $p=0,1008$ ).

Rivera ve arkadaşlarının (81) 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise 225 GBM'li olguda qRT-PCR yöntemi ile MGMT promotor metilasyonunu incelemiş ve 54 tanesinde (%24) MGMT genini metile olarak saptamışlardır. MGMT promotor metilasyonunun sağ kalım avantajı sağladığını bildirmişlerdir. MGMT metile olgular 63 hafta sağ kalırken unmetile olguların 51 hafta sağ kaldıklarını bildirmişlerdir ( $P=0.019$ , log-rank).

Yaptığımız çalışmada MGMT metilasyonu, %32,5 olarak bulunmuştur ve bu oran Rivera ve arkadaşlarının (81) yaptıkları çalışma hariç diğer literatürlerle çok az farklı bulunmuştur. Metilasyon oranımız Rivera ve arkadaşlarının (81) bildirdikleri oran ile uyumlu olarak görülmektedir. Bu uyumluluğun yöntemlerimizin benzerliğinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. qRT-PCR'da MS-HRM yöntemi gibi real-time-PCR tabanlı bir analiz yöntemidir ve konvansiyonel RT-PCR'a göre daha hassas

## PDF Eraser Free

bir yöntemdir. Yapılan istatistiksel analizde metile MGMT'li olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, unmetile MGMT'li olguların ise 15 ay olarak bulunmuştur. Metile ve unmetile olgular arasında saptanan 4 aylık fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Log Rank Test,  $P>0.05$ ).



**Tablo 5.1.** MGMT geni için çalışmamızda saptadığımız metilasyon oranı ve sağ kalım sürelerinin literatür verileri ile karşılaştırılması (S.=Sekonder GBM, Pr. GBM=Primer GBM).

Araştırmacı ismi	GBM (n)	Metilasyon Yüzdesi (MGMT)	Sağ Kalım Süresi	
			Metile	Unmetile
Nakamura ve arkadaşları 2001	36 Pr. GBM 16 S. GBM	Pr. GBM %36 S. GBM %75	-	-
Paz ve arkadaşları 2004	51	%71,4	-	-
Anselmo ve arkadaşları 2006	10	%70	-	-
Blanc ve arkadaşları 2004	44	%68	9,9 ay	8,1 ay
Hegi ve arkadaşları 2004	38	%68	18 ay	-
Karayan-Tapon ve arkadaşları 2010	81	%67,9	19 ay	15 ay
Esteller ve arkadaşları 2000	29	%63	-	-
Cao ve arkadaşları 2009	76	%60,5	19.87 ay	12,3 ay
Gerstner ve arkadaşları 2009	64	%57,8	345 gün	223 gün
Crinie`re ve arkadaşları 2007	219	%57,5	14,4 ay	13,6 ay
Park ve arkadaşları 2008	48	%54,2	17 ay	17 ay
Minniti ve arkadaşları 2010	83	%50,6	15.3 ay	10.2 ay
Costa ve arkadaşları 2010	80	%47,5	16 ay	13 ay
Kreth ve arkadaşlarının 2011	53	%45	18,2 ay	12,2 ay
Hegi ve arkadaşları 2005	206	%44,7	18,2 ay	12,2 ay
Weller ve arkadaşları 2009	301	%44	-	-
Herrlinger ve arkadaşları 2006	19	%42	19 ay	6 ay
Weiler ve arkadaşları 2009	39	%41	-	-
Rivera ve arkadaşları 2010	225	%24	63 hafta	51 hafta
<b>Bizim Çalışmamız</b>	<b>40</b>	<b>%32,5</b>	<b>19 ay</b>	<b>15 ay</b>

### 5.2. Glioblastomalı Olgularda Saptanan MGMT Metilasyonu ile Prognoz ve Tedaviye Yanıtlarının Literatür Verileri İle Karşılaştırılması

Blanc ve arkadaşlarının (6) 2004 yılında yaptıkları çalışmada; %4.5 hasta sadece kemoterapi, %32,55 radyoterapi ve %50 kemo ve radyoterapi almıştır. %13,5 hasta ise tedavi görmemiştir. Kemoterapi ve radyoterapiyi beraber alan olgular (9.8 ay; 95% CI: 8–14) ile sadece radyoterapi alan olgular (12 ay; 95% CI: 7.2–15) arasında ortalama sağ kalım süresinde bir fark saptamadıklarını bildirmişlerdir. Adjuvan bir tedavi almayan olguların ortalama sağ kalım süresinin adjuvan terapi alanlara göre (sadece radyoterapi  $P<10^{-4}$ , radyoterapi ve kemoterapi  $P<10^{-4}$ ) daha düşük olduğunu (3,2 ay, CI: 0,4-5,3) saptamışlardır. Yapılan tek değişkenli analizlerde MGMT promotor metilasyonu ve OS veya PFS arasında belirgin bir ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir. Kombine kemoterapi ve radyoterapi alan olguların OS'nın metile (9,5 ay: %95 CI; 7,1-14,1) ve unmetile MGMT'li olgular arasında (9,8 ay: %95 CI; 8-14,1) belirgin olarak farklı olmadığını ve sadece radyoterapi alan metile olguların ortalama sağ kalım süresinin ise 10,9 ay (%95 CI; 7,2-15) olduğunu saptamışlardır. MGMT promotor metilasyonunun GBM'lerde alkile edici ajanlarla tedaviye yanıt için prognostik faktör olarak değerlendirilemediğini belirtmişlerdir.

Thang Cao ve arkadaşlarının (13) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 36 olgu (%43,4) konkominant adjuvan kemoterapi ve 47 olgu (%56,6) rekürrent Temodal kemoterapisi almıştır. Konkominant adjuvan kemoterapi alan olguların ortalama sağ kalım süresinin 14,4 ay (95% CI; 8.34–20.47 ay) ve rekürrent Temodal kemoterapisi alan olguların ise ortalama sağ kalım süresinin 15,38 ay (95% CI; 12,33–19,34 ay) olduğunu belirtmişler ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık saptanmadığını ifade etmişlerdir.

Gerstner ve arkadaşlarının (29) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 35 olgu kemoradyasyon, 16 olgu sadece radyoterapi ve 3 olgu sadece kemoterapi almıştır. 37 metile olgunun 24 tanesi ve 27 unmetile olgunun 16 tanesi de alkile edici ajan kullandığı ayrıca 6 metile ve 4 unmetile olgunun ise tedavi almadığı veya tedavisinin

bilinmediği belirtilmiştir. Alkile edici ajan kullanan olguların mOS'ının 489 gün, unmetile olguların ise 263 gün olduğu (P= 0.0021) ve bu olguların mPFS'lerinin ise 405 güne 246 gün olduğu (P<0.2742) bildirilmiştir.

Crinie`re ve arkadaşlarının (17) 2007 yılında yaptıkları çalışmada; 77 olgunun RT ile bereber adjuvan kemoterapi aldığını ve 85 olgunun ise radyoterapi aldığını bildirmişlerdir. RT+adjuvan kemoterapi alan olguların 45 tanesinin ve RT alan olguların ise 43 tanesinin metile MGMT'li oldukları ifade edilmiştir. RT alan metile ve unmetile olgular arasında ortalama sağ kalım açısından bir farklılık saptamadıklarını bildirmişlerdir. RT+ adjuvan kemoterapi alan olguların metilasyon durumunun sağ kalımda (17.1 aya 13.1 ay, P = 0.041) bir gösterge olduğunu ifade etmişler ve MGMT metilasyonun tedavi yöntemleri ve programları için prognostik etkisinin olabileceğini vurgulamışlardır.

Hegi ve arkadaşlarının (34) 2005 yılında yaptıkları çalışmada; 307 olgunun 206 tanesinde MGMT metilasyonunu değerlendirebilmişler ve bu olguların 100 tanesinin sadece radyoterapi, 106 tanesi ise radyoterapi ve kemoterapiyi birlikte almıştır. MGMT metile olup radyoterapi alan olgu sayısı 46, temozolomid ve radyoterapi alan olgu sayısı ise 46 olarak bildirilmiştir. Metile MGMT'li radyoterapi alan olguların sağ kalım süresi 15.3 ay (13.0–20.9), RT+TMZ alan olguların sağ kalım süresi ise 21.7 ay (17.4–30.4) olarak bildirilmiştir. Unmetile MGMT'li radyoterapi alan olgu sayısı 54, RT+TMZ alan olgu sayısı ise 60 olarak bildirilmiştir. Unmetile MGMT'li radyoterapi alan olguların sağ kalım süresi 11.8 ay (9.7–14.1), RT+TMZ olguların sağ kalım süresi ise 12.7 ay (11.6–14.4) olarak bildirilmiştir. Metile MGMT'li olguların temozolomidden daha fazla yarar sağladığını ifade etmişlerdir.

Rivera ve arkadaşlarının (81) 2010 yılında yaptıkları çalışmada; 53 olgu adjuvan kemoterapi ve 172 olgu ise tümör rekürrensine kadar herhangi bir kemoteropatik ajan kullanmamıştır. Alkile edici kemoteropatiklerin kullanılmadığı olgularda MGMT metilasyonunun tümör progresyonunu unmetile MGMT'li tümörlere göre 2 katı daha fazla geciktirdiğini göstermişleridir. Sadece radyoterapi alan olgularda MGMT

promotor metilasyonunun radyoterapiye yanıt ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 40 olgunun 17 tanesi radyoterapi ile kombine edilmiş kemoterapi, 9 olgu radyoterapi, 1 olgu kemoterapi almış olup 13 olguya ise adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmamıştır. RT+KT alan olguların 6 tanesi metile MGMT, 11 tanesi ise unmetile MGMT genine sahiptir. Metile MGMT'li olgu sayımız az olduğu için sağ kalım süreleri istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Unmetile olguların sağ kalım süresi 15 ay (%95 CI: 10-21), adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların ise 13 ay (%95 CI: 6-19) olarak saptanmış ve istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır (Log Rank Test; P=0.569). Grup olarak RT+KT alan olgular değerlendirildiğinde olguların sağ kalım süresi 17 ay (%95 CI: 13-23), adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım süresi 14 ay (%95 CI: 8-20) olarak saptanmış ve istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır (Log Rank Test; P=0.480). Sadece RT alan olguların sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde 14 ay (%95 CI: 10-19), adjuvan bir tedavi protokolü uygulanmayan olguların sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde 14 ay (%95 CI: 8-20) olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Log-Rank Test P=0.376). Radyoterapi alan olgular metile ve unmetile olarak ayrıldığında ve sadece kemoterapi alan olgu sayısı 7'nin altında olduğu için istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Çalışmamızın sonucu Blanc ve ark.(6) ile Thang Cao ve ark.(13) sonuçları ile uyumlu olarak MGMT promotor metilasyonunun GBM'lerde alkile edici ajanlarla tedaviye yanıt için prognostik faktör olarak değerlendirilememiştir. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler Gerstner ve ark.(29), Crinie`re ve ark. (17), Hegi ve ark.(34) ile Rivera ve ark.(81) ile uyumsuz olduğu görülmektedir. Çalışmamızda MGMT metilasyonu ile tedavi tipleri arasında bir ilişki saptanamamıştır. Tedavi tiplerine göre olgularımız gruplandırıldığında, olgularımız gruplara dağıldığında sayılarının az olması ve istatistiksel olarak değerlendirilememesinin MGMT metilasyonunun tedavi üzerindeki prognostik etkisini saptayamamıza neden olduğunu düşünmekteyiz.

### 5.3. Dizi Analizi Yöntemi İle IDH1 Mutasyonu İçin Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması

IDH1 geni 2q33 de lokalize izositrat dehidrogenaz kodlayan sitrik asit (krebs) siklusundaki bir enzimdir. İsoisitrat dehidrogenaz trikarboksilik asit döngüsünde nükleotid, lipid ve amino asit sentezine aracılık eder ve bu nedenle replikasyon ve hücre çoğalması için gerekli bir enzimdir (95). IDH1 mutasyonu tümör spesifiktir ve çeşitli glioma tiplerinde özellikle histolojik olarak sınıflandırılmış düşük grade gliomalar ve sekonder glioblastomalarda ayrıca akut myeloid lösemide (8), B-akut lenfoblastik lösemi, kolorektal kanser ve prostat karsinomunda bulunmuştur. En son çalışmalarda tiroid kanseri ve foliküler tiroid kanserinde iki yeni homozigot IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir. IDH1 mutasyonunun özellikle primer ve sekonder GBM ayırımında kullanılabilir bir marker olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır.

IDH1 mutasyonu genellikle genç GBM'li kişilerde meydana gelmekte ve mutant IDH1' li kişilerin ortalama yaşı 33, yabanıl tip IDH1'li kişilerin ortalama yaşı 53 (P <0.001) olarak rapor edilmiştir. Farklı kaynaklarda IDH1 mutasyonu taşıyan GBM' li kişilerin yaş ortalamasını farklı farklı verilmiştir fakat genel kanı mutasyonlu kişilerin mutasyon taşımayanlara göre genç oldukları yönündedir (55).

Literatürde IDH1 mutasyonu genellikle dizi analizi ile (5, 7, 49, 69, 88, 95, 105) çalışılmıştır. Array-CGH (37, 84, 90) ve SSCP (69) gibi yöntemlerle de yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda IDH1 mutasyonunun prognostik belirteç olabileceği ve genellikle genç kişilerde gözlemlendiği vurgulanmıştır. Literatürde bildirilen mutasyonlar heterozigot ve çoğunlukla kodon 132'de nükleotid transisyonu şeklinde olduğu yönündedir (R132H, CGT>CAT). Çalışmamızda GBM olgularında IDH1 geninde mutasyonların kümelenildiği 4. ekzonun genomik dizilemesi dizi analizi ile yapılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, literatürde benzer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır (Tablo 5.2.).

Yan ve arkadaşlarının (105) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 445 santral sinir sistemi tümörü ve 494 santral sinir sistemi tümörü olmayan dokuda IDH1 ve IDH2 genlerinin sekanslamasını yapmışlardır. Tüm tümör tiplerinden 161 tanesinde R132 somatik mutasyonunu tanımlamışlardır. R132H mutasyonu 142 dokuda, R132C 7 dokuda, R132S 4 dokuda, R132L 7 dokuda ve R132G 1 dokuda bildirilmiştir. Tümör tiplerindeki dağılım ise; 30 diffuz astrositomanın 25 tanesinde, 7 pleomorphik xanthoastrositomanın 1 tanesinde, 52 anaplastic astrositomanın 36 tanesinde, 13 sekonder GBM'in 11 tanesinde (%85) ve 123 primer GBM'in 6 tanesinde (%5), 51 oligodendrogliomanın 41 tanesinde, 36 anaplastik oligodendrogliomanın 31 tanesinde, 3 oligoastrositomanın 3 tanesinde, 7 anaplastik oligoastrositomanın 7 tanesinde IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Tüm GBM'ler bir arada değerlendirildiğinde ise 136 olgunun 17 tanesinde (%12,5) IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir. IDH1 mutasyonlu primer GBM'li olguların yaş ortalamasını 32, mutasyon taşımayan olguların ise yaş ortalamasını 59 olarak; IDH1 mutasyonlu sekonder GBM'li olguların yaş ortalamasının 32, IDH1 mutasyonu olmayan olguların ise yaş ortalamasını 62 olarak bildirmişlerdir. IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalımını 31 ay, mutasyon taşımayanların ortalama sağ kalımını ise 15 ay olarak (P=0.002) bildirmişler ve mutasyon taşıyanların daha uzun sağ kalıma sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Balss ve arkadaşlarının (5) 2008 yılında yaptıkları çalışmada; 685 farklı tümör örneği ile çalışmışlar ve 221 tanesinde IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Bu mutasyonların; 205 tanesi R132H, 8 tanesi R132C, 4 tanesi R132S, 2 tanesi R132G, 1 tanesi R132L ve 1 tanesinin R132V olduğunu bildirmişlerdir. Bu geniş tümör serisi içerisinde toplam 121 GBM olgusunda IDH1 mutasyonu dizi analizi ile incelenmiş ve 15 olguda (%12,3) IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir. Saptanan mutasyonların dağılımını ise; 99 primer GBM'li olguda 7 tane (%7), 8 sekonder GBM'li olguda 7 tane (%88) ve 14 pediatrik GBM'li olguda 1 tane (%7) şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Primer GBM'li olgularda yaş ile IDH1 mutasyonunun varlığı ve yokluğu arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu belirtmişler ve IDH1 mutasyonlu olguların mutasyon taşımayan olgulara göre daha genç olduklarını ifade etmişlerdir. IDH1 mutasyonlu

primer GBM'li kişilerin yaş ortalamasının 40,3, IDH1 mutasyonu olmayan GBM'li kişilerin yaş ortalamasının ise 52,6 ( $P<0.005$ ) olduğunu saptamışlardır.

Krell ve arkadaşlarının (49) 2011 yılında yaptıkları çalışmada; 47 GBM'li olgu dizi analizi ile incelenmiştir. 47 GBM'li olgunun 6 tanesinde (%12) IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Tüm mutasyonların c.395G.A olduğunu bildirmişlerdir.

Parsons ve arkadaşlarının (73) 2008 yılında yaptıkları çalışmada; toplam 149 GBM'i incelemişler ve IDH1 genini %12 mutant olarak saptamışlardır. IDH1 mutasyonu taşıyan olguların yaş ortalamasını 33, mutasyon taşımayan olguların yaş ortalamasını ise 53 olarak bildirmişlerdir ( $P<0.001$ ). IDH1 deki mutasyonların sekonder GBM'lerde görüldüğünü ( $P<0.001$ ) ve bu mutasyonun önemli ölçüde iyi prognostik olduğunu, ortalama sağ kalım süresinin ise mutasyon taşıyan olgularda 3,8 yıl, mutasyon taşımayanlarda ise 1,1 yıl ( $P < 0.001$ , log-rank test) olduğunu belirtmişlerdir. IDH1 değişikliklerinin spesifik moleküler sonuçlarının ne olursa olsun, IDH1 mutasyonunun saptanmasının büyük olasılıkla klinik olarak yararlı olacağına ve IDH1 mutasyonunun sekonder GBM'ler için spesifik potansiyel bir marker olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bu literatür GBM'lerde IDH1 mutasyonunun saptandığı ilk yayın olma özelliğini taşımaktadır.

Sanson ve arkadaşlarının (84) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; grade II, III ve IV tümörlerden oluşan 404 glioma serisini incelemişlerdir. Toplam 155 (38%) dokuda IDH1 mutasyonunu tespit etmişler ve mutasyonların 138 tanesinin (89%) G395A (Arg132His), 3 tanesinin C394A (Arg132Ser), 2 tanesinin G395T (Arg132Leu), 7 tanesinin C394G (Arg132Gly) ve 5 tanesinin C394T (Arg132Cys) olduğunu bildirmişlerdir. 404 gliomadan oluşan bu serinin içerisinde 196 GBM'li olguya da yer verilmiş ve bu olguların 21 tanesinde (%10,7) IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir. 183 primer GBM'li olgunun 11 tanesinde (%6,  $P<10^{-8}$ ) ve 13 sekonder GBM'li olgunun ise 10 tanesinde (%77) IDH1 mutasyonunu saptamışlardır. IDH1 mutasyonu taşıyan olguların IDH1 mutasyonu taşımayan olgulara göre sağ kalım süresinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır (OS; 27,4 e 14 ay  $P< 0.01$ ).

Çalışmamızda 40 GBM'li olgunun 5 tanesinde (%12,5) IDH1 R132H mutasyonu saptanmıştır. IDH1 mutasyonu taşıyan GBM'lerin yaş ortalamasının  $41\pm 13$ , mutasyon taşımayan GBM'lerin yaş ortalamasının ise  $58\pm 13$  olduğu saptanmıştır. IDH1 mutasyonu taşıyan olgular ile taşımayanlar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $t=2.659$  ve  $P=0.011$ ). Mutasyon oranımız ve mutasyon taşıyan olguların taşımayanlara göre daha genç olmaları literatür ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Yan ve arkadaşları (105), Parsons ve arkadaşları (73) ile Sanson ve arkadaşları (84) mutasyon taşıyan olguların taşımayanlara göre daha uzun sağ kalım süresine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, mutasyon taşımayan olguların sağ kalım süresi ise 16 ay olarak saptanmış fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Log Rank,  $P=0,56$ ).

Bleeker ve arkadaşlarının (7) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 94 primer GBM'li ve 15 sekonder GBM'li olguda IDH1 mutasyonunu dizi analizi ile incelemişler ve toplam 109 olgunun 22 tanesinde IDH1 genini mutant olarak saptamışlardır. 94 primer GBM'li olgunun 11 tanesinde ve 15 sekonder GBM'li olgunun 11 tanesinde IDH1 mutasyonunu saptamışlar (22/109, %20) ve bu mutasyonların 3 tanesinin R132C, 1 tanesinin R132G, 1 tanesinin R132L ve 17 tanesinin R132H şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda ise IDH1 mutasyonunun baskın olarak sekonder GBM'lerde gözleendiği sonucuna varmışlardır ( $P= 0.0000016$ , Fisher's exact test).

Gravendeel ve arkadaşlarının (31) 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise 496 glioma örneğinde IDH1 mutasyonu taranmış ve 246 (%49,6) IDH1 mutasyonu tespit edilmiştir. Bu glioma serisi içerisinde yer alan 175 GBM'li olgunun 34 tanesinde (%19) IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Bu mutasyonunun 31 tane p.R132H ve 3 tane p.R132X olduğunu bildirmişleridir. IDH1 mutasyonu ile uzun sağ kalım arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir (2.0 yıla 0.72 yıl,  $P<0.001$ ).



Toedt ve arkadaşlarının (90) 2010 yılında gliomalarla ilişkili patomekanizmayı ve moleküler markerları belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada; 87 primer GBM, 13 sekonder GBM, 19 anaplastik astrositoma ve 12 diffuz astrositoma incelenmiştir. IDH1 kodon 132 mutasyonlarının AII (10/12), AIII (16/19) ve sGBIV (11/13, %84), daha az oranda pGBIV (7/87, %8) tespit edilmiştir. Toplam 100 GBM olgusunun 18 tanesinde (%18) IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. IDH1 mutasyonlu primer GBM'li olguların mutasyon taşımayan GBM'li olgulara göre daha genç ve daha uzun OS'a sahip olduklarını ifade etmişlerdir. Sekonder GBM'li olguların ortalama yaşını 42, mutasyon taşımayan primer GBM'li olguların ortalama yaşını 65, mutasyon taşıyan primer GBM'li olguların ortalama yaşını 44 olarak bildirmişlerdir.

Bleeker ve arkadaşlarının (8) 2010 yılında yaptıkları çalışmada; IDH1 mutasyon durumu daha önceden tanımlanmış 94 primer ve 15 sekonder GBM'den oluşan 109 GBM örneğini incelemişlerdir. Retrospektif sağ kalım analizi için 85 primer ve 13 sekonder GBM'i kullanmışlardır. Çalışmaya dahil edilen 94 primer GBM'in 11 tanesinde ve 15 sekonder GBM'in 11 tanesinde IDH1'in mutant olduğunu (22/109, %20) ve IDH1 mutasyonlu olguların yaş ortalamasını 41, mutasyon taşımayan olguların yaş ortalamasını 58 olarak saptamışlardır ( $P<0.001$ ). IDH1 mutasyonu taşıyanların ortalama sağ kalım süresinin artmış olduğunu belirtmektedirler ( $P=0.002$ ).

Çalışmamızda IDH1 mutasyon oranı %12,5 olarak saptanmıştır. Bu oranın 4 literatüre göre biraz düşük olduğu görülmektedir. Mutasyon olan ve olmayan olgularımızın sağ kalım süreleri değerlendirildiğinde aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuş ve bu yüzden de mutasyonun sağ kalım üzerine olan etkisi çalışmamızda saptanamamıştır. Az sayıda olguda IDH1 mutasyonunun tespit edilmiş olması iki grup arasındaki sağ kalım sürelerinin farklı olmamasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Olgularımızın yaşları dikkate alındığında literatürle uyumlu olarak mutasyon saptadığımız olgular, mutasyon saptanmayan olgulara göre daha genç olduğu görülmektedir.

Watanabe ve arkadaşlarının (95) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 266 glioma olgusundan elde ettikleri 321 tümör dokusunda IDH1 mutasyonunu SSCP ile taramışlar ve daha sonra mutasyon tespit ettikleri olguları direkt sekanslama ile incelemişlerdir. R132 de lokalize 130 mutasyon saptamışlardır. 12 mutasyonun Arg→His; 6 mutasyonun CGT→TGT, 5 mutasyonun CGT→GGT ve 1 mutasyonun CGT →AGT şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu geniş olgu serisi 59 primer GBM ve 34 sekonder GBM'i kapsamaktadır. Primer GBM'li olgularda %5 ve sekonder GBM'li olgularda %82 IDH1 mutasyonu tespit etmişlerdir. IDH1 mutasyonlu GBM'li olguların ortalama yaşlarının mutasyon taşımayanlara göre belirgin olarak daha düşük olduğunu saptamışlardır (44.2±12.6 ye 56.4±10.7; P=0.0001). Fakat primer ve sekonder GBM'li olguları ayrı ayrı analiz ettiklerinde yaş ve IDH1 mutasyonu arasında bir ilgi bulamadıklarını belirtmişlerdir (Primer GBM P=0.202; sekonder GBM, P=0.405).

Ichimura ve arkadaşlarının (37) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 183 GBM'li olgunun da dahil olduğu 305 astrositik tümörde IDH1 mutasyonunu array-CGH ile incelemişler ve 119 olguda somatik IDH1 mutasyonunu tanımlamışlardır. Tüm mutasyonların kodon 132'de olduğunu ve 110 tanesinin c.395G>A (Arg132His), 1 tanesinin c.394C>A (Arg132Ser), 4 tanesinin c.394C>G (Arg132Gly) ve 4 tanesinin ise c.394C>T (Arg132Cys) şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. 173 primer GBM'li olgunun 6 tanesinde (%3), 10 sekonder GBM'li olgunun ise 5 tanesinde (%50) IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir (11/183, %6). IDH1 mutasyonunu sekonder GBM'li olgularda primer GBM'li olgulara oranla daha yüksek frekansta saptamışlar (p<0.001) ve IDH1 mutasyonunun genellikle genç olgularda gözlendiğini ve IDH1 mutasyonlu GBM'li olguların yaş ortalamasının 41, mutasyon taşımayanların yaş ortalamasını ise 56 olduğunu bildirmişlerdir ( t-test, P=0.002).

Nobusawa ve arkadaşlarının (69) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 377 primer GBM'li ve 30 sekonder GBM'li olguyu IDH1 mutasyonunun varlığını saptamak için SSCP analizi ile taramışlar ve IDH1/IDH2 mutasyonu tespit edilen olguları direkt sekanslama yöntemi ile incelemişlerdir. 407 GBM'li olgunun 36 tanesinde (%8,8) IDH1 mutasyonu saptamışlar ve tüm mutasyonların kodon 132'de olduğunu ve %83 G395A

(Arg→His), %11,1 C394G (Arg→Gly), %2,8 C394T (Arg→Cys;), %2,8 C394A (Arg→Ser) şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. IDH1 mutasyonu taşıyan olguların (ortalama 47,9±12,9 yaş) mutasyon taşımayanlara (60,6±13,5 yaş; P < 0,0001) göre genç olduğunu rapor etmişlerdir. IDH1 mutasyonu klinik olarak sekonder GBM tanısı almış olgularda daha sık (30 tanenin 22'sinde, %73,3) buna karşılık primer GBM'li olgularda ise nadir olarak bulunduğunu saptamışlardır (377 tanenin 14'ünde %3,7; P<0,0001). IDH1 mutasyonun sensitivite ve spesifitesinin, sekonder GBM'lerin primer GBM'lerden ayırımının yapılmasında moleküler marker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca IDH1 mutasyonu taşıyan olguların genel sağ kalım süresinin 27,1 ay, mutasyon taşımayan olguların sağ kalım süresini ise 11,3 ay (P<0,0001) olarak saptamışlardır.

Sonoda ve arkadaşlarının (88) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 125 gliomadan oluşan bir seri ile çalışmışlar ve 39 tanesinde IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Tüm mutasyonların R132H olduğunu bildirmişler ve 9 oligodendrogliomanın 6 tanesinde, 21 anaplastik astrositomanın 12 tanesinde, 4 anaplastik oligoastrositomanın 3 tanesinde, 14 anaplastik oligodendrogliomanın 7 tanesinde, 59 primer GBM'in 3 tanesinde, 3 sekonder GBM'in 2 tanesinde, 8 gangliogliomanın 3 tanesinde, 5 anaplastik gangliogliomanın 3 tanesinde IDH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Sekonder GBM'li olgularda %67, primer GBM'li olgularda %5 (5/62, %8) oranında IDH1 mutasyonu saptamışlar ve IDH1 mutasyonu taşıyan olguların yaş ortalamasını 35, mutasyon taşımayanların yaş ortalamasını ise 57 olarak bildirmişlerdir (P = 0,0158). IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 66 ay iken mutasyon taşımayan olguların ortalama sağ kalım süresinin 49 ay olduğu rapor edilmiştir. Sağ kalım süreleri arasında belirgin olarak fark olmamasını IDH1 mutasyonu taşıyan çok az tümörün tespit edilmiş olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda saptadığımız %12,5'lik mutasyon oranının literatürlerde bildirilen orandan biraz yüksek olduğu görülmektedir. IDH1 mutasyonu taşıyan GBM'lerin yaş ortalamasının 41±13, mutasyon taşımayan GBM'lerin yaş ortalamasının ise 58±13 olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (t=2.659 ve

P=0.011). Mutasyonlu olguların mutasyon taşımayanlara göre daha genç olması literatür (37, 69, 88, 95) ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, mutasyon taşımayan olguların sağ kalım süresi ise 16 ay olarak saptanmış fakat aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır (Log Rank, P=0,56). Bu nedenle çalışmamızda mutasyonun sağ kalım üzerine olan etkisi saptanamamıştır.

**Tablo 5.2.** IDH1 geni için çalışmamızda saptadığımız mutasyon oranı, hasta yaşı ve sağ kalım sürelerinin literatür verileri ile karşılaştırılması (S.=Sekonder GBM, Pr. GBM=PrimerGBM).

Araştırmacı ismi	GBM (n)	Mutasyon Yüzdesi (IDH1)	Yaş Ortalaması (Yıl)		Sağ Kalım Süresi	
			Mut. +	Mut. -	Mut. +	Mut. -
Yan ve arkadaşları 2009	123 Pr.GBM 13 S. GBM Toplam:136	Pr. GBM %5 S. GBM %85 Toplam:%12,5	Pr.GBM; 32 S.GBM;32	Pr.GBM; 59 S.GBM;62	31 ay	15 ay
Balss ve arkadaşları 2008	99 Pr.GBM 8 S. GBM 14 Ped.GBM Toplam:121	Pr. GBM %7 S. GBM %88 Ped. GBM %7 Toplam:%12,3	P.GBM; 40,3	P.GBM; 52,6	-	-
Krell ve arkadaşları 2011	47	%12	-	-	-	-
Parsons ve arkadaşları 2008	149	%12	33	53	3,8 yıl	1,1 yıl
Sanson ve arkadaşları 2009	183 Pr.GBM 13 S. GBM Toplam:196	Pr. GBM %6 S. GBM %77 Toplam:%10,7	-	-	27,4 ay	14 ay
Bleeker ve arkadaşları 2009	94 Pr.GBM 15 S.GBM Toplam:109	Toplam:%20	-	-	-	-
Gravendeel ve arkadaşları 2010	Toplam:175	%19			2 yıl	0.72 yıl
Toedt ve arkadaşları 2010	87 Pr.GBM 13 S. GBM Toplam:100	Pr. GBM %8 S. GBM %84 Toplam:%18	P.GBM;44	P.GBM;65	-	-
Bleeker ve arkadaşları 2010	94 Pr.GBM 15 S. GBM Toplam:109	%20	41	58	-	-
Watanabe ve arkadaşları 2009	59 Pr.GBM 34 S. GBM	Pr. GBM %5 S. GBM %82	44.2	56.4	-	-
Ichimura ve arkadaşları 2009	173 Pr.GBM 10 S. GBM Toplam:183	Pr. GBM %3 S. GBM %50 Toplam:%6	41	56	-	-
Nobusawa ve arkadaşları 2009	377 Pr.GBM 30 S. GBM Toplam:407	Pr. GBM %3,7 S. GBM %73 Toplam:%8,8	47,9	60,6	27,1 ay	11,3 ay
Sonoda ve arkadaşları 2009	59 Pr.GBM 3 S. GBM Toplam:62	Pr. GBM %5 S. GBM %67 Toplam:%8	35	57	66 ay	49ay
<b>Bizim Çalışmamız</b>	<b>40</b>	<b>%12,5</b>	<b>41</b>	<b>58</b>	<b>19 ay</b>	<b>16 ay</b>

### 5.4. MGMT Metilasyonu ve IDH1 mutasyonun Birlikte Değerlendirilmesi ve Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması

Sanson ve arkadaşlarının (84) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 404 gliomadan oluşan bir olgu serisinde MGMT metilasyonunu MSP ile ve IDH1 mutasyonunu direkt sekanslama ile incelemişlerdir. MGMT metilasyonunu 194 tümörde analiz edebilmişler ve 133 tanesinde (%68,5) MGMT'yi metile olarak saptamışlardır. MGMT metilasyonu ile IDH1 mutasyonunun ilişkili olduğunu bildirmişler; 86 IDH1 mutant tümörün 70 tanesinde (%81,3) MGMT'yi metile olarak bulmuşlar ve 108 IDH1 mutasyonu olmayan tümörün ise 63 tanesinde (%58,3,  $P < .001$ ) MGMT'yi metile olarak bulmuşlardır. Metile MGMT'li tümörlerde IDH1 mutasyonunu daha sık saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Toedt ve arkadaşlarının (90) 2010 yılında gliomalarla ilişkili patomekanizmayı ve moleküler markerları belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada; MGMT metilasyonu ve TP53 mutasyonu ile IDH1 mutasyonu ( $p < 0.001$ ) arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Christensen ve arkadaşlarının (15) 2011 yılında yaptıkları çalışmada; glioblastomalar, astrositomalar, oligodendrogliomalar, oligoastroitomalar, ependymomalar ve pilositik astrositomalardan oluşan 131 glioma ve 7 tümör olmayan beyin dokusu ile çalışmışlardır. IDH1 mutasyonu 56 (%60) tümörde tespit edilmiş ve EGFR amplifikasyonu ile ilişkilendirilmemiştir ( $P = 0.10$ ) fakat IDH1 mutasyonu saptanan tümörlerde MGMT metilasyonunun belirgin olarak artmış olduğunu saptamışlardır ( $P = 3,6 \times 10^{-4}$ ).

Weller ve arkadaşlarının (97) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; 301 GBM'li olguda TP53 mutasyonu, EGFR, CDK4, MDM2 amplifikasyonu, CDKN2A homozigot delesyonu, MGMT metilasyonu ve IDH1 mutasyonunu incelemişlerdir. MGMT promotor metilasyonunun uzun PFS ve OS ile ilişkili olduğunu, IDH1 mutasyonunun

ise PFS ve OS üzerinde olumlu etkisi olduğunu fakat diğer moleküler faktörlerin (TP 53 mutasyonu, EGFR, CDK4, MDM2 amplifikasyonu, CDKN2A homozigot delesyonu) ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 40 GBM’li olgumun MGMT metilasyonu ve IDH1 mutasyonu incelenmiştir. MGMT metilasyonu ile IDH1 mutasyonu sadece 1 tümörde birlikte saptanmış ve istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarında bir ilişki saptanamamıştır ( $P>0.05$ ). Çalışmamızda IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, mutasyon taşımayanların ortalama sağ kalım süresi ise 16 ay olarak (Log Rank,  $P=0,56$ ) ve MGMT geni için ise; metile olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay ve unmetile MGMT’li olguların ise 15 ay olarak tespit edilmiştir (Log Rank Test,  $P=0.1$ ). Mutasyon ve metilasyon saptadığımız olgu sayımızın az olması nedeni ile bu iki gen arasında bir ilişki saptayamadığımızı düşünmekteyiz. İleriki dönemler için daha geniş olgu serileri ile çalışmalar yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma grubunu oluşturan 40 GBM'li olgunun tümör dokularında MGMT metilasyonu MS-HRM yöntemi ile ve IDH1 mutasyonu dizi analizi yöntemi ile incelenerek literatür ile karşılaştırıldı.

- Çalışmamızda IDH1 mutasyonu ve MGMT metilasyonu ile GBM fenotipi ve olgu yaşı arasındaki ilişkiler araştırılmış ve tedaviye bağlı sağ kalım süreleri belirlenmiştir.
- Çalışmamız MGMT metilasyonu ve IDH1 mutasyonu ile GBM arasındaki ilişkiyi araştıran Türkiye'deki ilk çalışma olma özelliğindedir.
- MGMT metilasyonu için çalışma grubumuzun metilasyon frekansı %32,5 olarak belirlenmiştir. Metile olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay, unmetile olguların ortalama sağ kalım süresi ise 15 ay olarak belirlenmiştir.
- IDH1 mutasyonu %12,5 olarak tespit edilmiştir. IDH1 mutasyonu taşıyan olguların ortalama sağ kalım süresi 19 ay mutasyon taşımayan olguların ortalama sağ kalım süresi ise 16 ay olarak saptanmış olup IDH1 mutasyonu taşıyan olguların yaş ortalaması  $41\pm 5.06$  iken IDH1 mutasyonu saptanmayan olguların yaş ortalaması  $57\pm 2.29$  olarak belirlenmiştir.
- Yapılacak çalışmalarda olgu sayısı ve metilasyonu tespit etmek için kullanılacak yöntemin hassasiyetinin önemi vurgulanmıştır.
- Gliomaların sınıflandırılmasında histolojik kriterler yanında moleküler markerların ve özellikle de IDH mutasyonlarının dikkate alınabileceğini düşünmekteyiz.



## 7.KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.K., Bigner, D.D., 2009, Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going, Expert opinion on investigational drugs, 18(8):1061-1083 p.
2. Agarwala, S.S., Kirkwood, J.M., 2000, Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma, The Oncologist, 5:144-151 p.
3. Anselmo, N.P., Bello, M.J., Gonzalez-Gomez, P., Antonio Araújo Dias, L., Walter de Almeida, J.R., José dos Santos, M., Rey J.A., Casartelli C., 2006, Epigenetic alterations in human brain tumors in a Brazilian population, Genetics and Molecular Biology, 29, 3, 413-422 p.
4. Bailey, P., Cushing, H., 1926, A Classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia: JB Lippincott; pp 146-167 p.
5. Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., von Deimling, A., 2008, Analysis of the *IDH1* codon 132 mutation in brain tumors, Acta Neuropathol. 116(6):597-602 p.
6. Blanc, J.L., Wager, M., Guilhot, J., Kusy, S., Bataille, B., Chantereau, T., Lapiere, F., Larsen, C.J., Karayan-Tapon, L., 2004, Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas, J Neurooncol.68(3):275-283 p.
7. Bleeker, F.E., Lamba, S., Leenstra, S., Troost, D., Hulsebos, T., Vandertop, W.P., Frattini, M., Molinari, F., Knowles, M., Cerrato, A., Rodolfo, M., Scarpa, A., Felicioni, L., Buttitta, F., Malatesta, S., Marchetti, A., Bardelli, A., 2009, IDH1 Mutations at Residue p.R132 (IDH1R132) Occur Frequently in High-Grade Gliomas But Not in Other Solid Tumors, Hum Mutat. 30(1):7-11 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

8. Bleeker, F.E., Atai, N.A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K.S., Tigchelaar, W., Troost, D., Vandertop, W.P., Bardelli, A., Van Noorden, C.J., 2010, The prognostic IDH1R132 mutation is associated with reduced NADP<sup>+</sup>-dependent IDH activity in glioblastoma, *Acta Neuropathol*, 119(4):487-494 p.
9. Blumenthal, D.T., Schulman, S.F., 2005, Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy, *Expert review of neurotherapeutics*, 5(5):683- 690 p.
10. Bock, C., Lengauer, T., 2008, Computational epigenetics, *Bioinformatics*, 2008, 24:1-10p.
11. Bradley, W.G., Daroff, R.B., Fenichel, G.M., Jankovic, J. Çeviri Editörleri: Tan, E., Özdamar, S.E., 2009, "Bölüm 56: Kanser ve Sinir Sistemi". *Neurology In Clinical Practice. Fifth Edition (Türkçe)*, Veri Medikal Yayıncılık, (Kitap Bölümü; çeviri), s; 1299-1300 p.
12. Bulut, T., 2007, Yüksek Dereceli Astrositomalarda klorokin tedavisini prognoz üzerine etkisi, *Tıpta Uzmanlık Tezi*, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı, 126 s.
13. Cao, V.T., Jung, T.Y., Jung, S., Jin, S.G., Moon, K.S., Kim, I.Y., Kang, S.S., Park, C.S., Lee, K.H., Chae, H.J., 2009, The correlation and prognostic significance of MGMT promotor methylation and MGMT protein glioblastomas, *Neurosurgery*, 65(5):866-875 p.
14. Carrabba, G., Mukhopadhyay, D., and Guha, A., 2010, *Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies* Springer Science+Business Media, *Aberrant Signalling Complexes in GBMs: Prognostic and Therapeutic Implications*, 95 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

15. Christensen, B.C., Smith, A.A., Zheng, S., Koestler, D.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Wensch, M.R., Kelsey, K.T., Wiencke, J.K., 2011, DNA Methylation, Isocitrate Dehydrogenase Mutation, and Survival in Glioma, *J Natl Cancer Inst*, 103(2):143-153 p.
16. Costa, B.M., Caero, C., Guimaraes, I., Martinho, O., Jaraquemada, T., Augusto, I., Castro, L., Osorio, L., Linhares, P., Honavar, M., Rsende, M., Braga, F., Silva, A., Pardal, F., Amorim, J., Nabico, R., Almeida, R., Alegria, C., Pires, M., Pinheiro, C., Carvalho, E., Lopes, J.M., Costa, P., Damasceno, M., Reis, R.M., 2010, Prognostic value of *MGMT* promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide-based chemoradiation: A Portuguese multicentre study, *Oncology reports*, 23: 1655-1662 p.
17. Crinière, E., Kaloshi, G., Laigle-Donadey, F., Lejeune, J., Auger, N., Benouaich-Amiel, A., Everhard, S., Mokhtari, K., Polivka, M., Delattre, J.Y., Hoang-Xuan, K., Thillet, J., Sanson, M., 2007, *MGMT* prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities, *J Neurooncol*, 83:173–179 p.
18. Dang, L., Jin, S., Su, S.M., 2010, IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia, *Trends in Molecular Medicine*, Volume 16, Issue 9, 387-397 p.
19. Das, P.M., Singal, R., 2004, DNA Methylation and Cancer, *The journal of Clinical Oncology*, 22:4632-4642 p.
20. Daumos-Dupport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J., Kelly, P., 1988, Grading of Astrocytomas, *Cancer*, 10: 2152-2165 p.
21. Dinçer, Y., 2000, Tiroid kanserli hastalarda lökosit O6 metil guanin DNA metil transferaz aktivitesinin tayini, *Doktora tezi*, 96 s.
22. Durmaz, R., 2007, Glioblastoma Multiforme, *Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci.*, 3(34):35-40 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

23. Durmaz, R., 2007, Diffuse Astrocytoma, Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci., 3(34):21-26 p.
24. Durmaz, R., Vural, M., 2007, Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği, Türk Nöroşirürji Dergisi, Cilt: 17, Sayı: 2, 80-90 p.
25. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000, Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents, N Engl J Med, 343:1350-1354 p.
26. Esteller, M., Herman, J.G., 2004, Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer, Oncogene, 23, 1–8
27. Ferrolì, P., Acerbi, F., Finocchiaro, G., 2010, From Standard Treatment to Personalized Medicine: Role of IDH1 Mutations in Low-Grade Glioma Evolution and Treatment, World Neurosurgery, 73 [4]: 231-238 p.
28. Garber, K., 2010, Oncometabolite? IDH1 Discoveries Raise Possibility of New Metabolism Targets in Brain Cancers and Leukemia, JNCI J Natl Cancer Inst., 102 (13): 926-928 p.
29. Gerstner, E.R., Yip, S., Wang, D.L., Louis, D.N., Iafrate, A.J., Batchelor, T.T., 2009, MGMT Methylation is a prognostic biomarker in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma, Neurology, 73(18):1509-1510 p.
30. Gopisetty, G., Ramachandran, K., Singal, R., 2006, DNA methylation and apoptosis, Molecular Immunology, 43:1729–1740 p.
31. Gravendeel, L.A., Kloosterhof, N.K., Bralten, L.B., van Marion, R., Dubbink, H.J., Dinjens, W., Bleeker, F.E., Hoogenraad, C.C., Michiels, E., Kros, J.M., van den Bent, M., Smitt, P.A., French, P.J., 2010, Segregation of Non-p.R132H Mutations in IDH1 in Distinct Molecular Subtypes of Glioma, Hum Mutat., 31(3):E1186-1199 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

32. Hamzaoğlu, O., Özcan, U., 2006, Türkiye Sağlık İstatistikleri, Türk Tabipleri Birliği Yayınları, Birinci Baskı, s. 51-62.
33. Hegi, M.E., Diserens, A.C., Godard, S., Dietrich, P.Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Van Melle, G., de Tribolet, N., Stupp, R., 2004, Clinical Trial Substantiates the Predictive Value of O-6- Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Glioblastoma Patients Treated with Temozolomide, Clin Cancer Res., Mar 15;10(6):1871-1874 p.
34. Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., 2005, *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma, N Engl J Med., Mar 10;352(10):997-1003 p.
35. Herrlinger, U., Rieger, J., Koch, D., Loeser, S., Blaschke, B., Kortmann, R.D., Steinbach, J.P., Hundsberger, T., Wick, W., Meyermann, R., Tan, T.C., Sommer, C., Bamberg, M., Reifenberger, G., Weller, M., 2006, Phase II Trial of Lomustine Plus Temozolomide Chemotherapy in Addition to Radiotherapy in Newly Diagnosed Glioblastoma: UKT-03, J Clin Oncol 24:4412-4417 p.
36. Iacob, G., Dinca, E.B., 2009, Current data and strategy in glioblastoma multiforme. Journal of medicine and life, 2(4):386-393 p.
37. Ichimura, K., Pearson, D.M., Kocialkowski, S., Bäcklund, L.M., Chan, R., Jones, D.T., Collins, V.P., 2009, IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas, Neuro Oncol., Aug;11(4):341-347 p.
38. Ironside, C.V., Moss, T.H., Louis, D.N., 2002, Astrocytic Tumours. Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours, 1. basım, Churchill-Livingstone, London, 53-121 p.
39. Jacinto, F.V., Esteller, M., 2007, MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend, DNA Repair (Amst)., Aug 1;6(8):1155-1160 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

40. Jansen, M., Yip S., Louis, D.N., 2010, Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers, *Lancet Neurol.*,9(7):717-726 p.
41. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W.P., 2007, MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents, DNA repair, 6(8):1079-1099 p
42. Kaina, B., Margison, G.P., Christmann, M., 2010, Targeting O6 methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy, *Cell. Mol. Life Sci.*, 67:3663–3681 p.
43. Kanu, O.O., Hughes, B., Di, C., Lin, N., Fu, J., Bigner, D.D., Yan, H., Adamson, C., 2009, Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways, *Clinical Medicine: Oncology*, 39–52p.
44. Karayan-Tapon, L., Quillien, V., Guilhot, J., Wager, M., Fromont, G., Saikali, S., Etcheverry, A., Hamlat, A., Loussouarn, D., Campion, L., Campone, M., Vallette, F.M., Gratas-Rabbia-Ré, C., 2010, Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods, *J Neurooncol.*, 97(3):311-322 p.
45. Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., 1993, Histological typing of tumors of the central nervous system. World Health Organization international histologic classification of tumors. 2nd ed. Berlin. Heidelberg: Springer Verlag; 3:255-258p.
46. Kleihues, P., Cavenee, W.K., 2000, WHO Classification of Tumors, Pathology and Genetics of tumors of the Nervous System. International Agency for Research on Cancer (IARC)., Lyon, 61(3):215-25 p.
47. Kloosterhof, N.K., Bralten, L.B., Dubbink, H.J., French, P.J., van den Bent, M.J., 2011, Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma ,12(1):83-91 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

48. Krakstad, C., Chekenya, M., 2010, Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: oppurtunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*, 9:135 p.
49. Krell, D., Assoku, M., Galloway, M., Mulholland, P., Tomlinson, I., Bardella, C., 2011, Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH Mutations in Glioblastoma, *PLoS ONE* 6(5): e19868.
50. Kreth, S., Thon, N., Eigenbrod, S., Lutz, J., Ledderose, C., Egensperger, R., Tomn, J.C., Kretzschmar, H.A., Hinske, L.C., Kreth, F.W., 2011, O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) mRNA Expression Predicts Outcome in Malignant Glioma Independent of MGMT Promoter Methylation, *PLoS One.*, 18;6(2):e17156.
51. Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., Von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schachert, G., 2007, Long-term survival with glioblastoma multiforme, *Brain: a journal of neurology*, 130:2596-606 p.
52. Krypuy, M., Wojdacz T.K., Dobrovic A., 2008, Rapid High-Throughput Methylation Analysis Using the LightCycler® 480 System, *Biochemica* No. 1
53. Kuzupınar, A., 2007, High resolution melting curve (HRM) analiz yönteminin delesyon tipi mutasyonların saptanmasında kullanımı, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 73 s.
54. Lee, C.H., Jung, K.W., Yoo, H., Park, S., Lee, S.H., 2010, Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea, *Journal of Korean Neurosurgical Society*,48(2):145-152 p.
55. Lei, Y., Song-tao, Q., Zhi-yong, L., 2010, Analysis of isocitrate dehydrogenase-1/2 gene mutations in gliomas, *Chinese Medical Journal* 123(24):3697-3705 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

56. Levin, V.A., Leibel, S.A., Gutin, P.H., Hellman, S., Rosenberg, S.A., DeVita, V.T., 2001, Cancer: Principles and Practice of Oncology (6th Ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2100-60 p.
57. Liu, L., Gerson, S.L., 2006, Targeted Modulation of MGMT: Clinical Implications, Clin Cancer Res., 12; 328p.
58. Loiseau, H., Huchet, A., Ruè, M., Cowppli-Bony, A., Baldi, I., 2009, Epidemiology of primary brain tumor. Revue neurologique, 165(8-9):650-670 p.
59. Louis, D.N., Holland, E.C., Cairncross, J.G., 2001, Glioma Classification, A Molecular Reappraisal. Am J Pathol, 159(3): 779-786 p.
60. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007, WHO classification of tumours of the central nervous system (4th Ed.), International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon, p.:10-11 p.
61. Marchesi, F., Turriziani, M., Tortorelli, G., Avvisati, G., Torino, F., De Vecchis, L., 2007, Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems, Italian Pharmacological Society, 56(4):275-287 p.
62. Martinez, R., Martin-Subero, J.I., Rohde, V., Kirsch, M., Alaminos, M., Fernandez, A.F., Ropero, S., Schackert, GT., Esteller, M., 2009, A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma Multiforme, Epigenetics 4:4, 255-264 p.
63. McPherson, M.J., Moller, S.G., 2006, PCR, 2nd edition. Taylor&Francis Group, MPG Books Limited, Bodmin, Cornwall, UK.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

64. Minniti, G., Salvati, M., Arcella, A., Buttarelli F., D'Elia, A., Lanzetta, G., Esposito, V., Scarpino, S., Maurizi Enrici, R., Giangaspero, F., 2010, Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide, *J Neurooncol.*, Apr;102(2):311-316 p.
65. Moore, K. and Kim Swapan, L., 2010, *Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies*, Springer Science+Business Media, Primary Brain Tumors: Characteristics, Practical Diagnostic and Treatment Approaches, 43 p.
66. Nagarajan, R.P., Costello, J.F., 2010, *CNS Cancer Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic*, Chapter 26; Epigenetic profiling of gliomas, 616-638 p.
67. Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues P., Ohgaki H., 2001, Promotor methylation of DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene, *Carcinogenesis*, vol.22, no.10, 1715-1719 p.
68. Newton, H.B., 2010, *Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies* © Springer Science+Business Media, Overview of the Molecular Genetics and Molecular Chemotherapy of GBM, 1 p.
69. Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2009, IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas, *Clin. Cancer Res*, 15(19):6002-7 p.
70. Ohgaki, H., and Kleihues, P., 2007, Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma, *The American Journal of Pathology*, 170(5): 1445-1453 p.
71. Ohgaki, H., Kleihues, P., 2009, Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas, *Cancer Sci.* Vol. 100, Issue 12, 2235-2241 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

72. Park, C.K., Park, S.H., Lee, S.H., Kim, C.Y., Kim, D.W., Paek, S.H., Kim, D.G., Heo, D.S., Kim, I.H., Jung, H.W., 2008, Methylation status of the MGMT gene promoter fails to predict the clinical outcome of glioblastoma patients treated with ACNU plus cisplatin, Japanese Society of Neuropathology., 29(4):443-449 p.
73. Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz LA, Jr., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., 2008, An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme, Science., 26;321(5897):1807-1812 p.
74. Patel, V., 2009, High-Resolution Melt Analysis Applications, Assay Tutorials: Oct 15, Vol. 29, No. 18.
75. Paz, M.F., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Reynes, G., Pollan, M., Aguirre-Cruz, L., García-Lopez, JL., Piquer, J., Safont, MJ., Balaña, C., Sanchez-Cespedes, M., García-Villanueva, M., Arribas, L., Esteller, M., 2004, CpG Island Hypermethylation of the DNA Repair Enzyme Methyltransferase Predicts Response to Temozolomide in Primary Gliomas, Vol. 10, 4933-4938 p.
76. Puduvalli, V.K., 2010, Editor Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies, Springer Science+Business Media, Aberrations of the Epigenome in Gliomas: Novel Targets for Therapy, 185 p.
77. Purow, B., Schiff, D., 2009, Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass?, Nat. Rev. Neurol. 5, 419–426 p.
78. Reitman, Z.J., Parsons, D.W., Yan, H., 2010, IDH1 and IDH2: Not Your Typical Oncogenes, Cancer Cell.,16;17(3):215-6 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

79. Riemenschneider, M.J., Hegi, M.E., 2010, MGMT promoter methylation in malignant gliomas, *Targ Oncol*, 5:161–165 p.
80. Riemenschneider, M.J., Jeuken, J.W.M., Wesseling, P., Reifenberger, G., 2010, Molecular diagnostics of gliomas: state of the art, *Acta Neuropathol* 120:567–584 p.
81. Rivera, A.L., Pelloski, C.E., Gilbert, M.R., Colman, H., De La Cruz, C., Sulman, E.P., Bekele, B.N., Aldape, K.D., 2010, MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma, *Neuro Oncol.*, 12(2):116-121 p.
82. Robertson, K.D., 2005, DNA Methylation and Human Disease, *Nature*, 6:597-610 p.
83. Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2004-2006 Yılları Türkiye Kansere İnsidansı.
84. Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y., 2009, Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas, *J Clin Oncol* 27:4150-4154 p.
85. Sarkar, C., Jain, A., Suri, V., 2009, Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*, 46(2):108-119 p.
86. Sathornsumetee, S., Rich, J.N., 2008, Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1142:108-132 p.
87. Sav, A., 2007, SSS Tümörleri Sınıflandırması ve Nöropatolojik Tanı, *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci.*, 3(34):1-20 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

88. Sonoda, Y., Kumabe, T., Nakamura, T., Saito, R., Kanamori, M., Yamashita, Y., Suzuki, H., Tominaga, T., 2009, Analysis of *IDH1* and *IDH2* mutations in Japanese glioma patients, *Cancer Sci.*, Oct;100(10):1996-1998 p.
89. TND Nöroonkolojik Cerrahi Öğretim ve Eğitim Grubu Bülteni, 2008, Turkish Neuro-Oncology Group Bülten, s.12-18.
90. Toedt, G., Barbus, S., Wolter, M., Felsberg, J., Tews, B., Blond, F., Sabel, M.C., Hofmann, S., Becker, N., Hartmann, C., Ohgaki, H., von Deimling, A., Wiestler, O.D., Hahn, M., Lichter, P., Reifenberger, G., Radlwimmer, B., 2010, Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status, *Int J Cancer.* Mar 1;128(5):1095-1103 p.
91. Tubbs, J.L, Pegg, A.E., Tainer, J.A., 2007, DNA binding, nucleotide flipping, and the helixturn-helix motif in the base repair O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy, *DNA repair*, 6:1100-1115 p.
92. Tubbs, J.L., Latypov, V., Kanugula, S., Butt, A., Melikishvili, M., Kraehenbuehl, R., Fleck, O., Marriott, A., Watson, A.J., Verbeek, B., MCGOWN, G., THORNCROFT, M., SANTIBANEZ-KOREF, M.F., MILLINGTON, C., ARVAI, A.S., KROEGER, M.D., PETERSON, L.A., WILLIAMS, D.M., FRIED, M.G., MARGISON, G.P., PEGG, A.E., TAINER, J.A., 2009, Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair, *Nature*, 459(7248):808-13 p.
93. von Deimling, A., Korshunov, A., Hartmann, C., 2011, The Next Generation of Glioma Biomarkers: MGMT Methylation, BRAF Fusions and IDH1 Mutations, *Brain Pathology* 21, 74–87 p.
94. Warren, J.J., Forsberg, L.J., Beese, L.S., 2006, The structural basis for the mutagenicity of O6-methyl-guanine lesions, *PNAS*, vol. 103, no. 52, 19701–19706 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

95. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2009, IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas, *Am J Pathol.*, 174(4):1149-1153 p.
96. Weiler, M., Hartmann, C., Wiewrodt D., Herrlinger, U., Gorlia, T., Bähr, O., Meyermann, R., Bamberg, M., Tatagiba, M., Von Deimling, A., Weller, M., Wick, W., 2009, Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol.77, Issue:3, 670-676 p.
97. Weller, M., Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J.P., Schramm, J., Westphal, M., Schackert, G., Simon, M., Tonn, J.C., Heese, O., Krex, D., Nikkhah, G., Pietsch, T., Wiestler, O., Reifenberger, G., von Deimling, A., Loeffler, M., 2009, Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network, *J Clin Oncol.*, Dec 1;27(34):5743-5750 p.
98. Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., Hegi, M.E., 2010, MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 39–51 p.
99. Weller, M., Wick, W., Von Deimling, A., 2011, Isocitrate Dehydrogenase Mutations: A Challenge to Traditional Views on the Genesis and Malignant Progression of Gliomas, *GLIA* 59:1200–1204 p.
100. Welsh, C.T., 2010, Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies © Springer Science+Business Media, Molecular Mechanisms of Pathogenesis in Glioblastoma and Current Therapeutic Strategies, 85 p.
101. Wojdacz, T.K., Dobrovic A., 2007, Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No.(6): e41

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

102. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., Hansen, L.L., 2008, Methylation-sensitive high-resolution melting, *Nature Protocols* 3, 1903 – 1908 p.
103. Wong, E.M., Dobrovic, A., 2011, Chapter 14 Assessing Gene-Specific Methylation Using HRM-Based Analysis, *Methods Mol Biol.*, 687:207-217 p.
104. Yan, H., Bigner, D.D., Velculescu, V., Parsons, W., 2009, Mutant Metabolic Enzymes Are at the Origin of Gliomas, *Cancer Res.*, 69(24): 9157–9159 p
105. Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Bigner, D.D., 2009, *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas, *N Engl J Med.*, Feb 19;360(8):765-773 p.
106. Yang, N., Wisman, G.B.A., Schuuring, E., van der Zee, A.G.J., 2010, An overview of different techniques to detect hypermethylation, 145 p.
107. Yen, K.E., Bittinger, M.A., Su, S.M., Fantin, V.R., 2010, Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities, *Oncogene*, 1-9 p.

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Rasime KALKAN  
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.06.1984 K.K.T.C  
Uyruğu : K.K.T.C.  
Medeni Durumu : Bekar  
İletişim Adresleri : Akarbaşı Mah. Ada Sokak Ada Apt. Apt. No: 11 Kat:2  
Daire:5 ESKİŞEHİR  
kalkanr@yahoo.com  
0.555.6672281  
0.533.8706788

### Eğitim Durumu

İlkokul : Lefke İstiklal İlkokulu-1995  
Ortaokul : Şehit Turgut Ortaokulu-1998  
Lise : Güzelyurt Türk Maarif Koleji-2001  
Üniversite : Eskişehir Osmangazi Üni. Fen-Ed. Fak. Biyoloji-2005  
Doktora : ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik  
Anabilim Dalı Lisans Sonrası Direk Doktora Programı-  
2011

Üye Olduğu Kuruluşlar :Tıbbi Genetik Derneği  
Türkiye Biyologlar Derneği