TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ

PRİMER GLİOBLASTOMA (WHO GRADE IV) HASTALARINDA MDR1 GENİ PROMOTOR BÖLGESİ METİLASYON ANALİZİ

DR. YAHYA EFE GÜNER

NÖROŞİRÜRJİ ANA BİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANLARI

PROF. DR. HASAN ÇAĞLAR UĞUR
YARD. DOÇ. DR. MEHMET TAŞPINAR

ANKARA
2014

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ

PRİMER GLİOBLASTOMA (WHO GRADE IV) HASTALARINDA MDR1 GENİ PROMOTOR BÖLGESİ METİLASYON ANALİZİ

DR. YAHYA EFE GÜNER

NÖROŞİRÜRJİ ANA BİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANLARI

PROF. DR. HASAN ÇAĞLAR UĞUR
YARD. DOÇ. DR. MEHMET TAŞPINAR

ANKARA
2014

KABUL ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	**:** Dr.Yahya Efe GÜNER	**Tarih:** 24/07 / 2014
Anabilim/Bilim Dalı	**:** BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ABD	
Tez Danışmanı	**:** Doç.Dr.Hasan Çağlar UĞUR	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: "PRİMER GLİOBLASTOMA (WHO GRADE IV) HASTALARINDA MDR1 GENİ PROMOTOR BÖLGESİ METİLASYON ANALİZİ"			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Unvanı, Adı, Soyadı
PROF.DR.AYHAN ATTAR
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Unvanı, Adı, Soyadı
PROF.DR.HASAN ÇAĞLAR UĞUR
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Unvanı, Adı, Soyadı
YARD.DOÇ.DR.MEHMET TAŞPINAR
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Glioblastoma hastalarında cerrahi sonrası kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları, hastaların sağkalım süresinde önemli rol oynamaktadır. Bu sağkalım süresinin uzatılması ve ileride glioblastoma hastalığının etkili tedavisi, hedefin tanınması ve başarılı analizi ile ortaya çıkacaktır. Glioblastomanın kemoterapiye dirençli olmasında MDR1 geni metilasyonunun rolü vardır. MDR1 geni metilasyonu ve ekspresyonunun glioblastoma hastalarında ortaya konulması ile ileride yeni tedavi modelleri ortaya atılacak ve glioblastoma hastalarının sağkalımı uzayacaktır. Yeni epigenetik ve genetik araştırmalar ile ileride glioblastoma hastalığının küratif tedavisi öngörülebilir.

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda her zaman yanımda olan, beni bilgi birikimi ve önerileriyle yönlendiren tez danışmanlarım Prof. Dr. Hasan Çağlar Uğur ve Yard. Doç. Dr. Mehmet Taşpınar'a, beyin ve sinir cerrahisiyle tanışmamı sağlayan Prof. Dr. Şükrü Çağlar'a, eğitimimde yanımda olan ağabeylerim Doç. Dr. Gökmen Kahiloğulları'na, Doç. Dr. Melih Bozkurt ve Uzm. Dr. İhsan Doğan'a, tezimin istatiksel analizini yapan Doç. Dr. Derya Öztuna'ya, beyin ve sinir cerrahisinde görev yapan, yetişmemde emeği olan bütün hocalarıma, beyin ve sinir cerrahisinde yıllarca beraber emek harcadığımız başta kardeşim, yol arkadaşım Dr. Emrah Kantarcıoğlu olmak üzere beyin ve sinir cerrahisi ana bilim dalında görev yapan ağabeylerim, ablalarım, kardeşlerim ve klinik çalışanlarına en içten duygularımla teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgi ve sabırla bana destek olan anneme ve babama, başarının sınır tanımadığını öğreten ablam Doç. Dr. Selin Ece Güner'e, bana geleceğin güzel olacağını her zaman hatırlatan Eda Erol'a, ebedi dostlarım ailemin diğer yarısı Prof. Dr. Murat Aksoy, Görkem Türker ve Onur Akyurt'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY i
ÖNSÖZ ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ŞEKİLLER vii
ÇİZELGELER viii
1. GİRİŞ 1
1.1. Neoplazi 1
1.2. Kanser 1
1.3. Beyin Tümörleri 11
1.4. Glioblastoma 15
1.4.1. Glioblastomaların Genetik Özellikleri 17
1.4.2. Glioblastoma Tedavisi 20
1.5. Temozolomid 23
1.5.1. Temozolomidin Klinik Kullanımdaki Önemi 23
1.5.2. Temozolomidin Sitotoksik Etkisine Direnç 24
1.6. Çoklu İlaç Direnci 1 Geni / P Glikoprotein (Pgp) 25
1.7. Epigenetik Mekanizmalar ve Bazal Fonksiyonları 28
1.7.1 DNA Metilasyonu 29
1.7.2. Histon Modifikasyonu ve Remodeling 29
1.7.3. Kodlanmayan (Non-Coding) RNA 30
1.7.4. Kanserdeki Değişiklikler 31
1.8. Amaç 34
2. GEREÇ VE YÖNTEM 35
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar 35
2.1.1. Doku ve Periferik Kan Örneklerinden Moleküler Çalışma Öncesi Ön Hazırlığı 35
2.1.2. Genomik DNA İzolasyonu 35
2.1.3. Bisülfit DNA Modifikasyonu 35
2.1.4.Agaroz Jel Elektoroforezi 36

2.2. Doku ve Periferik Kan Örneklerinin Moleküler Çalışma Öncesi Ön Hazırlığı 36
2.3. Tümör Dokusundan Genomik DNA İzolasyonu 36
2.3.1. Genomik DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi 38
2.4. Periferik Kan Örneğinden Genomik DNA İzolasyonu 39
2.4.1. Genomik DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi 40
2.5. Genomik DNA Modifikasyonu 40
2.6. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR) 41
2.7. İstatistiksel Analiz 43
3. BULGULAR 44
3.1 Glioblastoma Dokularının Temini, Toplanması ve Hasta Bilgilerinin Yorumlanması 44
3.2.Glioblastoma Hastalarının Klinik Verileri 45
4. TARTIŞMA 50
5. SONUÇ 54
ÖZET 55
SUMMARY 56
KAYNAKLAR 57
Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu 77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Anaplastik Astrositom
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Plazma Konsantrasyonunun Altındaki Alan
BER	Baz Çıkarım Tamiri
BLU	Akciğer Kanseri B–Katenin Geni
CDK	Cyclin Bağımlı Kinaz
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2
C_{maks}	Plazma Tepe Konsantrasyonu
COMET	Tek Hücre Jel Elektroforezi
Da	Dalton
dH_2O	distile su
DKK-1	Dickkopf-1
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoxynükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTIC	Dakarbazin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
GB	Glioblastoma
GRP78	Glikoz Düzenleyici Protein 78
Gy	Gray
HDM2	İnsan Double Minute 2
IC_{50}	İnhibitör doz
IDH1	İzositrat Dehidrogenaz 1
IDL	Eklenme / Çıkarılma
IGFRBP	İnsülin Büyüme Faktörü Reseptörü Bağlanma Proteini
kb	Kilobaz
LOH	Heterozigosite Kaybı
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MGMT	O^6-Metilguanin- DNA-Metiltransferaz

MMR	Yanlış Eşleşme Tamir Merkanizması
MS-PZR	Metilasyon Spesifik-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NER	Nükleotit Çıkarım Tamiri
NFκB	Nükleer Faktör κB
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PCV	Prokarbazin, Lomustin, Vinkristin
PDGFRA	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü A
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PKB	Protein Kinaze B
pRB1	Retinoblastom Yatkınlık Lokusu 1 Protein
PTEN	Fosfat ve Tensin Homolog
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TMZ	Temozolomid
TP53	Tümör Baskılayıcı Protein 53
V_d	Dağılım Hacmi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Her iki cinsiyette tahmini kanser vaka sayısı 5
Şekil 1.2. Erkeklerde tahmini kanser vaka sayısı 6
Şekil 1.3. Kadınlarda tahmini kanser vaka sayısı 7
Şekil 1.4. Her iki cinsiyette tahmini kansere bağlı ölüm sayısı ve oranları 8
Şekil 1.5. Erkeklerde tahmini kansere bağlı ölüm sayısı ve oranları 9
Şekil 1.6. Kadınlarda tahmini kansere bağlı ölüm sayısı ve oranları) 10
Şekil 1.7. Primer ve sekonder glioblastoma gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler 19
Şekil 2.1. Hastaların tümör ve normal dokularına ait metilasyon paterni örnekleri. 42

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Sık Görülen Neoplazmlar ve İsimlendirilmeleri 3
Çizelge 1.2. Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinin genel sınıflandırılması 13
Çizelge 1.3. Glioma Sınıflandırılması 14
Çizelge 2.1. MDR1 metilasyon analizi için PZR şartları 42
Çizelge 3.1. Hastaların tümör yerleşim yerleri dağılımı 46
Çizelge 3.2 Çalışmaya katılan hastaların klinik verileri 47
Çizelge 3.3. Hastaların tümör örneklerindeki MDR1 promotor metilasyonu ile kemoterapötik direnç gelişimi arasındaki ilişki 48
Çizelge 3.4. Metilasyon bazında MDR1 promotor metilasyon sayıları ve oranları 48
Çizelge 3.5. Ortalama ve ortanca değerler ile MDR1 tümör metilasyon ve sağkalım süreleri karşılaştırılması 49
Çizelge 3.6. Rekürrens tespit edilen glioblastoma hastalarında metilasyon analizi 49

1. GİRİŞ

1.1. Neoplazi

Neoplazinin kelime anlamı "yeni büyüme"dir. Bütün neoplazmların kökeni, normal büyüme kontrollerine verilen cevabın kaybıdır. Belirli bir derecede otonomiden hoşlanan neoplazmlar lokal çevreleri ile konakçının beslenme durumuna bakmaksızın büyüklüğünü az veya çok artırır (Kumar ve ark., 2000).

Aslında tümör kelime anlamı olarak dokuda ödem, kanama veya diğer nedenlerle oluşan şişlik anlamına gelmekte ise de genel tıp kullanımında neoplazi için sıklıkla "tümör" kelimesi kullanılmaktadır.

Tümörler davranış paternine göre "benign" ve "malign" olmak üzere ikiye ayrılır.

Mikroskobik ve makroskopik olarak sessiz kabul edilirse tümörün lokalize kalacağı ve diğer bölgelere yayılmayacağı, bu nedenle lokal cerrahi eksizyonu ile hastanın sağ kalacağı düşünülürse tümör "benign" kabul edilir (Kumar ve ark., 2000).

Malign tümörler ise topluca "kanser" olarak adlandırılır. Latince "yengeç" kelimesinden gelen kanser, vücudun herhangi bir parçasına yengeç gibi inatçı bir şekilde yapışır. Malign olarak değerlendirilen neoplazm; komşu yapılara yayılan, onlara zarar veren ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz) ölüme yol açan lezyondur. Bütün kanserlerin ölüme yol açmadığı, erken teşhis ile başarılı bir şekilde tedavi edilebildiği bilinmektedir (Kumar ve ark., 2000).

1.2. Kanser

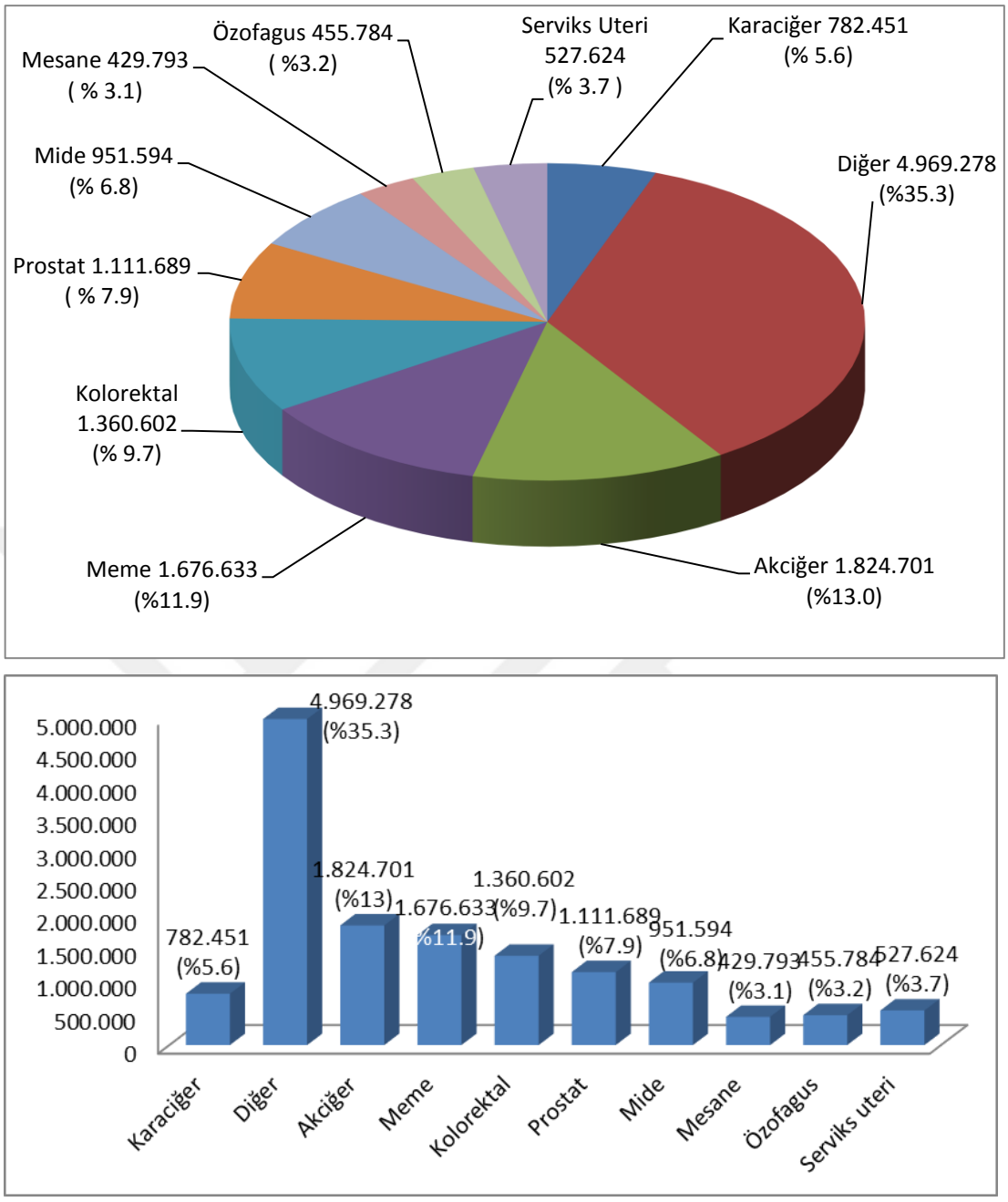
Malign tümörlerin isimlendirilmesi esas olarak belirli eklemeler ve istisnalar dışında benign tümörlere benzemektedir. Mezenkimal doku ve türevlerinden kaynaklanan malign neoplazmlar; sarkom, epitelyal hücre kökenli malign neoplazmlar karsinom adını alır. Hematopoetik hücrelerden köken alan malign neoplaziler; lösemi, lenfoid

doku kökenli hücreler ise malign lenfoma olarak adlandırılır. Sık görülen neoplazmların isimlendirilmeleri çizelge 1.1'de verilmiştir.

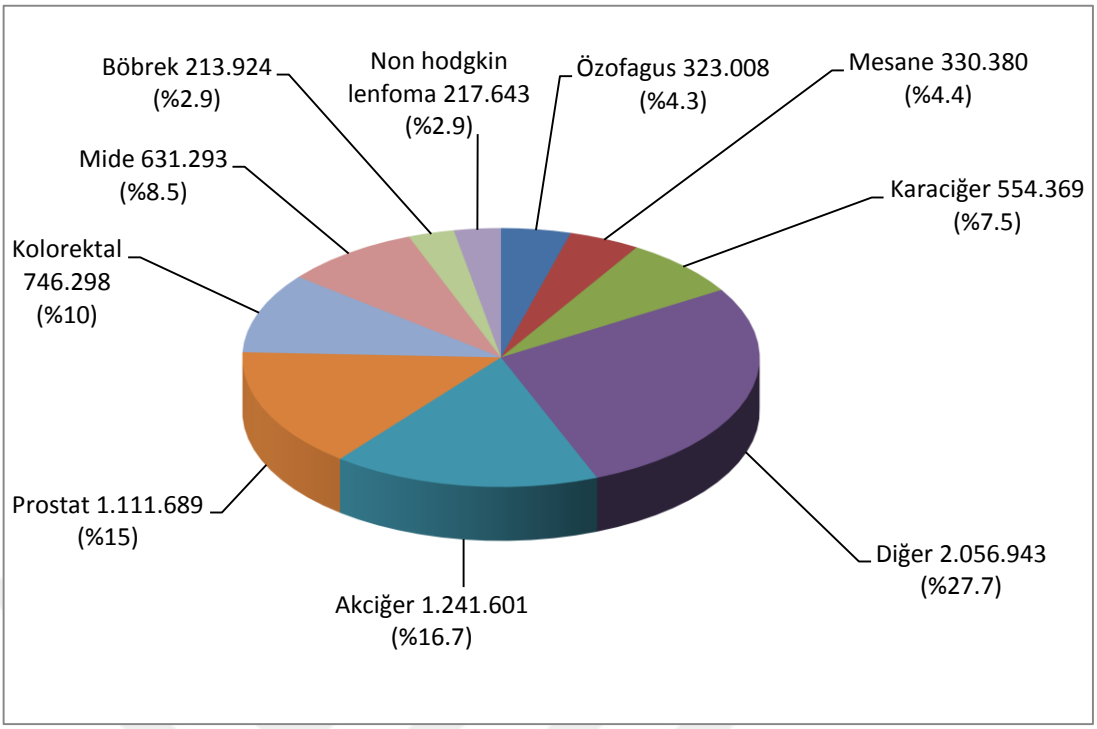
Çizelge 1.1. Sık Görülen Neoplazmlar ve İsimlendirilmeleri (Kumar ve Ark., 2000)

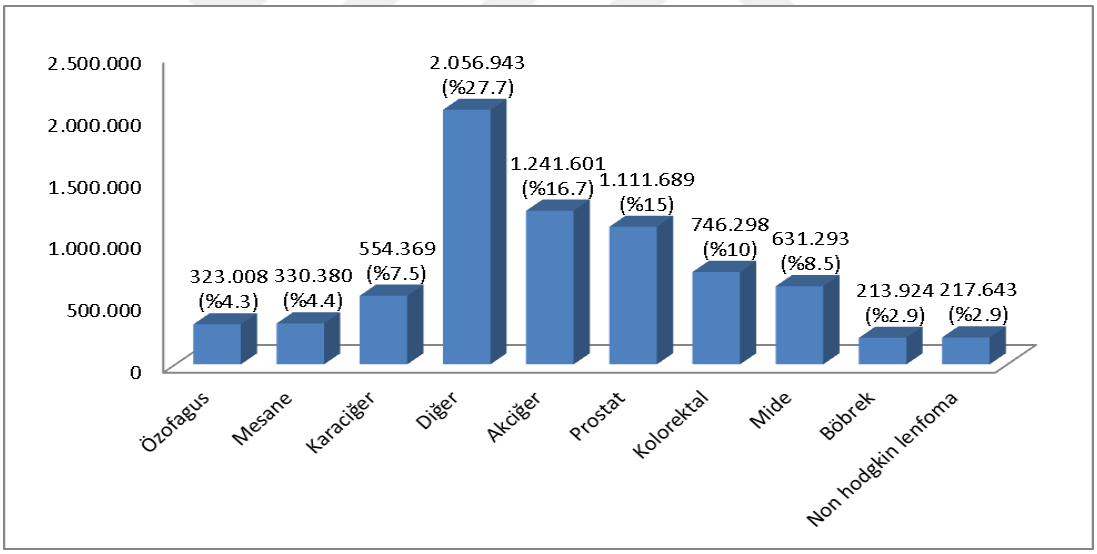
Parankim Hücre Tipinden Oluşan Tümörler			Bening	Malign
Mezenkimal Kökenli Tümörler				
		Bağ dokusu ve türevleri	Fibrom	Fibrosarkom
			Lipom	Liposarkom
			Kondrom	Kondrosarkom
			Osteom	Osteosarkom
Endotel ve İlişkili Dokular		Kan damarı	Hemanjiom	Anjiosarkom
		Lenf damarı	Lenfanjiom	Lenfanjiosarkom
		Sinovya		Sinovyal sarkom
		Mezotel		Mezotelyoma
		Beyin zarları	Meningiom	Invaziv meningiom
Kan Hücreleri ve İlgili Hücreler		Hematopoetik hücreler		Lösemi
		Lenfoid doku		Malign lenfoma
Kas Dokusu		Çizgisiz	Leiomiyom	Leiomiyosarkom
		Çizgili	Rabdomiyom	Rabdomiyosarkom
Epitelyal Kökenli Tümörler				
	Çok katlı yassı epitel		Yassı hücreli papillom	Yassı hücreli veya epidermoid karsinom
	Deri veya eklerinin bazal hücresi			
	Epitelyal yüzey		Adenom	Adenokarsinom
			Papillom	Papiller adenokarsinom
			Kistadenom	Kistadenokarsinom
	Solunum yolu			Bronkojenik karsinom
				Bronş adenomu
	Karaciğer hücresi		Hepatoselüler adenom	Hepatoselüler karsinom

GLOBOCAN (Ferlay J. ve Ark., 2012) projesi sonuçlarına gore 2012 yılında dünya çapında tahmini 14.1 milyon yeni kanser vakası (melanoma dışı cilt kanserleri dışında) tanı almıştır. Yaklaşık 8.2 milyon kansere bağlı ölüm rapor edilmiştir (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ). Bu yaşa göre standardize edildiğinde insidans her 100.000'de 182 ve mortalite oranı her 100.000'de 102 olarak görülmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla bir miktar daha yüksek insidans (toplamın %53'ü) ve daha yüksek mortalite oranı (toplamın %57'si) gözlenmektedir. Dünya çapında sık rastlanan kanser olgularında yaklaşık yeni kanser vaka sayısı ve yüzdeleri, kansere bağlı mortalite oranları, olguların genel yüzdeleri, erkek ve kadın cinsiyetine göre dağılımları şekil 1.1., şekil 1.2., şekil 1.3., şekil 1.4., şekil 1.5. ve şekil 1.6.'da belirtilmiştir.

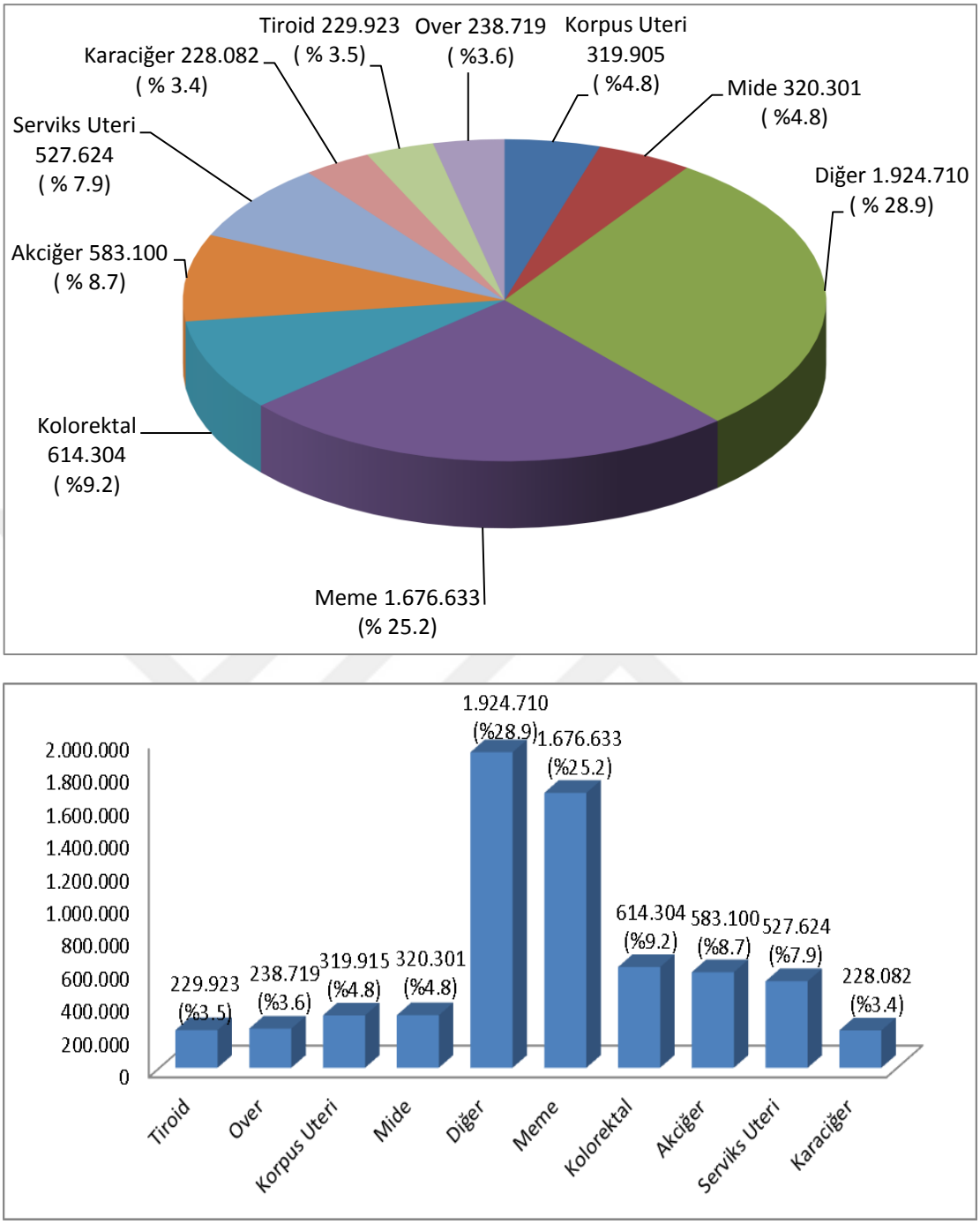


Şekil 1.1. Her iki cinsiyette tahmini kanser vaka sayısı - tüm yaşlar (toplam 14.090.149) (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ)

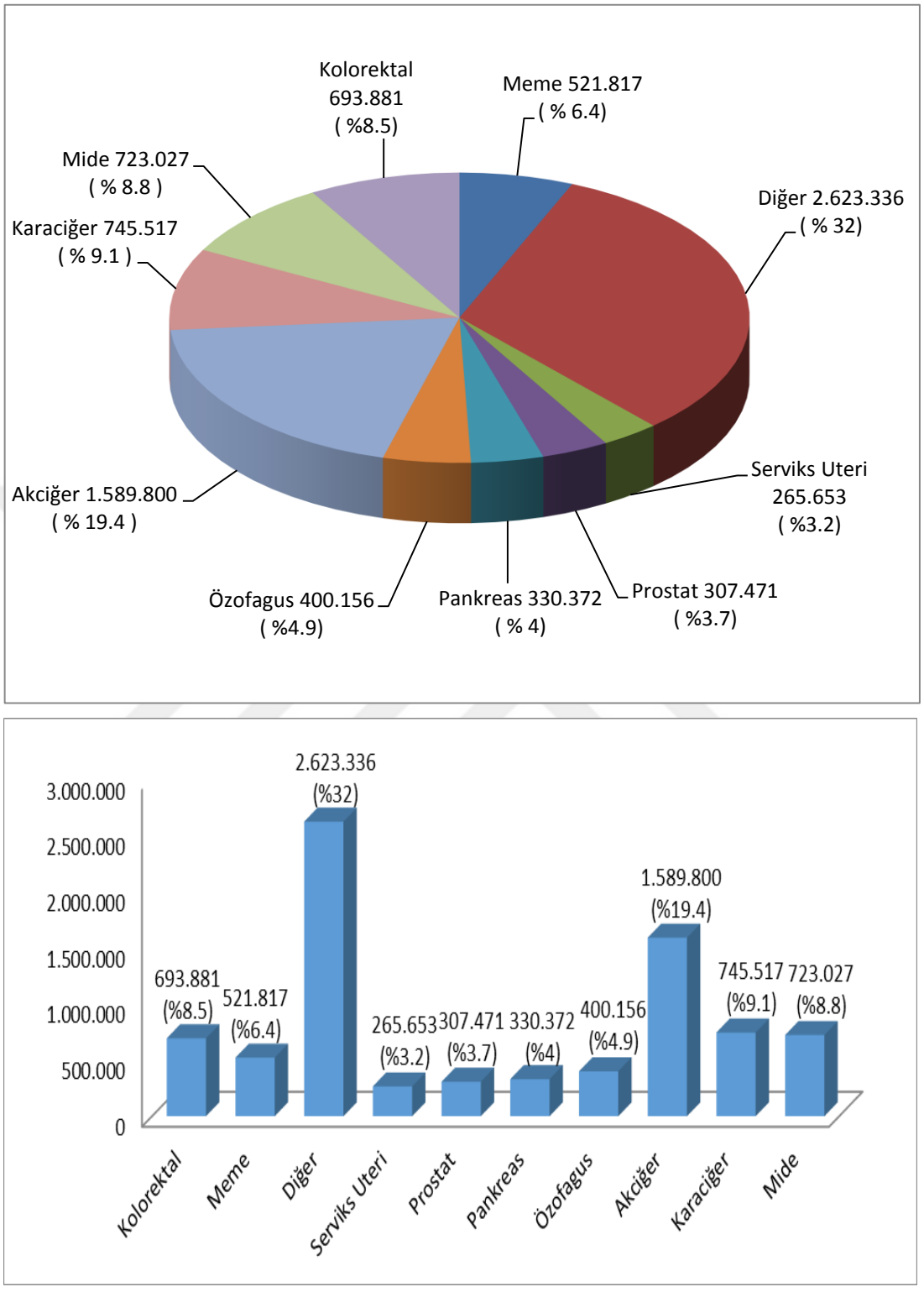




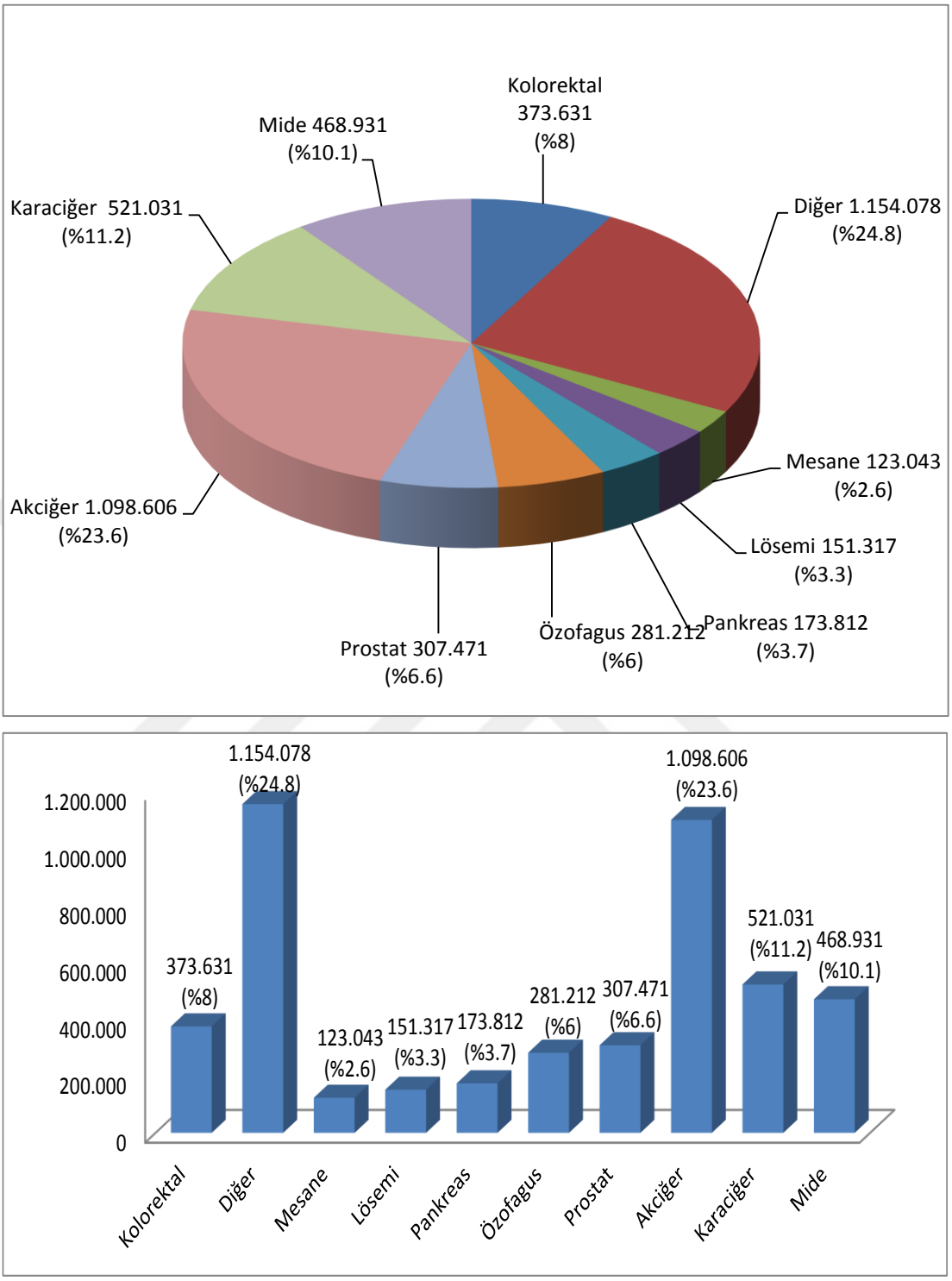
Şekil 1.2. Erkeklerde tahmini kanser vaka sayısı - tüm yaşlar (toplam 7,427,148) (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ)



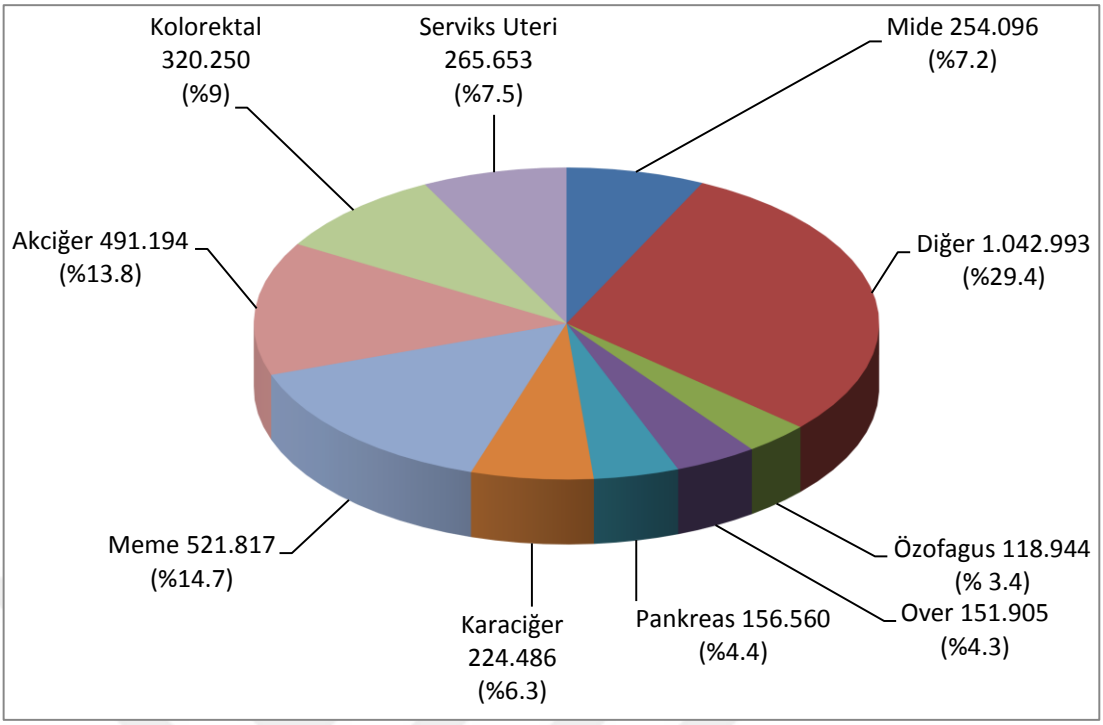
Şekil 1.3. Kadınlarda tahmini kanser vaka sayısı - tüm yaşlar (toplam 6.663.001) (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ)

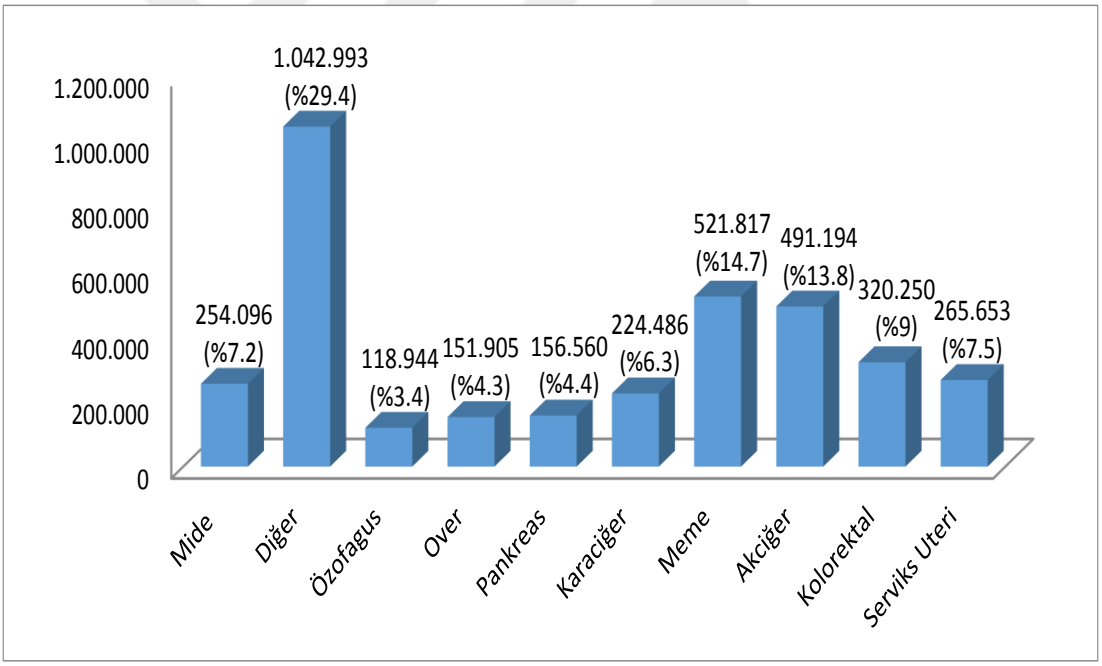


Şekil 1.4. Her iki cinsiyette tahmini kansere bağlı ölüm sayısı ve oranları - tüm yaşlar (toplam 8.201.030) (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ)



Şekil 1.5. Erkeklerde tahmini kansere bağlı ölüm sayısı ve oranları - tüm yaşlar (toplam 4.653.132) (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ)





Şekil 1.6. Kadınlarda tahmini kansere bağlı ölüm sayısı ve oranları - tüm yaşlar (toplam 3.547.898) (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ)

Erkeklerde 2012 yılında en sık kanser tanısı alan bölgeler %16.7 oranı ile akciğer, %15.0 ile prostat, %10.0 ile kolorektal, %8.5 ile mide ve %7.5 ile karaciğerdir. Bunlar aynı zamanda erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en sık görüldüğü bölgelerdir. Akciğer kanseri toplamın %23.6'sını oluşturarak artmakta, karaciğer kanseri %11.2 ve mide kanseri %10.1 ile ikinci ve üçüncü sırayı paylaşmaktadırlar (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ).

Kadınlarda kanser tanısı alan en sık 5 bölge; toplamın %25.2'si ile meme, %9.2 ile kolorektal, %8.7 ile akciğer, %7.9 ile serviks ve %4.8 ile mide kanserleridir. Bunlar aynı zamanda kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık görüldüğü bölgelerdir. Toplamın yüzde 14.7'si ile meme kanseri düşmekte, %13.8 ile akciğer kanseri arkasından gelmektedir (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ).

Her iki cinsiyette en sık görülen kanser bölgeleri akciğer (toplamın %13'ü), meme (%11.9), kolorektal (%9.7), prostat (%7.9) ve mide (%6.8)'dir. Bu 5 bölgenin kanserleri global kanser yükünün yarısını oluşturmaktadır (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ).

Santral sinir sistemi tümörleri, dünya çapında en sık görülen tümörler içerisinde yıllık yaklaşık 256.000 yeni tanı sayısı ile 17. sırada yer almaktadır. Daha gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranda görülmektedir. Yüksek ölüm oranı da göz önünde bulundurulduğunda bu kanserler, dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında 12. sıraya yükselmektedir (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ).

Bu tez çalışmasında beyin tümörleri içerisinde yüksek evreli tümörlerden glioblastoma (GB) üzerinde çalışılmıştır.

1.3. Beyin Tümörleri

Tüm kanserlerin %1,5'ini beyin tümörleri oluşturur. Ayrıca beyin tümörleri, kansere bağlı ölümlerin %2'sinden sorumludur. Son yıllardaki araştırmalara göre yıllar içerisinde santral sinir sistemi tümörlerinin sıklığında hızlı bir artış olduğu görülmektedir. (Blumenthal ve Schulman, 2005; Lee ve Ark., 2010) Son yıllardaki

beyin tümörü sıklığının artışının ortaya çıkmasında, kansere neden olan faktörlerin artmasının yanı sıra (Blumenthal ve Schulman, 2005) beyin tümörlerinin tanısını kolaylaştıracak gelişmelerin (bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi) yaygınlaşmasının rol oynayabileceği belirtilmiştir (Loiseau ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010).

Beyin tümörleri yaşa göre bimodal dağılım göstermektedir. İlk piki, çocukluk çağında; ikinci ve daha büyük piki, 45-70 yaş arası erişkinlerde gözlenir. GB'ler erkeklerde daha sık gözlenirken benign meninjiomlar kadınlarda belirgin olarak daha yüksek oranda gözlenmektedir (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ).

Beyin tümörlerinin oluşumuna neden olan etken veya etkenler net olarak belirlenememiştir. Ancak diğer kanserlerde olduğu gibi bazı çevresel faktörler var olsa da beyin tümörleri için en önemli faktör radyasyon olarak gösterilmektedir (Prasad ve Haas-Kogan, 2009; Losieau ve ark., 2009). Ayrıca 10 yıl veya daha uzun süreli cep telefonu kullanımının beyin tümörlerinin artışına katkı sağladığı sonucuna varılmıştır (Khurana ve ark., 2009).

İntrakranial tümörler, çeşit olarak oldukça fazladır ve herkes tarafından kabul görmüş bir tümör sınıflandırması yapmak zordur. Günümüzde sınıflandırma genel olarak patolojiye göre yapılmaktadır (Çizelge1.2.) (Louis ve ark., 2007; Tatter 2010).

Çizelge 1.2. Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinin genel sınıflandırılması (Louis ve ark., 2007; Tatter, 2010)

MSS Tümörleri	
Astrositik Tümörler	***1-*** Astrositom (Derece I) ***2-*** Anaplastik Astrositom (Derece II) ***3-*** Glioblastoma (Derece IV) ***4-*** Pilositik Astrositom (Derece I)
Oligodendroglial Tümörler	***1-*** Oligodendroglioma (Derece II) ***2-*** Anaplastik Dendroglioma (Derece III)
Karışık Gliomlar	***1-*** Karışık Oligoastrositom (Derece II) ***2-*** Anaplastik Oligoastrositom (Derece III) ***3-*** Diğerleri (Ependimo-astrositom vb.)
Ependimal Tümörler	***1-*** Ependimoma (Derece II) ***2-*** Anaplastik Ependimoma (Derece III) ***3-*** Miksopapillar Ependimoma (Derece III) ***4-*** Subependimoma (Derece I)
Koroid Pleksus Tümörler	***1-*** Koroid Pleksus Papilloma ***2-*** Koroid Pleksus Karsinoma
Nöronal ve Karışık Nöronal Tümörler	***1-*** Gangliositoma ***2-*** Serebellum Displastik Gangliostoması ***3-*** Ganglioglioma ***4-*** Anaplastik Ganglioglioma ***5-*** Desmoplastik İnfantile Ganglioglioma ***6-*** Merkezi Nörositoma ***7-*** Disembriyoplastik Nöroepiteliyal Tümör ***8-*** Olfaktor Nöroblastoma
Nöroepiteliyal Belirsiz Kökenli Tümörler	***1-*** Polar Spongioblastoma (Derece IV) ***2-*** Astroblastoma (Derece IV) ***3-*** Gliomatosis Serebri (Derece IV)
Embriyonal Tümörler	***1-*** Medullaepiteliyoma ***2-*** Multipotent Başkalaşmış Primitive Nöroektodermal Tümörler ***3-*** Nöroblastoma ***4-*** Retinoblastoma 5- Ependimoblastoma
Pineal Parankim Tümörler	***1-*** Pineositoma ***2-*** Pineoblastoma Karışık Pineositoma/Pineoblastoma
Diğer MSS Tümörleri	***1-*** Sellar Bölge Tümörleri ***2-*** Hematopoetik Tümörler ***3-*** Germ Hücre Tümörleri vb.

Tüm primer merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinin %85-90'ını intrakranial tümörler oluşturur (Levin ve ark., 2001). Beyin tümörleri, primer veya sekonder olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Primer intrakranial tümörler; kranium içerisindeki

glial doku, damar, nöron, meninks veya endokrin hücrelerden kaynaklanabilir. Gliomalar, yetişkinlerde saptanan en yaygın primer beyin tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütünün morfolojik özelliklerine göre yaptığı son sınıflandırmasında gliomalar; astrositik, oligodendroglial, oligoastrositik ve ependimomlar olmak üzere 4 gruba ayrılan destekleyici glial dokudan köken alan nöroepitelyal tümörlerdir (Çizelge 1.3.) (Sarkar ve ark., 2009).

Çizelge 1.3. Glioma Sınıflandırılması (Sarkar ve ark., 2009)

Glioma Tipi	**Derece**	**İsim**	**Beyin Tümöleri İçindeki Sıklığı**	**Yaş**	**Cinsiyet (E:K)**
Asrositik Tümörler	I	Pilositik Astrositom	% 5-6	≤20	1:1
		Subependimal Dev Hücreli Astrositom	<% 1	2-20	Eşit
	II	Diffüz infiltre Astrositom	%10-15	30-40	1,18:1
	III	Anaplastik Astrositom	%10-15	45-50	1,1:1
	IV	Glioblastoma	%12-15	45-75	1,26:1
Oligodendroglial Tümörler	II	Oligodendroglioma	%2.5	40-45	1,1:1
	III	Anaplastik Oligodendroglioma	%1.2	45-50	1,1:1
Oligoastrositik Tümörler	II	Oligoastrositoma	%1.8	35-45	1,3:1
	III	Anaplastik Oligoastrositoma	%1	40-45	1,15:1
Ependimal Tümörler	I	Subependimoma	%0.7	50-60	2,3:1
		Miksopapiller Ependimoma	%0.3	20-35	2,2:1
	II	Ependimoma	%4.7	<16, 30-40	1:1
	III	Anaplastik Ependimoma	%1	<16	1:1

Tüm glial tümörlerin %80-85'ini astrositomlar oluşturur (Weil 2006). Astrositomlar, histopatolojik görünümlerine göre 4 dereceye ayrılmaktadır (Kleihues ve ark., 1993). Derece artışıyla beraber tümörün vaskularitesinde ve mitoz özellikleri ile karakterize büyüme potansiyelinde artış ve prognozda kötüleşme söz konusudur. 1. derece astrositomlar, iyi farklılaşmış gliomlardır. Pilositik astrositomlar, pleomorfik ksantoastrositomlar, subependimal dev hücreli astrositomlar bu grubun içerisinde yer alırlar. 2. derece astrositomlar aynı zamanda diffüz astrositomlar olarak da adlandırılırlar. Anaplastik astrositomlar (AA) 3. derece astrositik tümörler olup

malign astrositom veya yüksek dereceli astrositom olarak da bilinirler. 4. derece astrositom GB'ler olup en malign astrositik tümör grubunu oluşturur (Kleihues ve ark., 2007). Son yıllarda primer beyin tümörlerinin görülme oranının arttığı belirtilmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005). Bu tümörlerin sıklığı ve görülme yaşı birbirlerinden farklıdır. Anaplastik astrositomlar ve GB'ler tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak %30'unu oluşturur (Levin ve ark., 2001). MSS tümörleri içinde astrositer kökenli tümörler, 15 yaşına kadar görülen primer tümörlerinin yaklaşık %40-45'ni, erişkin yaş grubunda ise %50-60'nı oluşturmaktadır (Giles ve Gonzales, 2001).

Nadir rastlanmasına rağmen beyin tümörlerinin, morbidite üzerindeki ve genellikle çocukluk çağında prognozun olumsuz seyrindeki payı büyüktür. Erişkinlerde en sık görülen malign beyin tümörü olan GB'lerde, radyoterapi ve kemoterapiye belirgin dirence bağlı prognoz halen zayıftır. Yeni tanı almış beyin tümörlerinde çevresel etkenler, yaşam biçimi veya genetik risk faktörleri ne yazık ki büyük oranda belirlenememiştir. Santral sinir sistemi tümörlerinin gelişimine katılan birçok genetik varyasyon tanımlanmakta ve teröpatik yaklaşımların önü açılmaktadır (Dünya Kanser Raporu 2014, DSÖ).

Bu tez çalışmasında GB tanısı almış hastalara ait örnekler kullanılmıştır.

1.4. Glioblastoma

Erişkinlerde en sık görülen (ortalama her 100.000'de 5 olgu) ve en malign beyin tümörü GB'dir (Rosell ve ark., 2008). GB'ler tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini ve tüm astrositik tümörlerin %50-60'ını oluşturur (Levin ve ark., 2001; Kleihues ve ark., 2007; Sathornsumetee S ve Rich 2008). GB, nekroz ve vasküler proliferasyon özellikleri göz önüne alınarak 4. derece astrositom olarak tanımlanmıştır. Olgular en sık 45-75 yaş arasında görülmesine rağmen her yaşta da görülebilir. Çocukluk yaşlarında görülmeleri nadirdir. Erkek/kadın oranı 1,5/1 civarındadır (Iacob ve Dinca, 2009).

GB gelişimine neden olan risk faktörü veya faktörleri, radyasyon haricinde tam olarak belirlenememiştir. Bunun dışında genel olarak GB etkenleri arasında sigara, elektromanyetik dalgalar, alerji, viral enfeksiyon (Krex ve ark., 2007) ve genetik yatkınlık sayılabilmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005). Ailesel birtakım hastalıkların (Li-Fraumeni sendromu, nörofibramatozis, tüberoz skleroz, Turcot sendromu) GB ile birliktelik gösterdiği belirtilmiştir (Blumenthal ve Schulman, 2005; Adamson ve ark., 2009).

GB'ler primer (de novo) ve sekonder olmak üzere iki gruba ayrılır. Primer GB'ler tüm GB'lerin %90'ını oluşturmakta, glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede GB tanısı konulan tümörlerdir. Klinik belirti ilk 3 ay içerisinde tümörün hızlı gelişmesine bağlı olarak oluşmaktadır. Primer GB'lerin öncesinde düşük dereceli (2. ve 3. derece) gliom öyküsü yoktur. Geri kalan grubun %10'unu oluşturan sekonder GB'ler, düşük dereceli gliomlardan sekonder olarak gelişir. Bu nedenle 60'lı yaşlarda görülen primer GB'ler, 30-40'lı yaşlarda görülen sekondere göre yaşlı insanlarda daha fazla görülmektedir (Durmaz ve Vural, 2007). Düşük dereceli astrositomların GB'ye dönüşmesi için geçmesi gereken süre ortalama 4–5 yıldır (Krakstad ve Chekenya 2010). Primer ve sekonder GB'ler, morfolojik olarak ayırt edilememekte ve hasta yaşı dikkate alınmadığında her ikisi de kötü prognoza sahiptir (Sarkar ve ark., 2009).

GB'ler başlıca serebral hemisferlerde yerleşim gösteren infiltratif tümörlerdir (Kleihues ve ark., 2007; DeAngelis 2001). En sık tuttuğu lokalizasyon frontal lob, en az tuttuğu lokalizasyon ise oksipital lobdur. Makroskopik olarak GB'ler çevre normal dokudan iyi sınırlarla ayrılmasına rağmen mikroskopik olarak incelendiğinde kitleden uzakta, normal doku içine infiltrasyon göstermektedir (Louis ve ark, 2007). Tümörün çevresindeki normal beyin dokusunda ödeme ve ekspansiyona neden olmaları, yüksek derecede invaziv tümör olmalarından kaynaklanır (Rosell ve ark., 2008).

GB'lerin neden olduğu semptom ve bulguların çoğu; hızlı büyümekte olan tümöre, tümörün çevresinde yaptığı ödeme, obstrüksiyona ve artmış kafa içi basıncına

bağlıdır. Baş ağrısı, bulantı, kusma, epileptik nöbetler, nöromotor fonksiyon kaybı ve mental değişiklikler en yaygın bulgulardır. Fokal bulgular, tutulan tümör lokalizasyonuna bağlı da oluşabilir (Krakstad ve Chekenya, 2010). GB; tedavisi güç, yüksek morbidite ve mortalite özelliklerine sahip, küratif tedavisi olmayan bir kanser çeşididir (Rosell ve ark., 2008). Hastaların sağkalım süresi, en gelişmiş tedavi uygulamalarına rağmen ortalama 14.6 aydır. 2 yıllık sağkalım süresine hastaların %10'luk bir kısmının ulaşabildiği bilinmektedir (Krakstad ve Chekenya, 2010).

Günümüzde uygulanan standart tedavi biçimleri; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (Adamson ve ark., 2009; Omay ve Vogelbaum, 2009). Her üç tedavi de tek başına yeterli değildir. Bu nedenle üç tedavi yaklaşımının sırasıyla uygulanması tercih edilmektedir. GB tedavisinde güncel yöntem; mümkün olan en geniş cerrahi rezeksiyon sonrasında adjuvant radyoterapi ve uygun olan hastalarda kemoterapi uygulamasıdır (Rosell ve ark., 2008).

1.4.1. Glioblastomaların Genetik Özellikleri

Tüm kanserlerde olduğu gibi GB hücrelerinde de anjiyogenez, yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, doku invazyonu yapabilme, kontrolsüz çoğalma ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir. GB'nin genetik yapısı heterojen özellik gösterir. Aynı tümör dokusunda ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının değişiklik gösterdiği ve bu nedenle hastalığın "multiform" olarak isimlendirildiği bildirilmektedir (Adamson ve ark., 2009; Krakstad ve Chekenya 2010). Klinik ve sitogenetik farklılıklar primer ve sekonder GB dokuları arasında bulunmaktadır (Sathornsumetee ve Rich, 2008).

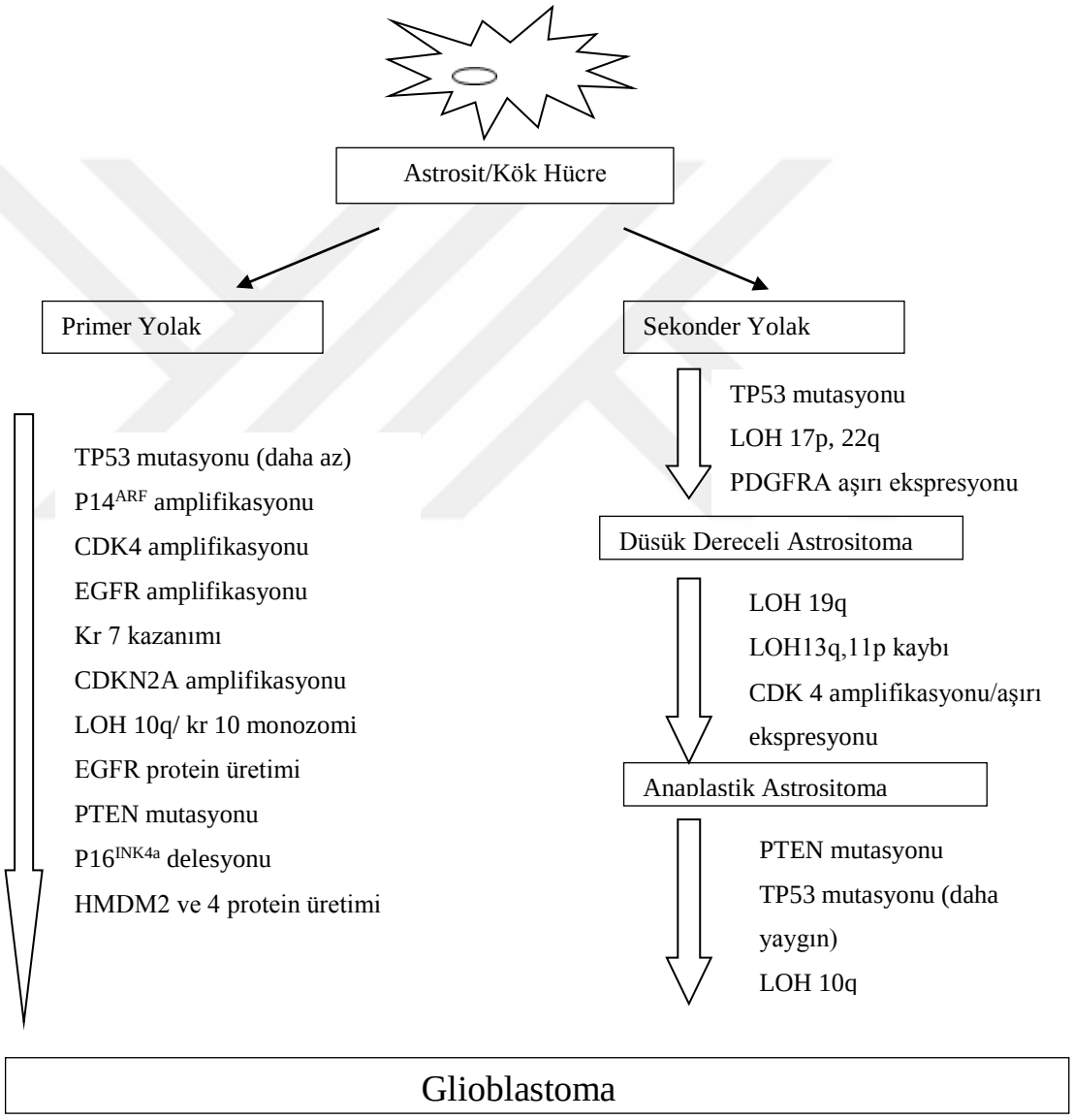
Primer GB'de en sık saptanan genetik değişiklikler epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A) genlerindeki mutasyonlar ve kromozom 10q23'te heterozigosite kaybıdır. Bir tümör baskılayıcı gen olan fosfat ve tensin homolog (PTEN) geni kromozom 10q23 bölgesinde bulunmaktadır ve bu bölgede meydana gelen heterozigosite kaybı (LOH) olguların %60-80'inde meydana gelmektedir (Krakstad ve Chekenya, 2010).

Sekonder GB'de tümör baskılayıcı protein 53 (TP53) genlerinde, platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA) ve PDGFRA ligandında çeşitli genetik değişiklikler saptanmıştır. Sekonder GB'de saptanmış genetik değişikliklerden bazıları da $p16^{INK4A}$, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (pRB1) genlerinde mutasyonlar, siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK) ve insan double minute 2 (HDM2) genlerinin amplifikasyonu ve kromozom 10 delesyonlarıdır (Sathornsumetee ve Rich, 2008; Sarkar ve ark., 2009). Ayrıca son yıllarda, oksidatif strese karşı korunmada yer alan izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geninde de mutasyonların var olduğu belirtilmektedir (Krakstad ve Chekenya, 2010).

Sekonder GB için TP53 mutasyonu, primer GB içinse EGFR amplifikasyonu karakteristik genetik değişikliklerdir (Sathornsumetee ve Rich, 2008). GB olgularında en sık değişiklik gösteren genleri yapılan genom analizinde TP53 (%40), EGFR (%37) ve PTEN (%30) olarak bildirmiştir (Parsons ve ark., 2008). Ancak bu genetik değişikliklerin prognozda GB'nin tedavisi için hiçbir değerinin olmadığı da bilinmektedir. Bu sınıflandırmanın kesin sınırları olmamakla birlikte tümör baskılayıcı PTEN gen delesyonu, kromozom 10 kaybı primer ve sekonder GB'de saptanan ortak genetik değişikliklerdir. Bu nedenle her iki tip GB'de de CDK4 amplifikasyonu ve TP53 mutasyonu gibi genetik değişikliklere rastlanabilir (Sathornsumetee ve Rich 2008; Sarkar C ve ark., 2009). Düşük dereceli glial tümörlerden GB'ye kadar olan genetik değişiklikler Şekil 1.3.'te özetlenmiştir.

Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağı GB hücrelerinde saptanan ve canlılığı tetikleyen en önemli yolaktır. EGFR, PDGFR gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörlerinin büyüme faktörleriyle aktivasyonu sonucu PI3K/protein kinaze B (PKB, AKT) yolağı aktifleşir ve nükleer faktör κB (NFκB) aracılığıyla yaşamı ve proliferasyonu düzenleyen genlerin aktivasyonu sağlanır. GB'de saptanan PTEN mutasyonunun bu yolağı inaktive etmediği belirtilmekle birlikte PTEN bu yolağı bloke edebilir. Ras onkogeni aracılığıyla mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağı da tirozin kinazların aktivasyonu sonucu tetiklenen diğer bir yoldur. Bu yolağın aktivasyonu ile beraber glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikler. GB'de tirozin kinaz

reseptörlerinde mutasyon meydana gelmesi, bu sinyallerin aktivasyonuna neden olarak sinyal yolaklarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu yolağın başında yer alan kinazları inhibe etmek için inhibitörlerin ve monoklonal antikorların kullanılması GB'de alternatif bir tedavi yöntemi olarak geçmektedir. Akt inhibitörleri (perifosine) ve EGFR inhibitörleri (erlotinib, gefitinib) ile ilgili çalışmalar ve yaşam sinyallerinin diğer üyeleri için inhibitör kullanımını geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Krakstad ve Chekenya, 2010).



Şekil 1.7. Primer ve sekonder glioblastoma gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler (Sathornsumetee ve Rich, 2008; Sarkar ve ark., 2009)

GB'ler sitogenetik yapı bakımından oldukça karışıktır. Sık saptanan kromozomal anomaliler translokasyonlardan t(15;19) ve t(10;19), kayıplardan 9p, 10p, 10q, 13q, 17p ve 19q bölgelerindeki kayıplardır. GB'lerde genel olarak kromozomal kazanımlardan çok kromozomal kayıpların olduğu belirtilmektedir (Durmaz ve Vural, 2007; Kleihues ve ark., 2007).

GB'de meydan gelen moleküler genetik değişikliklerden faydalanarak alternatif tedavi yolları geliştirme çalışmaları, büyük bir hızla devam etmektedir (Khasraw ve Lasmann, 2010). Yapılan araştırmalarda birçok genetik değişiklik adayı saptanmıştır. Kaspaz 8 ve WNT sinyal yolağı antogonistlerinden Dickkopf-1 (DKK-1) genlerinin metilasyonu, akciğer kanseri β–katenin geni (BLU), EGFR ve PTEN genlerindeki mutasyonlar, insülin büyüme faktörü bağlanma proteini (IGFRBP), nörofilin-1 ve endoplazmik retikulum stres sinyalinde yer alan glikoz düzenleyici protein 78 (GRP78) genlerinin aşırı ekspresyonları bunlardan bazılarıdır (Rosell ve ark., 2008). GB'de meydana gelen ve tedaviyle ilişkilendirilen önemli genetik değişikliklerden biri de çoklu ilaç direnci 1 (multiple drug resistance 1/MDR1) isimli genin metilasyonu sonrası çoklu kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen dirençtir (Bredel, 2001).

1.4.2. Glioblastoma Tedavisi

1.4.2.1. Glioblastoma Tedavisinde Cerrahi

GB cerrahisinde amaç, nörolojik harabiyete neden olmadan tümörün çıkartılmasıdır (Levin ve ark., 2001). Cerrahi, tümörün boyutu ve lokalizasyonun uygunluğuna göre kısmi veya total rezeksiyon şeklinde yapılmaktadır (Sathornsumetee ve Rich, 2008). Eksize edilen tümörün boyutu, sağkalımı artıran ve adjuvan tedavi sonuçlarını etkileyen önemli bir prognostik faktördür (Omay ve Vogelbaum, 2009). Ancak infiltratif yapısı nedeniyle GB'nin tamamının çıkartılması hemen hemen imkansızdır **(**Kim ve Glantz, 2006**)**. Geniş tümör eksizyonu ve başarılı bir cerrahi sonrasında bile alınamayan mikroskobik bir tümör kalıntısı GB'nin rekürrensine neden olmaktadır. Kısmi cerrahi sonrası geride kalan makroskobik tümör parçasının etkinliğini ortadan kaldırabilmek veya total cerrahi sonrası geride kalan tömör hücrelerinin çoğalmasını

önlemek için radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin üçünün de uygulanmasına rağmen hastalarda rekürrens gelişmekte ve bu hastalara ikinci bir cerrahi müdahale gerekmektedir (Sathornsumetee ve Rich, 2008).

1.4.2.2. Glioblastoma Tedavisinde Radyoterapi

GB hastalarında radyoterapi uygulamasının sağkalıma ve nörolojik yaşam kalitesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Omay ve Vogelbaum, 2009). Uygulama biçiminde birtakım farklılıklar bulunmakta, radyoterapi ya tüm beyin ışınlanması ya da kısmi beyin ışınlanması şeklinde yapılmaktadır. Uygulama biçimlerinden hangisinin üstün olduğu konusu tartışmalıdır. Radyoterapide dozun belirlenmesi, rastlanılan en sık problemlerdendir. Güncel radyoterapi, tümör yatağına 6 haftada düzenli periyotlarla toplam 60 gray (gy)'lik dozun verilmesi şeklindedir (Smith ve ark., 2008). Ancak uygulamada ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Ortalama 7 gy x 4 parça halinde düzenlendiği gibi 2.5 gy x 20 şeklinde düzenlenen radyasyon, lokal veya tüm beyne farklı sürelerde uygulandığı rapor edilmiştir (Clarke ve ark., 2008).

1.4.2.3. Glioblastoma Tedavisinde Kemoterapi

İnfiltratif yapısı nedeniyle GB'lerde tümörün tamamının cerrahiyle çıkarılabilmesi hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle primer GB olgularında, cerrahi sonrası sırasıyla veya aynı anda radyoterapi ve kemoterapi uygulaması standart tedavi modeli olarak sunulmaktadır (Kim ve Glantz, 2006). Yüksek dereceli beyin tümörlerinde kemoradyoterapinin yalnızca radyoterapi uygulaması ile karşılaştırıldığında sağkalım oranını %10 artırdığı saptanmıştır (Sathornsumetee ve Rich, 2008). Kemoterapinin sağkalım üzerine etkisini gösteren araştırmalara ait sonuçların değerlendirildiği meta analiz çalışmalarında GB'lerde kemoterapinin sağkalımı artırdığı kesinlik kazanmıştır (Kim ve Glantz, 2006). Bu nedenle GB olgularında kemoterapi uygulaması, tedavideki başarı oranının arttırılmasında önemli bir basamaktır (Stupp ve ark., 2007). Kemoterapötik maddenin seçimi, uygulama süresi, dozu ve hastaya ait genetik faktörler kemoterapi sürecini doğrudan etkileyen unsurlardır (Hegi ve ark., 2008).

Kan beyin bariyeri, beyin tümörlerinin kemoterapötik ajanlarla tedavisinde karşılaşılan sorunların başında gelmektedir (Stupp ve ark., 2007). Kemoterapötikler, difüzyonunun yavaş olması nedeniyle kan beyin bariyeri bozulmuş olsa bile MSS içerisinde yeterli doku konsantrasyonuna ulaşamazlar. Beyin tümörlerinde kullanılacak kemoterapötiklerin glioma hücrelerine etki edebilmeleri için kan beyin bariyerini hızlı ve kolay geçebilmesi gerekmektedir. İn vitro araştırmalar, radyasyonun kemoterapötiklerin glioma hücrelerine olan etkisini artırdığı yönünde bulgular sunmaktadır. Kemoterapötiklerin etkilerinin artması nedeniyle radyoterapi ile eş zamanlı uygulanması gerektiği bildirilmektedir (Stupp ve ark., 2005). Ancak bu noktada, kan beyin bariyerini kolay geçebilen, yan etkisi az, toksisitesi düşük kemoterapötiklerin geliştirilmesi gerekmektedir.

GB tedavisinde alkilasyon ajanları, antimetabolitlerden hidroksiüre, 6-tioguanin, 5-florourasil ve alkoloidlerden vinkristin kullanılmaktadır (Kim ve Glantz, 2006; Marchesi ve ark., 2007). Alkilasyon ajanları en sık kullanılan kemoterapötiklerdir. Diğer kanser tedavilerinde de 30 yıldır kullanılan alkilasyon ajanlarının, son yıllarda GB tedavisinde özellikle tercih edildikleri görülmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005; Adamson ve ark., 2009). Alkilasyon ajanları genel olarak azotlu hardallar, etileniminler, nitrözüreler, alkilsulfonatlar ve trizan-hidrazin türevleri olmak üzere 5 gruba ayrılır. Azotlu hardallar içerisinde siklofosfamid, klorambusil, melfalan ve meklerotamin; etileniminler içerisinde tiotepa ve altretamin; nitrozoüreler içerisinde karmustin, lomustin, semustin ve fotemustin; alkilsulfonatlar içerisinde busulfan ve son grup olan trizan ve hidrazin türevleri içerisinde dakarbazin, prokarbazin ve temozolomid yer alır.

GB'de sıkça kullanılan kemoterapötikler triazin bileşikleridir (Kim ve Glantz, 2006). Adjuvant olarak genellikle PCV (prokarbazin, lomustin ve vinkristin) kombinasyonu veya prokarbazin ya da karmustin monoterapisi kullanılmaktadır (Kim ve Glantz, 2006; Kaina ve ark., 2010). GB tedavisinde son yıllarda hastaların büyük çoğunluğunda temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. (Marchesi ve ark., 2007; Kaina ve ark., 2010).

1.5. Temozolomid

TMZ, alkilasyon ajanlarının imidazotetrazinonlar veya triazin bileşikleri olarak adlandırılan grupta yer almaktadır. TMZ, ticari olarak Schering-Plough tarafından Temodal ismiyle üretilmekte, 1984 yılında Stevens ve arkadaşları tarafından Aston Üniversitesinde (İngiltere) sentezlenen bir bileşiktir. (Agarwala ve Kirkwood, 2000). Dakarbazin [DTIC, 5-(3,3-dimethyltriazeno) imidazol-4-carboxamide] ve mitozolomid bileşikleri de bu grup içerisinde yer alır (Şekil 1.8.) (Marchesi ve ark., 2007).

TMZ, mide pH'ında stabil ve molekül ağırlığı 196 Dalton (Da) olan küçük bir moleküldür (Agarwala ve Kirkwood, 2000). TMZ, oral kullanım ile hızlıca ve tamamen gastrointestinal yoldan absorbe olur (%100 biyokullanılırlık). Plazma tepe konsantrasyonuna ulaşması için gereken süre (t_{max}) 30 ile 90 dakika arasındadır. TMZ 200 mg/m^{2}lik konsantrasyonda ortalama 1,8 saatlik yarı ömür ve %20 civarında plazma proteinine bağlanımıyla doğrusal bir farmokokinetiğe sahiptir. Oral yolla uygulanan TMZ'nin öngörülebilen farmakokinetik parametreleri bulunmaktadır. C_{maks} (plazma tepe konsantrasyonu) ve AUC (plazma konsantrasyonunun altındaki alan, zaman eğrisi) dozla beraber doğrusal olarak artar. Beş gün için günlük 200 mg (miligram)/m^{2}lik TMZ konsantrasyonunda C_{maks} yaklaşık 13-14 mg/L (litre) ve 1. günde AUC 33,2 mg saat/L ve 5. günde 34,5 mg saat/L'dir. TMZ'nin oral dozunu (50-1250 mg/m^2) alan hastalarda dağılım hacmi (V_d) 28.3 ile 47.2 L aralığında değişmektedir. İlaç kan beyin bariyerini geçtikten sonra serebro spinal sıvıda kalır. Serebro, spinal sıvıda plazmatik konsantrasyonun %30-40'ına ulaşabilir. TMZ bu nedenle primitif ve metastatik beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Marchesi ve ark., 2007).

1.5.1. Temozolomidin Klinik Kullanımdaki Önemi

Farmakokinetik ve terapötik özellikleriyle klinik kullanımda ilk akla gelen kemoterapötik gruplardan biri triazin bileşikleri ve özellikle TMZ'dir. Bu bileşiklerin tercih edilmesinin nedenleri aşağıda belirtilmiştir.

- TMZ kolay tolere edilebilen, kendiliğinden fizyolojik şartlarda aktifleşebilen bir ilaçtır.
- Klasik kemoterapiye direnç gösteren hematopoietik veya solid tümörlerin birçoğu triazinlere duyarlıdır.
- TMZ'ye karşı gelişen dirençte DNA tamir sistemlerine ait genlerin metilasyon veya ekspresyon gibi birtakım genomik bilgileri önemli rol oynar. DNA tamir sistemlerine ait bu bilgilerin öğrenilmesi, hastaların ilaca olan duyarlılığı hakkında bir öngörü sunabilir.
- Kanser hücrelerinin bu bileşiklere gösterdikleri hassasiyet DNA tamir enzimlerinin fonksiyonel aktivitesinin ve ekspresyon seviyesinin düzenlenmesiyle büyük ölçüde artırılabilir.

1.5.2. Temozolomidin Sitotoksik Etkisine Direnç

TMZ'nin alkilasyon ajanlarıyla kıyaslandığında birçok üstün ve avantajlı özelliğe sahip olduğu görülür. Düşük molekül ağırlığı, fizyolojik pH'ta kendiliğinden çözünebilme ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilme özellikleri TMZ'ye üstünlük kazandırmaktadır. Bu nedenle TMZ son yıllarda GB tedavisinde en çok tercih edilen kemoterapötik ilaç olarak sunulmaktadır (Blumenthal ve Schulman, 2005). İlacın terapötik etkisine karşı direnç göstermesi TMZ kullanımında karşılaşılan en büyük problemlerden biridir. MGMT, MMR eşleşme ve baz çıkarım yoluyla tamir (BER); TMZ direncinden sorumlu DNA tamir sistemleridir (Marchesi ve ark., 2007). MMR, BER veya nükleotit çıkarım tamir (NER) mekanizmaları metillenme sonucunda oluşan replikasyon hatalarında aktif hale geçmektedir (Verbeek ve ark., 2008; Kaina ve ark., 2010).

DNA polimerazın hata düzeltme aktivitesinden kaçan replikasyon hatalarını MMR sistemi düzeltir. MMR sistemi, yanlış eşleşmiş bazları ve aynı zamanda eklenme/çıkarılma (IDL) hatalarını da tanır ve tamir eder (Shah ve ark., 2010). MMR sisteminde meydana gelen hatalar sonucunda ortaya çıkan DNA tamirindeki işlev kaybının, karsinogeneze yol açan mutasyon sıklığının artışıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Hoeijmakers, 2001; Shah ve ark., 2010).

Hücrelerin TMZ duyarlılığı ile MMR fonksiyonu arasında doğrusal (Sarkaria, 2008), MGMT fonksiyonu arasında da ters bir ilişki vardır (Kaina ve ark., 2010). Araştırmalar MMR fonksiyon kaybının triazin bileşiklerine karşı gelişen dirençte önemli olduğunu (Caporaso ve ark., 2007) ve MMR'ın, DNA hasarı sonucu oluşan apoptotik yolağın tetiklenmesinden sorumlu olduğunu bildirmektedir (Şekil 1.10.) (Marchesi ve ark., 2007).

BER tamir sistemi, çeşitli ajanlarca oluşturulan baz modifikasyonlarına karşı hasar kontrolü yapan ve DNA bazlarının metilasyonu veya oksidasyonu sonucu oluşan lezyonlara karşı çalışan çok enzimli bir sistemdir. Tümörigenez oluşumuna BER tamir sistemi hatalarının neden olabileceği belirtilmektedir (Sweasy ve ark., 2006).

İn vitro çalışmalar, yukarıda yer alan DNA tamir sistemlerine ek olarak TMZ aracılı sitotoksisitede MDR1 ekspresyonunun da rol alabileceğini göstermektedir. MDR1 genotiplerinin çok değişkenli analizlerinde bazı MDR1 varyantlarının temozolomid ile tedavi edilen GB hastalarının sağkalımında, prediktif rol oynayabileceği belirtilmektedir. Bu etki MGMT metilasyon durumundan bağımsız olarak gösterilebilmektedir (Schaich M. ve ark., 2009).
TMZ direncinde rol alabilecek diğer bir mekanizma da MDR1'dir.

1.6. Çoklu İlaç Direnci 1 Geni / P Glikoprotein (Pgp)

Pgp, MDR1 geni tarafından kodlanan molekül ağırlığı 170 kilodalton (kDa) olan glikolize bir hücre zarı glikoproteinidir. Pgp, hücre içi ilaç yükünü azaltan aktif ATP (adenozin trifosfat) bağımlı bir hücre duvar taşıyıcısı olarak görev yapar. Klinik kullanımda P-glikoprotein bağlantılı ilaç direnci iyi bilinen MDR mekanizmasını oluşturmaktadır (Endicott ve Ling, 1989; Feun ve ark., 1994; Gros ve ark., 1986; Kartner ve ark., 1983; Van der Bliek ve Borst, 1989). İlaç transportu üzerine yapılan deneylerde Pgp'nin iki yönlü transferinde hücre içi konsantrasyonlarda azalma ve ekstraselüler alana ilaç atılımında artma tespit edilmiştir.

Bazı insan kaynaklı tümörlerde MDR1 geninin *intrensek* veya *edinilmiş* artmış ekspresyonu tespit edilmiştir (Goldstein ve ark., 1989; Pastan ve Gottesman, 1987).

Bunun yanı sıra fizyolojik bezlerin salgılarının dahil olduğu dokularda MDR1 ekspresyonu çeşitlilik göstermektedir (Cardon-Cardo ve ark., 1990; Goldstein ve ark., 1989; Hitchins R. N. ve ark., 1988; Van Kalken ve ark., 1993). Bütün bunlara ek olarak Pgp, toksik metabolitlerin endotelyal hücreler aracılığı ile beyine girmesini engellemekle ilişkilendirilmiştir ancak Pgp'nin tümöral olmayan dokuda eksprese edilmediği görülmektedir (Cordon-Cardo ve ark., 1989; Schinkel ve ark., 1994).

Günümüzde MDR1 geninin insan kanser olgularında hangi hücresel mekanizma ile artmış ekspresyonu gösterdiği net olarak belirlenememiştir (Bredel, 2001). Kondo ve arkadaşları Murin Double Minute 2 (MDM2) geninin MDR1 baglantılı ilaç direncinde rolü olabileceğini belirtmişlerdir. GB hücrelerinde, MDM2 ekspresyon artışının MDR1 geninin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Kondo ve ark., 1996).

MDR1 ekspresyonu bazı intraselüler ve ekstraselüler mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bir fosfolipid düzenleyici serin/treonin kinaz olan protein kinaz C (PKC), özellikle yüksek evreli GB ve medulloblastoma olgularında Pgp'nin ekspresyonunu düzenleyerek ve/veya fosforilasyon düzeyini değiştirerek Pgp'nin fonksiyon ve aktivitesini etkilediği yönünde bulgular bulunmaktadır (Bredel, 2001; Blobe ve ark., 1993; Yu ve ark., 1991). Düzenleyici ekstraselüler faktörler ise tümör nekroz faktörü α (TNF α) ve transforme edici büyüme faktörü β (TNF β) olarak görülmektedir (Pohl ve ark., 1999).

Beyin tümörlerinde kemoterapötiklere ilaç direncinde, Pgp'nin belirgin bir rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle bu proteinin etkileri, oldukça duyarlı olduğu epifofilotoksin ve vinkristin ajanlarında gözlenmiştir. Ancak MSS neoplazileri düşünüldüğünde Pgp'nin çoklu ilaç direncindeki gerçek önemi konusundaki tartışmalar halen sürmektedir. MDR1 geninin çoklu ilaç direnci olan gliomalarda, ilaç duyarlı gliomalarla kıyaslandığında amplifikasyon olmadan artmış ekspresyon gösterdiği, bu tümörlerde MDR kazanımının Pgp aktivitesine bağlandığı ve direncin derecesinin MDR1 mRNA seviyeleri ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Mousseau ve ark., 1993). Bazı araştırmalar beyin tümörlerinde Pgp ekspresyonunun

dikkat çekecek kadar yüksek seviyelerde olduğunu göstermiştir (Becker ve ark., 1991; Matsumoto ve ark., 1990; Tishler ve ark., 1992). Matsumoto ve arkadaşları immunhistokimyasal Pgp ekspresyonunun varlığını 18 glioma hücre örneğinde göstermiştir. Pgp pozitif glial hücreler %6.5 ile %27 arasında değişkenlik ve çeşitlilik göstermiştir (Matsumoto ve ark., 1991).

Pgp ekspresyonunun sıklığı ve Pgp eksprese eden hücrelerin tümör içerisindeki yüzdesi, malignite ve genel olarak astrositik tümörün evresinde artışa işaret eder. Von Bossayni ve arkadaşları, 53 serilik astrositik gliomalar üzerinde yaptığı immunhistokimyasal çalışmada düşük evreli astrositomların %31'inde; yüksek evreli astrositomların %88'inde Pgp ekspresyonunu belirlemişlerdir (Von Bossayni ve ark., 1997). Ancak proliferatif aktivite ve Pgp arasında bulunan bu direkt ilişki, gliomaların Pgp ekspresyonu üzerine yapılan çalışmaların hepsinde sabit gözlenen bir bulgu değildir. Bazı çalışmalarda da (Yokogami ve ark., 1998) tedavi verilmemiş gliom olgularında evre arttıkça Pgp seviyelerinde düşme gözlemlemiş, Pgp ile tümör evresi arasında ters orantı olduğu düşünülmüştür (Yokogami ve ark., 1998).

Kemoterapi öncesi ve sonrası Pgp ekspresyonu üzerine yapılan bir incelemede kemoterapi sonrası Pgp eksprese eden hücrelerin boyanmasının yüzdesinde artış kaydedilmiştir. Bu durum MSS neoplazmlarının parsiyel *"edinilmiş"* Pgp ekspresyonu yeteneğini akla getirmektedir. Primer ve metastatik beyin tümörlerinde kemoterapi direnci genetiği üzerine yapılan benzer bir çalışmada MDR1 mRNA'nın yalnızca tümörlerin yüzde 2'sinde görüldüğü ve yükselmiş MDR1 gen ekspresyonunun ilaç direnci fenotipi olan tümörlerde olmazsa olmaz bir bulgu olmadığını düşündürmüştür (Mousseau ve ark., 1993).

Qiu ve arkadaşları (2007) nöroblastom hastalarından alınan örneklerde yapılan gerçek zamanlı PZR sonuçlarında, MDR1 artmış promotor metilasyonu sonrasında MDR1 geni transkripsiyonel inaktivasyonunu nöroblastoma tümörlerinin progresyonu ve patogenezi ile ilişkilendirmişlerdir.

Vidal ve arkadaşları (2007) klonal hematopoetik kök hücre hastalığı olan myelodisplastik sendromda MDR1, MRP1 ve LRP gibi ilaç direnç genlerinde artmış ekspresyon miktarlarını çoklu ilaç direnci olan myelodisplastik sendromlu hastalarda göstermişlerdir.

MDR1 geninin myelodisplastik sendrom, meme kanseri, nöroblastom ve gastrik kanserler gibi farklı tip kanserlerde ekspresyonu ve epigenetik değişikliklerinin önemli olduğu bildirilmiştir (Vidal ve ark., 2007; Qiu ve ark., 2007; Von Bossayni ve ark., 1997; Tahara ve ark., 2010; Sharma G ve ark., 2012). MDR miktarını belirleyen en önemli mekanizmalardan biri epigenetik değişikliklerdir ve bu epigenetik mekanizmaların en önemlilerinden biri de metilasyondur.

Bu tez çalışmasında, kemoterapötik ilaç olarak TMZ kullanan GB hastalarında MDR1 geninin ekpsreyonunu doğrudan etkileyen promotor bölge metilasyonu çalışılmış, MDR1 geni promotor metilasyonuyla hastaların sağkalım ve kemoterapötik ilaçlara verdikleri yanıtlar arasındaki olası ilişki araştırılmıştır.

1.7. Epigenetik Mekanizmalar ve Bazal Fonksiyonları

Epigenetik mekanizmalardan ilk defa 1983'te bahsedilmiştir. Hipometilasyon, hipermetilasyon, imprinting kaybı ve kromatin modifikasyonlarını içeren bu mekanizmalarla ilgili bilgiler zamanla daha anlaşılabilir hale gelmektedir. Bu mekanizmalar aynı zamanda epigenetik değişikliklerin kanser genetiğinin ve epigenetiğin beraber yorumlanmasına ve hastalıkların temeline daha genel olarak bakılabilmesine olanak vermektedir (Feinberg ve Tycko, 2004).

Epigenetik kalıtım DNA'nın kendi kalıtımının dışında, hücre bölünmesi esnasında hücresel bilginin aktarılması olarak tanımlanır. Epigenetik kalıtım, kendi aralarında da bağlantılı olmak üzere DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve genomik imprinting olmak üzere 3 ana grupta toplanır. Epigenetik düzenlemeler; hücrenin büyümesi ve yaşlanması ile ölümsüzlük arasında; normal hücreler ile tümör hücreleri arasında; diferansiye olmuş hücreler ile yaşlanmış hücreler arasındaki farkın anlaşılmasında anahtar rol üstlenir. Gen ekspresyonunu kontrol eden epigenetik

şablonlar DNA sekansından bağımsız olarak yavru hücrelere aktarılır. Bu kararsız oluşum bazen fetal dönemde anormal olarak gelişerek pediatrik kanserlere yatkınlık oluşturmakta veya normal yaşlanma sürecinde değişerek erişkinlerde genel kanser riskine neden olabilmektedir. Aynı zamanda epigenetik düzenleme kanserlerde klonal gelişimi destekleyerek tümör progresyonuna neden olabilmektedir (Feinberg ve Tycko, 2004).

1.7.1 DNA Metilasyonu

Sitozin bazının C5 pozisyonundan modifikasyonu (5mC) memeli somatik hücrelerinde CpG dinükleotidinin yaklaşık %70-80'inde ve bazı embriyonik kök hücrelerin non-CpG sekanslarında gözlenir (Lister R. ve ark., 2009; Li Y. ve ark., 2010). DNA metilasyonu, imprinting, X kromozomu inaktivasyonu veya heterokromatin oluşumu gibi farklı epigenetik fenomenlerin oluşumunda temel oluşturur (Berdasco M. ve ark., 2010). Genellikle promotor bölgelerin DNA metilasyonu, gen ekspresyonu ile ters orantı içerisinde bulunurlar. Ancak promotor bölgelerin %60'ında bulunan CpG dinükleotid bölgeleri bunun istisnasıdır (Sharma S. ve ark., 2010). Bu bölgelerin yüksek CpG yoğunluğu ve genellikle aktivite bölgeleri metilasyon bağımsızdır (Takai D. ve ark., 2002; Gal-Y am E.N ve ark., 2008). Buna rağmen kanser hücrelerinde altta yatan genin sessizleşmesine neden olan promotor CpG adalarının hipermetilasyonuna meyil gözlenmektedir (Egger G. ve ark., 2004).

1.7.2. Histon Modifikasyonu ve Remodeling

Ökaryotik genomların organizasyonunun temelini nukleozom partiküllerinin etrafında yer alan DNA sarmalı oluşturur. Kor histon proteinlerinin çok çeşitliliğe sahip, farklı post-translasyonel modifikasyonları (H2A, H2B, H3 ve H4) spesifik kromatin alanlarında ve bölgelerinde demarkasyona izin verir (Zhou V.W. ve ark., 2011). Histon modifikasyonları dinamik olarak eklenerek veya kaldırılarak kromatinin aktif ve baskılanmış bölgeleriyle bağlantı kurarlar. Günümüze kadar histon proteinleri içerisinde 150'den fazla korunmuş rezidüyü modifiye edebilen onlarca çeşitli histon modifikasyonu tespit edilmiştir (Tan M. ve ark., 2011).

Genellikle asetilasyon veye fosforilasyon gibi belirli histon modifikasyonları, kromatin yapısını histon proteinlerinin net pozitif yükünü değiştirerek DNA sekansındaki bilginin çevirisine ulaşılabileceği düşünülmektedir (Wolffe A.P. ve ark., 1999).

DNA'nın ulaşılabilirliği nukleozomların yapısı ve onların DNA ile belirli standart histonların histon varyantları ile değişiminden veya histon modifikasyonlarından etkilenebilir. Ayrıca DNA zincirinde nükleozomların pozisyonu ve dansitesi ulaşılabilirliğin derecesini belirler. Aktif genlerintranskripsiyon faktörleri için bağlanma sekansları içeren, transkripsiyon başlangıç bölgelerinin üstünde önceden konumlanmış nükleozomlarla değişmiş karakteristik nükleozom silinme alanları (NSA) mevcuttur (Segal E. ve ark., 2006). Baskılanmış genlerin genellikle NSA'dan yoksun olduğu ancak DNA sekansı, transkripsiyon föktörü bağlanması ve kromatin düzenleme kompleksleri çok basamaklı işlemler aracılığıyla lokal nukleozom kompozisyonu ve dansitesini belirlemek üzere çalışmakta olduğu öne sürülmektedir (Bell O. ve ark., 2011).

1.7.3. Kodlanmayan (Non-Coding) RNA

Son yıllarda kodlanmayan RNA'ların, kromatin regülasyonu ve gen ekspresyonundaki önemli modulatörler oldukları açıklığa kavuşmaktadır. Bütün genom ve transkriptom sıralaması protein kodlayan genlerin %2'den azını temsil etmesine rağmen, genomun en az %90'ının aktif olarak transkripte edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle transkriptomun kodlanmayan kısmı gen ekspresyonu ve kromatin düzenlenmesinde yeni bir odak olmuştur (Bertone P. ve ark., 2004; Carninci P. ve ark., 2005; Wilhelm B.T. ve ark., 2008; Kapranov P. ve ark., 2007).

Şu anda kodlanmayan RNA oyuncularından iki ana grup mevcuttur. İlk grupta olan küçük ncRNA'lar uzun prekürsörlerden oluşur. İyi çalışılmış microRNA'lar (miRNA), transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)'lara ek olarak piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA), küçük nükleer RNA'lar (snoRNA) ve diğer az bilinen RNA'ları içerir (Esteller M. ve ark., 2011; Knowling S. ve ark., 2011). 2. grupta yer

alan uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) 200 nt ile 100 kb arasında değişebilen heterojen yapıda mRNA benzeri transkripsiyonu vardır ve proteinler için kodlanmazlar (Brosnan C.A. ve ark., 2009). Fonksiyonel lncRNA'lar gen ekspresyonu, protein komplekslerini birleştirmek ve bunları genomik hedef DNA sekansına konumlandırmak gibi önemli düzenleyici rolleri vardır (Guttman M. ve ark., 2012).

1.7.4. Kanserdeki Değişiklikler

1.7.4.1. Epigenetik Paternlerdeki Değişiklikler

Kanser hücrelerinin epigenomu normali ile karşılaştırıldığında sayısız değişikliklerle karşımıza çıkar. DNA metilasyonundaki değişiklikler genomun geniş kayıpları ve bölgesel DNA metilasyon kazanımlarını içerir. Bunun sonucunda bir taraftan genomik instabilite ve doku spesifik ve kodlanmış genlerin düzenlenmesinde bozukluk meydana gelirken diğer taraftan da hücre siklusu, apopitoz veya DNA tamiri ile ilgili tümör baskılayıcı genlerin promotor CpG adacıklarından hipermetilasyonu ile sessizleşmesine neden olur (Berdasco M. ve ark., 2010; Egger G. ve ark., 2004).

İlginç biçimde CIMP (CpG adacık metilatör fenotipi) glioma ve meme kanserlerinde bulunabilir. Bu, aynı zamanda tümörlerin alt gruplarının çıkarılmasına ve metastatik potansiyellerinin belirlenmesine izin verir (Noushmehr H. ve ark., 2010; Fang F. ve ark., 2011). Genetik mutasyona benzer olarak tümör progresyonu esnasında tümör DNA metilasyonu oranlarını biriktirerek daha yüksek seviyelere çıkarabilir ve bu durumun farklı tümör tiplerinin sınıflandırılmasında faydalı olduğu ispat edilmiştir (Dedeurwaerder S. ve ark., 2011; Hinoue T. ve ark., 2012).

Post-translasyonel histon modifikasyonu aşamasında çok sayıda modifikasyon paterni gözlenmiştir (Fullgrabe J. ve ark., 2011). Bu bölgelerde baskılayıcı heterokromatin kaybı, H4K20me3 ve H4K16ac gibi baskılayıcı histon izlerinin silinmesi olarak yansımaktadır (Fraga ve ark., 2005). Ayrıca H3K27me3'ün DNA

metilasyonu ve farklı kanserlerde genlerin de novo sessizleşmesini desteklediği öne sürülmektedir (Fullgrabe J. ve ark., 2011).

1.7.4.2. Olağandışı Epigenetik Paternlerin Olası Sebepleri

Kromatin dizilimi de dahil olmak üzere çekirdek yapısı tümör hücrelerinde farklılık gösterir ve patologlar tarafından malignitenin tanısında kullanılır.

Kromatin dizilimi moleküler olarak olağandışı kromatin yapısı ve düzeni bozulmuş gen ekspresyonuna yol açan genomik organizasyonun yeniden şekillenmesinde önemli bir potansiyel oluşturur, kanser hücrelerinde olağandışı DNA metilasyonu sonucu ikinci bir yolaktan değişmiş epigenetik paternlerin oluşmasına neden olur (Wen B. ve ark., 2009; Hansen K. D. ve ark., 2011; Berman B. P. ve ark., 2011; Easwaran H. P. ve ark., 2010).

Sonuç olarak değişen epigenetik komplekslerin yorumlanması veya hedefin değişmesi ile kanser epigenomunda değişiklikler gözlenir. O'Hagan ve arkadaşları hücresel oksidatif stresin indüklenmesi ile DNMT ve HDAC içeren komplekslerin oluştuğunu ve zarar gören DNA alanlarında toplandığını göstermişlerdir. Kompleksin bileşenleri, GC fakir alanlardan GC zengin alanlara yönelmişlerdir. Benzer değişikliklerin in vivo inflamatuar modellerde gösterilmesi ile anahtar epigenetik enzimlerin lokalizasyon kaybının kanser hücrelerinde hücresel stres sonucu global veya lokal epigenetik değişikliklere yol açtığı düşünülmektedir (O'Hagan H. M. ve ark., 2011).

1.7.4.3. Glioblastomada Epigenetik Mekanizmalar

Primer GB'ler genellikle daha önce herhangi bir prekürsor neoplazi öyküsü olmadan gelişen neoplazilerdir. Sekonder GB'ler ise 1 ila 10 yıllık bir periyod sonrası astrositom veya oligodendrogliom gibi düşük evreli bir glial tümörden gelişebilir. Histolojik olarak benzer olmalarına rağmen primer ve sekonder GB'lerin genetik değişiklikleri birbirlerinden farklıdır. Yakın zamanda sekonder GB'de tanımlanan

*IDH*1/2 mutasyonların varlığının klinik uygulamalarda alınan yanıtta önemli bir gelişme olarak gösterilmektedir (Caren ve ark., 2013).

Yakın zamanda yayımlanmış iki çalışmada histon proteinleri ve kromatin düzenlenlenmesini kodlayan genlerde bozulma ile pediatrik yüksek evreli gliomalar ve difüz intrensek pons gliomları arasında doğrudan genetik bozulma tanımlanmıştır (Wu ve ark., 2012; Schwartzentruber ve ark., 2012).

P53, RTK/PI3K ve RB/CDK yolaklarında kendiliğinden oluşan genetik bozulmalar, primer GB'lerde sık görülür (McLendon ve ark., 2008; Parsons ve ark., 2008). Ancak primer GB'lerde gen ekspresyonu ve genetik değişiklikler temel alınarak en az 3 veya 4 subtip ortaya çıkmıştır (Phillips ve ark., 2006; Verhaak ve ark., 2010). Bu subtipler gen ekspresyonu izlerine göre 'pronöral', 'nöral', 'klasik' ve 'mezenşimal' olarak isimlendirilmişlerdir. Bu subtiplerin kesin biyolojik farklılıkları, etyolojisi ve hastalığın farklı formlarına ne şekilde yansıdığı veya hastalığın progresyonunda alternatif evreler halen belirsizliğini korumakla birlikte bazı belirli subtiplerde hasta sağkalım süresi ve tedaviye cevabı korelasyon göstermektedir (Phillips ve ark., 2006; Verhaak ve ark., 2010). 'Pronöral' grupta yüksek oranda TP53 ve IDH1 mutasyonları, *PDGFRA* mutasyonu ve artmış ekspresyon gözlenir. Diger subtiplerle karşılaştırıldığında pronöral grupta belirgin olarak daha genç hastalar ve daha yüksek sağkalım oranları gözlenir. 'Klasik' subtipinde temel olarak yüksek oranda *EGFR* sapması ve TP53 mutasyonu olmaması, 'mezenşimal' subtipinde tipik olarak tümör baskılayıcı gen olan NF1 kaybı gözlenir. Nöral grubun ise diğer gruplar arasında en az tanımlanmış ve spesifik bir gen veya yolağı gösterilmemiştir. Bu ayrımları ile GB laboratuvar çalışmaları ile daha detaylı incelenmesi ve hastalığın tedavisinde daha iyi sonuçlar alınabilmesi için hastalığın modellemesinin anlaşılması gerekmektedir.

1.8. Amaç

GB tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi tedavilerinin her birinin hastaların yaşam süresi ve hayat kaliteleri üzerine etkileri oldukça büyüktür. Bu tedavilerden kemoterapötik ilaç olarak TMZ kullanımı son yıllarda artmaktadır. Hastalarda edinilmiş veya kazanılmış TMZ direnci, tedaviyi ve hasta sağkalımını önemli ölçüde etkilemektedir. TMZ direncinin oluşumunda ve gelişiminde MDR1 geni promotor metilasyonunun rolü olabilir. Bugüne kadar GB hastalarının tanı ve tedavilerinde MDR1 geni metilasyonunun rolü hakkında veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, GB tanısı almış hastalarda MDR1 geni metilasyonunun sağkalım ve kemoterapötiklere yanıtı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

2.1.1. Doku ve Periferik Kan Örneklerinden Moleküler Çalışma Öncesi Ön Hazırlığı

Serum Fizyolojik (%0,9 NaCl) Solüsyonu	: Polifleks^{TM}
Steril Plastik Tüpler	: 2 ml (Eppendorf)
Bistüri	: AE marka, karbon çelik, 11 numara
15 ml'lik tüpler	: Sarstedt marka, No: 62.554.502 (15 ml)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	: Applichem marka, No: 6381-92-6.

2.1.2. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyon kiti	:PureLink Genomik DNA Kiti (Life Technologies, K182002)
Etanol	: %96 -100' lük etanol (Merck, No: 100983)
Steril DNase-free mikrosantrfifüj tüpleri	: 2 ml (Eppendorf)
Su banyosu	: Nüve (No:BM15)
Proteinaz K	: 20 mg/ml (Vivantis, No: PC-0712)
RNase A solüsyonu	: 10 mg/ml (Amresco, No: E-866**)**

2.1.3. Bisülfit DNA Modifikasyonu

EZ DNA methylation-Gold^{TM} kit

DNA modifikasyonu için EZ DNA methylation-Gold^{TM} modifikasyon kiti kullanılmıştır. Kitin ilgili protokolü öncesinde bir takım hazırlıklar yapılması gerekmektedir. Bu hazırlık aşaması aşağıda özetlenmiştir.

2.1.4.Agaroz Jel Elektoroforezi

Agaroz (Applichem, standart)

Tris-Borik Asit EDTA tampon (TBE) (pH:7,5)	: Tris baz (Amresco) Borik asit (Applichem) Na_2EDTA (Merck)
Yükleme Tamponu	: 1XTBE tampon 100ml Gliserol (Merck) Fenol Blue (Mavi)
Etidyum Bromür	: 10mg/ml

Moleküler Ağırlık Belirleyicisi-1 : VC, pBR322/HaeIII, 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80 baz çifti

2.2. Doku ve Periferik Kan Örneklerinin Moleküler Çalışma Öncesi Ön Hazırlığı

SF içerisinde Nöro-Onkoloji laboratuarına getirilen tümör dokuları laminar akım kabini içerisinde dikkatlice çıkarılarak, nekrotik ve damarlı bölgeleri temizlendi ve ardından -190°C'lik sıvı azotla muamele edilerek, sıvı azot tankına yerleştirildi. Kontrol amaçlı alınan periferik kan örnekleri, içerisinde 100 µl EDTA (0,5M, pH=8) bulunan iki ayrı 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılıp DNA izolasyonu için +4°C'ye kaldırıldı.

2.3. Tümör Dokusundan Genomik DNA İzolasyonu

Tümör Dokusundan Genomik DNA izolasyonunda "PureLink Genomik DNA izolasyon Kiti" kullanılmıştır.

A.Lizat Hazırlığı

- Su banyosu ya da heat blok u 55 °C' ye getirildi.
- Steril mikrosantrifüj tüpüne doku örneğini koyuldu. (25 mg'a kadar).

- Üzerine 180 µl PureLink Genomik Kesim Tamponu ve 20 µl proteinaz K (Kitle beraber gelen) ilave edildi. Dokunun tampon karışımı içerisine tamamıyla gömüldüğünden emin olundu.
- Lizis tamamlanana kadar (1-4 saat) karışımı 55 °C de arada vorteksleyerek inkübe edildi. Büyük doku parçaları için lizis reaksiyonunun gece boyunca sürdürüldü.
- Lizatı oda sıcaklığında (RT) maksimum güçte 3 dakika boyunca santrifüj ederek içindeki muhtemel partikülleri uzaklaştırıldı.
- Kitte bulunan RNaz dan 20 µl alıp lizata eklendi, kısa bir vorteksle iyice karışıtırıldı ve RT'de 2 dakika inkübe edildi.
- Üzerine 200 µl pureLink Genomik Lizis/Bağlanma tamponu eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
- Lizata 200 µl %96-100 etanol eklendi ve 5 saniye vorteksleyerek iyice karıştırıldı.
- Binding DNA kısmına geçildi.

B. Spin Kolona DNA bağlayarak izolasyon

PureLink genomik Yıkama Tamponu 1 ve PureLink genomik Yıkama Tamponu 2'ye her bir şişedeki talimata uygun olarak %96-100'lük etanol ilave edildi. İyice karıştırıldı. Tampon şişelerinin üstündeki etanol ilave edildi kutucuğunu işaretlendi. Etanollü yıkama tamponları oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Binding DNA (DNA'yı bağlama)

- Kolleksiyon (Toplama) tüpündeki PureKLink Spin-kolonunun paketinden çıkarıldı.
- PureLink Genomik Lizis/Bağlanma Tamponu ve etanolle ile hazırlanmış lizatı (~640 µl) PureLink Spin Kolonuna ilave edildi.
- Kolon oda sıcaklığında 1 dakika boyunda 10.000x g'de santrifüj edildi.
- Toplama tüpünü atıldı ve spin koloni kitte bulunan temiz kolleksiyon tüpü içerisine yerleştirildi.
- DNA yıkama basamağına geçildi.

C. DNA Yıkama

- Kolona etanolle hazırlanmış Yıkama Tamponu 1'den 500 µl ilave edildi.
- Kolonu oda sıcaklığında 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpünü atıldı ve spin kolonu yeni-temiz bir PureLink toplama tüpüne yerleştirildi (kitte bulunmaktadır).
- Kolona etanolle hazılanmış Yıkama Tamponu 2'den 500 µl ilave edildi.
- Kolonu maksimum hızda ve oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünü atıldı.
- DNA Elüsyonu kısmına geçildi.

D. DNA Elüsyonu

- Kolonu steril bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 25-200 µl PureLink Genomik Elüsyon Tamponunu kolona ilave edildi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Kolonu oda sıcalığında 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında tüpte pürifiye olmuş genomik DNA bulunmaktadır.
- Daha fazla DNA'yı toplamak için ilk elüsyondaki elüsyon tamponu hacmi ile aynı miktar tamponla ikinci bir elüsyon basamağını kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpü içerisine alınarak gerçekleştirildi. Genomik DNA bir sonraki deney basamaklarında kullanılıncaya kadar -20°C' de saklandı.

2.3.1. Genomik DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

- Genomik DNA'nın kalitatif analizi için elde edilen DNA'dan 3-5 µl'si etidyum bromür eklenmiş %1'lik agaroz jel de yürütüldü. Yürütme sonunda fragmantasyon gözlenmez ise bu elde edilen DNA kalitesinin kalitatif olarak iyi olduğunu göstermektedir.
- Genomik DNA'nın kantitaif analizi için, çözülmüş DNA örneğinden 5 µl alınıp quartz tüp içinde dH_2O ile hacmi 2 ml'ye tamamlandı, iyice karıştırıldı.
- Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçüldü. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak DNA' nın saflığı belirlendi.

260:280 oranı DNA'nın saflığının hesaplanmasında alınan temel kriterdir.

- Aşağıdaki formül kullanılarak elde edilen DNA'nın konsantrasyonu belirlenir.

  Konsantrasyon (µg/µl) = OD260 x 0.05 x 400 (sulandırma katsayısı)

2.4. Periferik Kan Örneğinden Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmamıza katılan gönüllü bireylerden alınan 5ml periferik kandan DNA izole edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu aşağıda belitrtilen standart fenol-kloroform yöntemiyle yapılmıştır (Sambrook ve ark., 1982).

- $2x10^6$ hücre 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatan uzaklaştırıldıktan sonra pelet 2 kez PBS ile yıkandı.
- 300µl lizis solüsyonu (5mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH=8,0, 100mM NaCl, %0,5 SDS (sodium dodecyl sulfate), 0,5 mg/ml proteinaz-K) ile yeniden süspanse edildi.
- Vortekslenen karışım bir gece 37^0C'de etüvde inkübe edildi.
- Ertesi gün solüsyon üzerine eşit hacimde doymuş fenol eklenip karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatan temiz bir tüpe alınıp üzerine eşit hacimde kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) eklendi ve karıştırıldı.
- 1500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatan temiz bir tüpe aktarıldı.
- Solüsyon üzerine eşit hacimde saf etanol ilave edildi ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın presipite olması beklendi. Presipite olan DNA mikropipet ile 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne aktarıldı.
- Bir kez saf etanol, bir kez de %70 etanol ile 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi, süpernatan atıldı ve DNA kurumaya bırakıldı.
- Kurutulan DNA, 10mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA eklenerek yeniden süspanse edildi.

2.4.1. Genomik DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Elde edilen DNA'nın miktar ve saflığının saptanabilmesi için 2.2.1.1.'de belirtilen yöntem periferik kandan elde edilen genomik DNA'ların analizinde aynen tekrar edilmiştir.

2.5. Genomik DNA Modifikasyonu

Genomik DNA'dan metilasyon analizi için öncelikle DNA'nın bisülfit modifikasyona maruz kalması gerekmektedir. Bisülfit ile muamele edilen genomik DNA'larda metile sitozinler değişmeden kalırken metile olmayan sitozinler urasile döner. Urasile dönen sitozinlerde PZR reaksiyonunda ilgili gen bölgesi çoğaltılırken baz dizilimi açısından karşısına timin bazını alır. PZR reaksiyonunda hem metile sitozinler hem de metile olmayan sitozinlerin tespiti için uygun primerler kullanılarak ilgili genin metilasyon durumu belirlenir. Bu DNA modifikasyon işlemi için çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir. Bu çalışmamızda, EZ DNA methylation-Gold^{TM} Kit kullanılmıştır. Bu kitin çalışma protokolü aşağıdaki gibidir.

- Ortalama 500-pg-2 ug DNA içeren örnekler kullanıldı.
- CT dönüştürme belirtecinin hazırlanması: CT Dönüştürme Belirteci katı bir karışım olarak kit içerisinde bulunmaktadır ve mutlaka ilk kullanımdan önce hazırlanmalıdır.

Hazırlık Aşaması:

- CT dönüştürme belirteci tüpüne 900 ul dH2O, 300 ul M-dilüsyon tamponu (M-Dilution Buffer) ve 50 ul M-Çözünme tamponu (M-Dissolving Buffer) eklendi. Sık sık vorteksleyerek ve sallayarak 10 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı.
- M-wash Tamponunun Hazırlanması: Kullanmadan önce 6 ml m-wash buffer konsantresine 24 ml %100 etanol eklendi ya da 96 ml %100'lük etanol 24 ml M-wash tamponuna ilave edildi.
- Bir PCR tüpü içerisinde 20 ul'lik DNA örneğine 130 ul CT dönüştürme belirteci (CT conversion reagent) eklendi. Eğer DNA hacmi 20 ul'den azsa

üzerine su ilave ederek bu hacme tamamlandı. Örneği parmak ile fiske vurarak ya da aşağı yukarı pipetleyerek karıştırıldı, hafif ve kısa bir santrifüjle örneği tüpün dibinde toplandı.

- Tüp PCR'a yerleştirildi ve aşağıdaki basamaklar takip edildi:
    a. 98°C'de 10 dakika
    b. 64 °C'de 2.5 saat
    c. 20 saate kadar 4°C'de muhafaza
- Zymo-Spin™ IC kolonuna 600 ul m-bağlanma tamponu eklendi ve kolonu kitte bulunan kolleksiyon tüpüne yerleştirildi.
- Basamak 2'deki örnekler m-binding buffer bulunan Zymo-Spin™ IC kolonuna yüklendi, kapağı kapatılarak ve kolon birçok defa ters çevirerek karıştırıldı.
- 30 saniye en yüksek hızda (≥10000xg) santrifüj yapıldı ve flow-trough sıvısı atıldı.
- Kolona 100 ul m-wash buffer eklendi. En yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi.
- Kolona 200 ul m-desulphonation buffer eklendi ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15-30 dakika bırakıldı. İnkübasyon sonrasında en yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi.
- Kolona 200 ul m-wash buffer eklendi. En yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi, yeniden 200 ul m-wash buffer eklendi ve en yüksek hızda 30 saniye santrifüj edildi.
- Kolon 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne yerleştirildi. Kolon matriksine direkt olarak 10 ul m-elution buffer eklendi. DNA'yı elüe etmek için 30 saniye en yüksek hızda santrifüj edildi.

2.6. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)

Bisülfit modifikasyona maruz bırakılan genomik DNA'larda MDR1 gen metilasyonunun araştırılması amacıyla MS-PZR yapıldı. MS-PZR sonucunda elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde (TBE tamponunda) yürütüldü. Metilasyon varlığı (M) 230 bp ve metilasyon yokluğu (U) 240 bp'lik ürün varlığıyla tanımlandı. Her iki allelinde metilasyon bulunmama durumu UU genotip, yalnızca bir allelinde

metilasyon bulunması UM (hemimetile) genotip olarak tayin edildi (Şekil 2.1. ve Çizelge 2.1.)

MDR1 gen metilasyonu için kullanılan primerler. Aşağıda dizisi belirtilmiş olan primerler MDR1 promtor bölgede 6 adet CpG adasını içermektedir ve bu bölge MDR1 gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir (Tahara ve ark., 2010).

Metilasyon için,

M F: GGG CGT GGG TTG AGT ATA GTC GTT TC

M R: CGC TCC TTA AAA CAA CCA CCA AAA CG

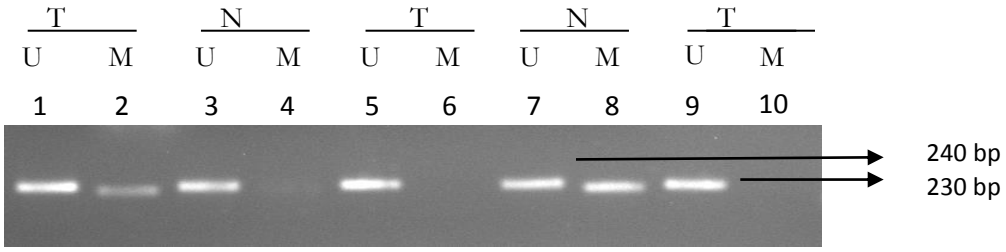
Unmetilasyon için,

U F: GGG TGT GGG TTG AGT ATA GTT GTT TT

U R: CCA ACT TTA CAT ACC CCT ACC TCA CA

Çizelge 2.1. MDR1 metilasyon analizi için PZR şartları

Reaksiyon Karışımı M ve U karışımlar ayrı ayrı hazırlanır	***MDR***	
Genomik DNA	3 µl	Reaksiyon Döngüsü,
Primerler, M veya U (10 pmol/µl)	0,4 µl	1-95°C 10' İlk denatürasyon
dNTP(10 mM)	0,5 µl	2-95°C 45"
$MgCl_2$ (25mM)	1,5 µl	3-57,8°C 45"
Hot start Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl	4-72°C 45"
Tampon (-$MgCl_2$,10X)	2,5 µl	5-72°C 5'
Toplam Hacim	25 µl	40 döngü



Şekil 2.1. Hastaların tümör ve normal dokularına ait metilasyon paterni örnekleri. 1,2,3 ve 4. kolonlarda aynı hastanın tümör ve normal dokularına ait metilasyon bantları. Tümör dokusunda UM iken normal doku UU. 5,6,7 ve 8. kolonlarda: Başka hastanın tümör ve normal dokularına ait metilasyon bantları. 9 ve 10. kolon: Yalnızca tümör dokusu olan hastanın metilasyon paterni.

2.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak kategorik değişkenlerde frekans (yüzde), ölçümle elde değişkenlerde ortalama (± standart sapma) [ortanca (minimum-maksimum)] verilmiştir. Tümörlü dokularda ve periferik kanda metilasyon oranları McNemar testi, gen ekspresyonu miktarları bağımlı gruplarda T testi ile değerlendirilmiştir. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Glioblastoma Dokularının Temini, Toplanması ve Hasta Bilgilerinin Yorumlanması

Tez çalışmamız, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 13/01/2014 tarihinde alınan kurul onayından (karar no: 01-14-14) sonra başlamıştır. Bu tez çalışmasının hasta grubunu klinik ön değerlendirme sonucu GB şüphesi taşıyan ve bu nedenle ameliyat edilen bireyler ve 2009-2013 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalında ameliyat edilmiş doku örnekleri tanı için Patoloji Ana Bilim Dalına gönderilmiş olan GB hastalarına ait preparatların parafinize edilmiş tümör dokularından genomik DNA izolasyonu yapılarak MDR1 geni promotor metilasyon analizi ve RNA elde edilebiliyorsa ilgili genin ekspresyonu çalışılabilen hastalar oluşturmaktadır. Ameliyat öncesinde, hastalığının ön tanısı hakkında bilgi sahibi olan bireylere çalışma hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastalardan ameliyat sırasında doku örneği ve periferik kan örnekleri alınmıştır. Bu kapsamda, 54 hastadan doku örneği ve periferik kan alınmış ve bunlarda MDR1 geni promotor metilasyonunun varlığı araştırılmıştır. Bu hastaların patoloji sonucunun GB'den farklı gelmesi ve takiplerinde kliniğimize başvurmamaları sonucunda detaylı klinik veriye ulaşılamaması nedeniyle 21 tanesi çalışmadan çıkarılmıştır. Ameliyat sonrasında, geri kalan 36 hastada Ankara Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından GB hastası olduğu rapor edilmiştir.

Dokuların ve periferik kan örneklerinin alınması her hastada birbirine benzer işlemlerle oluşmuştur. Ameliyat esnasında tümör dokusunun patolojiye gönderilen kısmı dışında 4 cm^3 boyutunda bir tümör parçası alınmıştır. Ayrıca hasta genel anestezi aldıktan sonra açılan damaryolundan 4 cc periferik kan örneği steril edtalı tam kan tüpüne alınarak -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tümör dokusu içerisindeki vasküler bölgeler ve nekrotik dokular çıkarılarak steril şartlarda temizlenmiştir. Temizlenen doku parçası doku kültürü sıvısı (DMEM) içerisinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Nöroonkoloji Laboratuvarı sıvı azot tankına yerleştirilerek muhafaza edilmiştir. Doku preparat sayısı 20'ye ulaştığında ve her

dokunun Ankara Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından GB hastası olduğu rapor edildiğinde 20 doku ve aynı hastalara ait 20 periferik kan örneği setler halinde soğuk zincir transferi ile Van Yüzüncüyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalına gönderilmiştir. Tümör dokusu alınıp periferik kan örneği alınamayan veya periferik kan örneği metilasyon sonucu gösterilemeyen 16 hasta da çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.Glioblastoma Hastalarının Klinik Verileri

54 hastadan doku örneği ve periferik kan alınmış ve bunlardan MDR1 geni promotor metilasyonuna bakılmıştır. Bu hastaların patoloji sonucunun GB'den farklı gelmesi veya takiplerinde kliniğimize başvurmamaları sonucunda detaylı klinik veriye ulaşılamaması nedeniyle 21 tanesi çalışmadan çıkarılmıştır. Ameliyat sonrasında, geri kalan 36 hastada Ankara Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından GB hastası olduğu rapor edilmiştir.

Tez kapsamında MDR1 gen metilasyonu araştırılan hastaların 36 tanesinde detaylı klinik veri, MDR1 metilasyon sonuçlarına ulaşılmıştır. Hastalarımızın ortalama yaşı 55,4±16,8'dir [ortanca 54,5 (20-82)] ve 10'u kadın 26'sı erkektir.

Tüm hastaların takipleri süresince ortalama sağkalımı 476,5±61 gün olarak saptanmıştır.

Hastaların tümör yerleşim yeri ilk iki sırada % 30,6 ile frontal lob ve paryetal lob olarak izlenmiştir. Temporal lob yerleşimli tümör yüzdesi %19,4 ile üçüncü sırada, occipital lob yerleşimi ise %16,7 ile dördüncü sırada yer almaktadır. (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. Hastaların tümör yerleşim yerleri dağılımı

Yerleşim Yeri	Hasta sayısı	Yüzde
Frontal	11	30,6
Temporal	7	19,4
Paryetal	11	30,6
Occipital	6	16,7
Ventriküler	1	2,8
Total	36	100

Hastaların hastaneye başvuru anında ilk semptomları %34,3 ile en sık baş ağrısı olmakta, sırasıyla % 20,0 ve %14,3 ile ekstremite kuvvet kaybı ve nöbet geçirme onu takip etmektedir.

Hastaların 29 tanesinde (%80,6) gross total eksizyon, 7 tanesinde (%19,4) subtotal eksizyon yapılmıştır.

Hastalar ile ilgili diğer klinik bilgilerden Çizelge 3.2. de bahsedilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmaya katılan hastaların klinik verileri (ilk semptom 1: Baş ağrısı 2: Baş dönmesi 3: Ataksi 4: Görme defisiti 5:Konuşma bozukluğu 6: Nöbet 7: Kuvvet kaybı 8: İzole kranial sinir felci 9: Bulantı-kusma)

Hasta	Yaş	Cinsiyet	İlk semptom	Lezyon yerleşim yeri	Yaşam süresi	Eksizyon derecesi	Durum	Nüks	Radyoterapi	Kemoterapi	MDR1 tm	MDR1 periferik
1	29	E	1	Frontal	1050	Grosstotal	Sağ	Yok	Var	Var	UM	UM
2	82	E	7	Paryetal	69	Grosstotal	Sağ	Yok	Yok	Yok	UM	UM
3	81	K	4	Frontal	85	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	-
4	70	K	7	Occipital	167	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	UM
5	32	K	1	Frontal	902	Grosstotal	Sağ	Yok	Var	Var	UM	UM
6	50	E	8	Paryetal	25	Subtotal	Sağ	Yok	Yok	Yok	UM	UM
7	66	E	7	Frontal	1182	Grosstotal	Sağ	Var	Var	Var	UM	-
8	59	E	6	Paryetal	124	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	UM
9	51	K	7	Paryetal	576	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	UM	UM
10	61	E	1	Temporal	625	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UU	UM
11	59	E	1	Temporal	574	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	UM
12	45	E	9	Frontal	387	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UU	UM
13	70	E	7	Temporal	452	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	UM
14	72	E	5	Occipital	201	Grosstotal	Sağ	Yok	Var	Var	UM	UM
15	65	K	1	Paryetal	344	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	UM
16	80	K	4	Frontal	538	Subtotal	Ex	Yok	Var	Var	UU	UU
17	58	E	6	Paryetal	31	Subtotal	Ex	Yok	Yok	Yok	UM	UM
18	82	E	7	Occipital	59	Grosstotal	Sağ	Yok	Var	Var	UM	UM
19	79	E	1	Paryetal	551	Grosstotal	Sağ	Yok	Var	Var	UM	UM
20	81	E	5	Occipital	43	Grosstotal	Ex	Var	Yok	Yok	UM	UM
21	58	E	1	Temporal	503	Subtotal	Ex	Var	Var	Var	UM	UM
22	43	E	1	Frontal	160	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	-
23	54	E	7	Occipital	75	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	MM	-
24	43	K	1-6	Frontal	450	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	UM	-
25	44	E	6	Paryetal	524	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	UM	-
26	42	E	-	Paryetal	260	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	MM	-
27	20	K	5	Ventriküler	650	Subtotal	Ex	Var	Yok	Yok	UM	-
28	52	E	6	Frontal	620	Subtotal	Ex	Var	Var	Var	UM	-
29	22	E	1	Frontal	5	Subtotal	Ex	Var	Yok	Yok	MM	-
30	53	K	1	Paryetal	960	Grosstotal	Sağ	Var	Var	Var	UU	-
31	59	E	4	Temporal	540	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	UM	-
32	55	E	1	Occipital	525	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	UM	-
33	42	E	1	Temporal	624	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	UM	-
34	48	E	6	Paryetal	105	Grosstotal	Ex	Var	Var	Var	MM	-
35	53	K	1	Frontal	246	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	-
36	36	E	1	Temporal	209	Grosstotal	Ex	Yok	Var	Var	UM	UM

Hastalarımızda kemoterapötik direnç gelişimi tümör dokularından elde edilen MDR1 promotor metilasyonuna göre değerlendirildiğinde, kemoterapötik direnç gelişimi ile metilasyon durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05) (Çizelge 3.3.)

Çizelge 3.3. Hastaların tümör örneklerindeki MDR1 promotor metilasyonu ile kemoterapötik direnç gelişimi arasındaki ilişki

	Tümör Örneklerinde Metilasyon Durumu			
Kemoterapötik Direnç	UU	UM	MM	Toplam
Var	1	11	4	16
Yok	3	17	-	20

MDR1 promotor metilasyonu, çalışmaya dahil edilen 36 hastanın 4 (%11,1)'ünde UU, 4 (%11,1)'ünde MM olarak saptanırken geri kalan 28 adet (%77.8) tümör dokusunda ise UM olarak saptanmıştır. Tümör dokularında metilasyon saptanmayan (UU) 4 hastanın 2'sinin periferik kanındaki metilasyon durumu UM (hemimetile) olarak saptanmıştır. Ayrıca tümör dokusunda MDR1 geni hemimetile (UM) olarak saptanan 28 hastanın 11'inin periferik kan kontrollerinde MDR1 metilasyonu saptanmamıştır. (Çizelge 3.4.)

Metilasyon bazında değerlendirildiğinde hastaların tümör dokularının yüzde 50'sinde MDR-1 promotor metilasyonu saptanmıştır.(Çizelge 3.4)

Çizelge 3.4. Metilasyon bazında MDR1 promotor metilasyon sayıları ve oranları

	UU	UM	MM	U	M
Tümör Dokusu	4 (%11)	28 (%77)	4 (%11)	36 (%50)	36 (%50)
Periferik Kan	1 (%5)	19(%95)	0 (%0)	21 (%52,5)	19 (%47,5)

Çalışmaya dahil edilen 36 hastada elde edilen bilgilerde ortalama sağkalım süresi MDR1 metilasyonuna bakılmaksızın ortalama 476,5±61 gün olarak saptanmıştır (p>0,05). Hastaların MDR1 geni promotor metilasyonları sağkalım süreleriyle karşılaştırıldığında ise her iki allelinde metilasyon saptanan MM genotipine sahip

hastalarda sağkalım süresi 111,2±53 gün, hemimetile grupta (UM) 500,5±69 gün ve metilasyon gözlenmeyen tümör dokularında ise 627,5±105 gün olarak saptanmıştır. (Çizelge 3.5.)

Çizelge 3.5. Ortalama ve ortanca değerler ile MDR1 tümör metilasyon ve sağkalım süreleri karşılaştırılması

MDR1 Tümör Dokusu Metilasyonu	Sağkalım Süresi (gün) Mean ± SS	Sağkalım Süresi (gün) Median ± SS
UU	627,500±105,004	538,000±119,000
UM	500,541±69,871	524,000±58,318
MM	111,250±53,827	75,000±50,000

MDR1 metilasyonu ile sağkalım süreleri karşılaştırıldığında MDR1 metilasyon durumunun sağkalıma olan etkisinin p>0,001 aralığında anlamlı olduğu gözlenmektedir.

GB tanısı alan hastaların tanı sonrası klinik takiplerinde MM genotipli hastaların %100 ünde rekürrens saptanmıştır. Rekürrensi olup unmetile (UU) hastalarda bu oran %25, rekürrensi olup hemimetile (UM) hastalarda ise %39,3 olarak saptanmıştır. (Çizelge 3.6.)

Çizelge 3.6. Rekürrens tespit edilen glioblastoma hastalarında metilasyon analizi

			MDR1 Tümör Dokusu			Toplam
			UU	UM	MM	
Rekürrens	Var	Sayı	1	11	4	16
		Rekürrens %	%6,3	%68,8	%25,0	%100
		MDR1 tm%	%25	%39,3	%100	%44,4
	Yok	Sayı	3	17	0	20
		Rekürrens %	%15	%85	%,0	%100
		MDR1 tm%	%75,0	%60,7	%,0	%55,6
Toplam		Sayı	4	28	4	36
		Rekürrens %	%11,1	%77,8	%11,1	%100
		MDR1 tm%	%100	%100	%100	%100

4. TARTIŞMA

Kanser 2012 yılı içerisinde yaklaşık 14 milyon yeni tanı ve 8 milyon kanser bağlantılı ölüm ile ülke veya bölgelerdeki popülasyonları etkileyerek morbidite ve mortalitenin ana sebeplerinden birini oluşturur. Büyük bir hızla globalleşen dünya; toplumsal, ekonomik ve yaşam tarzı değişiklikleri ile kanser yükünün ölçek ve profilini daha da derinleştirmekte ve kanser kontrolü ve önlenmesi için etkili ve özel stratejilerin oluşturulması gerekmektedir.

Beyin tümörleri ise tüm kanser yükünün %2'lik bir kısmını oluşturmasına rağmen belirgin morbiditeye neden olurlar ve santral sinir sisteminin histolojik olarak en sık rastlanan tipi olan gliomalarda prognoz halen kötüdür (Dünya Kanser Raporu, 2014). GB'lerin oluşum nedeni/nedenleri net olarak tanımlanamamıştır, küratif bir tedavisi yoktur ve tanı sonrası ortalama yaşam süresi çok kısadır (Rosell ve ark., 2008; Prasad ve Haas-Kogan, 2009; Losieau ve ark., 2009). GB'lerin karakteristik özelliklerinin ortaya konması ile ilgili birçok araştırma yapılmaktadır ve bu araştırmalar GB'lerin her açıdan (klinik, genetik, tedavi) heterojen bir yapısının olduğunu işaret etmektedir (Adamson ve ark., 2009; Krakstad ve Chekenya, 2010). Dolayısıyla klinik ve genetik yapısıyla heterojen karakterli bir hastalığın tedavisinde genel bir strateji sunmak GB için çok doğru bir bilimsel yaklaşım olmayabilir.

GB'de tedavi öncesinde ve tedavi sırasında kemoterapötik direnç gelişebilmektedir. Bu direncin altında yatan mekanizmalardan biri MDR1 proteini olabilir. MDR1 proteini hücre membranında yerleşerek ilaçların hücre içine alınımı engellemektedir. Yüksek MDR1 eksprese eden hücrelerde, hücre içine ilaç alımının MDR1 ekpsresyonu düşük olan hücrelere göre daha düşük düzeyde gerçekleşmesi beklenmektedir. Bazı kanserlerde MDR1 ekspresyonu yüksek olduğu bildirilmektedir (Tahara ve ark., 2010; Ambudkar ve ark., 2003; Chen ve ark., 1990; Takanishi ve ark., 1997; Scotlandi ve ark., 1999). MDR1 ekpsreyonunu düzenleyen en önemli mekanizmalardan biri de DNA metilasyonudur. Genin promotor bölgesinde yer alan CpG adacıklarının metilasyonu sonucu genin ekspresyonu azalmaktadır. MDR1 metilasyonu birçok kanser türünde saptanmış ve metilasyon ile bazı kanserlerde hastalığın prognozu etkileyebileceği hatta prognoz takibinde

biyomarker olabileceği bildirilmiştir (Podolsky-Renic ve ark., 2013). Ancak literatürde GB hastalarında MDR1 metilasyonunun rolüne ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmamızda GB hastalarının tedavi süreçlerinde MDR1 metilasyonunun olası rolü araştırılmıştır. Tez çalışmamız, GB hastalarında MDR1 geni promotor metilasyonunun araştırıldığı ilk çalışmadır.

Astrositik tümörlerde MDR1 ekspresyonunun farklı yöntemlerle varlığının araştırıldığı az sayıda çalışma vardır. Von Bossayni ve ark. (1997) 53 serilik astrositik glioma olgusunda immunhistokimya aracılığıyla düşük evreli astrositomlarda %31, buna karşın yüksek evreli lezyonlarda %88 oranında Pgp boyanması tespit etmişlerdir. Buna rağmen Pgp seviyesi ile proliferatif aktivite arasındaki doğrudan ilişki gliomalarda Pgp ekspresyonu bakılan her çalışmada sabit bir bulgu olmamaktadır. Yokogami ve ark. (1998) malignite derecesi arttıkça Pgp seviyelerinin düştüğünü 16 serilik tedavi edilmemiş glioma olgusunda göstererek Pgp'nin tümör evresi ile ters orantılı olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu tez çalışmamızda değerlendirilen tüm olgular 4. Derece GB olgusudur. Bu olgularda da MDR1 ekspresyonunu doğrudan etkileyen DNA metilasyonu tümör örneklerinde (%11,1) normal örneklere göre (%5) daha yüksek saptanmıştır.

Abe ve ark. (1998) tarafından yapılan ve az sayıdaki (9) GBM hastasının değelendirildiği çalışmada, gliomalarda kemoterapötik dirençte MRP'nin Pgp'ye göre daha önemli rol oynadığı, glioma dokularında Pgp ekpsreyonunun düşük olabileceği ve Pgp'nin kan beyin bariyeri ilaç taşınımında daha önemli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Abe ve ark. (1998) MDR1 ekpsresyonun glioma tedavisindeki prognostik değeri için kemoterapi öncesi daha fazla sayıda hastanın klinik verileriyle değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışması, glioma hastalarında MDR1 ekpsresyonunun varlığına işaret eden promotor metilasyonun klinik takiple birlikte araştırıldığı ilk çalışmadır. Tez çalışması sonucunda MDR1 promotor metilasyonu tümör dokularında yüksek oranda (%50) bulunmuştur. Bu sonuç, Abe ve arkadaşlarının sonucuyla uyumludur.

Yegnasubramanian ve ark. (2004), Bastian ve ark. (2008) ve Ellinger ve ark. (2008) tarafından prostat kanserli olgular değerlendirilerek yapılan MDR1 gen metilasyon çalışmasında yüksek oranda (sırasıyla %88, %83,3 ve %80) MDR1 metilasyonu saptadıkları bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da MDR1 metilasyonu yüksek oranda (%50) bulunmuştur.

Qiu ve ark. (2007) nöroblastom hastalarından alınan örneklerde yapılan MDR1 metilasyon çalışması sonucunda MDR1 geni transkripsiyonel inaktivasyonunu nöroblastoma tümörlerinin progresyonu ve patogenezi ile ilişkilendirmişlerdir. Tez çalışmamızda da metilasyon saptanan hastalarda tümör progresyonu saptanmıştır. Bu nedenle Qui ve arkadaşlarının çalışması bizim sonuçlarımızla paralellik göstermiştir.

Schaich ve ark. (2009) tarafından insan kronik myeloid hücre serilerinde yapılan çalışmada TMZ sitotoksisitesinde ve direncinde MDR1 ekspresyonunun önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, TMZ direnci ile MDR1 metilasyon durumu arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Bu farklılığın değerlendirilen biyolojik materyallerin birbirinden tamamen farklı genetik yapıya sahip olmaları ve değerlendirilen hasta sayısının az olmasından kaynaklanabilir.

Tahara ve ark. (2010), gastrik kanserlerde yüksek oranda MDR1 geni promotor metilasyonu saptandığını ve MDR1 metilasyonunun gastrik kanser oluşumunda etkili olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Tahara ve ark. (2010), MDR1 metilasyonunun ve ekpsresyon azalmasının kanserde hücre proliferasyon artışı ile korele olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışmasında da GB hastalarında yüksek oranda MDR1 metilasyonu saptanmış ve metilasyon saptanan hastaların tamamında rekürrens tespit edilmiştir. Ki-67 gibi hücre proliferasyon arttırıcıların ekspresyonlarının MDR1 geni ekspresyonuyla ters ilişkide olduğu bilinmektedir (Tahara ve ark., 2010). Metilasyon saptanan hastalarımızda hücre proliferasyonu, Ki-67 gibi hücre proliferasyon tetikleyilerce tetiklenmiş ve bu yüzden de rekürrens gelişmiş olabilir. Bu açıdan sonuçlarımız, Tahara ve arkadaşlarının (2010) sonuçları ve önerileriyle uyumludur.

Çalışmamızda GB hastalarında mevcut olabilecek kemoterapötiklere direnç gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen MDR1 geni promotor metilasyonu araştırılmıştır. Elde edilen bulgular GB hastaları arasında ve hatta aynı bireyin farklı örnekleri arasında bile MDR1 geni metilasyonunun farklı olabileceği saptanmıştır. Ancak bu denli genetik heterojenite gösteren GB hastalarında benzer tedavi modaliteleri uygulanmaktadır. GB tedavisinde, genetik yapısı farklı hastalarda aynı tedaviler uygulanması yerine kemoterapötik direnç geliştirebilecek genetik belirteçlerin belirlenmesinden sonra bireysel kanser tedavisi uygulanması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında da genetik yapıları dikkate alınarak bireysel tedavi modalitelerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya konmuştur. Ayrıca tez çalışmamızda GB dokularında araştırılan MDR1 geni metilasyonunun hastaların rekürrens, sağkalım ve kemoterapiye verdikleri yanıtlar gibi klinik veriler ile karşılaştırıldığında MDR1 geni metilasyon varlığının sağkalım ve rekürrens oluşumunda prognozu daha kötüye götürdüğü gösterilmiştir. Bu tez çalışması, elde edilen tüm verilerle birlikte GB'de MDR1 geni promotor metilasyonunun araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır.

5. SONUÇ

- GB hastalarında MDR1 her iki allelinde metilasyon (MM) gözlenen grupta sağkalım sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.001$) oranda kısa olduğu gösterilmiştir.
- Sağkalım süreleri kısa olmasına rağmen her iki allelinde metilasyon (MM) gözlenen hastaların hepsinde (%100) kemoterapi ve radyoterapiye rağmen rekürrens gelişimi izlenmiştir.
- GB'nin heterojen genetik yapısı nedeniyle her hastaya standart bir doz kullanmak yerine, hastaların kemoterapötik ajan ile tedavi öncesinde tedavide direnç oluşturabilen genlerin epigenomik yapılarının ve ekspresyon miktarlarının araştırılmasıyla tedavinin belirlenmesi gerektiği önerilmektedir.
- GB hastalarında kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen dirençte farklı epigenetik mekanizmların araştırılması GB tedavisinde yeni yaklaşımların önünü açacaktır.
- Çalışmamızda GB hastalarına ait tümör dokusu ve periferik kan toplanması devam etmekte, çalışmaya dahil edilen hasta sayısı arttıkça farklı epigenetik mekanizmalar daha çok gün ışığına çıkacaktır.
- GB hastalarının genomik heterojeniteye sahip olduğu görüşü bu çalışmayla desteklenmiştir.
- GB hastalarının TMZ duyarlılıklarında MDR1 gen metilasyonunun önemli olduğu gösterilmiştir.
- MDR1 geni metilasyonu ile GB arasındaki olası ilişki ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.
- GB hastalarında MDR1 geni metilasyonuna bakılarak sağkalım süresi hakkında öngörü oluşturulabileceği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

ÖZET

Primer Glioblastoma (DSÖ 4. Derece) Hastalarında MDR Geni Ekspresyon ve Metilasyonu

Erişkinlerde görülen en sık ve en malign beyin tümörü glioblastomadır (GB). GB hastalarında günümüzde standart tedavi biçimi olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulanır. Prognozun kötü olması nedeniyle tek başına her üç tedavi de yeterli olmamakla birlikte üç tedavi yaklaşımının sırasıyla uygulanması tercih edilmektedir. GB'de meydana gelen moleküler genetik değişikliklerden faydalanarak alternatif tedavi yolları geliştirme çalışmaları büyük bir hızla devam etmektedir. GB'de meydana gelen ve tedaviyle ilişkilendirilen önemli genetik değişikliklerden birisi de çoklu ilaç direnci 1 (multiple drug resistance 1/MDR1) isimli genin metilasyonu sonrası kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen dirençtir. Bugüne kadar GB tedavisinde kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç üzerinde MDR1 geni üzerinde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı GB tümör dokusunda MDR1 geni metilasyonunun GB hastalarının klinik bilgileri doğrultusunda hastaların sağkalım, kemoterapi direnci ve rekürrens gelişimi üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Bu kapsamda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalında GB tanısı alan ve opere edilen 36 hastada tümör dokusuna ait örnekler alındı ve doku örneklerinden bisülfit modifikasyona maruz bırakılan genomik DNA'larda MDR1 gen metilasyonunun araştırılması amacıyla MS-PZR yapıldı. MS-PZR sonucunda elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde (TBE tamponunda) yürütüldü. Metilasyon varlığı (M) 230 bp ve metilasyon yokluğu (U) 240 bp'lik ürün varlığıyla tanımlandı. Her iki allelinde metilasyon bulunmama durumu UU genotip, yalnızca bir allelinde metilasyon bulunması UM ve her iki allelinde de metilasyon varlığı MM genotip olarak tayin edildi. Hastalara ait klinik veriler ile hastalara ait dokuların MDR1 metilasyon durumları karşılaştırılarak MDR1 metilasyonunun hasta sağkalım, kemoterapi direnci ve rekürrens oluşumu üzerindeki etkileri incelendi.

Bu çalışmada GB hastalarında MDR1 her iki allelinde metilasyon (MM) gözlenen grupta sağkalım sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.001$) oranda kısa olduğu gözlendi. Ayrıca sağkalım süreleri kısa olmasına rağmen her iki allelinde metilasyon (MM) gözlenen hastaların hepsinde (%100) kemoterapi ve radyoterapiye rağmen rekürrens gelişimi izlendi. GB'nin heterojen genetik yapısı nedeniyle her hastaya standart bir doz kullanmak yerine, hastaların kemoterapötik ajan ile tedavi öncesinde tedavide direnç oluşturabilen genlerin epigenomik yapılarının ve ekspresyon miktarlarının araştırılmasıyla tedavinin belirlenmesi gerektiği önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, Çoklu İlaç Direnci-1, Pgp , Epigenetik Mekanizmalar

SUMMARY

MDR1 Gene Expression and Methylation on Primary Glioblastoma (WHO grade IV) Patients

Glioblastoma (GB) is the most frequent and malignant brain tumor seen in the adults. Standard treatment of GB is to perform surgery, radiotherapy and chemotherapy. Because of poor prognoses all the treatment options are inadequate alone. It is mostly preferred to perform all the options in order. Alternative ways to treat GB with the help of molecular genetic changes is a rapidly growing research subject. One of the important genetic changes of GB associated with treatment of the disease is methylation of Multipl Drug Resistance 1 (MDR1) gene and resistance to chemotherapy agents. Until now there is not yet any published studies about MDR1 gene and resistance to chemotherapeutics. The aim of this study is the effect of MDR1 gene methlylation and expression status on GB tumor tissue related with patients survival, chemotherapy resistance and recurrence of the disease.

In this context, 36 patients operated with GB from Ankara University School of Medicine Neurosurgery Department. Tumor tissue and perperipheral blood samples were taken from the patients and exposed to bisulfite modification; MS-PCR is performed to genomic DNA's and products of MS-PCR are runned in %2 agarose gel (TBE buffer). Methylation (M) is described with 230 bp and unmethylation (U) is described with 240 bp products. Unmethylation of both alleles is described with UU genotype and methylation of one allele is described with UM (hemi-methylated) genotype. Patients' clinical information and MDR1 methylation status of tumor tissues is compared for the effect on patients survival, resistance to chemotherapy and recurrence of the tumor.

In this study MDR1 bimethylated (MM) GB patients found to have statisstically significant ($p>0.001$) shorter survival time. Although shorter survival times of bimethylated GB patients recurrence of tumor have seen all of the bimetyhlated tumor tissues (%100) despite of chemotherapy and radiotherapy treatment. Because of genetic heterogenity of GB; choosing standard medications take into consideration with epigenomic structures and expression status instead administration of standard chemotherapeutics to all of the GB patients.

Key Words: Glioblastoma, Multipl Drug Resistance-1, Pgp, Epigenetic Mechanism

KAYNAKLAR

Abdouh, M., Facchino, S., Chatoo, W., Balasingam, V., Ferreira, J., Bernier, G. (2009). BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. The Journal of Neuroscience **29(28):** 8884–8896.

Abe, T., Mori T., Wakabayashi Y., Nakagawa, M., Cole, S.P.C., Koike, K., Kuwano, M., Hori, S. (1998). Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. Journal of Neuro-Oncology **40**: 11–18

Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Dı, C., Lın, N., Mattox, A.A., Bıgner, 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.

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.

Alaminos, M., Davalos, V., Ropero, S., Setien, F., Paz, M.F., Herranz, M., Fraga, M.F., Mora, J., Cheung, N.K., Gerald, W.L., Esteller, M. (2005) EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. Cancer Research **65(7)**: 2565–2571

Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M. (2003) P-Glycoprotein: from genomics to mechanism. Oncogene **22**: 7468–7485

Baek, S.H. (2011) When signaling kinases meet histones and histone modifiers in the nucleus. Molecular Cell **42**: 274–284

Bastian, P.J., Palapattu, G.S., Yegnasubramanian, S., Rogers, C.G., Lin, X., Mangold, L.A., Trock, B., Eisenberger, M.A., Partin, A.W., Nelson W.G. (2008). CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. Journal of Urology .**179:** 529-34; discussion 534-5

Becker, I., Becker, K.F., Meyermann, R., Hollt, V. (1991). The multidrug ¨ resistance gene MDR1 is expressed in human glial tumors. Acta Neuropathologica **82**: 516–519

Bell, O., Tiwari, V.K., Thoma, N.H., Schubeler, D. (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. Nature Reviews Genetics **12**: 554–564

Berdasco, M., Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. Developmental Cell **19**: 698–711

Berman, B.P., Weisenberger, D.J., Aman, J.F., Hinoue, T., Ramjan, Z., Liu, Y., Noushmehr, H., Lange, C.P., Van Dijk, C.M., Tollenaar, R.A., Van Den Berg, D., Laird, P.W. (2011) Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear laminaassociated domains. Nature Genetics **44**: 40–46

Bernard, W.S., Chrıstopher, P.W. (2014). World Cancer Report 2014. The global and regional burden of cancer pp.16-68; Tumours of the nervous system pp.511-522. Lyon.

Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Urban, A.E., Zhu, X., Rinn, J.L., Tongprasit, W., Samanta, M., Weissman, S., Gerstein, M., Snyder, M. (2004). Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. Science. **306**: 2242–2246

Blanc, J.L., Wager, M., Guilhot, J., Kusy, S., Bataille, B., Chantereau, T., Lapierre, F., Larsen, C.J., Karayan, Tapon, L. (2004). Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. Journal of Neurooncology **68(3)** :275–283

Blobe, G.C., Sachs, C.W., Khan, W.A., Fabbro, D., Stabel, S., Wetsel, W.C., Obeid, L.M., Fine, R.L., Hannun, Y.A. (1993). Selective regulation of expression of protein kinase C (PKC) isoenzymes in multi-drug resistant MCF-7 cells. The Journal of Biological Chemistry **268:** 658–664

Blumenthal, D.T., Schulman, S.F. (2005). Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. Expert Review of Neurotherapeutics **5(5)**: 683-90.

Bredel, M. (2001). Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. Brain research. Brain research reviews **35(2)**: 161-204.

Brosnan, C.A., Voinnet, O. (2009). The long and the short of noncoding RNAs. Current Opinion in Cell Biology **21**: 416–425

Caporaso, P., Turrızıanı, M., Vendıttı, A., Marchesı, F., Buccısano, F., Tırındellı, M.C., Alvıno, E., Garbın, A., Tortorellı, G., Toppo, L., Bonmassar, E., D'atrı, S., Amadorı, S. (2007). Novel role of triazenes in haematological malignancies: pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. DNA Repair **6(8)**: 1179-86.

Cardon-Cardo, C., O'brien J.P., Boccia, J., Casalo, D., Bertino, J.R., Melamed, M.R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissue, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry **38**: 1277–1287

Cardon-Cardo, C., O'brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., J. Biedler, L., Melamed, M.R., Bertino, J.R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood–brain barrier sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**: 695–698

Carén, H., Pollard, S.M., Beck, S. (2013) The good, the bad and the ugly: Epigenetic mechanisms in glioblastoma. Molecular Aspects of Medicine **34(4)**: 849–862

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V.B., Brenner, S.E., Batalov, S., Forrest, A.R., Zavolan, M., Davis, M.J., Wilming, L.G., Aidinis, V., Allen, J.E., Ambesi-Impiombato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R.N., Bailey, T.L., Bansal, M., Baxter, L., Beisel, K.W., Bersano, T., Bono, H., Chalk, A.M., Chiu, K.P., Choudhary, V., Christoffels, A., Clutterbuck, D.R., Crowe, M.L., Dalla, E., Dalrymple, B.P., De Bono, B., Della Gatta, G., Di Bernardo, D., Down, T., Engstrom, P., Fagiolini, M., Faulkner, G., Fletcher, C.F., Fukushima, T., Furuno, M., Futaki, S., Gariboldi, M., Georgii-Hemming, P., Gingeras, T.R., Gojobori, T., Green, R.E., Gustincich, S., Harbers, M., Hayashi, Y., Hensch, T.K., Hirokawa, N., Hill, D., Huminiecki, L., Iacono, M., Ikeo, K., Iwama, A., Ishikawa, T., Jakt, M., Kanapin, A., Katoh, M., Kawasawa, Y., Kelso, J., Kitamura, H., Kitano, H., Kollias, G., Krishnan, S.P., Kruger, A., Kummerfeld, S.K., Kurochkin, I.V., Lareau, L.F., Lazarevic, D., Lipovich, L., Liu, J., Liuni, S., Mcwilliam, S., Madan Babu, M., Madera, M., Marchionni, L., Matsuda, H., Matsuzawa, S.,

Miki, H., Mignone, F., Miyake, S., Morris, K., Mottagui-Tabar, S., Mulder, N., Nakano, N., Nakauchi, H., Ng, P., Nilsson, R., Nishiguchi, S., Nishikawa, S., Nori, F., Ohara, O., Okazaki, Y ., Orlando, V., Pang, K.C., Pavan, W.J., Pavesi, G., Pesole, G., Petrovsky, N., Piazza, S., Reed, J., Reid, J.F., Ring, B.Z., Ringwald, M., Rost, B., Ruan, Y., Salzberg, S.L., Sandelin, A., Schneider, C., Schonbach, C., Sekiguchi, K., Semple, C.A., Seno, S., Sessa, L., Sheng, Y., Shibata, Y., Shimada, H., Shimada, K., Silva, D., Sinclair, B., Sperling, S., Stupka, E., Sugiura, K., Sultana, R., Takenaka, Y., Taki, K., Tammoja, K., Tan, S.L., Tang, S., Taylor, M.S., Tegner, J., Teichmann, S.A., Ueda, H.R., Van Nimwegen, E., Verardo, R., Wei, C.L., Y Agi, K., Y Amanishi, H., Zabarovsky, E., Zhu, S., Zimmer, A., Hide, W., Bult, C., Grimmond, S.M., Teasdale, R.D., Liu, E.T., Brusic, V., Quackenbush, J., Wahlestedt, C., Mattick, J.S., Hume, D.A., Kai, C., Sasaki, D., Tomaru, Y., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Suzuki, M., Aoki, J., Arakawa, T., Iida, J., Imamura, K., Itoh, M., Kato, T., Kawaji, H., Kawagashira, N., Kawashima, T., Kojima, M., Kondo, S., Konno, H., Nakano, K., Ninomiya, N., Nishio, T., Okada, M., Plessy, C., Shibata, K., Shiraki, T., Suzuki, S., Tagami, M., Waki, K., Watahiki, A., Okamura-Oho, Y., Suzuki, H., Kawai, J., Hayashizaki, Y. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. Science. **309**: 1559–1563

Chatoo, W., Abdouh, M., David, J., Champagne, M.P., Ferreira, J., Rodier, F., Bernier, G. (1990). The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. The Journal of Neuroscience **29(2)**: 529–542

Chen, C.J.; Clark, D.; Ueda, K.; Pastan, I.; Gottesman, M.M.; Roninson, I.B. (1990) Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. The Journal of Biological Chemistry **265**: 506–514

Clarke, J.W., Chang, E.L., Levın, V.A., Mayr, N.A., Hong, E., Cavalıere, R., Lo, S.S. (2008). Optimizing radiotherapy schedules for elderly glioblastoma multiforme patients. Expert review of anticancer therapy **8(5)**: 733-41.

Costello, J.F., Futscher, B.W., Tano, K., Graunke, D.M., Pieper, R.O. (1994). Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA

methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. The Journal of Biological Chemistry **269(25)**: 17228–17237

Deangelıs, LM. (2001). Brain tumors. The New England Journal of Medicine, **344(2)**: 114-23.

Dedeurwaerder, S., Fumagalli, D., Fuks, F. (2011). Unravelling the epigenomic dimension of breast cancers. Current Opinion in Oncology **23**: 559–565.

Durmaz, R., Vural, M. (2007). Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. Türk Nöroşirürji Dergisi, **17(2)**: 80-90.

Easwaran, H.P., Baylin, S.B. (2010). Role of nuclear architecture in epigenetic alterations in cancer. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **75**:507–515

Ellinger, J., Bastian, P.J., Jurgan, T., Biermann, K., Kahl, P., Heukamp, L.C., Wernert, N., Müller, S.C., Von Ruecker, A. (2008). CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. Urology **71(1)**:161-7.

Endicott, J.A., Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annual Review of Biochemistry **58**: 137–171.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature **429**: 457–463

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. New England Journal of Medicine **343(19)**:1350-4.

Esteller, M., Hamılton, S.R., Burger, P.C., Baylın, S.B., Herman, J.G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. Cancer Research **59(4)**: 793-7.

Esteller, M., Risques, R,A., Toyota, M., Capella, G., Moreno, V., Peinado, M.A., Baylin, S.B., Herman, J.G. (2001). Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. Cancer Research **61(12)**: 4689-92.

Esteller M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. Nature Reviews. Genetics **12**: 861–874

Fang, F., Turcan, S., Rimner, A., Kaufman, A., Giri, D., Morris, L.G., Shen, R., Seshan, V., Mo, Q., Heguy, A., Baylin, S.B., Ahuja, N., Viale, A., Massague, J., Norton, L., Vahdat, L.T., Moynahan, M.E., Chan, T.A. (2011) Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. Science Translational Medicine **3(75)**: 75ra25

Feinberg, A.P., Tycko, B. (2004) The history of cancer epigenetics. Nature Reviews Cancer **4(2)**:143–153

Feun, L.G., Savaraj, N., Landy, H.J. (1994). Drug resistance in brain tumors. The Journal of Neurooncology **20**: 165–176.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. European Journal of Cancer. **49(6)**:1374-403

Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Canoi A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., Esteller, M.(2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nature Reviews Genetics **37**:391–400

Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., Kouzarides, T.(2003) The methyl-CpG- binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. The Journal of Biological Chemistry **278**: 4035–4040

Fukushima, T., Katayama, Y ., Watanabe, T., Yoshino, A., Ogino, A., Ohta, T., Komine, C. (2005). Promoter hypermethylation of mismatch repair gene hMLH1 predicts the clinical response of malignant astrocytomas to nitrosourea. Clinical Cancer Research: an Official Journal of American Association for Cancer Research **11(4)**: 1539– 1544

Fullgrabe, J., Kavanagh, E., Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. Oncogene **30:** 3391–3403

Gal-Y, Am E.N., Egger, G., Iniguez, L., Holster, H., Einarsson, S., Zhang, X., Lin, J.C., Liang, G., Jones, P.A., Tanay, A. (2008). Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell

line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 12979–12984

Gros, P., Nerıah, Y.B., Croop, J.M., Housman, D.E. (1986) . Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance, Nature **323**: 728–731

Gıles, G.G., Gonzales, M.F. (2001). Brain tumors (2nd Ed). Kaye, H.A., Laws, E.R., pp. 51-70. Harcourt Publishers

Goldsteın, L.J., Galskı, H., Fojo, A., Wıllıngham, M., Lai, S.L., Gazdar, A., Parker, R., Green, A., Christ, W., Brodeur, G.M., Et, AL. (1989). Expression of a multidrug-resistance gene in human cancer, Journal of the National Cancer Institute **81**: 116–124

Gonzalez-Gomez, P., Bello, M.J., Arjona, D., Lomas, J., Alonso, M.E., Decampos, J.M., Vaquero, J., Isla, A., Gutierrez, M., Rey, J.A. (2003). Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. International Journal of Oncology **22(3)**:601–608

Guttman, M., Rinn, J.L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. Nature **482**:339–346

Hansen K.D., Timp W., Bravo, H.C., Sabunciyan, S., Langmead, B., Mcdonald, O.G., Wen, B., Wu H., Liu, Y ., Diep, D., Briem, E., Zhang, K., I, R.A., Feinberg, A.P. (2011). Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. Nature reiew: Genetics **43**:768–775

Hegi, M.E., Liu, L., Herman, J.G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M.P., Gilbert, M.R. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **26(25)**:4189-99.

Herman, J.G., Jen, J., Merlo, A., Baylin, S.B. (1996). Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. Cancer Research **56(4)**: 722–727

Hesson, L., Bieche, I., Krex, D., Criniere, E., Hoang-Xuan, K., Maher, E.R., Latif, F. (2004). Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes

located within the critical 3p21.3 region in gliomas. Oncogene **23(13)**: 2408–2419

Hinoue, T., Weisenberger, D.J., Lange, C.P., Shen, H., Byun, H.M., Van Den Berg, D., Malik, S., Pan, F., Noushmehr, H., Van Dijk, C.M., Tollenaar, R.A., Laird, P.W. (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. Genome Research **22**: 271–282

Hitchins, R.N., Harman, D.H., Davey, R.A., Bell, D.R. (1988). Identification of a multidrug resistance associated antigen (P-glycoprotein) in human normal tissues, European Journal of Cancer and Clinical Oncology **24**: 449–454

Hoeıjmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature **411(6835**): 366-74.

Horiguchi, K., Tomizawa, Y ., Tosaka, M., Ishiuchi, S., Kurihara, H., Mori, M., Saito, N. (2003). Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. Oncogene **22(49)**:7862–7865

Horiguchi, M., Kim, J., Matsunaga, N., Kajı, H., Egawa, T., Makıno, K., Koyanagı, S., Ohdo, S. (2010). Glucocorticoid-dependent expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **333(3)**:782-7.

Iacob, G., Dınca, E.B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. Journal of medicine and life **2(4)**: 386-93.

Kartner, N., Rıordan, J.R., Lıng, V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. Science **221**: 1285–1288..

Kaına, B., Margıson, GP., Chrıstmann, M. (2010). Targeting O^6-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. Cellular and Molecular Life Science: CMLS **67(21)**: 3663-81.

Kaına, B., Chrıstmann, 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.

Kapranov, P., Willingham, A.T., Gingeras, T.R. (2007) Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. Nature Review: Genetics **8**:413–423

Khasraw, M., Lasmann, A.B. (2010). Advances in the treatment of malignant gliomas. Current Oncology Reports **12(1)**: 26-13.

Khurana, V.G., Teo, C., Kundı, M., Hardell, L., Carlberg, M. (2009). Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiological data. Surgical Neurology **72(3)**: 205-14.

Kım, L., Glantz, M. (2006). Chemotherapeutic options for primary brain tumors. Current treatment options in oncology **7(6)**: 467-78.

Kim J.K., Esteve, P.O., Jacobsen, S.E., P, S. (2009). UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. Nucleic Acids Research **37**: 493–505

Kleihues, P., Burger, P.C., Scheıthauer, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. Brain pathology **3(3)**:255-68. (Zurich, Switzerland),

Kleihues, P., Louıs, D.N., Wıestler O.D., Burger, P.C., Scheıthauer, B.W. (2007). WHO classification of tumours of the central nervous system (4th Ed.). Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., pp.10-11. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon

Klose, R.J., Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends in Biochemical Sciences **31**:89–97

Knowling, S., M, K.V. (2011). Non-coding RNA and antisense RNA. Nature's trash or treasure? Biochimie **93**: 1922–1927

Kondo, S., Kondo, Y., Hara, H., Kaakaji, R., Peterson, J.W., Morimura, T., Takeuchi, J., Barnett, G.H. (2006). Mdm2 gene mediates the expression of Mdr1 gene and P-glycoprotein in a human glioblastoma cell line. British Journal of Cancer **74**: 1263–1268

Krakstad, C., Chekenya, M. (2010). Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: oppurtunities for targeted therapeutics. Molecular cancer **9**:135.

Krex, D., Klınk, B., Hartmann, C., Von Deımlıng, A., Pıetsch, T., Sımon, M., Sabel, M., Steınbach, J.P., Heese, O., Reıfenberger, G., Weller, M., Schackert, G. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. Brain: a journal of neurology **130**: 2596-606.

Kumar, V.,Cotran, R.S., Robbıns, S.L. (2000) Temel Patoloji – altıncı edisyon **6**:133-74

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)**: 145-52.

Lee J., Son M.J., Woolard, K., Donin, N.M., Li, A., Cheng, C.H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y ., Walling, J., Ahn, S., Kim, M., Totonchy, M., Cusack, T., Ene, C., Ma, H., Su, Q., Zenklusen, J.C., Zhang, W., Maric, D., Fine, H.A. (2008). Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. Cancer Cell **13(1)**:69–80

Lehnertz, B., Ueda, Y ., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A.H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. Current Biology: CB **13**:1192–1200

Levın, V.A., Leıbel, S.A., Gutın, P.H. (2001). Cancer: Principles and Practice of Oncology (6th Ed). DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, p.:2100-60. S.A. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Y E Z.,Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., Ecker, J.R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature **462(7271)**: 315–322

Li, Y ., Zhu, J., Tian, G., Li, N., Li, Q., Y E M., Zheng, H., Y U J., Wu ,H., Sun, J., Zhang, H., Chen, Q., Luo, R., Chen, M., He, Y ., Jin, X., Zhang, Q., Y U, C., Zhou, G., Huang, Y ., Cao, H., Zhou, X., Guo, S., Hu, X., Li, X., Kristiansen, K., Bolund, L., Xu, J., Wang, W., Y Ang, H., Wang, J., Li, R., Beck, S., Zhang, X. (2008). The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. PLoS Biology **8**:e1000533

Liang, G., Gonzalgo, M.L., Salem, C., Jones, P.A. (2002). Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. Methods **27(2)**:150–155

Loiseau, H., Huchet, A., Rué, M., Cowpplı-Bony, A., Baldi, I. (2009). Epidemiology of primary brain tumor. Revue neurologique **165(8-9)**: 650-70.

Louıs, D.N., Ohgakı, H., Wıestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheıthauer, B.W., Kleıhues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathologica **114(2)**:97-109.

Marchesı, F., Turrızıanı, M., Tortorellı, G., Avvısatı, G., Torıno, F., De Vecchis, L. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society **56(4)**:275-87.

Martinez, R., Martin-Subero, J.I., Rohde, V., Kirsch, M., Alaminos, M., Fernandez, A.F., Ropero, S., Schackert, G., Esteller, M. (2009). A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. Epigenetics **4(4)**:255–264

Matsumoto, T., Tani, E., Kaba, K., Kochi, N., Shindo, H., Yamamoto, Y., Sakamoto, H., Furuyama, J. (1990). Amplification and expression of a multidrug resistance gene in human glioma cell lines, Journal of Neurosurgery **72**: 96–101

Matsumoto, T., Tani E., Kaba, K., Shindo H., Miyaji, K. (1991). Expression of P-glycoprotein in human glioma cell lines and surgical glioma specimens. Journal of Neurosurgery **74**: 460–466

Mclendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van, Meir, E.G., Brat, D.J., Mastrogianakis, G.M., Olson, J.J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K., Yung, W.K.A., Bogler, O., Weinstein, J.N., Vandenberg, S., Berger, M., Prados, M., Muzny, D., Morgan, M., Scherer, S., Sabo, A., Nazareth, L., Lewis, L., Hall, O., Zhu, Y ., Ren, Y ., Alvi, O., Yao, J., Hawes, A., Jhangiani, S., Fowler, G., San, Lucas, A., Kovar, C., Cree, A., Dinh, H., Santibanez, J., Joshi, V., Gonzalez-Garay, M.L., Miller, C.A., Milosavljevic, A., Donehower, L., Wheeler, D.A., Gibbs, R.A., Cibulskis, K., Sougnez, C., Fennell, T., Mahan, S., Wilkinson, J., Ziaugra, L., Onofrio, R., Bloom, T., Nicol, R., Ardlie, K., Baldwin, J., Gabriel, S., Lander, E.S., Ding, L., Fulton, R.S., Mclellan, M.D., Wallis, J., Larson, D.E., Shi, X., Abbott, R., Fulton, L., Chen, K., Koboldt, D.C., Wendl, M.C., Meyer, R., Tang, Y ., Lin, L., Osborne, J.R., Dunford-Shore, B.H., Miner, T.L., Delehaunty, K., Markovic, C., Swift, G., Courtney, W., Pohl, C., Abbott, S.,

Hawkins, A., Leong, S., Haipek, C., Schmidt, H., Wiechert, M., Vickery, T., Scott, S., Dooling, D.J., Chinwalla, A., Weinstock, G.M., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Getz, G., Winckler, W., Verhaak, R.G.W., Lawrence, M.S., O'kelly, M., Robinson, J., Alexe G., Beroukhim, R., Carter, S., Chiang, D., Gould, J., Gupta, S., Korn, J., Mermel, C., Mesirov, J., Monti, S., Nguyen, H., Parkin, M., Reich, M., Stransky, N., Weir, B.A., Garraway, L., Golub, T., Meyerson, M., Chin, L., Protopopov, A., Zhang,, J., Perna, I., Aronson, S., Sathiamoorthy, N., Ren, G., Wiedemeyer W.R., Kim, H., Sek, W.K., Xiao, Y ., Kohane, I.S., Seidman, J., Park, P.J., Kucherlapati, R., Laird, P.W., Cope, L., Herman, J.G., Weisenberger, D.J., Pan, F., Van Den Berg, D., Van Neste, L., Joo, M.Y ., Schuebel, K.E., Baylin, S.B., Absher, D.M., Li, J.Z., Southwick, A., Brady, S., Aggarwal, A., Chung, T., Sherlock, G., Brooks, J.D., Myers, R.M., Spellman, P.T., Purdom, E., Jakkula, L.R., Lapuk, A.V., Marr, H., Dorton, S., Y Oon, G.C., Han, J., Ray, A., Wang, V., Durinck, S., Robinson, M., Wang, N.J., Vranizan, K., Peng, V., Van Name, E., Fontenay, G.V., Ngai, J., Conboy, J.G., Parvin, B., Feiler, H.S., Speed, T.P., Gray, J.W., Brennan, C., Socci, N.D., Olshen, A., Taylor, B.S., Lash, A., Schultz, N., Reva, B., Antipin, Y ., Stukalov, A., Gross, B., Cerami, E., Wei, Q.W., Qin, L.X., Seshan, V.E., Villafania, L., Cavatore, M., Borsu, L., Viale, A., Gerald, W., Sander, C., Ladanyi, M., Perou, C.M., Hayes, D.N., Topal, M.D., Hoadley, K.A., Qi, Y ., Balu, S., Shi, Y ., WU J., Penny, R., Bittner, M., Shelton, T., Lenkiewicz, E., Morris, S., Beasley, D., Sanders, S., Kahn, A., Sfeir, R., Chen, J., Nassau, D., Feng, L., Hickey, E., Barker, A., Gerhard, D.S., Vockley, J., Compton, C., Vaught, J., Fielding, P., Ferguson, M.L., Schaefer, C., Madhavan, S., Buetow, K.H., Collins, F., Good, P., Guyer, M., Ozenberger, B., Peterson, J., Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 455 (7216): 1061–1068

Meilinger, D., Fellinger, K., Bultmann, S., Rothbauer, U., Bonapace, I.M., Klinkert, W.E., Spada, F., Leonhardt, H. (2009). Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. EMBO Reports **10**:1259–1264

Mousseau, M., Chauvin, C., M. Nissou, F., Chaffanet, M., Plantaz, D., Pasquier, B., Schaerer, R., Benabid, A. (1993). A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors, European Journal of Cancer **29A(5)**: 753-9

Mueller, W., Nutt, C.L., Ehrich, M., Riemenschneider, M.J., Von Deimling, A., Van Den Boom, D., Louis, D.N. (2007). Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. Oncogene **26(4)**: 583–593

Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleıhues, P., Ohgakı, H. (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. Carcinogenesis **22(10)**: 1715-9.

Nakamura, M., Yonekawa, Y ., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2001). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology **81(1)**: 77–82

Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Hayes, D.N., Perou, C.M., Schmidt, H.K., Ding, L., Wilson, R.K., Van Den Berg, D., Shen, H., Bengtsson, H., Neuvial, P., Cope, L.M., Buckley, J., Herman, J.G., Baylin, S.B., Laird, P.W., Aldape, K. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell **17**: 510–522

O'hagan, H.M., Wang, W., Sen, S., Destefano, Shields, C., Lee, S.S., Zhang, Y .W., Clements, E.G., Cai, Y ., Van Neste, L., Easwaran, H., Casero, R.A., Sears, C.L., Baylin, S.B. (2011). Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. Cancer Cell **20**:606–619

Omay, S.B., Vogelbaum, M.A. (2009). Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. Indian Journal of Cancer **46(2)**: 88-95.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lın, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Sıu, I.M., Gallıa, G.L., Olıvı, A., Mclendon, R., Rasheed, B.A., Keır, S., Nıkolskaya, T., Nıkolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Dıaz La, J.R., Hartıgan, J., Smıth, D.R., Strausberg, R.L., Marıe, S.K., Shınjo, S.M.,

Yan, H., Rıggıns, G.J., Bıgner, D.D., Karchın, R., Papadopoulos, N., Parmıgıanı, G., Vogelsteın, B., Velculescu, V.E., Kınzler, K.W. (2008). An integrated genomic analaysis of human glioblastoma multiforme. Science (New York, N.Y.) **321**:1807-1812.

Pastan, I., Gottesman, M.M. (1987). Multiple-drug resistance in humancancer. The new England Journal of Medicine **316(22)**: 1388-93.

Paz, M.F., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Reynes, G., Pollan, M., Aguirre-Cruz, L., García-Lopez, J.L., Piquer, J., Safont, M.J., 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. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **10(15)**: 4933-8.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G., Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell **9(3)**: 157–173

Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., Vescovi, A.L. (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumourinitiating cells. Nature **444(7120)**: 761–765

Podolski-Renić, A., Jadranin, M., Stanković, T., Banković, J., Stojković, S., Chiourea, M., Aljančić, I., Vajs, V., Tešević, V., Ruždijić, S., Gagos, S., Tanić, N., Pešić, M. (2013). Molecular and cytogenetic changes in multi-drug resistant cancer cells and their influence on new compounds testing. Cancer Chemotherapy and Pharmacology **72(3)**:683-97. doi: 10.1007/s00280-013-2247-1. Epub 2013 Aug 10

Pohl, U., Cairncross, J.G., Louis, D.N. (1999). Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendroglioma. Brain Pathology (Zurich,Switzerland) **9(4):**639-43

Prasad, G., Haas-Kogan, D.A. (2009). Radiation-induced gliomas. Expert review of neurotherapeutics **9(10)**:1511-7.

Qiu, Yy., Mirkin, B.L., Dwivedi, R.S. (2007). MDR1 hypermethylation contributes to the progression of neuroblastoma. Molecular and Cellular Biochemistry. **301(1-2)**: 131-5

Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E., Almouzni, G. (2011). Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. Molecular Cell **44**: 928–941

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. **414(6859)**:105–111

Ringrose, L., Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. Annual review of Genetics **38**: 413–443

Rosell, R., De Las Penas, R., Balana, C., Santarpıa, M., Salazar, F., De Aguırre, I., Reguart, N., Vılla, J., Weı, J., Ramırez, J.L., Molına, M.A., Y Cajal, S.R., Jablons, D., Taron, M. (2008). Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. Future Oncology (London, England) **4(2)**: 219-228.

Sarkar, C., Jaın, A., Surı, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. Indian Journal of Cancer **46(2)**: 108-119.

Sarkarıa, J.N., Kıtange, G.J., James, C.D., Plummer, R., Calvert, H., Weller, M., Wıck, W. (2008). Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **14(10)**: 2900-8.

Sathornsumetee, S., Rıch, J.N. (2008). Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme. Annals of the New York Academy of Sciences **1142**: 108-132.

Sawada, T., Kato, Y., Sakayori, N., Takekawa, Y., Kobayashi, M. (1999). Expression of the multidrug-resistance P-glycoprotein (Pgp, MDR1) by endothelial cells of the neovasculature in central nervous system tumors. Brain Tumor Pathology **16(1)**: 23-7

Sawicka, A., Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation – a versatile chromatin modification for different occasions. Biochimie **94(11)**: 2193-201

Schaich, M., Kestel, L., Pfirrmann, M., Robel, K., Illmer, T., Kramer, M., Dill, C., Ehninger, G., Schackert, G., Krex, D. (2009) A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. Annals of Oncology **20**: 175–181, doi:10.1093/annonc/mdn548

Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., Van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol C.A.A.M., Van Der Valk M.A., Robanus-Maandag, E.C., Te Riele, H.P.J., Berns, A.J.M., Borst, P. (1994). Distribution of the mouse md1a P-glycoprotein gene leads to deficiency in the blood–brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell **77(4)**: 491-502

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.Y., Jones, D.T., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.A., Tonjes, M., Hovestadt, V., Albrecht, S., Kool, M., Nantel, A., Konermann, C., Lindroth, A., Jager, N., Rausch, T., Ryzhova, M., Korbel, J.O., Hielscher, T., Hauser, P., Garami, M., Klekner, A., Bognar, L., Ebinger, M., Schuhmann, M.U., Scheurlen, W., Pekrun, A., Fruhwald, M.C., ROGGENDORF W., Kramm, C., Durken, M., Atkinson, J., Lepage, P., Montpetit, A., Zakrzewska, M., Zakrzewski, K., Liberski, P.P., Dong, Z., Siegel, P., Kulozik, A.E., Zapatka, M., Guha, A., Malkin, D., Felsberg, J., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Ichimura, K., Collins, V.P., Witt, H., Milde, T., Witt, O., Zhang, C., Castelo-Branco, P., Lichter, P., Faury, D., Tabori, U., Plass, C., Majewski, J., Pfister, S.M., Jabado, N. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature **482**: 226–231

Scotlandi, K., Manara, M.C., Serra, M., Benini, S., Maurici, D., Caputo, A., De Giovanni, C., Lollini, P.L., Nanni, P., Picci, P., Campanacci, M., Baldini, N. (1999). The expression of P-glycoprotein is causally related to a less aggressive phenotype in human osteosarcoma cells. Oncogene **18(3)**:739-46

Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y ., Chen, L., Thastrom, A., Field, Y ., Moore, I.K., Wang, J.P., Widom, J. A (2006) Genomic code for nucleosome positioning. Nature **442**: 772–778

Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell **138(5)**: 822-9. doi:10.1016/j.cell.2009.08.017

Shah, S.N., Hıle, S.E., Eckert, K.A. (2010). Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. Cancer Research **70(2)**: 431-5.

Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. **31**: 27–36

Sharma, S., Gerke, D.S., Han, H.F., Jeong, S., Stallcup, M.R., Jones, P.A., Liang, G. (2012). Lysine methyltransferase G9a is not required for DNMT3A/3B anchoring to methylated nucleosomes and maintenance of DNA methylation in somatic cells. Epigenetics and Chromatin. **5(1)**: 3 doi: 10.1186/1756-8935-5-3

Smıth, K.A., Ashby, L.S., Gonzalez, L.F., Brachman, D.G., Thomas, T., Coons, S.W., Battaglıa, M., Scheck, A. (2008) Prospective trial of gross-total resection with Gliadel wafers followed by early postoperative Gamma Knife radiosurgery and conformal fractionated radiotherapy as the initial treatment for patients with radiographically suspected, newly diagnosed glioblastoma multiforme. Journal of Neurosurgery, Supplement **109**: 106-17.

Stupp, R., Hegı, M.E., Gılbert, M.R., Chakravartı, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology **10;25(26)**: 4127-36.

Stupp, R., Mason, W.P., Van Den Bent, M.J., Weller, M., Fısher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosı, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwın, S.K., Gorlıa, T., Allgeıer, A., Lacombe, D., Caırncross, J.G., Eısenhauer, E., Mırımanoff, R.O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. The New England Journal of Medicine **352(10)**: 987-96

Suva, M.L., Riggi, N., Janiszewska, M., Radovanovic, I., Provero, P., Stehle, J.C., Baumer, K., Le, Bitoux, M.A., Marino, D., Cironi, L., Marquez, V.E., Clement, V., Stamenkovic, I. (2009). EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. Cancer Research **69(24)**: 9211–9218

Sweasy, J.B., Lang, T., Dımaıo, D. (2006). Is base excision repair a tumor suppressor mechanism? Cell cycle (Georgetown, Tex.) **5(3)**: 250-9.

Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. The EMBO Journal. **27**: 2681– 2690

Tahara, T., Shibata, T., Yamashita, H., Yoshioka, D., Hirata, I., Arisawa, T. (2010). Promoter methylation status of multidrug resistance 1 (MDR1) gene in noncancerous gastric mucosa correlates with Helicobacter Pylori infection and gastric cancer occurrence. Cancer Investigation **28(7)**:711-6.doi: 10.3109/07357907.2010.483505.

Takai, D., Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 3740–3745

Takanishi, K.; Miyazaki, M.; Ohtsuka, M.; Nakajima, N. (1997). Inverse relationship between P-glycoprotein expression and its proliferative activity in hepatocellular carcinoma. Oncology **54**: 231–237

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Y Ang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S.,Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., Zhao, Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell **146**: 1016–1028

Tatter, S.B. (2010). The new WHO Classification of Tumors affecting the Central Nervous System. Erişim, [http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.htm]. Erişim tarihi: 01.04.2014.

Teng, I.W., Hou, P.C., Lee, K.D., Chu, P.Y ., Y Eh, K.T., Jin, V.X., Tseng, M.J., Tsai, S.J., Chang Y .S., Wu, C.S., Sun, H.S., Tsai, K.D., Jeng, L.B., Nephew, K.P., Huang, T.H., Hsiao, S.H., Leu, Y .W. (2011). Targeted methylation of two tumor suppressor genes is sufficient to transform mesenchymal stem cells into cancer stem/initiating cells. Cancer Research **71(13)**: 4653–4663

Tishler, D.M., Raffel, C. (1992). Development of multidrug resistance in a primitive neuroectodermal tumor cell line. Journal of Neurosurgery **76(3)**:502-6

Uhlmann, K., Rohde, K., Zeller, C., Szymas, J., Vogel, S., Marczinek, K., Thiel, G., Nurnberg, P., Laird, P.W. (2003). Distinct methylation profiles of glioma subtypes. International Journal of Cancer.Journal International du Cancer **106(1)**:52–59

Unoki, M., Nishidate, T., Nakamura, Y. (2004). ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. Oncogene **23**: 7601–7610

Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y ., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell **17(1)**: 98–110

Van Der Bliek, A., Borst, P. (1989). Multidrug resistance. Advances in Cancer Research **52:** 165-203

Van Kalken, C.K., Broxterman, H.J., Pinedo, H.M., Feller, N., Dekker, H., Lankelma, J., Giaccone, G. (1993). Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. British Journal of Cancer **67(2)**: 284-9

Verbeek, B., Soutgate, T.D., Gılham, D.E., Margıson, G.F. (2008). O6-mehylguanine-DNA methytransferase inactivation and chemotherapy. British Medical Bulletin **85**: 17-33

Vidal, D.O., Lopes L.F., Valera E.T. (2007). Drug resistance and methylation in myelodysplastic syndrome. Current Pharmaceutical Biotechnology **8(2)**: 77-81.

Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., De Launoit, Y ., Fuks, F. (2006). The polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature **439**: 871–874

Von Bossanyi, P., Diete, S., Dietzmann, K., Warich, Kirches, M., Kirches, E. (1997). Immunohistochemical expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferases in cerebral gliomas and response to chemotherapy, Acta Neuropathologica **94**: 605–611

Wen, B., Wu, H., Shinkai, Y ., Irizarry, R.A., Feinberg, A.P. (2009). Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. Nature Genetics **41**: 246–250

Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J., Bahler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. Nature **453**:1239–1243

Wolffe, A.P., Hayes, J.J. (1999). Chromatin disruption and modification. Nucleic Acids Research **27**:711–720

Yokogami, K., Kawano, H., Moriyama, T., Uehara, H., Sameshima, T., Oku, T., Goya, T., Wakisaka, S., Nagamachi, S., Jinnouchi, S., Tamura, S.(1998). Application of SPET using technetium-99m sestamibi in brain tumors and comparison with expression of the MDR-1 gene: is it possible to predict the response to chemotherapy in patients with gliomas by means of 99m Tc-sestamibi SPET?, European Journal of Nuclear Medicine **25**: 401–409

Wu, G., Broniscer, A., Mceachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., Zhang, J., Gajjar, A., Dyer, M.A., Mullighan, C.G., Gilbertson, R.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Ellison, D.W., Baker, S.J. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. Nature Genetics **44(3)**: 251–253

Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalgo, M.L., Zahurak, M., Piantadosi, S., Walsh, P.C., Bova G.S., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Nelson W.G. (2004). Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. Cancer Research **64(6)**: 1975-86.

Yu, G., Ahmad, S., Aquino, A., Fairchild, C.R., Trepel, J.B., Ohno, S., Suzuki, K., Tsuruo, T., Cowan, K.H., Glazer, R.I. (1991). Transfection with protein kinase C alpha confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein. Cancer Communications **3**: 181–189

Zhou, V.W., Goren, A., Bernstein, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. National Reviews. Genetics. **12**: 7–18

Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01-14-14	Tarih: 13 Ocak 2014	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerd gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETIK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒	Toplan
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☒	Toplan
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☒	Deşte
Prof.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☒	H☐	E☐	H☒	Yrd.Araş. Oy. katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☒	Rahatsız

*:Toplantıda Bulunma

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

2

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhıye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastoma multiforme hastalarında MDR1 geni promotor metilasyon analizi ve MDR1 geni ekspresyonu" başlıklı (Laboratuar Araştırma, çok merkezli, Derya hoca yardımcı araştırıcı			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Hasan ÇAĞLAR UĞUR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Beyin ve Sinir Cerrahisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Laboratuar Araştırması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

12 Ağu... ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

1