



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GLİOBLASTOMA KANSER KÖK HÜCRELERİNDE
İNTEGRİN VE ADEZYON GEN PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ

Şeyma ÖZKANCA

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

ANKARA

2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA KANSER KÖK HÜCRELERİNDE
İNTEGRİN VE ADEZYON GEN PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ

Şeyma ÖZKANCA

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 114S189 numaralı projesi ile desteklenmiştir

ANKARA

2016

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Glioblastoma Kanseri Kök Hücrelerinde İntegrin Ve Adezyon Gen Profillerinin Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında
Şeyma ÖZKANCA tarafından hazırlanan
“Glioblastoma Kanseri Kök Hücrelerinde İntegrin Ve Adezyon Gen Profillerinin
Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ**
olarak **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29.07.2016

İmza
Prof. Dr. Duygu UÇKAN
Hacettepe Ünv. Kök Hücre Enstitüsü
Jüri Başkanı

İmza
Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA
Ankara Ünv. Kök Hücre Enstitüsü
Üye

İmza
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Ünv. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
yönetim kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof.Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Sinir Sistemi ve Hücrelerinin Sınıflandırılması	1
1.2. Sinir Sistemi Kanseri Çeşitleri ve Sınıflandırılması	2
1.3. Glioblastoma Multiforme	2
1.3.1. Güncel GBM Tedavi Yöntemleri	4
1.4. Kanseri Kök Hücreleri	6
1.4.1. Glioblastoma Kök Hücreleri ve Yüzey Belirteçleri	7
1.4.1.1. CD133	8
1.5. Glioblastoma Mikroçevresi	9
1.5.1. Glioblastoma Kök Hücrelerinin Mikroçevresi	10
1.6. Glioblastoma Hücrelerinin İnvazyonu ve Migrasyonu	11
1.7. Tez Amacı	13
2. GEREÇ ve YÖNTEM	15
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	15
2.1.1. Hücre Hatları ve Hasta Dokularının Temini	15
2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler	16
2.1.3. MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizinde Kullanılan Malzemeler	17
2.1.4. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonunda Kullanılan Malzemeler	18
2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler	18
2.1.6. Kanseri Kök Hücre Paneli PCR Array, Hücre Yüzey Belirteçleri PCR Array, Sitokin/ Kemokin Reseptör PCR Array ve Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative RT-PCR) Yönteminde Kullanılan Malzemeler	18
2.1.7. Akım Sitometri metodunda kullanılan malzemeler	26
2.1.8. Konfokal Mikroskopunda görüntü almak için slayt hazırlanmasında kullanılan malzemeler	27
2.1.9. Protein izolasyonu için kullanılan malzemeler	27
2.1.10. Western Blotting için kullanılan malzemeler	27
2.2. Yöntemler	28
2.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü ve Primer Kültür	28
2.2.1.1. Primer Kültür	28

2.2.1.2. Hücrelerin Sıvı Azottan Çıkarılıp Çözdürülmesi	29
2.2.1.3. Hücrelerin Beslenmesi	29
2.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması	30
2.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması	30
2.2.2. Glioblastoma Hücrelerinden Kanser Kök Hücre İzolasyonu	31
2.2.2.1. MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizi	31
2.2.3. RNA İzolasyonu	32
2.2.4. RNA Kantitasyonu	32
2.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	32
2.2.6. RT ² Profiler TM PCR Dizi (Array) Sistemi	33
2.2.7. Akım Sitometri	35
2.2.8. Konfokal Mikroskobunda Görüntüleme İçin Slayt Hazırlama	35
2.2.9. Protein İzolasyonu	36
2.2.10. Western Blotting	36
2.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistik	38
3. BULGULAR	39
3.1. Glioblastoma Hücre Hatlarının ve Primer Hücre Kültürlerinin Mikroskop Görüntüleri	39
3.2. RNA Ölçümleri	40
3.3. Eş Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrileri	41
3.3.1. Adezyon Paneli Eş Zamanlı PZR Sonuçları	42
3.3.2. İntegrin Paneli Eş Zamanlı PZR Sonuçları	45
3.3.3. Apoptoz Paneli Eş Zamanlı PZR Sonuçları	48
3.4. Akım Sitometri Sonuçları	50
3.5. Konfokal Mikroskobu ile Elde Edilen Görüntüler	51
3.6. Protein Ölçümleri	53
3.7. Western Blotting	55
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	74
5.1. Öneriler	76
ÖZET	77
SUMMARY	78
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖNSÖZ

Bu tez günümüzün en ölümcül tümörlerinden olan Glioblastoma Multiforme'nin kanser kök hücrelerini araştırmaktadır. Glioblastoma kök hücrelerinin adezyon ve integrin profillerinin belirlenmesi ve araştırılması bu tezin amacıdır.

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesinde yardımlarını ve değerli bilgilerini benden esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam
Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Tez çalışmam sırasında bilimsel metotları öğrenmemde ve uygulamamda emeği geçen ve desteklerini benden esirgemeyen
Yunus YÜKSELTEN'e

Tezimin her aşamasında yardımcı ve varlığı ile her zaman destek olan sevgili arkadaşım Merve Gülsen BAL'a

Tez çalışmam sırasında yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen ve bana araştırmacı kimliği kazanma yolunda bir çok şey katan sevgili
Yrd. Doç. Dr. Dilara AKCORA YILDIZ'a

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren ve emeği geçen
Dr. Tülin Özkan, Sibel ARAT ve Furkan BALBAY'a

Tezi gerçekleştirmemi sağlayan TUBİTAK 114S189 numaralı "Glioblastoma Multiforme (GBM) İlaç Direncinde Rol Oynayan CD133+ Glioblastoma Kök Hücrelerini (GKH) Hedefleyen Terapötik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi" isimli proje kurulu ve yürütücüsüne,

Sayın hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve tüm Tıbbi Biyoloji ailesine,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi bana destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimle...

SİMGELER VE KISALTMALAR

GBM	Glioblastoma Multiforme
GKH	Glioblastoma Kök Hücre
KKH	Kanser Kök Hücre
cDNA	Komplementer DNA
FBS	Fötal Sığır Serumı
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
DMSO	Dimetilsülfoksit
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
VEGF	Vasküler epidermal büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
UPR	Unfolded protein response
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
ScFv	Single chain variable fragment
MMP	Metalloproteinase
FRAT1	Frequently Rearranged In Advanced T-Cell Lymphomas 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
APS	Amonium persulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
PVDF	Polyvinylidene fluoride
TBS	Tris-buffered saline

TBS-t	Tris-buffered saline tween
ECL	Enhanced chemiluminescence
OD	Optical Density
GTP	Guanosine triphosphate
GDP	Guanosine diphosphate
TIC	Tumor initiating cell



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Merkezi ve periferik sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Zhu & Parada, 2002)	1
Şekil 1.2. 2016, WHO tarafından yapılmış olan GBM karakterizasyon tablosu (Louis ve ark., 2016)	3
Şekil 1.3. Kök hücrelerin beyin tümörü tedavisi için modifiye edilmesi (Shah, 2016)	5
Şekil 1.4. Tümör oluşumunda stokastik model ve kanser kök hücre modeli (Girouard & Murphy, 2011)	7
Şekil 1.5. CD133 yüzey belirtecinin hücre membranındaki yapısal gösterimi	9
Şekil 1.6. Glioblastoma tümör mikroçevresi (Godlewski, Krichevsky, Johnson, Chiocca, & Bronisz, 2015)	10
Şekil 1.7. Glioblastoma tümör hücrelerinin invazyonunda etkili olan yollar ve işleyiş mekanizmaları (Paw, Carpenter, Watabe, Debinski, & Lo, 2015)	13
Şekil 3.1. Glioblastoma hücre hatlarının ışık mikroskopunda görünümü (10X)	39
Şekil 3.2. Glioblastoma hasta primer kültürlerinin ışık mikroskopunda görünümü (10X)	40
Şekil 3.3. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan adezyon, integrin ve apoptoz panellerinin toplamında taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.	41
Şekil 3.4. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan adezyon panelinde taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.	42

Şekil 3.5. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan integrin panelinde taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.	45
Şekil 3.6. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan apoptoz panelinde taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.	48
Şekil 3.7. U87 hücre hattı. CD70-FITC, DR6-FITC ve CD133-PE antikorları ile boyandıktan sonra yalnızca CD70, yalnızca DR6, yalnızca CD133, DR6 ile CD133 birlikte ve CD70 ile CD133 birlikte boyanan hücrelerin yüzdesi. A. U87 unstained, B. U87 CD133-PE , C. U87 DR6-FITC , D. U87 CD70-FITC , E. U87 CD133-DR6 , F. U87 CD133-CD70 .	50
Şekil 3.8. Seçilen bir GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı) ve DAPI (mavi) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.	51
Şekil 3.9. Seçilen bir GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı), DR6-FITC (yeşil) ve DAPI (mavi) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.	52
Şekil 3.10. Seçilen bir GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı), CD70-FITC (yeşil) ve DAPI (mavi) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.	53
Şekil 3.11. Standart olarak hazırlanmış proteinlerin ölçümlerinden elde edilmiş referans grafik	54
Şekil 3.12. ECL solüsyonu ile muamele edilerek görüntüsü elde edilen proteinler	55
Şekil 3.13. BCL-10 geninin protein düzeyinde kontrole göre CD133+ ve CD133- GBM hücre hattı ve hasta örneklerindeki kat artışları	56
Şekil 3.14. TIAM-1 geninin protein düzeyinde kontrole göre CD133+ ve CD133- GBM hücre hattı ve hasta örneklerindeki kat artışları	56
Şekil 4.1. Bu tez çalışması kapsamında yapılmış olan eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda anlamlı ve kayda değer artış gösteren genlerin hücre içerisinde etkiledikleri mekanizma ve ekstraselüler matriks ile olan ilişkilerini özetleyen şekil.	73

ÇİZELGELER

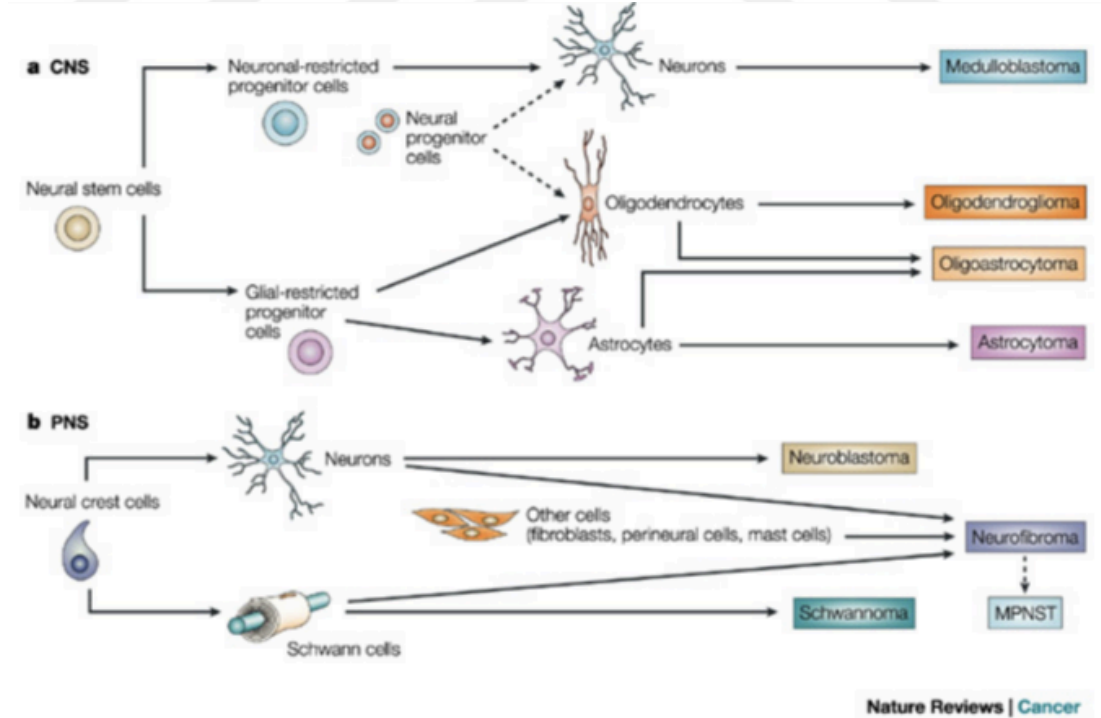
Çizelge 2.1. Tez Çalışması İş Paketi	15
Çizelge 2.2. İnsan Apoptoz Eş zamanlı-PZR Paneli	
İçinde Yer Alan Genler	19
Çizelge 2.3. İnsan İntegrin Sinyalizasyon Eş zamanlı-PZR Paneli	
İçinde Yer Alan Genler	21
Çizelge 2.4. İnsan Apoptoz Eş zamanlı-PZR Paneli	
İçinde Yer Alan Genler	24
Çizelge 2.5. cDNA Sentez Protokolü	33
Çizelge 2.6. PCR array çalışma protokolü	34
Çizelge 3.1. GBM hücre hattı, hasta primer kültürü ve kontrol beyin dokusundan izole edilmiş RNA'ların kantitatif ölçümleri.	40
Çizelge 3.2. Adezyon panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.	43
Çizelge 3.3. Adezyon panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.	43
Çizelge 3.4. Adezyon panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerde ortak olarak anlamlı kat artış/azalışı gösteren genlerin CD133+ ve CD133- hücrelerdeki ifadeleri.	44
Çizelge 3.5. İntegrin panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.	46

Çizelge 3.6. İntegrin panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.	46
Çizelge 3.7. İntegrin panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerde ortak olarak anlamlı kat artış/azalışı gösteren genlerin CD133+ ve CD133- hücrelerdeki ifadeleri.	47
Çizelge 3.8. Apoptoz panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.	48
Çizelge 3.9. Apoptoz panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.	49
Çizelge 3.10. Apoptoz panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerde ortak olarak anlamlı kat artış/azalışı gösteren genlerin CD133+ ve CD133- hücrelerdeki ifadeleri.	49
Çizelge 3.11. GBM hücre hattı U138 ve GBM hasta örneklerinden elde edilen proteinlerin OD değerleri ve konsantrasyonları.	54

1. GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi ve Hücrelerinin Sınıflandırılması

Merkezi sinir sisteminde, embriyonik nöral tüpün ventriküler/subventriküler bölgesinde bulunan multipotent nöral kök hücreler, merkezi sinir sistemini oluşturan 3 temel hücre tipini oluşturur. Bu hücre tipleri nöronlar, oligodendrositler ve astrositlerdir. Nöral kök hücreler, nöral progenitor hücreler ve glial progenitor hücreler olmak üzere iki tip atasal hücre tipine dönüşürler. Nöral progenitor hücrelerden, nöronlar ve oligodendrositler oluşurlar. Glial progenitor hücreler ise hem oligodendrositleri hem de astrositleri oluşturabilmektedir. Periferel sinir sisteminde ise nöral krest hücrelerinden nöronlar ve Schwan hücreleri oluşmaktadır. Nöral krest hücreleri nöral tüplerde bulunan multipotent kök hücrelerden oluşmuştur (Zhu & Parada, 2002) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Merkezi ve periferel sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Zhu & Parada, 2002).

1.2. Sinir Sistemi Kanser Çeşitleri ve Sınıflandırılması

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2016 yılında yayımlamış olduğu bildiride, merkezi sinir sistemi tümörleri son yıllarda yapılan çalışmaların ve gelişen teknolojinin ışığında tekrar sınıflandırılmıştır. Bu sınıflardan bazılarına örnek verilecek olursa; yayılcı astrositik ve oligodendrogial tümörler, ependimal tümörler, embriyonal tümörler, menenjiomalar, mezenkimal tümörler vb. gösterilebilir(Louis ve ark., 2016).

Sınıflandırma yapılırken öncelikle histolojiye dikkat edilmiştir. Astrositoma, oligoastrositoma, oligodendroglioma ve glioblastoma olmak üzere dört farklı histoloji kategorisi bulunmaktadır. Bu kategoriler, IDH (izositrat dehidrogenaz) mutasyonuna sahip olan ve olmayan tümörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Astrositoma, oligoastrositoma ve oligodendroglioma yapısına sahip ve IDH mutasyonu bulunduran tümörler ise, ATRX ve/veya TP53 mutasyonlarına sahip olan ve 1p/19q ko-delesyonuna sahip olan tümörler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Glioblastomalar ise yine IDH mutant ve IDH yaban tip olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar (Louis ve ark., 2016).

1.3. Glioblastoma Multiforme

Primer beyin neoplazması olan glioblastoma multiforme (GBM), beyin tümörlerinin en ölümcül olanıdır. Genetik ve fenotipik olarak heterojen tümör gruplarından oluşan GBM vakalarının %90'ı de novo oluşurken, %10'u düşük grade tümörlerden gelişerek oluşmaktadır. GBM oluşumuna G1/S kontrol noktasında meydana gelen deregülasyonların yanı sıra, kromozom 10q'da meydana gelen kayıpların, EGFR, FGFR2, IRS2 ve AKT3 gibi genlerin amplifikasyonu ve PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD ve NF1 genlerinde meydana gelen mutasyonların başlıca sebep olduğu bilinmektedir. WHO tarafından yapılmış olan GBM karakterizasyon tablosu şekil 1.2. de gösterilmektedir.

	IDH-wildtype glioblastoma	IDH-mutant glioblastoma
Synonym	Primary glioblastoma, IDH-wildtype	Secondary glioblastoma, IDH-mutant
Precursor lesion	Not identifiable; develops de novo	Diffuse astrocytoma Anaplastic astrocytoma
Proportion of glioblastomas	~90%	~10%
Median age at diagnosis	~62 years	~44 years
Male-to-female ratio	1.42:1	1.05:1
Mean length of clinical history	4 months	15 months
Median overall survival		
Surgery + radiotherapy	9.9 months	24 months
Surgery + radiotherapy + chemotherapy	15 months	31 months
Location	Supratentorial	Preferentially frontal
Necrosis	Extensive	Limited
<i>TERT</i> promoter mutations	72%	26%
<i>TP53</i> mutations	27%	81%
<i>ATRX</i> mutations	Exceptional	71%
<i>EGFR</i> amplification	35%	Exceptional
<i>PTEN</i> mutations	24%	Exceptional

Şekil 1.2. 2016, WHO tarafından yapılmış olan GBM karakterizasyon tablosu (Louis ve ark., 2016).

GBM başlıca beyinde gelişir. Beyine infiltre olarak geliştiği için genelde normal dokudan ayırt etmek zordur. Beyin dışına GBM metastazı nadir olsa da dalak, akciğerler, lenf nodları, karaciğer, kemikler, pankreas ve ince bağırsaklara GBM metastazı görülebilmektedir. GBM tümör dokusu ve çevresinde anjiyogenez çok yüksek oranda görülmektedir (Urbańska, Sokołowska, Szmidt, & Sysa, 2014). Bu yüzden tümör dokusu çevresi yüksek oranda hipoksiktir ve tümör proliferasyon oranı yüksektir.

1.3.1. Güncel GBM Tedavi Yöntemleri

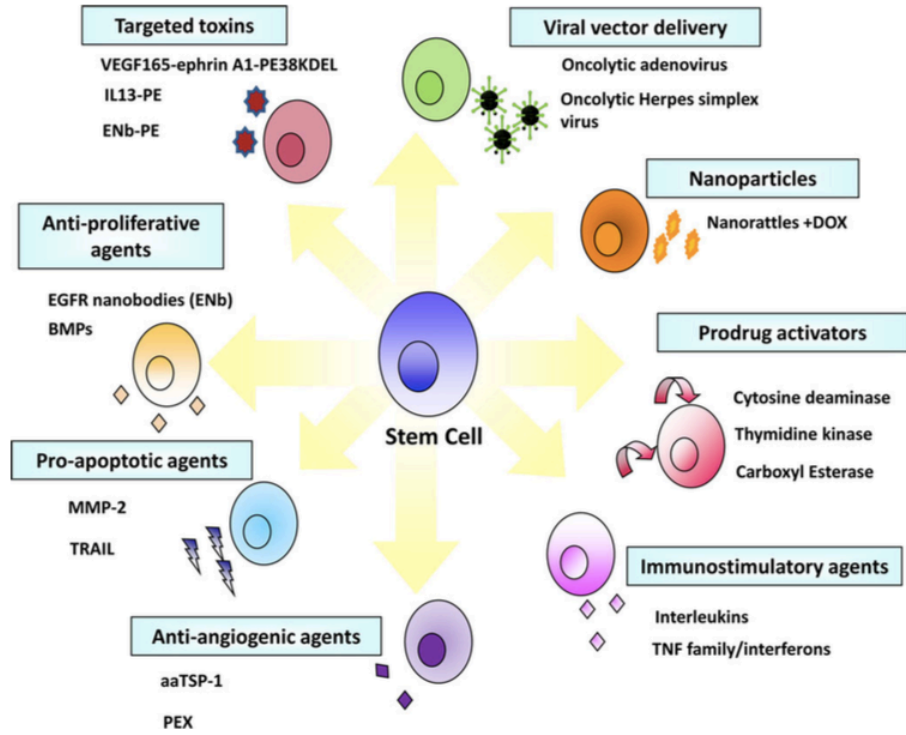
Hastanın bir takım şikayetleri üzerine manyetik rezonans görüntülemenin ardından, GBM primer tanısı GFAP (glial fibrillary acidic protein) immünohistokimyasal yöntemle boyanarak yapılmaktadır. GFAP astrositlerin intermediate filamentlerinde bulunur ve astrositlere özel bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Astrositik tümör gelişimi ile GFAP ifadesinde artma görülmektedir. Bu yöntem ile tümör oluşumu ve gelişimi hakkında bilgi sahibi olunamasa da farklılaşmamış tümör hücreleri özgün olarak seçilebilmektedir. GBM yüksek oranda proliferatif ve infiltrate edici bir hastalık olduğundan, ameliyat ile tüm bölgenin tamamen çıkarılması ve radyoterapi her zaman iyi bir tedavi seçeneği değildir. Bunların yanısıra beyin kan bariyeri sebebiyle ilaçların hedefe ulaştırılması zorlaşırken, tümör hücrelerinin hipoksik bölgelerde bulunması da radyoterapiyi zorlaştırmaktadır (Urbańska ve ark., 2014).

Günümüzde GBM, cerrahi müdahalenin ardından bir kemoteröpatik ajan olan Temazolamide (TMZ) uygulanması ile tedavi edilmektedir. Fakat bu tedavi hastaların ömrünü en fazla 12-14 ay uzatabilmektedir. Bu tedavi sonrasında hastaların tamamına yakınında hastalık nüks etmektedir. Nüks eden hastaların %90'ında aynı bölgeden hastalık geliştiği görülmüştür. Bunun en önemli sebebi, GBM tümörlerinin aşırı infiltrate yapıya sahip olmaları ve bulundukları bölgeye yerleşiklikleri sebebiyle cerrahi yöntemler ile tamamının temizlenmesinin mümkün olmamasıdır. Kemoterapinin ardından, kemoterapiye dirençli populasyonun arttığı düşünülmektedir (Y. Ramirez, Weatherbee, Wheelhouse, & Ross, 2013).

Kemoterapi haricinde, anjiyogenezi inhibe etmek de diğer bir GBM tedavi yöntemi olarak ortaya atılmıştır. Bu tedavinin temeli, tümör hücrelerinin yeni oluşan damarlar yoluyla beslenmesini ve dolayısıyla proliferasyonu engellemektir. In vitro çalışmalar ile umut vaat edici sonuçlar elde edilse de, GBM'in tedaviye hızlı bir şekilde dirençli hale gelmesi sebebiyle bu alanda da halen etkili bir tedavi bulunamamıştır (Y. Ramirez ve ark., 2013).

GBM tedavisindeki en büyük problemlerden biri normal doku ile tümörlü dokunun iç içe oluşudur. Yüksek invazif kapasiteye sahip GBM

dokuları, normal doku içine yerleştiğinden günümüzde GBM için kullanılan tedavilerin hepsi aynı zamanda normal dokuya da zarar vermektedir. Buna bir çözüm olarak kök hücrelerin hedefe yönelik taşıyıcı olarak kullanılması düşünülmüştür. Bu yöntemle in vitro ortamda kök hücrelerin tümör-karşıtı transgenleri ifade etmesi için manipüle edilmesi ve daha sonra in vivo hücre implantasyonu yapılması hedeflenir. Kök hücreler şekil 1.3.'de görüldüğü gibi, bir çok farklı ajanı ve molekülü salgılayarak özgün olarak yalnızca hedeflenen tümör hücrelerine etki edecek şekilde, manipüle edilebilmektedir.

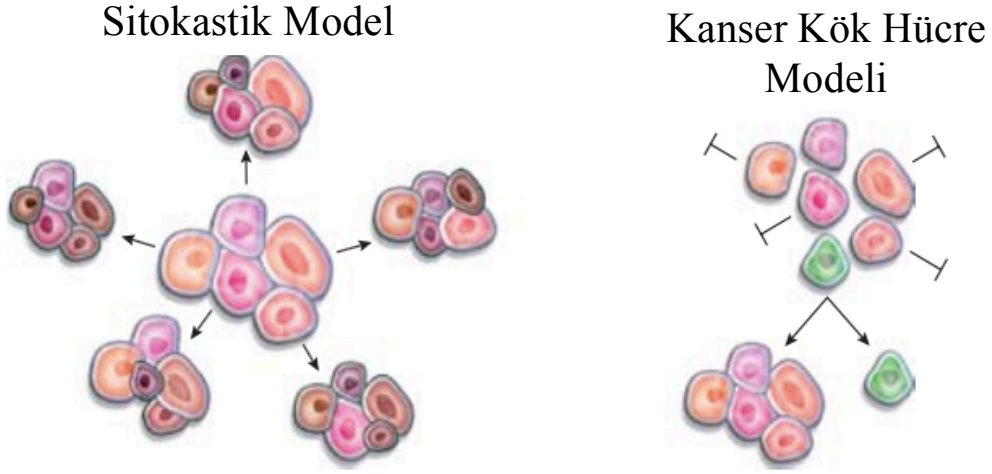


Şekil 1.3. Kök hücrelerin beyin tümörü tedavisi için modifiye edilmesi (Shah, 2016).

1.4. Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücre (KKH) teorisine göre, malin kütlenin içerisinde yer alan küçük bir populasyon kanserin oluşumundan ve durdurulamaz bir şekilde gelişmesinden sorumludur. Bu hücreler yetişkin kök hücreleri gibi kendilerini yenileme ve farklılaşma yetilerine sahiptirler. KKH'lerin ilk olarak nasıl oluştuğu konusunda farklı teoriler ortaya atılmıştır. Bunlardan ilki, sağlıklı yetişkin kök hücrelerinde meydana gelen bazı mutasyonların sonucunda KKH'lerin oluştuğu yönündedir. Bir diğer teori ise, bazı projenitör hücrelerde gerçekleşen onkogenik transformasyonlardan KKH'lerin oluştuğu yönündedir. Diferansiye olmuş olan somatik hücrelerin tekrar kök hücre özelliği kazanarak maliniteye katkısı olabileceği de önerilen teorilerden biridir. Son olarak normal kök hücrelerin, mutant somatik hücreler ile füzyona uğrayarak KKH'lerin oluşabileceği yönündeki teoriden söz edilebilir (Girouard & Murphy, 2011).

KKH'ler, 1960'lar ve 70'lerde lösemi ve multipl miyelomda tümör popülasyonunda yalnızca az miktarda hücrenin sürekli proliferasyona uğradığının görülmesi ile tanımlanmıştır. Doksanlı yıllarda bu hücreler izole edilerek, yüzeylerinde özgün belirteçler bulundurdıkları keşfedildi. Bu hücrelerin fareye transfer edildiğinde tümör başlatıcı özelliğe sahip oldukları görülmüştür. Bu keşfin ardından, tümör gelişimi için mevcut güne kadar kabul edilegelmiş sitokastik model, kanser kök hücre modeli ile karşılaştırılmaya başlandı (Şekil 1.4.). Kanser kök hücre modeline göre, küçük bir malin hücre topluluğu kanserin gelişimine ve tümörün heterojen fenotip oluşturmaya sebep olur. Sitokastik model ise herhangi bir tümör hücresinin veya tümördeki her hücrenin rastgele mutasyon ve klonal seçim ile tümör oluşturma kapasitesinin olduğunu öngörmektedir (Girouard & Murphy, 2011).



Şekil 1.4. Tümör oluşumunda stokastik model ve kanser kök hücre modeli (Girouard & Murphy, 2011).

1.4.1. Glioblastoma Kök Hücreleri ve Yüzey Belirteçleri

GBM kök hücrelerin (GKH) çoğunlukla nöral kök hücrelerden oluşurken, bir kısmının normal beyin hücrelerinden tekrar diferansiye olarak oluştuğuna dair bir teori bulunmaktadır. GKH'ler ikiye ayrılmaktadır; fetal nöral kök hücrelerle benzerlik gösteren pronöral GKH'ler ve yetişkin nöral kök hücrelere benzeyen mezenkimal GKH'ler. Mezenkimal GKH'ler, pronöral olanlara göre çok daha agresif, invazif, anjiyogenik ve radyoterapiye dirençlidir. GBM tümör kütleleri heterojen yapıya sahip olsalar da, CD133, CD15, A2B5 ve CD44 gibi kök hücre belirteçlerini hemen hemen tüm GKH'ler yüzeylerinde bulundurmaktadırlar. Bu sebeple GBM tedavisi için çok önemli hedefler olarak görülmektedirler (Bradshaw ve ark., 2016).

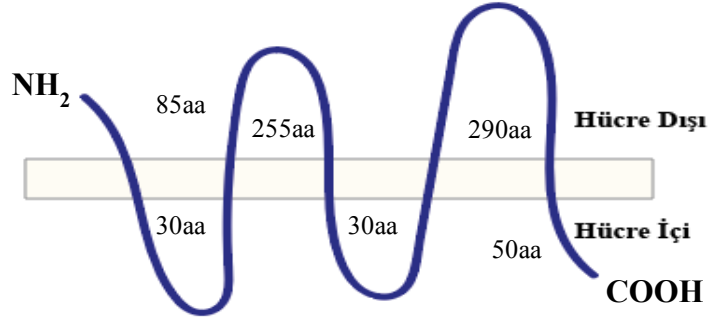
Kanser kök hücrelerinin, embryonik kök hücrelerden geliyor olabileceği tezini destekleyen bir özellik olarak, araştırılan 40 kanser tipinden 18 tanesinde kanser kök hücrelerinin bilinen embryonik kök hücre belirteçlerinden (OCT-4, SOX2, KLF-4 ve c-Myc) en az birini ifade ettiği görülmüştür. GKH'ler için önerilmiş belirteçler arasında da EKH işaretleri yer alır ve bunlar; CD133, nestin, NANOG, SALL4, L1CAM, Bmi1, Olig2,

c-Myc, SOX2, STAT3, CD44 ve KLF4 olarak sıralanabilir (Bradshaw ve ark., 2016).

1.4.1.1. CD133

Prominin-1 (CD133), ilk olarak fare nöroepitel kök hücrelerinin yüzeyinde keşfedilmiştir. Daha sonra bu molekülün insan homoloğu, hematopoietik kök hücrelerden izole edilmiştir (Shmelkov, St Clair, Lyden, & Rafii, 2005). CD133 “pentaspan” bir membran glikoproteinidir (Şekil 1.5.). CD133, literatürde birçok kanserde belli bir hücre topluluğunun yüzeyinde görülmüştür. Bu kanser çeşitlerine, meme kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri, melanoma, pankreas kanseri vb. örnek verilebilir. Bir çok kanser çeşidinde bulunması sebebi ile CD133 iyi bir kanser kök hücre belirteci olarak kabul edilmiştir. GBM başlatıcı hücreler olduğu kabul edilen GKH’ler de, literatürde CD133+ hücreler olarak tanımlanmaktadır (Schmohl & Vallera, 2016). CD133’ün normal dokularda da ifade edilmesi sebebi ile iyi bir kök hücre belirteci olup olmadığı tartışılmakta olsa da, iki farklı grubun (Ricci-Vitiani ve ark., 2006) ve (O’Brian ve ark., 2007) CD133+ hücrelerin kolon karsinomu oluşturabildiğini, CD133- hücrelerin ise tümör başlatıcı özellikte olmadıklarını göstermeleri ile CD133+ hücrelerin seçici bir KKH belirteci olduğu belirtilmektedir.

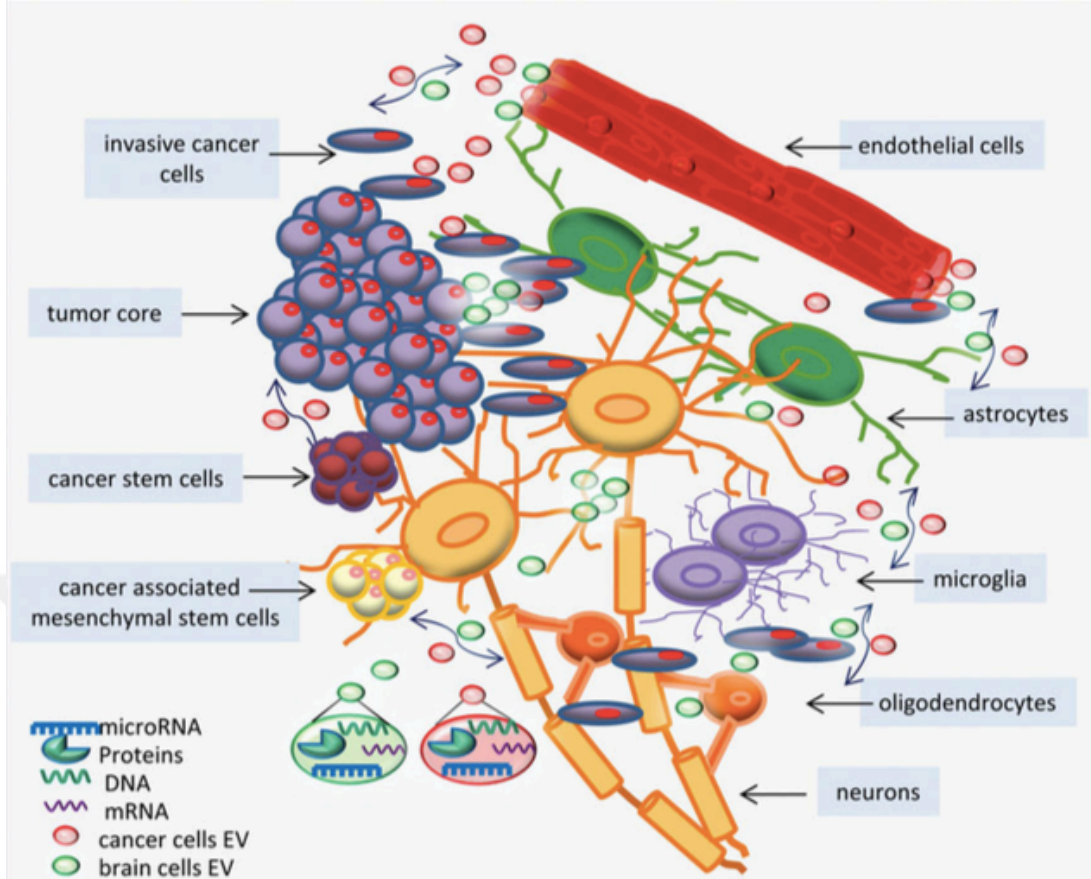
CD133’ü hedefleyen bazı tedaviler ile ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır. Fakat tümör kütesine tedavi için tasarlanmış molekülü damar yoluyla ulaştırmak zor olmaktadır. GBM gibi yüksek oranda invazif kanserlerde ise tümör kütesine ulaşmak için ekstraselüler matriksin aşılması gerekmektedir. Son yıllarda CD133’e özgün, immunoteröpatik bir çok molekül ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Monospesifik antikorların yanı sıra, CD133’e özgü ScFv ile antikor zincirine bağlı toksinler, anti-CD133 nanopartiküllerin içerisinde anti-kanser ilaçlar, CD133’leri tanıyan ve immün sistemi harekete geçiren T-hücre aktivatörleri, CD133’ün yanında bir diğer KKH yüzey belirtecini de tanıyan bispesifik antikorlar ve CD133 antikorlarına bağlı NK hücreleri ile KKH’lerin elimine edilmesi gibi çalışmalar yapılmaktadır (Schmohl & Vallera, 2016).



Şekil 1.5. CD133 yüzey belirtecinin hücre membranındaki yapısal gösterimi.

1.5. Glioblastoma Mikroçevresi

Solid tümörler kendi başlarına değil, çevreleriyle ilişki içerisinde ve çevrelerine bağlı bulunurlar. Tümör hücrelerinin çevrelerine uyum sağlama yetilerinin yanı sıra, çevreyi kendilerine uygun şekilde değiştirme yetileri de bulunmaktadır. Bu durum kendi içlerinde ve etraflarındaki tümöral olmayan hücrelerle iyi bir iletişim sağlamalarını gerektirmektedir. Mikroçevre, ekstraslüler matriks, bağışıklık hücreleri, kan damarları çevre stromalar ve tümör hücrelerinden oluşan lokalize bir niş olarak tanımlanmaktadır. GBM hücreleri çevrelerindeki tümör ilişkili parenkimal hücreler, vasküler hücreler, mikroglia, bağışıklık hücreleri ve nöral prekürsör hücreler ile etkilişimde bulunurlar. Vasküler hücreler, besin ve oksijen sağlamanın yanı sıra GKH'ler için özel bir niş oluşumunda görev alırlar. Mikroglial hücreler, GBM invazyonunda önemli role sahiptirler. Tümör mikroçevresinde bulunan, GBM hücreleri tarafından salgılanan ve hücreler arası iletişimi sağlayan moleküller konusunda ise hala çok bir bilgiye sahip olunamamıştır (Godlewski ve ark., 2015).



Şekil 1.6. Glioblastoma tümör mikroçevresi (Godlewski ve ark., 2015).

1.5.1. Glioblastoma Kök Hücrelerinin Mikroçevresi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, GBM tedavisinde özellikle temazolamide'e karşı direnç gelişmesinin ve hastalığın nüks etmesinin sebebinin büyük ölçüde GKH'ler olduğunu göstermiştir. Bu sebeple, GKH'lerin hedeflenmesi ve kök hücre özelliklerini devam ettirmelerinin engellenmesi GBM tedavisi için iyi bir yöntem olarak gösterilmektedir. GKH'lerin hedeflenmesi için en sağlıklı yollardan birinin, kök hücrelerin mikroçevre ile ilişkilerinin kesilmesi olduğu düşünülmektedir. Bu sayede, anjiyogenez ve bağışıklık sisteminden kaçışın da önüne geçilebilmesi mümkündür (Liebelt ve ark., 2016).

GKH'lerin kök hücre özelliklerini devam ettirebilmek için kullandıkları bazı sinyal yolları bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak Notch, Sonic Hedgehog ve Wnt sinyal yolları gösterilebilir. Notch yolağının GKH'lerde yüksek oranda aktif olduğu literatürde yer almaktadır. Bu yolağın aktif olması ile GKH'ler diferansiasyonu baskılayarak, kök hücre karakterinin devam etmesini sağlamaktadırlar. Notch ve Delta-like-1 ve Jagged-1 gibi ligandlarının ifadelerinin azalması ile GKH'lerin onkogenik potansiyelleri azalmaktadır. Dolayısıyla Notch yolağı GKH'lerin sağ kalımı ve proliferasyonunda rol oynamaktadır. Wnt yolağı ise hem GKH'lerin proliferasyon ve diferansiasyonlarında kritik bir role sahiptir, hem de tümör büyümesine önemli katkı sağlamaktadır. Bir diğer yolak ise EGFR yolağıdır. EGFR aktivasyonu GKH proliferasyonunu ve tümör gelişimini tetikler. EGFR yüksek ifade edildiğinde, GKH'lerin kendilerini yenileme kapasitelerini artırır. Son olarak, sonic hedgehog yolağı GKH'lerde yüksek oranda aktiftir ve GKH'lerin kök hücre karakterlerini devam ettirmelerinin yanı sıra tümör oluşumuna da katkıda bulunur (Liebelt ve ark., 2016).

GKH'ler, vaskülogenezis ve anjiyogenezis haricinde iki farklı yol ile daha yeni damar oluştururlar. Bunlardan ilki "vascular co-option" adı verilen bir süreçtir. Bu yöntemde glioma hücreleri normal beyin damarlarının etrafına infiltre olurlar ve bu damarları tümör dokusunun içine katarlar. Bu sürecin sonunda hipoksi de arttığından anjiyogenez de indüklenmiş olur. Anjiyogenez varolan damarlardan VEGF yoluyla yeni damarların oluşması sürecidir. Hipoksi, GKH'lerde SDF-1 adı verilen geni aktive ederek, VEGF üretilmesine sebep olur. VEGF endotel hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlar. GKH'ler, endotel hücre migrasyonunu ve anjiyogenezi tetikleyen hepatoma kökenli büyüme faktörü salgırlar (Liebelt ve ark., 2016). Bir başka damar oluşturma yöntemi ise "vaskülojenik mimik"dir. Bu yöntemde endotel hücreler yerine tümör hücreleri matriks benzeri yapılar oluştururlar. CD133+ GKH'lerin 3 boyutlu matrijel tüp formasyonu deneyi ile vaskülojenik bir ağ oluşturduğu gösterilmiştir (Hallani ve ark., 2010).

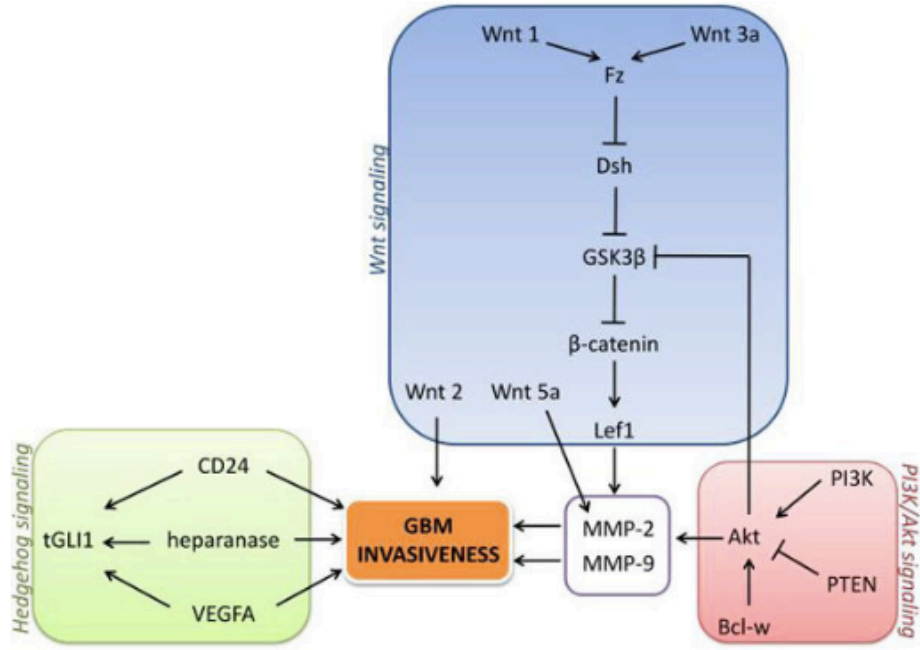
1.6. Glioblastoma Hücrelerinin İnvazyonu ve Migrasyonu

Kanser hücrelerinde invazyon ve migrasyon, adezyon ve integrin proteinlerinin ifadelerine bağlıdır. Öncelikle tümör hücreleri morfolojik olarak

polarize hale gelirler ve ekstraselüler matrikse (ECM) uzanıp tutunmaya yarayacak çıkıntılar oluştururlar. Bu süreçte GBM hücreleri şeklini ve hacmini değiştirerek çok dar bölgeler de dahil invazyon ve migrasyon yaparlar. Mobilitenin yanı sıra GBM hücreleri ECM üzerindeki bir takım proteinlere bağlanarak kendilerini ileri çekerler. Bir yandan da tümör hücrelerine bariyer olan ECM'yi geçmek için bazı proteazlar ile ECM'yi parçalarlar. Dahası tümör hücreleri ECM'den salgılanan bazı molekülleri regüle ederek çevredeki stromal hücreleri de etkiler ve bu sayede tümör büyümesi ve invazyonu sağlanmış olur. Glioma hücrelerinde motilite disregüle edildiğinden, GBM hücreleri yüksek oranda migrasyona yatkın hale gelirler (Paw ve ark., 2015).

Ekstraselüler matriks (ECM), normalde glioma hücrelerinin invazyonu için bir bariyer görevi görmektedir. Ancak bu bariyerin proteazlar aracılığı ile yıkımı GBM hücrelerinin invazyonuna olanak tanır. Birçok çalışma bazı MMP'lerin (matrix metalloproteinase) GBM'de yüksek ifade edildiğini göstermiştir. Proteolitik enzim olan MMP'ler invazyonda önemli role sahiptirler (Mentlein, Hattermann, & Held-Feindt, 2012).

GKH'lerin GBM invazyonun da birincil sebep oldukları düşünülmektedir. β -catenin'in GBM'de yüksek ifade edildiği bilinmektedir. β -catenin susturulduğunda GBM hücrelerinin invazif kapasitelerinin azaldığı görülmüştür (Pu ve ark., 2008). EGFR aktivasyonun ise β -catenin transaktivasyonunu sağlayarak invazyona sebep olduğu gösterilmiştir (Ji ve ark., 2009). GBM invazyonu ile ilgili olduğu düşünülen bir başka protein ise FRAT1 (frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas-1) proteinidir. β -catenin'in pozitif regülatörü olan FRAT1, GBM'de yüksek ifade edilmektedir ve tümör büyümesinin yanı sıra invazyonu da tetiklemektedir (G. Guo ve ark., 2013). Glioma invazyonunda rolü olan bir başka yolak ise PI3K/Akt yolağıdır. GBM'de, özellikle tümör ve normal beyin dokusu arasındaki bariyerde bulunan hücrelerde, Akt sinyalizasyonu MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini artırmaktadır. Tümör hücreleri bu şekilde proteolitik yeti kazanarak normal dokuyu işgal edebilmektedirler (Kubiatowski ve ark., 2001). Bcl-w proteininin ise Akt sinyalizasyonunu aktive ederek GBM invazyonunu tetiklediği gösterilmiştir (W. S. Lee ve ark., 2013) (Paw ve ark., 2015). GBM invazyonunda ve dolayısıyla migrasyonunda etkili olduğu düşünülen yollar ve ayrıntıları şekil 1.7. de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Glioblastoma tümör hücrelerinin invazyonunda etkili olan yollar ve işleyiş mekanizmaları (Paw ve ark., 2015).

1.7. Tezin Amacı

GBM tedavisinde kök hücreleri hedefleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak yeni biyobelirteçler keşfetmek amacı ile, GKH oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan CD133 pozitif GKH'lerde integrin, adezyon ve apoptoz yolları ile ilgili RT-PZR array uygulanarak yaklaşık 250 genin taranması ile genom ebadında yapılmış geniş bir çalışma bulunmamaktadır. Özellikle CD133+ hücrelerde toplu bir mikro dizin analizinin yapılması, GBM tedavisinde rol oynayacak önemli bir adımdır.

Bu tez çalışmasının primer amacı, CD133+ GBM kök hücrelerinde adezyon, integrin ve apoptoz ile ilgili olup; farklı ifade edilen genlerin saptanması GBM hücrelerinin elimine edilebilmesi ve hedefleme tedavilerine kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin belirlenmesidir. GBM kök hücrelerine özgü karakteristik olarak etkin olan genlerin saptanması, GBM kök hücrelerinde tutunma ve apoptoz ile ilgili

mekanizmaların anlaşılması ve bu genlerin GBM tedavisinde ilerideki araştırmalara kaynak oluşturması bu tezin temelini oluşturmaktadır.

Tezin Hedefleri:

1. GBM kök hücrelerinin adezyon profilini belirlemek
2. GBM’de ve kök hücrelerinde integrin gen ifade farklarını tespit etmek
3. Apoptoz ile ilgili farklı ifade edilen genleri saptamak
4. GBM kök hücrelerinin kullandığı moleküler mekanizmaları açığa çıkarmak



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çizelge 2.1. Tez Çalışması İş Paketi

İş Paketi
4 GBM hücre hattı ve 10 primer hasta dokusu kültüre edildi
Hücreler tripsinize edildi ve MACS yöntemi ile CD133+ ve CD133- hücreler ayrıldı
Elde edilen CD133+ ve CD133- hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı
RNA'dan cDNA elde edildi
cDNA ile insan hücre adezyonu, insan integrin sinyalizasyonu ve insan apoptoz panellerinde bulunan primerler kullanılarak eş zamanlı PZR yapıldı
Eş zamanlı PZR sonucunda yalnızca CD133+ hücrelerde ve hem CD133+ hem de CD133- hücrelerde mRNA ifadesi istatistiksel olarak anlamlı artan/azalan 13 gen belirlendi
Seçilen genlerden, yüzeyde bulunan CD70 ve DR6'nın protein düzeyinde ifadelerine akım sitometri ve konfokal mikroskobu ile bakıldı
Seçilen genlerden, Tiam1 ve BCL10'un protein düzeyinde ifadelerine western blotting ile bakıldı

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme Ve Solüsyonlar

2.1.1. Hücre Hatları ve Hasta Dokularının Temini

GBM tümör ve non tümöral hasta dokularından lobektomi yöntemi ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tavsiye edilen standart yöntemlere dayanılarak hasta dokuları temin edilmiştir. GBM hücre hattı olarak bu tez çalışmasında U118, T98, U138 ve U87 kullanılmıştır.

2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler

- PBS: Hücre yıkamalarında kullanıldı (Lonza 10X Katalog No: 17-517Q)
- Tripsin: Hücreleri flask yüzeyinden kaldırma amaçlı kullanıldı (Capricorn 10X - Katalog No: TRY - 1B10)
- Hücre hatlarını beslemek için kullanılan besiyerleri;
- U118 ve T98 hücre hatlarını beslemek için: RPMI 1640 (Lonza, 500ml), %1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS
- U138 hücre hattını beslemek için: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml) 1,5 gr düşük glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %20 FBS
- U87 hücre hattını beslemek için: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml) 1,5 gr düşük glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS
- Primer hücreleri beslemek için kullanılan besi yeri;
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml) 4,5 gr yüksek glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 500ml) 4,5 gr yüksek glukoz, %1 Penisilin/Streptomisin, %40 FBS
- %10 Dimetilsülfoksit (DMSO) solüsyonu: Hücreleri dondurmak için kullanıldı (Appllichem, Katalog No: 67-68-5)
- Etil alkol: %75, Sterilizasyon için kullanıldı (Riedel-de Haen, Katalog No: 64-17-5)
- Falcon tüp: (15, 50 ml) (Sarstedt, Katalog No: 62.554.502, 62.547.254)
- TC Flask (T25): Hücre ekimi için kullanıldı (Sarstedt, Katalog No: 83.1810.002-300)

- TC Flask (T75): Hücre ekimi için kullanıldı (Sarstedt, Katalog No: 83.1813.002-100)
- Hücre dondurmada kullanılmak üzere Cryotüpler

Hücre Kültürü Saklanması Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

- Steril kabin (Holten S-20100)
- CO₂ Etüvü (Sanyo MCO-20 AIC, 37°C %5)
- CO₂ İnkübatör (ThermoScientific)
- Işık Mikroskobu (Nikon TS 100)
- Derin Dondurucu -20 (Sanyo)
- Derin Dondurucu -80 (Sanyo)
- Sıvı Azot Tankı
- Santrifüj cihazı (Nüve NF 400)

2.1.3. Hücre Saflaştırma İçin (MACS) Kullanılan Malzemeler

- Miltenyi Biotech MACS çoklu ve manuel ayırma düzeneği
- MACS Tampon Çözeltisi: 50ml fosfat-tuz tamponu (PBS), 0,25 gr sığır serum albümin (BSA) ve 0,5M EDTA
- CD133 AC133 monoklonal antikor (Miltenyi Biotech)
- CD133 293C3 monoklonal antikor (Miltenyi Biotech)
- Manyetik tanecikler (Miltenyi Biotech)
- MACS kolonları (Miltenyi Biotech)
- Ependorf tüpler 1.5ml, 2ml

2.1.4. RNA İzolasyonu ve Ölçümünde Kullanılan Malzemeler

- Iscript RNA izolasyon kiti (Bio-Rad)
- Santrifüj (Eppendorf – Centrifuge 5415 R)
- Spektrofotometre cihazı (BioTek - Epoch) ve Gen 5 programı

2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler

Bio-Rad cDNA sentez kiti (Katalog numarası: 170-8891)

- RNA İscript Supermix (5X) (BioRad)
- Reverse Transcriptase Enzyme (BioRad)
- Steril dH₂O

200ul PCR tüpleri

Corbett Research PCR cihazı

2.1.6. Kanser Kök Hücre Paneli PCR Array, Hücre Yüzey Belirteçleri PCR Array, Sitokin/ Kemokin Reseptör PCR Array ve Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative RT-PCR) Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Cihaz: Roche Applied Science LightCycler-R-480 Real Time PCR Sistemi

SsoAdvancedUniversal SYBR Green (Bio-Rad, 172-5274)

İnsan Hücre Adezyonu Eş zamanlı-PCR Paneli İçinde Yer Alan Genler (Çizelge 2.2.)

İnsan İntegrin Sinyalizasyon Eş zamanlı-PZR Paneli İçinde Yer Alan Genler (Çizelge 2.3.)

İnsan Apoptoz Eş zamanlı-PZR Paneli İçinde Yer Alan Genler (Çizelge 2.4.)

Çizelge 2.2. İnsan Hücre Adezyonu Eş zamanlı-PZR Paneli İçinde Yer Alan Genler

Kuyu	Sembol	Genin Açık Adı	Kuyu	Sembol	Genin Açık Adı
A1	ABL1	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	E1	NF2	neurofibromin 2 (merlin)
A2	ACTN1	actinin, alpha 1	E2	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
A3	ADAM12	ADAM metalloproteinase domain 12	E3	PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
A4	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	E4	PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
A5	ARF1	ADP-ribosylation factor 1	E5	PIP5K1C	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma
A6	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	E6	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor
A7	ARPC2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	E7	FERMT2	fermitin family member 2
A8	BCAR1	breast cancer anti-estrogen resistance 1	E8	PPP2CA	protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme
A9	CALR	calreticulin	E9	PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha
A10	CAPN1	calpain 1, (mu/I) large subunit	E10	PRKCA	protein kinase C, alpha
A11	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	E11	PTEN	phosphatase and tensin homolog
A12	CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	E12	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
B1	CD47	CD47 molecule	F1	PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
B2	CDC42	cell division cycle 42	F2	PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
B3	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	F3	PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F

B4	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	F4	PTPRO	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
B5	CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog	F5	PXN	paxillin
B6	CSK	c-src tyrosine kinase	F6	RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
B7	DDEF1	development and differentiation enhancing factor 1	F7	RHOA	ras homolog family member A
B8	DNM2	dynammin 2	F8	ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
B9	DOCK1	dedicator of cytokinesis 1	F9	SDC4	syndecan 4
B10	ENAH	enabled homolog (Drosophila)	F10	SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)
B11	ENG	endoglin	F11	SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
B12	FLNA	filamin A, alpha	F12	SLC9A1	solute carrier family 9, subfamily A (NHE1, member 1)
C1	FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	G1	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1
C2	GAB1	GRB2-associated binding protein 1	G2	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
C3	GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	G3	SRC	v-src sarcoma viral oncogene homolog
C4	GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	G4	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
C5	GRB7	growth factor receptor-bound protein 7	G5	SYK	spleen tyrosine kinase
C6	HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	G6	TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
C7	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2	G7	THY1	Thy-1 cell surface antigen
C8	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	G8	TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
C9	ILK	integrin-linked kinase	G9	TLN1	talin 1
C10	INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	G10	TRIO	triple functional domain (PTPRF interacting)

C11	INSR	insulin receptor	G11	VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
C12	IRS1	insulin receptor substrate 1	G12	VAV1	vav 1 guanine nucleotide exchange factor
D1	ITGA5	integrin, alpha 5	H1	VCL	vinculin
D2	ITGB1	integrin, beta 1	H2	VIL2	Villin 2
D3	KCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 2	H3	VIM	vimentin
D4	KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1	H4	ZYX	zyxin
D5	LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	H5	ACTB	Actin, beta
D6	LYN	v-src-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	H6	B2M	Beta-2-microglobulin
D7	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	H7	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D8	MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	H8	GUSB	Glucuronidase, beta
D9	MAPK8 IP3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D10	MARC KS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	H10	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
D11	NCK2	NCK adaptor protein 2	H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
D12	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	H12	RPL13 A	Ribosomal protein L13a

Çizelge 2.3. İnsan İntegrin Sinyalizasyon Eş zamanlı-PZR Paneli İçinde Yer Alan Genler

Kuyu	Sembol	Genin Açık Adı	Kuyu	Sembol	Genin Açık Adı
A1	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	E1	ITGB6	integrin, beta 6
A2	ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1	E2	ITGB7	integrin, beta 7

		motif, 13			
A3	ADAMTS8	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 8	E3	ITGB8	integrin, beta 8
A4	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	E4	LAMA1	laminin, alpha 1
A5	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin	E5	LAMA2	laminin, alpha 2
A6	CNTN1	contactin 1	E6	LAMA3	laminin, alpha 3
A7	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	E7	LAMB1	laminin, beta 1
A8	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	E8	LAMB3	laminin, beta 3
A9	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	E9	LAMC1	laminin, gamma 1
A10	COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	E10	MMP1	matrix metallopeptidase 1
A11	COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	E11	MMP10	matrix metallopeptidase 10
A12	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	E12	MMP11	matrix metallopeptidase 11
B1	COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	F1	MMP12	matrix metallopeptidase 12
B2	COL5A1	collagen, type V, alpha 1	F2	MMP13	matrix metallopeptidase 13
B3	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	F3	MMP14	matrix metallopeptidase 14
B4	COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	F4	MMP15	matrix metallopeptidase 15
B5	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1	F5	MMP16	matrix metallopeptidase 16
B6	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	F6	MMP2	matrix metallopeptidase 2
B7	CTGF	connective tissue growth factor	F7	MMP3	matrix metallopeptidase 3
B8	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	F8	MMP7	matrix metallopeptidase 7
B9	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	F9	MMP8	matrix metallopeptidase 8
B10	CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	F10	MMP9	matrix metallopeptidase 9
B11	CTNND2	catenin (cadherin-associated protein), delta 2	F11	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
B12	ECM1	extracellular matrix protein 1	F12	PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
C1	FN1	fibronectin 1	G1	SELE	selectin E

C2	HAS1	hyaluronan synthase 1	G2	SELL	selectin L
C3	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	G3	SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
C4	ITGA1	integrin, alpha 1	G4	SGCE	sarcoglycan, epsilon
C5	ITGA10	integrin, alpha 10	G5	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
C6	ITGA11	integrin, alpha 11	G6	SPG7	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)
C7	ITGA2	integrin, alpha 2	G7	SPP1	secreted phosphoprotein 1
C8	ITGA3	integrin, alpha 3	G8	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
C9	ITGA4	integrin, alpha 4	G9	THBS1	thrombospondin 1
C10	ITGA5	integrin, alpha 5	G10	THBS2	thrombospondin 2
C11	ITGA6	integrin, alpha 6	G11	THBS3	thrombospondin 3
C12	ITGA7	integrin, alpha 7	G12	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
D1	ITGA8	integrin, alpha 8	H1	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
D2	ITGA9	integrin, alpha 9	H2	TNC	tenascin C
D3	ITGAD	integrin, alpha D	H3	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
D4	ITGAL	integrin, alpha L	H4	VCAN	versican
D5	ITGAM	integrin, alpha M	H5	ACTB	Actin, beta
D6	ITGAV	integrin, alpha V	H6	B2M	Beta-2-microglobulin
D7	ITGAX	integrin, alpha X	H7	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D8	ITGB1	integrin, beta 1	H8	GUSB	Glucuronidase, beta
D9	ITGB2	integrin, beta 2	H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D10	ITGB3	integrin, beta 3	H10	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
D11	ITGB4	integrin, beta 4	H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
D12	ITGB5	integrin, beta 5	H12	RPL13A	Ribosomal protein L13a

Çizelge 2.4. İnsan Apoptoz Eş zamanlı-PZR Paneli İçinde Yer Alan Genler

Kuyu	Sembol	Genin Açık Adı	Kuyu	Sembol	Genin Açık Adı
A1	APAF1	Apoptotic protease activating factor	E1	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
A2	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	E2	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
A3	BAG1	BCL2-associated athanogene	E3	CARD4	Caspase recruitment domain family, member 4
A4	BAG3	BCL2-associated athanogene 3	E4	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
A5	BAG4	BCL2-associated athanogene 4	E5	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
A6	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	E6	RPA3	Replication protein A3, 14kDa
A7	BAX	BCL2-associated X protein	E7	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator
A8	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	E8	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
A9	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	E9	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
A10	BCL2A1	BCL2-related protein A1	E10	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
A11	BCL2L1	BCL2-like 1	E11	TNFRSF10C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
A12	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	E12	TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d
B1	BCL2L2	BCL2-like 2	F1	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
B2	BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	F2	TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
B3	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	F3	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
B4	BIRC1	Baculoviral IAP repeat-containing 1	F4	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
B5	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	F5	CD40	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)
B6	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	F6	TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8

B7	BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	F7	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
B8	BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	F8	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
B9	BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	F9	TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
B10	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	F10	TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
B11	BRE	Brain and reproductive organ-expressed	F11	TNFSF13B	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
B12	BOK	BCL2-related ovarian killer	F12	TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
C1	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease	G1	TNFSF18	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18
C2	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	G2	TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
C3	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	G3	CD40LG	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5)
C4	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	G4	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C5	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	G5	TNFSF7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7
C6	CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	G6	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
C7	CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	G7	TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
C8	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	G8	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
C9	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	G9	TP73L	Tumor protein p73-like
C10	CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	G10	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1
C11	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	G11	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
C12	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	G12	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
D1	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	H1	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4

D2	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	H2	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5
D3	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	H3	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
D4	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor	H4	TRIP	TRAF interacting protein
D5	DAPK1	Death-associated protein kinase 1	H5	ACTB	Actin, beta
D6	DAPK2	Death-associated protein kinase 2	H6	B2M	Beta-2-microglobulin
D7	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	H7	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D8	DFFB	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide	H8	GUSB	Glucuronidase, beta
D9	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D10	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	H10	PGK	Phosphoglycerate kinase 1
D11	HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein	H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
D12	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	H12	RPL13A	Ribosomal protein L13a

2.1.7. Akım Sitometri metodunda kullanılan malzemeler

- PBS + EDTA (hücreleri kaldırmak için)
- Tavsiye edilen tampon: 98ml PBS, 2ml FBS, 300ul 0,5M EDTA
- İlgili Akım Sitometrisi Antikorları (Konjuge FITC **DR6** ve **CD70**, PE **CD133**)
- Soğutmalı santrifüj
- Eppendorf tüpler 1.5ml, 2ml
- Cihaz: Accuri C6 Akım Sitometre

2.1.8. Konfokal Mikroskopunda görüntü almak için slayt hazırlanmasında kullanılan malzemeler

- PBS + EDTA (hücreleri kaldırmak için)
- Konfokal Mikroskopu (Zeiss LSM 800)
- FBS
- Boyaması yapılacak genin florasan boya işaretli antikoru (Konjuge FITC **DR6** ve **CD70**, PE **CD133**)
- 6 kuyucuklu plaka
- Mikroskop slaytları (lam, lamel)

2.1.9. Protein izolasyonu için kullanılan malzemeler

- T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent) (Thermo-Scientific)
- Vortex
- Eppendorf tüpler: 1.5, 2ml
- Soğutmalı santrifüj

2.1.10. Western Blotting için kullanılan malzemeler

- %95 Comassie Blue + %5 2-mercaptoethanol: Proteinleri kaynatmak için kullanıldı.
- Isı bloğu
- Bio-rad hazır jel
- İnce ve kalın camlar
- 10'lu tarak
- APS
- TEMED
- İzopropanol
- Pastör pipet

- Bio-rad western blotting standı
- Protein büyüklüğünü (kD) gösteren işaretçi (Prism Ultra Protein Ladder (10-245 kDa) (ab116028))
- Bio-rad western blotting yürütme tankı
- Bio-rad güç kaynağı
- 1X Çalışma tamponu
- 10X Çalışma tamponu
- PVDF membran
- Transfer tamponu (5.4g Tris + 1.14 Glisin + 75ml Methanol + dH₂O)
- Bio-rad western blotting transfer cihazı
- Transfer kağıtları
- Süt Tozu
- 1X TBS-t (100ml 10X TBS + 900ml dH₂O + 500ul Tween)
- 10X TBS
- İlgili primer antikor (Tiam1, ((F-11): sc-377355) ve BCL10, 331.3: sc5273)
- Sekonder antikor
- ECL Solüsyonu (Advansta WesternBright Sirius Kat. No: K-12043-D10)
- Bio-rad görüntüleme cihazı
- ImageLab western blotting görüntüleme programı

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü ve Primer Kültür

2.2.1.1. Primer Kültür

- Laboratuvarımıza gelen hasta dokuları kültür ortamına alınarak küçük parçalara ayrıldıktan sonra %10 FBS bulunan DMEM de 3 kere yıkandı.
- Yıkamanın ardından falkon tüpün dibine çökmüş olan doku parçaları %40 FBS bulunan DMEM yüksek glukoz besiyeri ile birlikte 25cm²lik flasklara ekildi.
- Hücreler dokulardan çıkmaya başladıktan sonra %10 FBS'li DMEM yüksek glukoz besiyeri ile beslemelere devam edildi.

2.2.1.2. Hücrelerin Sıvı Azottan Çıkarılıp Çözdürülmesi

- Daha önce dondurulup sıvı azot tankında saklanan hücre hatları çıkartılarak tekrar kültür edildi.
- Bunun için cryo-tüpler içerisindeki hücreler tamamen çözülmeden hızlı bir şekilde 8ml besiyerinin içine alınarak homojen bir şekilde çözüldü.
- 1100rpm de 5dk santrifüj yapıldı ve süpernatanda bulunan DMSO'dan kurtarıldı.
- Pellet oluşturan hücreler tekrar 8ml uygun besiyerinde çözüldü.
- Hücreler ilk pasajında 25cm²lik, sonraki parajlarda ise 75 cm²lik flasklara ekildi.
- CO₂ inkübatöründe 37°C de büyümeye bırakıldı.

2.2.1.3. Hücrelerin Beslenmesi

- İnkübatörden alınan flasklardaki eskiyen besi yeri pastör pipetlerle çekildi.

- 3ml PBS ile yıkama yapıp, PBS pastör pipet yardımı ile tekrar çekildi.
- 25 cm²lik flasklar için 3ml, 75 cm²lik flasklar için 7-8ml taze besiyeri eklenerek hücreler tekrar etüve kaldırıldı.

2.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

- Kültürde bulunan flasklar %70 oranında hücre ile kaplandığında pasajlama işlemine alındı.
- Öncelikle flask üzerinde bulunan eski besi yeri çekilerek 3ml PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- Ardından 25cm²lik flasklar için 0.5ml, 75 cm²lik flasklar için 1ml Tripsin eklendi ve flasklar 37°C inkübatörde 5 dk inkübe edildi.
- 5 dk sonra etüvden alınan flasklardaki tripsin enziminin etkisini durdurmak için tripsin miktarının en az iki katı miktarda besi yeri eklendi.
- Hücreler bir falkon tüpe alındı ve 1100rpm de 5dk santrifüj yapıldı.
- Hücrelerin bir kısmı dondurulmak üzere ayrıldı kalan kısmı ise pasajı devam edecek flasklara yeniden ekilerek etüve kaldırıldı.

2.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması

- Kültürü devam eden hücreler olası deney tekrarlama veya sonraki projelerde kullanılmak üzere her pasajda dondurularak kaldırıldı.
- Bunun için tripsinize edilip pellet haline getirilen hücreler dondurma solüsyonu eklenerek cryo tüplere alındı.
- Dondurma solüsyonu: %10 DMSO ve %90 besi yeri
- Dondurma işlemi aşamalı olarak soğutarak gerçekleştirildi.

- Bunun için cryo tüpler -20°C 'de 1 saat bekletildikten sonra, -80°C 'de 24 saat bekletildi. Ardından ise bu tüpler azot tankına kaldırıldı.

2.2.2. Glioblastoma Hücrelerinden Kanser Kök Hücre İzolasyonu

2.2.2.1. MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Analizi

- Hücreler yeterli sayı ve büyüklüğe ulaştıktan sonra 4 hücre hattının ve 10 hastanın primer hücreleri CD133+ ve CD133- olmak üzere manyetik hücre ayırma tekniği olan MACS yöntemi ile ayrıldı.
- Her bir hücre hattından ve primer hücrelerden 2 tekrar olacak şekilde toplamda 28 MACS analizi yapıldı.
- Ayırma yöntemi CD133 hücre izolasyon kiti ile yapıldı (Miltenyi Biotec).
- Hücreler 50ml fosfat-tuz tamponu (PBS), 0,25gr sığır serum albümin(BSA) ve 0,5M EDTA ile hazırlanan MACS tamponu ile yıkandıktan sonra, CD133 AC133 mAb (Miltenyi Biotec) ile 10dk karanlıkta ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi.
- Ardından tekrar MACS tamponu ile yıkandıktan sonra, bu kez manyetik taneler (Miltenyi Biotec) ile hücreler 15dk karanlıkta ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi.
- Hücreler MACS kolonlarından geçirildiğinde pozitif olan hücreler kolona bağlı kalırken, negatif hücreler kolonlardan akıtıldı.
- CD133+ hücreleri içeren kolonlar manyetik alandan ayrıldıktan sonra, hücreler MACS tamponu ile yıkanarak kolondan ayrıldı.
- Ayrılan hücreler RNA izolasyonu veya protein izolasyonu yapılmak üzere pellet haline getirilerek -80°C ye kaldırıldı.

2.2.3. RNA İzolasyonu

- Iscript RNA izolasyon kiti ile 100.000 hücre için 100ul iScript solüsyonu olacak şekilde pelletler çözüldü.
- 15.000 rcf'de 2dk santrifüj ile izolasyon yapıldı.
- Süpernatanda bulunan RNA'lar temiz bir ependorf tüpe alınarak -80°C'de saklandı.

2.2.4. RNA Kantitasyonu

- Seyreltilen RNA örneklerinden 2 µl alınarak spektrofotometre cihazında Gen 5 programı yardımıyla ölçüm yapıldı.

2.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

- Seçilen CD133- ve CD133+ hücre popülasyonlarından izole edilen RNA örneklerinden, Bio-Rad cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentezi çizelge 2.5.'teki protokol izlenerek yapıldı.

Çizelge 2.5. cDNA Sentez Protokolü

Master Mix Hazırlanışı		
Komponentler	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	1000ng
İscript RT supermix	4µl	60µM
Nucleaz içermeyen su	Değişken	Son hacim su ile 16µl ye tamamlanır
Toplam Hacim 20µl		
Reaksiyon Protokolü		
Primer Bağlanması	25 °C' de 5dk	
Reverse Transkripsiyon	30 °C' de 42dk	
RT inaktivasyonu	85 °C' de 5dk	

2.2.6. RT² ProfilerTM PCR Dizi (Array) Sistemi

- RT² ProfilerTM PCR Array Sistemi, 96 kuyucuklu, ilişkili genlerin sıralandığı ve iç kontrollerin de bulunduğu optimize gerçek zamanlı PCR deneyleri setidir.
- Bu yöntemin gerçekleştirilmesi için daha önce hazırlanmış olan cDNA ile hazırlanan master mix karıştırıldı ve her kuyucukta 9ul olacak şekilde dağıtıldı.
- Bu tezde 3 panel çalışılmıştır. Her bir panel 88 gen ve 8 referans hizmetçi genden oluşmaktadır.

Çalışma protokolü çizelge 2.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. PCR array çalışma protokolü

Master Mix Hazırlanışı (1 kuyucuk için)		
Komponentler	Hacim	
Nükleaz free H2O	3.8	
Primer	1µl	
SYBR green	5µl	
cDNA	0.2	
Toplam Hacim 10µl		
Reaksiyon Protokolü		
Denatürasyon	95 °C’ de 5 dk	
Amplifikasyon	95 °C’ de 5 dk	} 45 siklus
	58 °C’ de 45sn	
	72 °C’ de 30sn	
Denaturasyon	99 °C’ de 5 dk	
	100 °C’ de 5 dk	
	101 °C’ de 5 dk	
Soğuma	102 °C’ de 5 dk	

2.2.7. Akım Sitometri

- Hücre kültüründe büyütülen hücreler PBS+EDTA ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 15ml'lik tüplere aktarıldı ve 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst kısım atıldı ve hücrelerin üzerine 3 ml PBS eklenerek tekrar 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı ve pelletlerin üzerine tavsiye edilen tampon eklenerek hücreler eppendorf tüplere alındı.
- 350 rcf'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- 100ul bloklama tamponu içerisinde önerilen oranda konjuge primer antikor eklendi.
- Primer antikor eklenen hücreler 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.
- Inkübasyon sonunda 350 rcf'de 5dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti 300ul tavsiye edilen tamponda çözüldü.
- 10.000 hücre sayılarak hücre yüzey belirteçlerinin protein oranları ACCURI C6 akım sitometre cihazında ölçüldü ve analiz edildi.

2.2.8. Konfokal Mikroskopunda Görüntüleme İçin Slayt Hazırlama

- 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilen lamellerin üzerine her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücreler konfluent olduğunda boyamaya alındı.
- Boyamaya alınan hücreler üzerindeki eski besiyeri çekilerek 1ml PBS ile yıkama yapıldı.
- Hücreler 1ml FBS ile 30dk karanlıkta inkübe edildi.
- 100µl FBS ile 10µl primer antikor slayt üzerine eklendi ve 20dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
- Slayt üzerine 1ml PBS eklenerek yıkandı.
- 150µl FBS ile 150µl DAPI slayt üzerine eklendi ve 5 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
- Slayt üzerine 1ml PBS eklenerek yıkandı.
- Boyanan lamel lamın üzerine alınarak konfokal mikroskopunda görüntüleme yapıldı.

2.2.9. Protein İzolasyonu

- Protein izolasyonu için tripsinize edilip pellet haline getirilen ve kullanılmaya dek -80°C 'de saklanan hücreler kullanıldı.
- İzolasyon yapılmak üzere -80°C 'den çıkarılan hücre pelletlerinin üzerine pellet hacmine göre, büyükse 200ul küçükse 100ul, T-per eklendi.
- Her örnek en az 30 kere olacak şekilde pipetleme yöntemi ile karıştırıldı.
- Daha sonra her örnek en az 30sn olacak şekilde vortex ile karıştırıldı.
- Örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 16000g de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden alınan örnekler tekrar pipetleme ve vortex yöntemleri ile karıştırıldı.
- Tekrar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 16000g de 20 dakika santrifüj yapıldı.
- Proteinleri içeren süpernatantlar yeni tüplere alındı.

2.2.10. Western Blotting

Jel Hazırlanışı (4 jel için):

- Kalın ve ince cam aralarında jel için boşluk kalacak şekilde standa yerleştirildi.
- Resolving jel için bio-rad hazır jel setinden “Resolver A” ve “Resolver B” solüsyonları 10'ar ml olacak şekilde falkon tüpte karıştırıldı.
- Karışımın içine 100ul APS ve 10ul TEMED eklendi.
- Jel karışımı camların arasına pastör pipet yardımı ile döküldü.
- Jelin üzeri düzgün olması ve hava ile teması kesmek için izopropanol ile kaplandı.
- “Resolving jel” donduktan sonra (yaklaşık 30 dk) stacking jel karışımı bio-rad hazır jel setinden “Stacker A” ve “Stacker B” solüsyonlarında 3.5'ar ml falkon tüpte karıştırıldı.
- Karışımın üzerine 35ul APS ve 7ul TEMED eklendi.
- “Resolving jel” üzerinde bulunan izopropanol dökülerek uzaklaştırıldı.
- Karışım pastör pipet yardımı ile “resolving jel” üzerine döküldü ve 10'luk taraklar stacking jel içerisine yerleştirildi.

Yürütme:

- “Stacking jel” de donduktan sonra tank üzerinde gösterilen seviyeye kadar “running buffer” konuldu ve jeller tarakları çıkarılmadan yürütme kasetlerine yerleştirildi.
- Jeller arasına yeni “running buffer” döküldükten sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı.
- Kaynatılmış proteinler belirlenen sıraya göre kuyucuklara yüklendi.
- Son olarak en baştaki kuyucuğa 4ul “marker” yüklendi.
- Tank güç kaynağına bağlandı ve proteinler stacking jeli geçene kadar 100V, geçtikten sonra 190-220V’da yürütüldü.

Transfer:

- Transfer için belirli boyutlarda kesilmiş olan membran 30sn methanol, 1-2 dk dH₂O ve 15dk transfer buffer içerisinde çalkalanarak aktiveleştirildi.
- Transfer cihazında en alta transfer kağıtları önce transfer buffer’da ısıtılıp arada hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi.
- Transfer kağıdı üzerine aktiveleştirilmiş membran yerleştirildi.
- Yürüme bittikten sonra kasetten çıkarılan jeller gerekli boyutlarda kesilerek membran üzerine yerleştirildi.
- En üste tekrar transfer kağıdı konuldu ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi.
- Cihazın kapağı kapatıldı ve yuvasına yerleştirildi.
- 30 dk 2.5A’de transfer yapıldı.

Bloklama:

- Transfer cihazından çıkarılan membranlar %5’lik (2gr süt tozu + 40ml TBS-t) içerisinde 1 saat oda sıcaklığında shaker üzerinde inkübe edildi.

Primer Antikor:

- Bloklamadan sonra uygun miktarlarda %5 süt tozu içerisinde hazırlanmış primer antikorlar membran üzerine döküldü.
- Membranlar shaker üzerinde +4°C’de gece boyu inkübe edildi.
- Ertesi sabah membranlar 10’ar dk 3 kere TBS-t ile yıkandı.
- Sekonder Antikor;
- Uygun miktarlarda %5 süt tozu içerisinde hazırlanan sekonder antikorlar membran üzerine döküldü.
- Oda sıcaklığında ve shaker üzerinde yaklaşık 1.5 saat inkübasyon yapıldı.
- Inkübasyon sonrası tekrar 10’ar dk 3 kere membranlar TBS-t ile yıkandı.

Görüntüleme:

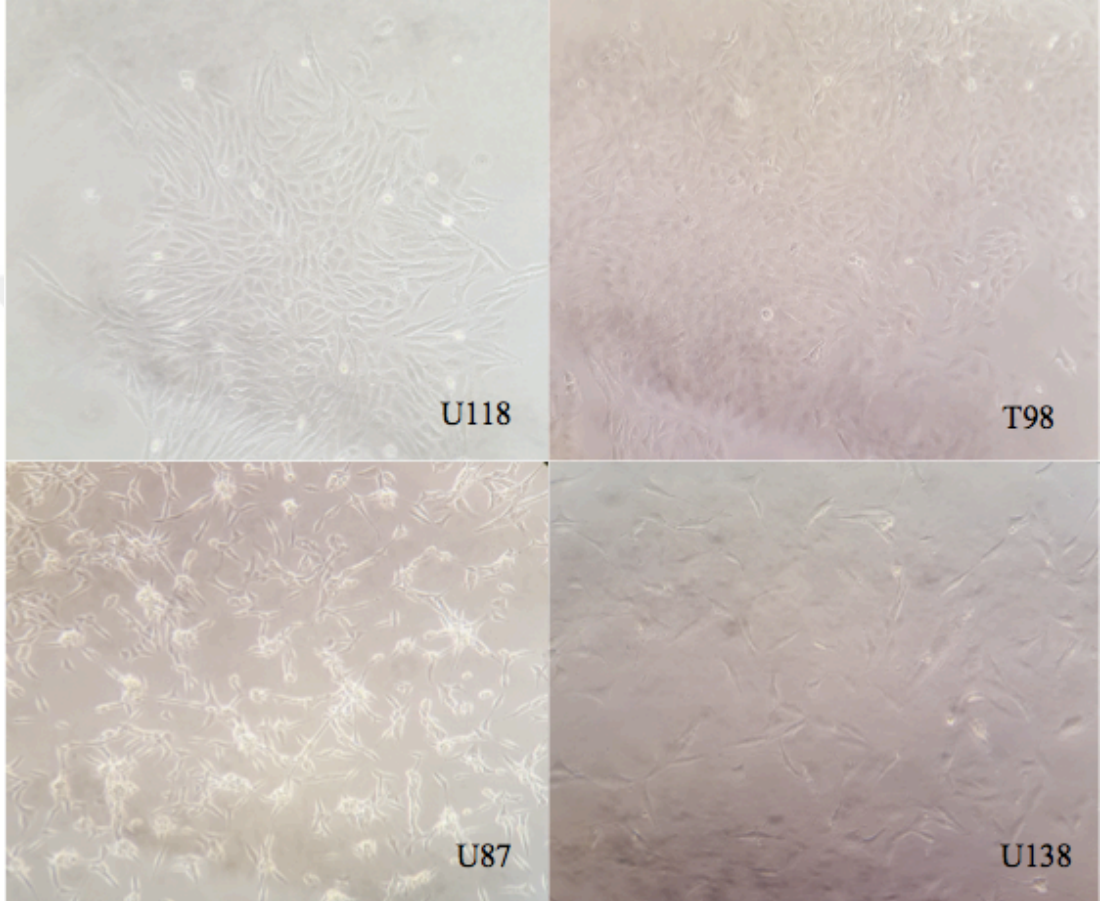
- ECL (enhanced chemiluminescent) solüsyonu A ve B 150'şer ul eppendorf içerisinde karıştırıldı ve 150ul dH₂O ile seyreltildi.
- Suyu süzdürülen membran bench üzerine yerleştirildi ve ECL karışımı membran üzerine eşit bir şekilde dağıtıldı.
- Boyanan membran 2dk karanlıkta inkübe edildi ve 2dk sonunda bio-rad görüntüleme cihazı ve ImageLab programı kullanılarak görüntüleme yapıldı.

2.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistik

- RT-PCR sonucunda hesaplanan kat artışları istatistiksel t-Test analizi ile 1'e karşı normalize edildi.
- Sonuçlar, ortalama +/- standard sapma olarak özetlendi. Toplanan verilerde öncelikle CD133 negatif hücrelerinin mRNA artış/azalışları CD133 pozitiflere kıyaslandı.
- Daha sonra bu iki grup kontrol mRNA'ya oranlandı. CD133 (-) ve CD133 (+) hücreler için ayrı ayrı olmak üzere istatistiksel anlamlı genler seçildi.
- İstatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

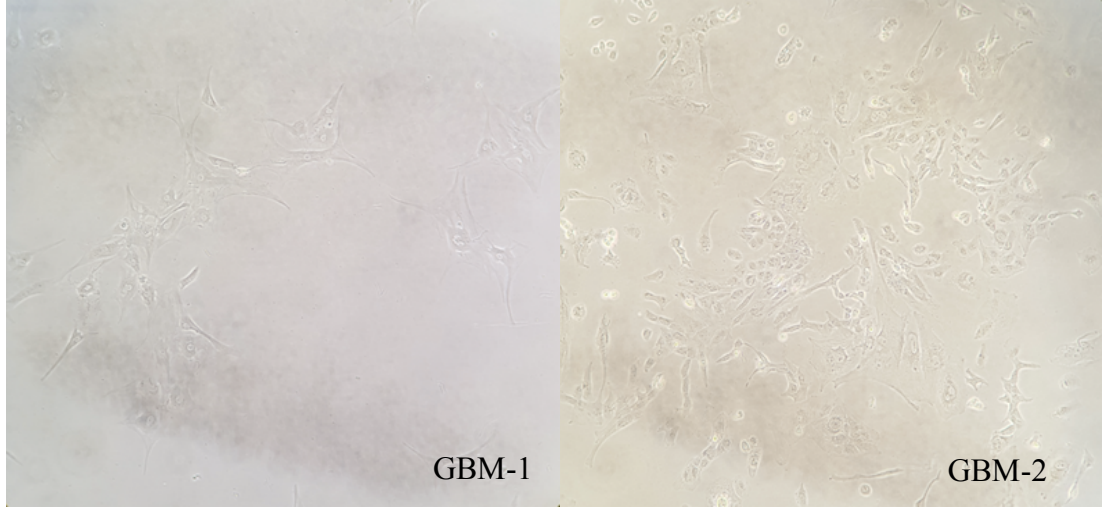
3. BULGULAR

3.1. Glioblastoma Hücre Hatlarının ve Primer Hücre Kültürlerinin Mikroskop Görüntüleri



Şekil 3.1. Glioblastoma hücre hatlarının ışık mikroskopunda görünümü (10X).

Tavsiye edilen besiyerlerinde kültüre alınan hücrelerin kültürün 7. pasajında mikroskopta elde edilen görüntüleri şekil 3.1 de yer almaktadır.



Şekil 3.2. Glioblastoma hasta primer kültürlerinin ışık mikroskopunda görünümü (10X).

Tavsiye edilen besiyerlerinde kültüre alınan primer hücrelerin kültürün 7. ve 8. pasajında mikroskopta elde edilen görüntüleri şekil 3.2 de yer almaktadır.

3.2. RNA Ölçümleri

GBM hücre hattı U138 ve hasta-1 ve hasta-2'nin primer kültürlerinden, ve kontrol beyin dokusundan izole edilen RNA'lardan elde edilmiş ölçüm değerleri çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

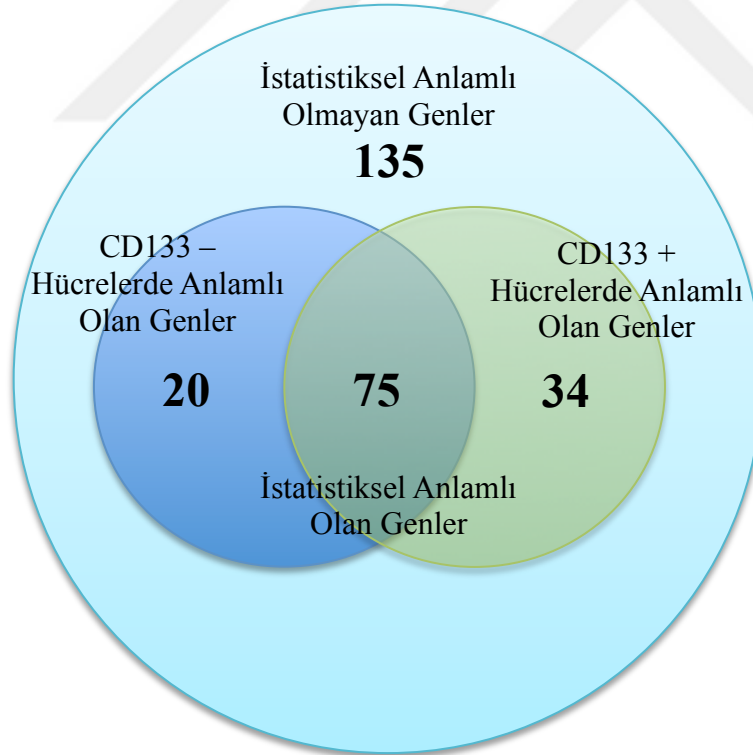
Çizelge 3.1. GBM hücre hattı, hasta primer kültürü ve kontrol beyin dokusundan izole edilmiş RNA'lardan elde edilen ölçüm değerleri.

<u>Örnek</u>	<u>260/280</u>	<u>ng/ul</u>
U138 CD133+	1,5045	93,8315
U138 CD133-	1,9995	460,39
Hasta-1 CD133+	1,5005	51,9845

Hasta-1 CD133-	1,967	169,904
Hasta-2 CD133+	1,493	37,9865
Hasta-2 CD133-	2,068	401,503
Kontrol Doku	1,7005	338,8705

3.3. Eş Zamanlı PZR Sonuçları

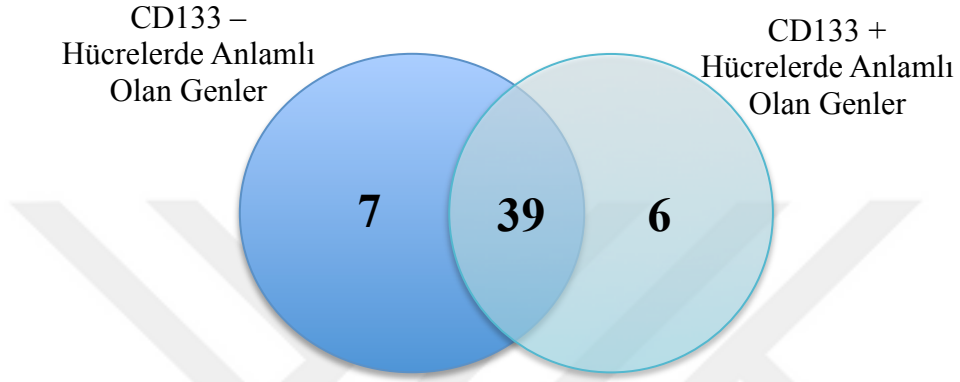
Eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda adezyon paneli, integrin paneli ve apoptoz panelinden elde edilen anlamlı kat artış/azalışına sahip genlerin isimleri, kat artış miktarları ve p değerleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.3. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan adezyon, integrin ve apoptoz panellerinin toplamında taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.

3.3.1. Adezyon Paneli Eş Zamanlı PZR Sonuçları

Eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda adezyon panelinden elde edilen anlamlı kat artış/azalışına sahip genlerin isimleri, kat artış miktarları ve p değerleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.4. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan adezyon panelinde taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.

Çizelge 3.2. Adezyon panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.

GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	p Değeri
SYK	0,11	0,000
PIP5K1C	0,34	0,000
PRKCA	0,34	0,000
IRS1	0,40	0,010
KEAP1	0,65	0,011
PRKACA	1,84	0,015
MAPK8	44,03	0,014

Çizelge 3.3. Adezyon panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.

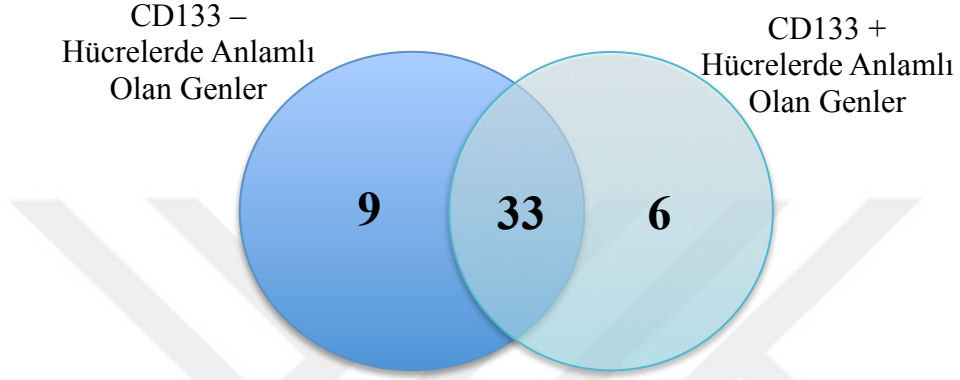
GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	p Değeri
SORBS1	0,24	0,000
PTEN	0,58	0,034
FYN	3,84	0,021
FERMT2	10,25	0,011
GRB2	25,00	0,001
TIAM1	95,58	0,045

Çizelge 3.4. Adezyon panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerde ortak olarak anlamlı kat artış/azalışı gösteren genlerin CD133+ ve CD133- hücrelerdeki ifadeleri.

GEN İSMİ	CD133(-) Hücrelerde Kat Artışı	p Değeri	GEN İSMİ	CD133(+) Hücrelerde Kat Artışı	p Değeri
SOS1	0,12	0	SRC	0,07	0
DOCK1	0,13	0	SOS1	0,21	0
PDPK1	0,14	0	DOCK1	0,29	0,012
HSPA2	0,20	0	HSPA2	0,31	0
SRC	0,28	0,018	PDPK1	0,32	0
ARHGAP5	3,22	0,003	THY1	3,51	0,044
THY1	3,28	0,046	ARHGAP5	3,96	0,007
STAT3	4,78	0,015	ENAH	5,14	0,006
ENAH	5,61	0	CDC42	5,72	0
INSR	6,60	0,012	STAT3	7,74	0,004
CDC42	9,85	0,01	MARCKS	11,83	0
PAK1	12,77	0,01	INSR	11,90	0,011
MARCKS	13,99	0,003	PAK1	13,32	0,003
TLN1	16,05	0	CRK	18,15	0
CRK	18,92	0	PTPN11	23,67	0
PTPN11	22,29	0	CAPN1	28,25	0,006
CAPN1	25,15	0,003	CAV1	28,30	0,002
VIL2	38,38	0,003	TLN1	38,38	0,002
RAC1	38,56	0,001	RAC1	40,46	0,001
CFL1	61,98	0	CFL1	43,89	0
CAV1	74,02	0,018	VIL2	44,74	0,007
SLC9A1	91,00	0	SDC4	100,99	0,001
CSK	97,11	0,023	SLC9A1	104,76	0,001
SDC4	171,10	0,002	CSK	134,68	0,058
NCK2	268,11	0	NCK2	248,12	0,003
SDCBP	322,79	0	SDCBP	303,23	0,001
PTPN1	330,80	0,001	PTPN1	389,06	0,002
BCAR1	461,91	0,003	BCAR1	675,33	0,009
TRIO	475,83	0,002	ROCK1	797,72	0
SHC1	908,68	0,017	TRIO	832,87	0
ROCK1	937,28	0	CALR	839,64	0
PTK2	1337,73	0,002	SHC1	960,81	0,03
CALR	1342,49	0	PTK2	1499,60	0,002
ILK	2858,95	0	ILK	2080,23	0
ARF1	4986,16	0,001	ITGA5	4665,67	0,003
ITGA5	5159,19	0,006	ARF1	6458,60	0,001
FLNA	6542,65	0,005	VIM	6514,38	0,001
VIM	8746,40	0	HSPB1	9861,35	0,001
HSPB1	18045,98	0,002	FLNA	12288,04	0,001

3.3.2. İntegrin Paneli Eş Zamanlı PZR Sonuçları

Eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda integrin panelinden elde edilen anlamlı kat artış/azalışına sahip genlerin isimleri, kat artış miktarları ve p değerleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.5. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan integrin panelinde taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.

Çizelge 3.5. İntegrin panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.

GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	p Değeri
ADAMTS13	0,00	0
ITGB2	0,01	0
MMP10	0,07	0
ITGA7	0,33	0,021
COL7A1	0,36	0
LAMB3	0,41	0,006
ITGA2	0,45	0,001
ITGA5	0,49	0,004
TGFBI	16,37	0,057

Çizelge 3.6. İntegrin panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.

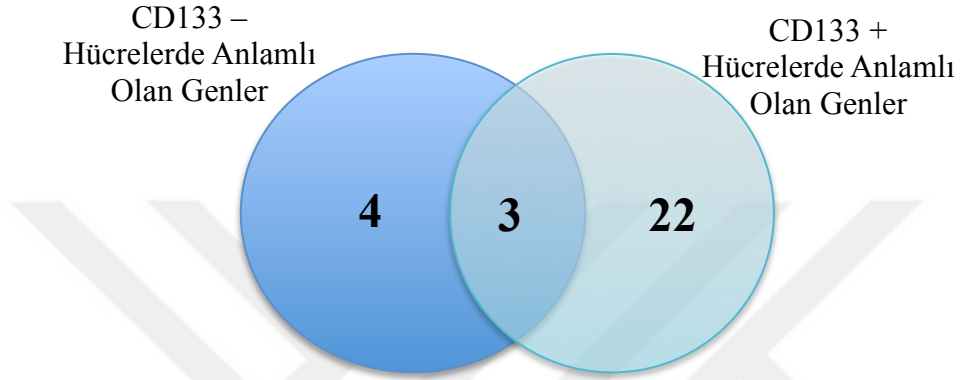
GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	p Değeri
SPG7	3,16	0,005
NCAM1	4,06	0,037
MMP8	4,21	0,045
COL12A1	39,27	0,024
MMP7	41,78	0,012
COL14A1	355,53	0,045

Çizelge 3.7. İntegrin panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerde ortak olarak anlamlı kat artış/azalışı gösteren genlerin CD133+ ve CD133- hücrelerdeki ifadeleri.

GEN İSMİ	CD133(-) Hücrelerde Kat Artışı	p Değeri	GEN İSMİ	CD133(+) Hücrelerde Kat Artışı	p Değeri
MMP3	0,00	0	THBS3	0,00	0
THBS3	0,00	0	MMP3	0,00	0
ITGAD	0,00	0	VCAN	0,00	0
VCAN	0,00	0	ITGAD	0,00	0
MMP12	0,00	0	TIMP1	0,00	0
COL8A1	0,00	0	COL8A1	0,01	0
TIMP1	0,00	0	ITGA3	0,01	0
ITGAX	0,01	0	MMP12	0,01	0
ITGA3	0,01	0	ITGB4	0,01	0
COL6A1	0,01	0	LAMA3	0,02	0
MMP15	0,01	0	CTNND1	0,02	0
COL4A2	0,01	0	MMP15	0,02	0
CTNND1	0,01	0	COL6A1	0,03	0
MMP9	0,02	0	TIMP2	0,04	0
TIMP2	0,02	0	COL4A2	0,05	0
ITGB4	0,02	0	MMP9	0,08	0
CD44	0,02	0	CD44	0,09	0
SELL	0,04	0	SELL	0,11	0
LAMA3	0,05	0	LAMA2	0,14	0
ADAMTS ₁	0,06	0	ITGAX	0,15	0
LAMA1	0,07	0	ITGB1	0,17	0
LAMA2	0,08	0	LAMA1	0,19	0
ITGB3	0,09	0	ITGA8	0,24	0,002
ITGB1	0,12	0	ADAMTS ₁	0,26	0
ITGB8	0,18	0	ITGB3	0,28	0,005
ITGA8	0,27	0,035	ITGB8	0,45	0,039
ITGA6	0,30	0	CTNNB1	0,47	0,008
CTNNB1	0,31	0	ITGA6	0,55	0,048
ITGAV	3,68	0,041	ITGAV	7,17	0,04
CTNNA1	10,81	0,004	CTNNA1	18,85	0,022
LAMC1	122,17	0,016	LAMC1	230,80	0,02
COL1A1	200,61	0,053	SGCE	682,67	0,014
SGCE	286,12	0,014	COL1A1	771,26	0,053

3.3.3. Apoptoz Paneli Eş Zamanlı PZR Sonuçları

Eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda apoptoz panelinden elde edilen anlamlı kat artış/azalışına sahip genlerin isimleri, kat artış miktarları ve p değerleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.6. Eş zamanlı PZR ile analizi yapılmış olan apoptoz panelinde taranmış olan, sadece CD133- ve sadece CD133+ hücrelerde anlamlı bulunan ve CD133- ve CD133+ hücrelerde ortak olarak anlamlı bulunan genlerin sayısını gösteren venn şeması.

Çizelge 3.8. Apoptoz panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133- hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.

GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	p Değeri
CIDEB	0,34	0,01
TNFSF13	0,42	0,009
TNFRSF10B	34,62	0,019
GADD45A	1097,28	0,035

Çizelge 3.9. Apoptoz panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin sadece CD133+ hücrelerde anlamlı kat artış/azalışı gösteren genler.

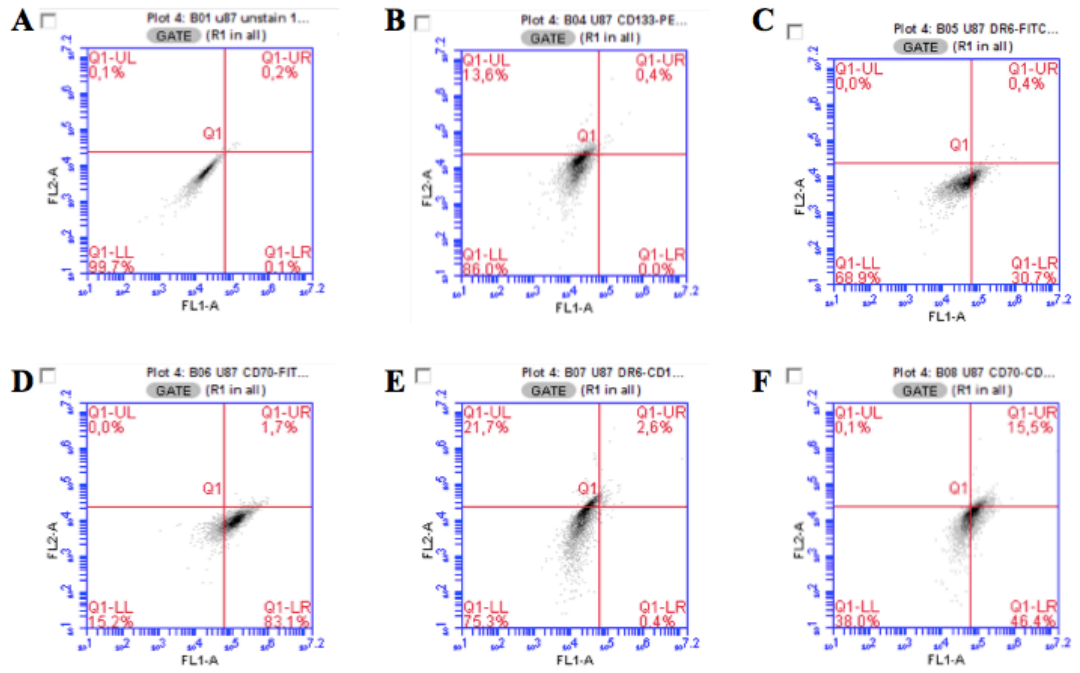
GEN İSMİ	KAT ARTIŞI	p Değeri
TRAF1	0,06	0
TNFSF9	0,09	0
TNF	0,27	0,002
BIRC3	0,35	0,006
CASP6	3,59	0,024
BIRC6	13,99	0,008
CASP8AP2	15,45	0,016
BAG3	17,05	0,004
BIRC2	17,80	0,006
TRAF2	17,88	0,035
TNFSF7	20,69	0,011
FAS	24,18	0,009
ATM	27,51	0,025
BCL10	43,93	0,011
TRIP	54,01	0,025
CASP2	56,42	0,013
CASP8	60,38	0,041
MCL1	67,60	0,013
BAG4	152,58	0,03
CFLAR	186,31	0,014
TNFRSF21	223,61	0,011
BFAR	317,81	0,004

Çizelge 3.10. Apoptoz panelinde, kontrol beyin dokusuna göre 10 GBM hastasından elde edilmiş primer hücrelerin CD133+ ve CD133- hücrelerde ortak olarak anlamlı kat artış/azalışı gösteren genlerin CD133+ ve CD133- hücrelerdeki ifadeleri.

GEN İSMİ	CD133(-) Hücrelerde Kat Artışı	p Değeri	GEN İSMİ	CD133(+) Hücrelerde Kat Artışı	p Değeri
BCL2	0,01	0	BCL2	0,02	0
TNFRSF8	0,09	0	TNFRSF8	0,08	0
BAG1	1154,01	0,005	BAG1	1750,59	0,001

3.4. Akım Sitometri Sonuçları

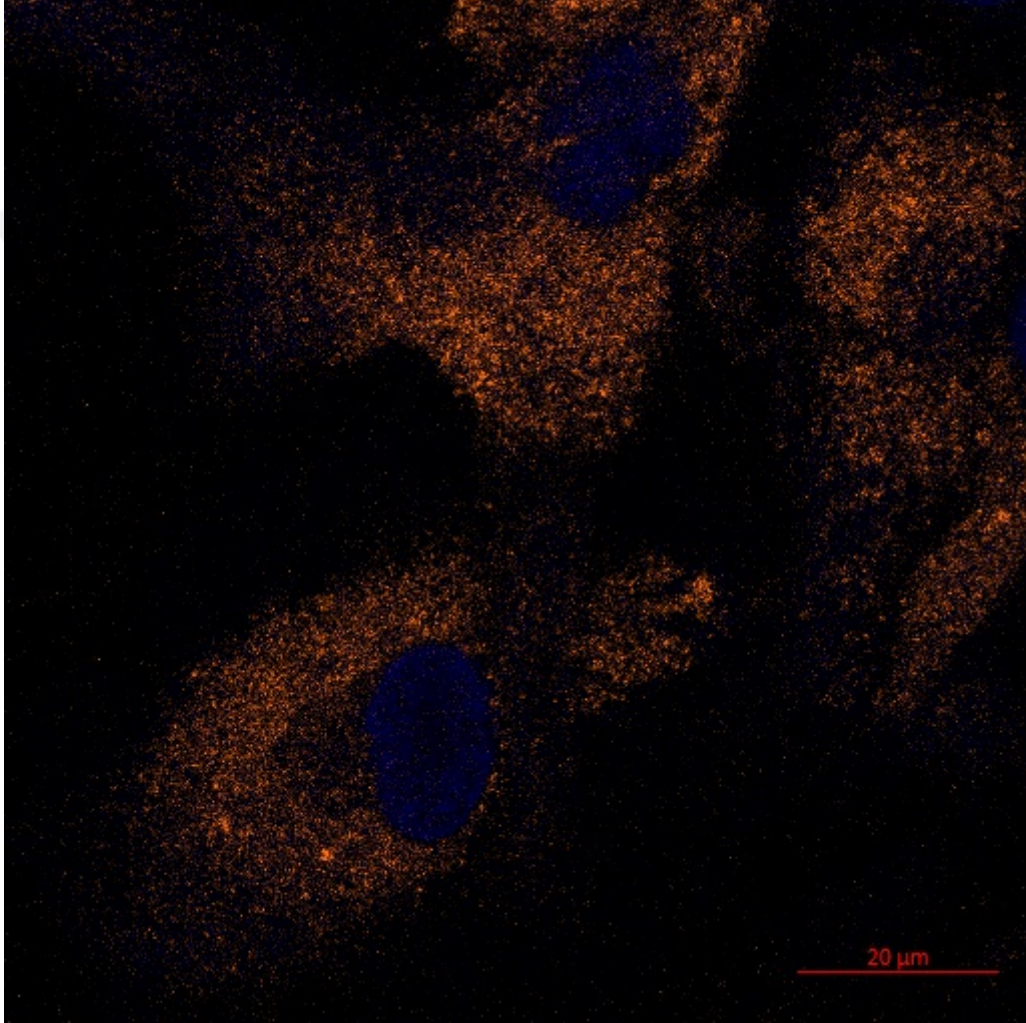
U87 GBM hücre hattından elde edilmiş hücreler CD70, DR6 ve CD133 antikorları ile boyanmışlardır. Bu boyamalar sonucunda yalnızca CD70, yalnızca DR6, yalnızca CD133, DR6 ile CD133 birlikte ve CD70 ile CD133 birlikte boyanan hücrelerin yüzdesi şekil 3.7.'de gösterilmiştir.



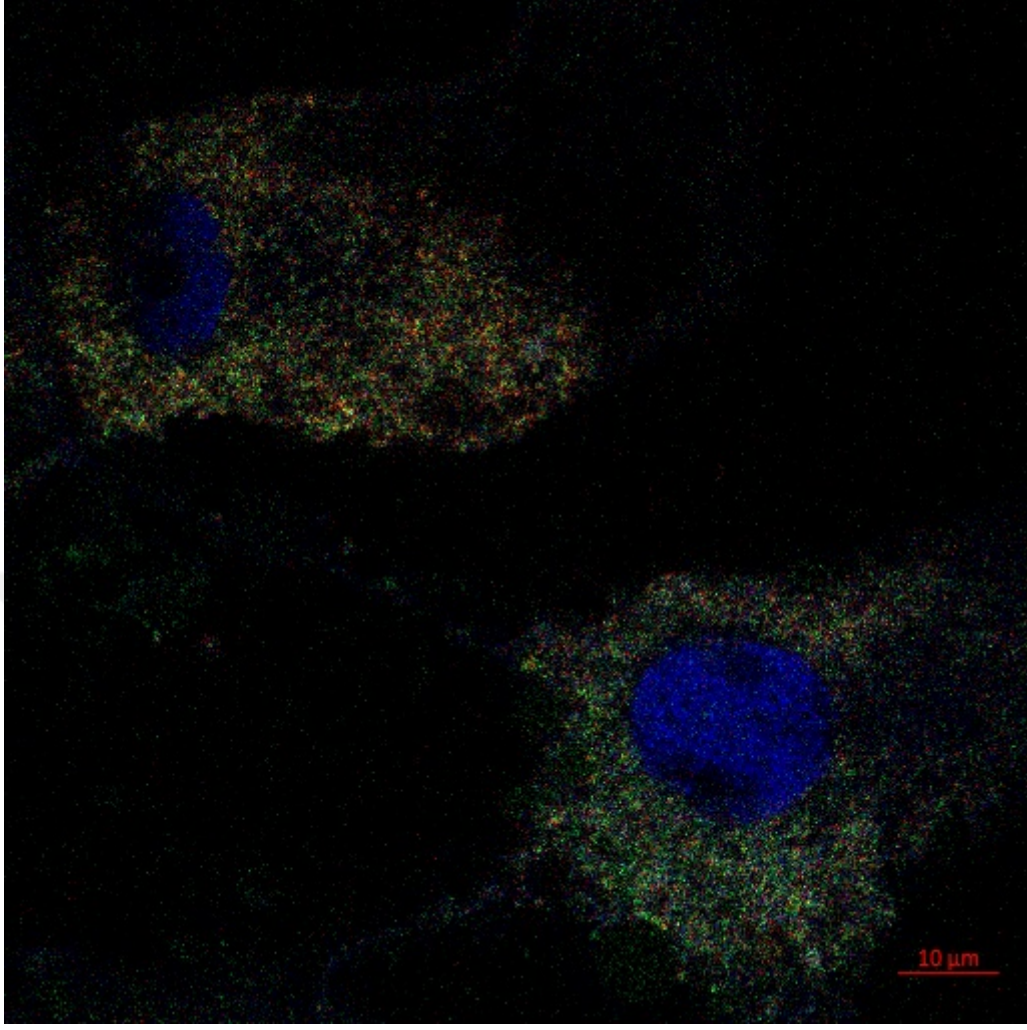
Şekil 3.7. U87 hücre hattı. CD70-FITC, DR6-FITC ve CD133-PE antikorları ile boyandıktan sonra yalnızca CD70, yalnızca DR6, yalnızca CD133, DR6 ile CD133 birlikte ve CD70 ile CD133 birlikte boyanan hücrelerin yüzdesi. **A.** U87 unstained, **B.** U87 **CD133-PE**, **C.** U87 **DR6-FITC**, **D.** U87 **CD70-FITC**, **E.** U87 **CD133-DR6**, **F.** U87 **CD133-CD70**.

3.5. Konfokal Mikroskobu ile Elde Edilen Görüntüler

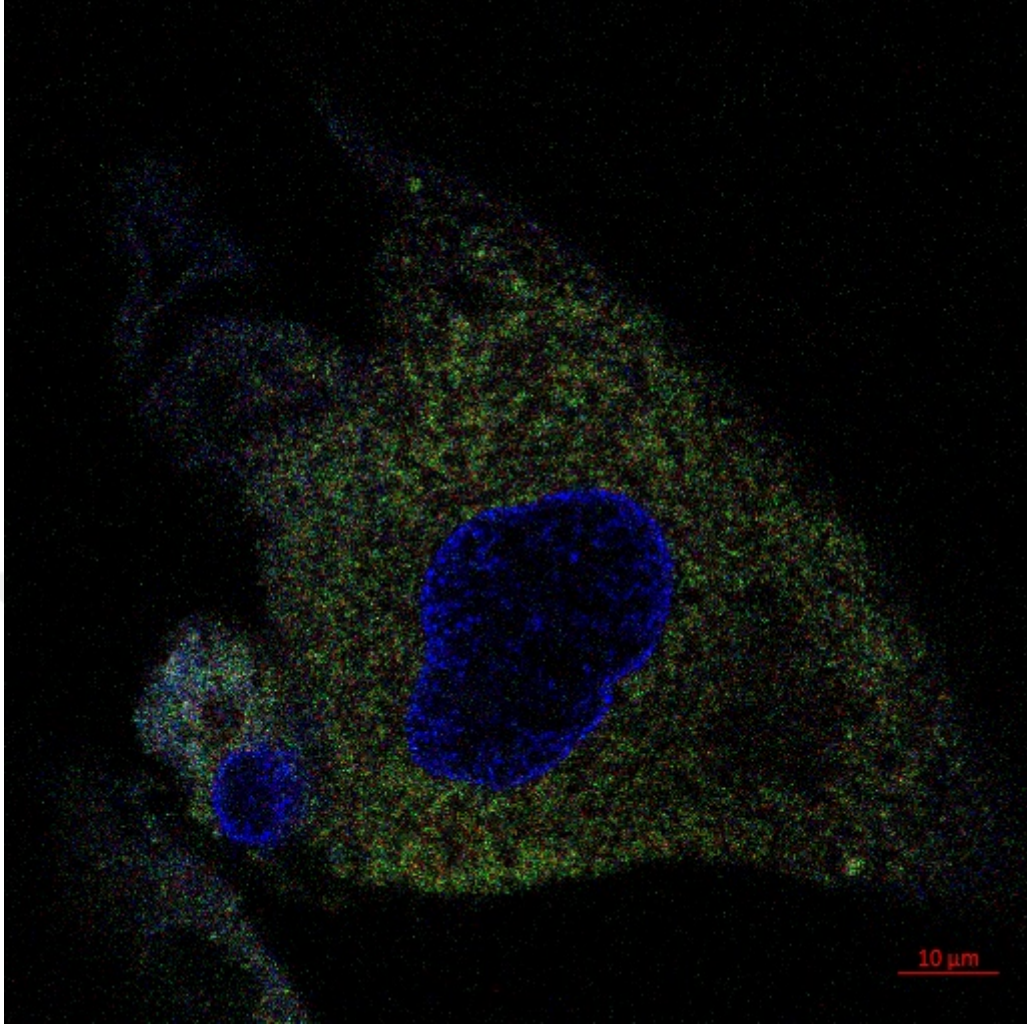
GBM primer hasta kültürlerinden birinde CD133-PE, DR6-FITC ve CD70-FITC florasan işaretli antikorlar ile yapılmış olan boyamalar sonucu konfokal mikroskobunda elde edilen görüntüler şekil 3.8., 3.9. ve 3.10’da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Seçilen bir GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı) ve DAPI (mavi) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.



Şekil 3.9. Seçilen bir GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı), DR6-FITC (yeşil) ve DAPI (mavi) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.



Şekil 3.10. Seçilen bir GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı), CD70-FITC (yeşil) ve DAPI (mavi) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.

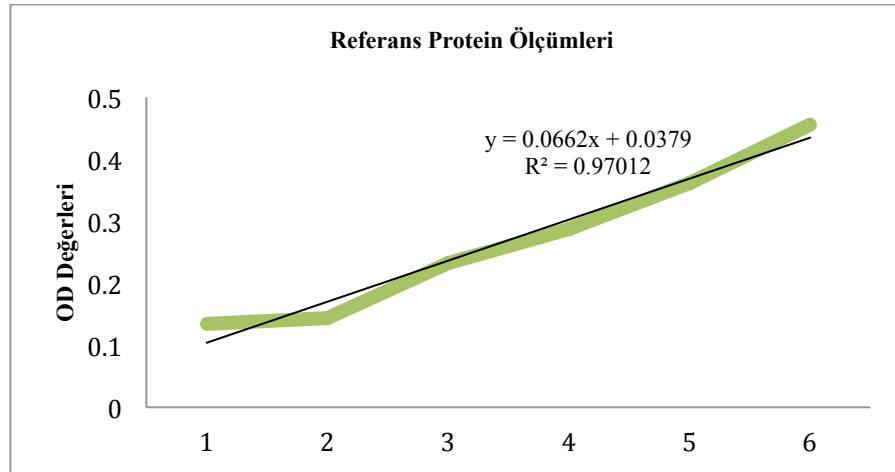
3.6. Protein Ölçümleri

GBM hücre hattı U138 ve GBM hasta-1 ve hasta-2'den elde edilmiş protein konsantrasyonlarını hesaplamak için spektrofotometre cihazında 595nm dalga boyunda ölçülen OD değerleri (Çizelge 3.11) ölçülmüştür. Protein ölçümleri için, referans proteinlerin ölçümü sonrası çizilmiş olan şekil 3.11.'deki grafikten elde edilmiş eğim formülü kullanılmıştır.

Şekil 3.11.'deki grafikten elde edilmiş formülde “y” yerine protein OD değeri konularak, “x” değeri olan protein konsantrasyonu elde edilmiştir (Çizelge 3.11.).

Çizelge 3.11. GBM hücre hattı U138 ve GBM hasta örneklerinden elde edilen proteinlerin OD değerleri ve konsantrasyonları.

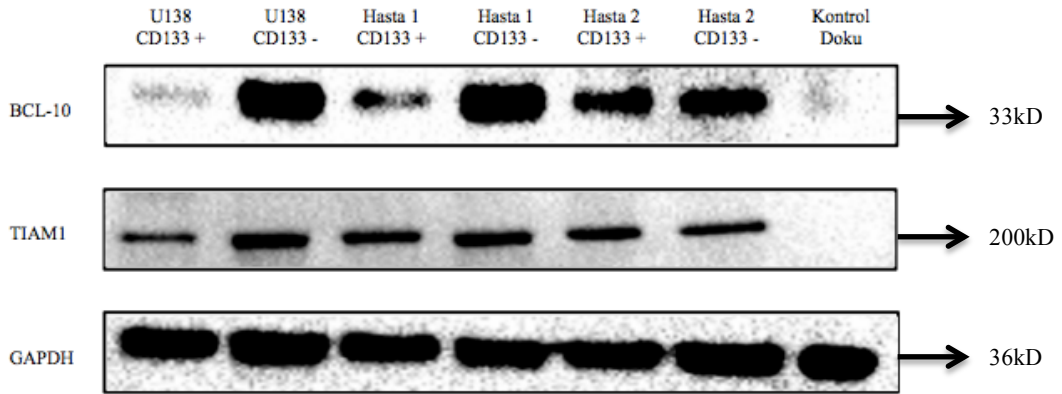
Örnek	OD Değeri	Protein Konsantrasyonu (ug/ul)
U138 CD133+	0,42075	6,783232628
U138 CD133-	0,4565	7,32326284
Hasta-1 CD133+	0,3685	5,993957704
Hasta-1 CD133-	0,4775	7,640483384
Hasta-2 CD133+	0,297	4,913897281
Hasta-2 CD133-	0,496	7,919939577



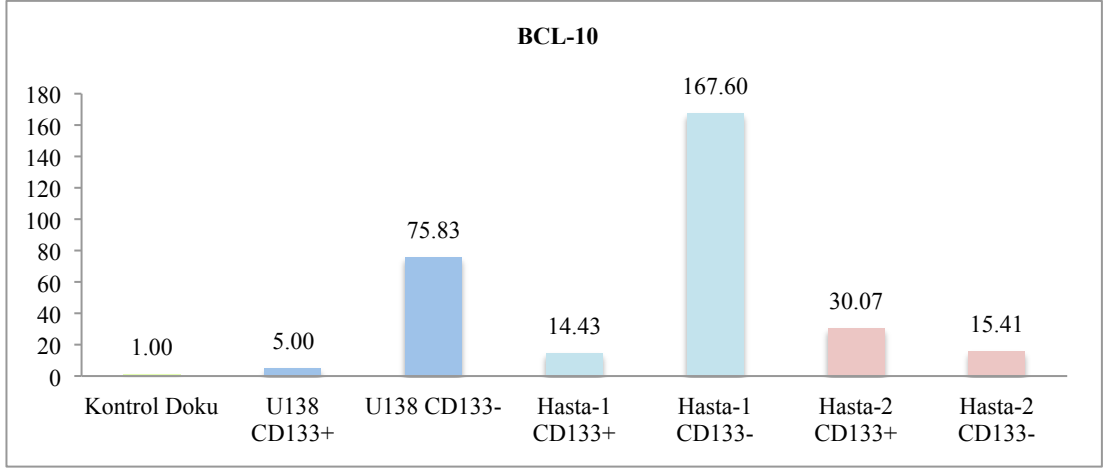
Şekil 3.11. Standart olarak hazırlanmış proteinlerin ölçümlerinden elde edilmiş referans grafik.

3.7. Western Blotting

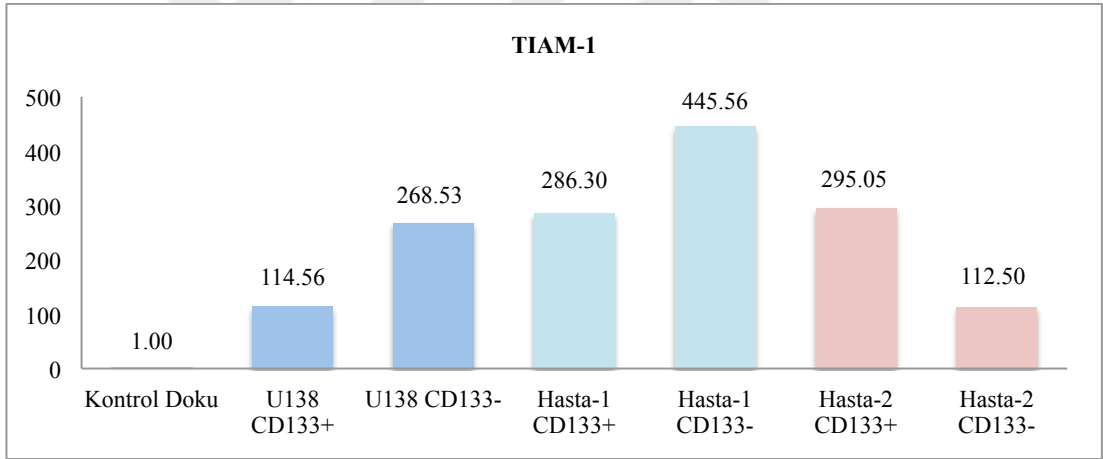
Eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olan ve araştırılmaya değer görülen genlerden TIAM1 ve BCL10'un protein düzeyinde doğrulanması için western blotting yapıldı. Yapılan ölçümler sonrası her örnek 45ug protein yoğunluğu olacak şekilde yöntem 2.2.9.'da anlatıldığı gibi kaynatıldı ve jellere yüklendi. Görüntüleme sonrası elde edilen sonuç şekil 3.12.'de gösterilmiştir. Görüntülenen bantların Bio-rad ImageLab programı ile yoğunlukları hesaplanmıştır. Öncelikle kontrol beyin dokusu, U138 hücre hattı (CD133+ ve CD133-) ve GBM hasta örneklerinin (CD133+ ve CD133-) protein yoğunlukları internal kontrol olarak kullanılmış olan GAPDH proteininin yoğunluğuna göre normalize edilmiştir. Daha sonra kontrol beyin dokusundan elde edilmiş total protein yoğunluğunun, U138 hücre hattı ve GBM primer hastalarının CD133+ ve CD133- hücrelerinden izole edilmiş proteinlerin yoğunluğuna oranlanması sonucu şekil 3.13. ve 3.14.'te gösterilen kat artışları belirlenmiştir.



Şekil 3.12. ECL solüsyonu ile muamele edilerek görüntüsü elde edilen proteinler.



Şekil 3.13. BCL-10 geninin protein düzeyinde kontrole göre CD133+ ve CD133-GBM hücre hattı ve hasta örneklerindeki kat artışları.



Şekil 3.14. TIAM-1 geninin protein düzeyinde kontrole göre CD133+ ve CD133-GBM hücre hattı ve hasta örneklerindeki kat artışları.

4. TARTIŞMA

Glioblastoma Multiforme (GBM) en ölümcül beyin kanseri ve neredeyse tüm hastalarda nüks eden bir hastalıktır. Günümüzde kullanılan tedavilere çok çabuk direnç geliştiren GBM’de, direnç ve nüksün en büyük sebebinin GBM kök hücreleri (GKH) olduğu düşünülmektedir. GKH’ler mikroçevreleri sayesinde beslenirler, kök hücre karakterlerini devam ettirirler, kök hücre olmayan GBM hücrelerine göre çok daha invazif bir yapıya sahiptirler ve kolayca migrasyon yapabilirler. Bunların yanı sıra mikroçevreyi regüle eden birçok sinyal yolağı ve molekül hem GBM tümör hücrelerinin hem de GKH’lerin apoptozdan ve bağışıklık sisteminden kaçarak sağ kalımını sağlarlar. Bu sebeple GBM ve GKH’lerin mikroçevrelerinin iyi analiz edilmesi, invazyonda etkili olan adezyon ve integrin belirteçlerinin belirlenmesi ve bu hücrelerin apoptozdan kaçışını sağlayan genlerin belirlenmesi GBM’in daha efektif bir şekilde tedavi edilmesi ve nüksün engellenmesi açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında GBM’de etkili olabileceği düşünülen adezyon, integrin ve apoptoz genlerinin belirlenmesi ve bu moleküllerin GBM ve özellikle GKH’ler için biyobelirteç olabilme yetilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda eş zamanlı PZR ile 3 farklı panelde yaklaşık 265 gen taranmıştır. Bu paneller; İnsan Apoptoz Paneli, İnsan İntegrin Sinyalizasyon Paneli ve İnsan Hücre Adezyon Paneli’dir. CD133+ ve CD133- GBM hücrelerinde taranan 265 genin ifadeleri normal beyin dokusundaki ifadeleri ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaların ardından yapılan istatistiksel analizler sonucunda, adezyon panelinde 7 gen yalnızca CD133+ hücrelerde, 6 gen yalnızca CD133- hücrelerde ve 39 gen hem CD133+ hem de CD133- hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. İntegrin panelinde ise, 9 gen yalnızca CD133+ hücrelerde, 6 gen yalnızca CD133- hücrelerde ve 33 gen hem CD133+ hem de CD133- hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. Son olarak apoptoz panelinde 4 gen yalnızca CD133+ hücrelerde, 22 gen yalnızca CD133- hücrelerde ve 3 gen hem CD133+ hem de CD133- hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

Bu analizlerin ardından, çoğunlukla yalnızca CD133+ hücrelerde ifadesi yükselmiş, diğerlerine göre daha anlamlı olabileceği düşünülen, literatürde GBM ile ilgili çalışmaya rastlanmamış veya araştırılmaya değer görülen 3 panelden toplamda 13 gen seçilmiştir. Bu genler; adezyon panelinden TIAM1, FERMT2, ARF1;

integrin panelinden COL12A1, COL14A1, MMP8, SPG7, SGCE; son olarak da apoptoz panelinden BCL10, CASP8AP2, TNFRSF21, TNFSF7 ve BAG1 olarak belirlendi. Bu genlerin bir kısmı protein düzeyinde doğrulanmıştır.

Eş zamanlı PZR sonuçları, doğrulama sonuçları ve belirlenen bu 13 gen aşağıda ayrıntılı tartışılmıştır.

TIAM1

Açılımı T-Cell Lymphoma Invasion And Metastasis 1 olan bu gen başlıca adezyonda ve hücre migrasyonunda görevlidir. Hücreler arası bağlantılarda ve hücre membranında bulunur. Tiam1, Rho-benzeri proteinlerin aktivitelerini düzenler, ekstraselüler matriks ve hücre iskeleti arasında sinyal iletiminde görev alır. Rho-benzeri GTPaz'lar bir çok hücrel mekanizmayı regüle eden moleküler “açma-kapama” düğmeleridir. Hücre motilitesi için vazgeçilmezdirler, hücre döngüsünde ve gen transkripsiyon regülasyonunda da görevleri vardır. Son zamanlarda bu genlerin tümör oluşumunda da rol oynadıkları keşfedilmiştir. Rho-benzeri GTPaz'ların aktivasyonu için GDP, GTP'ye dönüşmelidir. Bunun için ise guanine nucleotide exchange factor (GEF)'e ihtiyaç vardır. Tiam1, Rho-benzeri GTPaz olan Rac'a özel bir GEF'dir (Mertens, Roovers, & Collard, 2003).

Literatürde bulunan bir çalışmada, Xu ve arkadaşları (2016), Tiam1'in bazı kanser türlerinde incelendiği ve tümör hücrelerinde ifadesinin yüksek olduğu, dolayısıyla da Tiam1'in tümör gelişiminde rol oynadığı belirtilmiştir. Aynı grup, Tiam1 ifadesinin, özellikle kanser hücreleriyle interaksyonda bulunan fibroblastlar gibi bazal hücrelerde, düşük olduğunu ve Tiam1'in meme kanseri metastazında etkili olduğunu belirtmişlerdir (Xu ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada, özofagus kanserinde Tiam1 ekspresyonunun normal dokuya göre yüksek olduğu ve metastazın yanı sıra invazyonu da tetiklediği gösterilmiştir (Q.-Y. Wu, Wang, Tong, Zhang, & Zhang, 2016). Tiam1 ifadesi kronik lenfoid lösemi hastalarında durgun KLL hücrelerinde düşük görülürken, aktif KLL hücrelerinde yüksek görülmüştür (Hofbauer ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise Tiam1 ifadesine bakılarak akciğer kanseri hastalarında prognozun belirlenebileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2014). Tiam-1 ifadesinin mide kanserinde de yüksek ifade edildiği ve Tiam-1 ifadesinin mir-329 tarafından baskılandığı ve tedavi konusunda öncü olabileceği de bir başka

çalışmada yer almıştır (Z. Li ve ark., 2015). Literatürde Tiam1 ve glioblastoma ilişkili bir yayına rastlanmamıştır.

Yaptığımız çalışma sonucu normal doku ile karşılaştırıldığında, CD133+ hücrelerde Tiam1 ifadesinin 95,5 kat yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 3.3.). Protein düzeyinde western blotting ile doğrulama yapılan Tiam1'in kontrol beyin dokusundaki ifadesi ile GBM hücre hattı U138, GBM hasta-1 ve hasta-2 CD133+ ve CD133- hücrelerindeki ifadesi karşılaştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında U138 hücre hattında ve GBM hasta-1'de Tiam1 protein miktarının CD133- hücrelerde, CD133+ hücrelere göre fazla olduğu görülürken, GBM hasta-2'de Tiam-1 ifadesinin CD133+ hücrelerde CD133- hücrelere göre fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.14.).

Yüksek oranda invazif yapıya sahip olan GBM hücrelerinde, Tiam1 ifadesinin yüksek olması invazyona katkı yaptığı düşünülmektedir. GBM hücrelerinin yayılmasında etkili olabileceği düşünülen Tiam1, hem CD133+ hem de CD133- hücrelerde yüksek ifade edildiğinden, GBM kök hücrelerinin yanı sıra, kök hücre olmayan (CD133-) hücrelerde de invazyonda etkili olabileceği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. Dahası, GBM hücre hattı U138 ile GBM hasta-1 için western blotting ile protein düzeyinde de yapılmış olan çalışma sonucunda, eş zamanlı PZR sonuçları ile örtüşen sonuçlar görülürken, GBM hasta-2 tam tersi bir profil sergilemiştir. Eş zamanlı PZR sonuçlarına göre CD133- hücreler, CD133+ hücrelere göre Tiam1'i yaklaşık iki kat ifade ederken, western blotting sonuçlarına göre CD133+ hücrelerin, CD133- hücrelere göre yaklaşık iki kat protein ifadesine sahip olduğu görülmüştür. Bu duruma, Hasta-2'nin CD133+ hücrelerinde protein yıkımının düzgün gerçekleşmemesinin ve protein birikiminin sebep olabileceği dolayısıyla da bu hücrelerde katlanmamış protein cevabının (UPR) yüksek olabileceği düşünülmektedir. Tiam1'in GBM hücrelerinde ve GBM kök hücre (GKH)'lerinde yüksek ifadeye sahip olması **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiş olacaktır.

FERMT2 (Kindlin-2)

Kindlin protein ailesinin bir üyesi olan Fermt2, integrin aktivasyonu ve ekstraselüler matriks – hücre interaksiyonunda görev alır. Scaffold protein olarak bilinen Fermt2, Talin ailesinin üyeleri aracılığı ile hücre adezyonu ve migrasyonunda rol oynar (B. Guo, Gao, Zhan, & Zhang, 2015). Anjiyogenezde de görev aldığı düşünülen Fermt2'nin genom instabilitesine sebep olarak meme kanseri gelişiminde de etkili olduğu bildirilmiştir (Q.-Y. Zhang ve ark., 2016). Fermt2 fokal adezyonlarda çokça bulunur, aktin birleşmesinde ve hücrenin şekil değiştirmesinde de rolü vardır. Fermt2 daha çok sitoplazmada bulunurken, plazma membranında da bulunmaktadır.

Fermt2 polimorfizmi Alzheimer's ile ilişkilendirilmiştir (Q.-Y. Zhang ve ark., 2016). Kanser ile ilgili olan ilişkisi Fermt2'nin EGFR aracılığı ile EGF-indüklenmiş meme kanseri migrasyonunda rol oynadığı gösterilince keşfedilmiştir. EGFR aktivasyonu sonrası EGFR-PI3K yolağı aracılığı ile Fermt2 ifadesinin arttığı ve bunun sonucunda da meme kanseri gelişiminin gerçekleştiği gösterilmiştir (B. Guo ve ark., 2015). Guo ve arkadaşları aynı zamanda metastatik meme kanseri hücrelerinde Fermt2 ifadesinin daha yüksek olduğunu ve proteinin fokal adezyonlarda lokalize olduğunu gösterirken, normal meme dokusunda Fermt2 ifadesinin düşük olduğunu ve proteinin daha çok sitoplazmada lokalize olduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, Fermt2 ifadesi yüksek olan prostat kanseri hücrelerinde sisplatin oluşumu engellendiği için, tümörün tedaviye cevap vermediği ve aynı zamanda Fermt2'nin invazyona katkı sağladığı gösterilmiştir (J.-R. Yang ve ark., 2016). Glioma ile ilişkili olduğu bilinen Fermt2'nin, sisplatin ilişkili apoptozu baskıladığı ve glioma tedavisinde önemli bir hedef olabileceği belirtilirken (Ou ve ark., 2014), bir diğer çalışmada ise GBM hücrelerinin aşırı invazif özelliklerine sebep olan genlerden birinin de Fermt2 olduğu ve özellikle COL16A1 ile ilişkili olarak ifadesinin GBM hücrelerinde yüksek olduğu belirtilmiştir (R. Bauer ve ark., 2011).

Bu tez çalışması kapsamında yapmış olduğumuz çalışmalar sonucunda Fermt2 ifadesinin kontrol beyin dokusu ile karşılaştırıldığında CD133+ hücrelerde 10,25 kat fazla ifade edildiği görülmüştür (Çizelge 3.3.). Elde edilmiş sonuçlar ışığında, özellikle CD133+ hücrelerin invazif yapı kazanmasında ve kemoteröpatik tedavilere dirençli olmasında Fermt2'nin etkili olabileceği düşünülmektedir.

ARF1

Hücre invazyonu birkaç farklı sinyal proteini tarafından regüle edilmektedir. Bunlardan biri GTP-bağı proteinlerdir. Kansere gelişiminde metastaz yapan hücreler, migrasyon ve invazyon ile çevre dokuları istila ederler. Küçük GTPaz'ların kanserli hücrelerde genellikle modüle edilmiş oldukları literatürde yer almaktadır. GTPaz ailesinin bir üyesi olan ARF (ADP-ribosylation factor)'lerin kansere gelişiminde rol oynadıkları bilinmektedir. Bu aileye dahil olan ARF1'in ise meme kanserinde yüksek ifade edildiği ve EGF tarafından aktive edilerek migrasyona sebep olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Schlienger, Campbell, & Claing, 2013). Schlienger ve arkadaşları, meme kanserinde EGFR stimülasyonu sonucu ARF1'in aktive edildiğini ve bunun sonucunda da PI3K yolağının aktive olması ile hücre proliferasyonunun ve migrasyonun tetiklendiğini bildirmişlerdir (Schlienger ve ark., 2013).

Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinde ARF1 ifadesinin susturulması ile MMP9 ifadesinin azaldığını gösteren Schlienger ve arkadaşları, invazyonda rolü olduğu düşünülen MMP9'un ARF1 tarafından regüle edildiğini ve dolayısıyla da ARF1'in invazyonda rolü olduğunu bildirmişlerdir (Schlienger, Ramirez, & Claing, 2015). Aynı grup bir başka çalışmalarında, yine meme kanserinde ARF1 ifadesinin yüksek olduğunu ve genin ifadesi ile meme kanseri hastalarının prognozu arasında korelasyon olduğunu, daha yüksek ARF1 ifadesine sahip olan hastaların kötü prognoza sahip olduklarını göstermişlerdir (Schlienger, Campbell, Pasquin, Gaboury, & Claing, 2016). Schlienger ve arkadaşları bir diğer çalışmalarında ise, ARF1'in PI3K yolağı dışında, Rac1'i aktive ederek hücrenin migrasyonunda etkili olacak lamellipodia oluşumunda da görev aldığını ve dahası ARF1'in aynı zamanda yine EGF aracılığı ile fokal adezyon oluşumunu da sağladığını göstermişlerdir (Schlienger ve ark., 2015). Davis ve arkadaşları ise, prostat kanserinde sürekli aktif bulunan ve tümör gelişimini tetikleyen MAPK yolağının, yine prostat kanserinde yüksek ifade edilen ARF1 tarafından aktive edildiğini göstermişlerdir (Davis ve ark., 2016). Literatürde ARF1 ve glioblastoma ile ilişkili bir yayına rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yapmış olduğumuz çalışmalar sonucunda ARF1 ifadesinin kontrol beyin dokusu ile karşılaştırıldığında CD133+ hücrelerde 6458,5 kat (Çizelge 3.4.), CD133- hücrelerde ise 4986 kat fazla ifade edildiği görülmüştür (Çizelge 3.4.). Daha çok meme kanserinde tanımlanmış olan ve invazyon ve

migrasyonda görev aldığı kanıtlanmış olan bu proteinin GBM ve GKH hücrelerinde yüksek ifade edildiği **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Daha sonra yapılabilecek çalışmalar arasında PI3K ve MAPK yollarının GBM’de incelenmesi ve ARF1’in GBM hücrelerinin inazyon ve migrasyonunda var olan etkisinin daha iyi anlaşılması sağlanabilir.

COL12A1

Kolajen tip 12, FACIT (Fibril Associated collagens with interrupted triple helices) ailesinin en büyük üyesidir (yaklaşık 331 kDa). Col12a1 yaygın olarak kolajen 1 içeren embriyoların mezenkimal dokularında ve yetişkinlerin fibroblastlarında bulunur. Col12a1, kolajen 1 fibrillerinin oluşmasında ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu proteinin eksikliğinde kas zayıflaması ve aşırı hareketli eklem ilişkili hastalıklar görülmektedir (Chiquet, Birk, Bonnemann, & Koch, 2014). Col12a1’in fibrozis (Tzortzaki ve ark., 2003) ve kanser gelişiminde rol oynadığına dair veriler literatürde bulunmaktadır (Karagiannis ve ark., 2012).

Yen ve arkadaşları, normal meme dokusu ile tümörlü meme dokusunu karşılaştırdıklarında, tümörlü dokuda normal dokuya göre yüksek oranda Col12a1 ifadesi görmüşler ve Col12a1’in meme kanseri tanısında kullanılabilecek bir biyobelirteç olabileceğini önermişlerdir (Yen ve ark., 2014). Başka bir grup ise, over kanseri hastalarından alınan örnekler ile yapmış oldukları çalışmada kemoterapötik dirence sahip hastalarda Col12a1 ifadesinin 20 kattan fazla artmış olduğunu, ECM yapısının solid tümörlerde bu sayede daha sağlam yapıya kavuştuğunu ve bu şekilde kemoterapiye karşı direnç kazandıklarını öne sürmüştür (Januchowski, Zawierucha, Ruci x144 ski, Nowicki, & Zabel, 2014). Bir başka çalışmada ise normal mukoza hücreleri ile kolon kanseri hücrelerinde Col12a1 ifadesi karşılaştırıldığında, kolon kanseri hücrelerinde Col12a1 ifadesinin yaklaşık 2 kat fazla olduğu görülmüş ve bu genin ifadesinin invazyona katkısı olabileceği bildirilmiştir (Karagiannis ve ark., 2012).

Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucu CD133+ hücrelerde COL12A1 ifadesi kontrol doku hücreleriyle karşılaştırıldığında 39,2 kat fazla görülmüştür (Çizelge 3.6.). Özellikle invazyonda etkili olduğu düşünülen COL12A1’in,

GKH'lerde ve CD133- GBM hücrelerinde **ilk kez** bu çalışma ile yüksek ifade edildiği gösterilmiştir. İnvazyonun yanı sıra kemoterapiye karşı dirence de sebep olabileceği düşünülen COL12A1'in, temazolamid gibi ilaçlarla muamele edildikten sonra ifadesinde meydana gelebilecek değişiklikler ilerde yapılması planlanabilecek çalışmalar arasındadır.

COL14A1

Kolajen tip 14, FACIT (Fibril Associated collagens with interrupted triple helices) adı verilen bir ailenin üyesidir. Undulin olarak da bilinen bu kolajen tipi fibrilleşmeyi sağlar. Genellikle mezenkimal dokularda kolajen fibrilleri ile etkileşimde bulunur. CD44'ün bir proteoglikan varyantının Col14a1 için reseptör olduğu ve dolayısıyla da Col14a1'in hücre adezyonunda ve sinyal iletiminde rolü olabileceği gösterilmiştir (M. Bauer, Dieterich, Ehnis, & Schuppan, 1997).

Yapılan çalışmalara örnek olarak; Goto ve ark. metastatik meme kanseri ve metastatik olmayan meme kanseri dokularını karşılaştırdıklarında, metastaza sahip hastalardan alınan dokularda Col14a1 ifadesinin daha fazla olduğunu görmüşlerdir (Goto, Nakamura, Takami, Sanke, & Tozuka, 2015). Bir başka çalışmada ise Fu ve ark. servikal kanserde radyasyon uygulanması sonucu Col14a1 ifadesinin arttığını göstermişlerdir. Bu sonuç doğrultusunda radyasyon tedavisi alan hastalarda ortaya çıkan direnç mekanizmasında Col14a1'in de etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür (Fu, Wang, & Cai, 2015). Gastrik kanserde ise Col14a1'in mutasyona yatkın olduğu bildirilmiştir (X. Li ve ark., 2016).

Laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz eş zamanlı PZR sonucunda, CD133+ hücrelerde kontrol beyin dokusu hücrelerine göre 355 kat fazla Col14a1 ifadesi görülmüştür (Çizelge 3.6.). Yapılan çalışmalar sonucunda, CD133+ hücrelerin metastatik yapı kazanmasında Col14a1'in etkili olabileceği **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

MMP8

MMP8, matriks metalloproteinaz 8, 25 üyesi olan MMP ailesinin bir üyesidir. MMP'ler ekstraselüler matriksi parçalamakla görevlidirler. Bu sebeple regüle ettikleri hücresel süreçler arasında reproduksiyon, embriyogenez, anjiyogenez ve doku modellenmesi bulunmaktadır. MMP8 kolajenleri kesmekle görevlidir. Çoğunlukla hücre yüzeyine yerleşmiştir. Özellikle hücre migrasyonunda etkili olan MMP8, tümör invazyonunda ve metastazında rol oynamaktadır (Dejonckheere, Vandenbroucke, & Libert, 2011).

Decock ve arkadaşları, MMP8'in meme kanserinde koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtirken (Decock ve ark., 2008), Palavalli ve arkadaşları da melanomada MMP8'in anti-tümöral role sahip olduğunu bildirmişlerdir (Palavalli ve ark., 2009). Bu sonuçların aksine başka gruplar ise artış gösteren MMP8 ifadesini invazyon ve metastaz ile ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmalardan biri Moilenen ve arkadaşları tarafından yapılmış ve bu grup, baş ve boyun kanserinde MMP8 ifadesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Moilenen, Pirilä, Grénman, Sorsa, & Salo, 2002). İki ayrı grup olarak, Staldmann ve arkadaşları, Stenman ve arkadaşları ise ovaryum kanserinde MMP8 ifadesinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (Staldmann ve ark., 2003; Stenman ve ark., 2003). Literatürde MMP8 ve glioblastoma ilişkili bir yayına rastlanmamıştır.

Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucu CD133+ hücrelerde MMP8 ifadesi kontrol doku hücreleriyle karşılaştırıldığında 4,21 kat fazla görülmüştür (Çizelge 3.6.). İnvazyon ve migrasyonda etkili olduğu düşünülen MMP8'in, GKH'lerde ve CD133- GBM hücrelerinde **ilk kez** bu çalışma ile yüksek ifade edildiği gösterilmiştir.

SPG7 (CAR)

SPG7, spastic paraplegia 7, nörodejeneratif bir hastalık olan spastik paraplegia'ya sebep olan gen olarak tanımlanmıştır. Bu gen, mitokondriyal metalloproteaz olan bir proteini kodlamaktadır (Settasatian ve ark., 1999). SPG7, mitokondri iç membranında yerleşik bulunan m-AAA proteaz adı verilen kompleksin bir parçasıdır. Bu kompleksin görevi, mitokondride biyogenezi regüle etmek ve kalite kontrolü yapmaktır. Bunun yanı sıra SPG7 geninin alternatif kesimlenmesinden üretilen izoform proteinlerin mitokondri dışında da fonksiyona sahip olabileceği bildirilmiştir (Mancuso, Barth, Crivello, & Rugarli, 2012). Aynı zamanda CAR (Cell Adhesion Regulator) olarak bilinen bu proteinin integrin yoluyla kolajenlere tutunmada da görev aldığı literatürde bulunmaktadır (Lauer, Furcht, & Fields, 1997).

Mikami ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada kolorektal kanser hastalarında SPG7 ifadesinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (Mikami ve ark., 2001). Lauer ve arkadaşları CAR aracılığı ile melanoma hücrelerinin bazal membrana tutunarak metastaz yaptıklarını, CAR'ın inhibe edilmesi ile ise metastazın durdurulabileceğini önermişlerdir (Lauer ve ark., 1997).

Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucunda, CD133+ hücrelerde SPG7 ifadesi kontrol doku hücreleriyle karşılaştırıldığında 3,16 kat fazla görülmüştür (Çizelge 3.6.). Literatürde bulunan çalışmaların aksine, yaptığımız çalışmalar sonucunda SPG7 ifadesi GBM ve GKH hücrelerinde azalmıştır. SPG7 ifadesinin azalması sonucu tümör hücrelerinin kolajenlere tutunmasının azalması ile invazyonun tetiklenebileceği düşünülmektedir. İnvazyon ve migrasyonda etkili olduğu düşünülen SPG7'nin, CD133+ ve CD133- GBM hücrelerinde **ilk kez** bu çalışma ile düşük ifade edildiği gösterilmiştir.

SGCE

Açılımı sarcoglycan epsilon olan bu gen, hücre membranında bolca bulunan ve aktin hücre iskeleti ile ekstrasellüler matriksi birbirine bağlayan bir transmembran proteini kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyonlar myoclonus-dystonia sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Peall ve ark., 2015).

Dong ve arkadaşları yapmış oldukları genom ebadındaki çalışmada, karaciğer kanseri hastalarında SGCE ifadesinin normal karaciğer dokusuna göre yüksek olduğunu göstermişlerdir (Dong ve ark., 2009). Başka bir çalışmada, SGCE'nin B-hücre kronik lenfotik lösemi hastalarında yüksek ifade edildiği gösterilmiştir (Kainz ve ark., 2007). Ortega ve arkadaşları ise kolorektal kanser hastalarında SGCE ifadesinin sağlıklı bireylere göre daha düşük ifade edildiğini bildirmişlerdir (ORTEGA ve ark., 2010). SGCE ve GBM ile alakalı literatürde herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucu CD133+ hücrelerde SGCE ifadesinde kontrol doku hücreleriyle karşılaştırıldığında 682 kat (Çizelge 3.7), CD133- hücrelerde ise 286,12 kat artış görülmüştür (Çizelge 3.7.). SGCE'nin kanserle olan ilişkisi hala henüz tam olarak anlaşılamadığından, GBM'de görülen yüksek ifade ile ilgili de kesin bir yorum yapılamamaktadır. Fakat bu genin ifadesinin hem CD133+ hem de CD133- hücrelerde çok yüksek ifade ediliyor oluşunun, GBM tümör hücrelerinin invazif karakter kazanmalarında etkili olabileceği düşünülmektedir. SGCE'nin, GKH'lerde ve CD133- GBM hücrelerinde **ilk kez** bu çalışma ile yüksek ifade edildiği gösterilmiştir.

BCL10

Bcl-10 (B-cell lymphoma-10), 233 aminoasite sahip ve 33kD büyüklüğü olan bir proteindir. Transkripsiyon faktörü NF- κ B lenfosit aktivasyonu, yaşamı ve proliferasyonunda önemli role sahiptir (Turvey ve ark., 2014). Lenfoid immün hücrelerin regülasyonu NF- κ B sinyalizasyonu ile gerçekleşirken, signalozom denilen ve CARD11-BCL10-MALT1 moleküllerinden oluşan kompleks de bu regülasyon için şarttır. Malt1 ve Bcl-10 direk olarak etkileşip ve bu şekilde NF- κ B yolağını aktive ederler (Turvey ve ark., 2014). Bcl-10'un C-terminal ucunda bulunan serin-treonin zengin bölgesi Malt1'e bağlanma bölgesidir. Bu bölge aynı zamanda antijen-reseptör bağlanması sonucu post-translasyonel modifikasyonların da gerçekleştiği bölgedir. Ser138'den fosforile olan Bcl-10, ubiquitinasyon için işaretlenir. Ser138 mutasyona uğradığı takdirde Bcl-10 degrade olamadığı için sürekli bir NF- κ B aktivasyonunun yanı sıra IL-2 üretimi de gerçekleşir. Bu durum Bcl-10 yollu NF- κ B yolağının regüle edilebileceğini göstermektedir (C. Yang, David, Qiao, Damko, & Wu, 2014).

BCL10 lenfoid temelli kanserlerde sıkça çalışılmıştır. Örneğin, T-hücre akut lenfoid lösemi'de Ma ve ark. sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında T-ALL hastalarında BCL10 ifadesinin arttığını göstermişlerdir (Ma ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise Knies ve ark. B-hücre lenfoma'da, sağlıklı B-hücre ile karşılaştırıldığında daha fazla BCL10 ifadesi görmüşlerdir (Knies ve ark., 2015). Glioblastoma ile doğrudan ilişkili olarak BCL10 ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucu CD133+ hücrelerde Bcl-10 ifadesi kontrol doku hücreleriyle karşılaştırıldığında 43,9 kat fazla görülmüştür (Çizelge 3.9.). Protein düzeyinde western blotting ile doğrulama yapılan Bcl-10'un kontrol beyin dokusundaki ifadesi ile GBM hücre hattı U138, GBM hasta-1 ve hasta-2 CD133+ ve CD133- hücrelerindeki ifadesi karşılaştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında U138 hücre hattında ve GBM hasta-1'de Bcl-10 protein miktarının CD133- hücrelerde, CD133+ hücrelere göre fazla olduğu görülürken, GBM hasta-2'de Bcl-10 ifadesinin, Tiam1 ile benzerlik göstererek, CD133+ hücrelerde CD133- hücrelere göre fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.13.). Aynı hasta örneğinin yine U138 hücre hattı ve Hasta-1'e göre benzer şekilde ters sonuçlar göstermesi, katlanmamış protein cevabı ile ilgili hipotezimizi destekler niteliktedir.

Sağ kalımda etkili olan NF- κ B yolağını aktive eden Bcl-10'un ifadesinin yüksek oluşunun, GBM ve GKH'lerin sağ kalımında ve tümör gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu proteinin GBM ve GKH'lerde yüksek ifade edildiği **ilk kez** bu çalışma ile gösterilmiştir.

CASP8AP2 (CED-4)

CED-4, sinyal ileten ATPaz grubunun bir üyesidir. Dört adet CED-4'ün bir araya gelmesi ile apoptozom adı verilen pro-kaspaz bir yapı oluşur (Yuan & Akey, 2013). Kaspaz-8'in ölüm efektör domaini ile etkileşime girerek apoptozu regüle eder (Juárez-Velázquez ve ark., 2014). Bir çok farklı fonksiyonu olan bu proteinin apoptozu regüle etmesinin yanı sıra, S fazının devam ettirilmesinde de rol oynadığı bildirilmiştir (Cui ve ark., 2015). Bunlar dışında Casp8ap2'nin hücre bölünmesinde, NF- κ B sinyalizasyonunda, c-Myb aktivasyonunda ve histon mRNA'ların 3' uçlarının transkripsiyonu ve maturasyonunda da görev aldığı literatürde yer almaktadır (Juárez-Velázquez ve ark., 2014).

Daha çok akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalığında çalışılmış olan Casp8ap2'nin, düşük ifade edildiğinde ALL hastalarının iyileştiği, fakat nüks vakalarının arttığı belirtilmiştir. Dolayısıyla, Casp8ap2'nin ALL hastalarında nüks için prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Cui ve ark., 2015; Juárez-Velázquez ve ark., 2014). Choi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada casp8ap2'nin çerçeve kayma mutasyonuna sahip olduğunu ve bu mutasyonunun kolon kanseri oluşumunda etkili olduğunu bildirmişlerdir (Choi, Gwak, Yoo, & Lee, 2015). Düşük Casp8ap2 ifadesinin hücre bölünmesinin inhibe olmasına sebep olduğu bilinmektedir. Minamida ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonucunda Casp8ap2'nin embriyonik kök hücrelerin oluşumunda etkili iken, embriyonik kök hücrelerin diferansiasyonunda ve proliferasyonunda bir etkisi olmadığını göstermişlerdir (Minamida, Someda, & Yonehara, 2014).

Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda CD133+ hücrelerin yüzeyinde kontrol hücrelerine göre Casp8ap2 ifadesinin 15,45 kat fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 3.9.). GKH'lerde ifadesi artmış olan Casp8ap2'nin tümör hücrelerinin sağ kalımında ve proliferasyonunda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra, Casp8ap2'nin GBM kök hücrelerinin kök hücre karakteri kazanmasında da etkili olma ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Casp8ap2'nin GKH'lerde yüksek ifade edildiği **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

TNFSF7 (CD70)

Tümör nekroz faktör (TNF) ailesi 29 üyeden oluşmaktadır. Bu ailenin üyeleri transmembran yapıdadırlar. Ekstraselüler olarak sistince zengin zincirlere sahip bu reseptörlere, homotrimerik transmembran yapıda bulunan TNFR ligandları bağlanırlar. TNFSF7 bu ligandlardan bir tanesidir. TNFSF7 tek geçişli bir transmembran proteindir. Aynı zamanda CD70 olarak da adlandırılan bu ligand aktive olmuş dendritik hücreler, B-hücre, T-hücre ve NK hücrelerinin yüzeylerinde ifade edilir. CD70, T-hücre üzerinde bulunan CD27 ile bağlanarak T-hücrelerinin efektör hale gelmesini sağlar ve immün cevabı kuvvetlendirir. Diğer TNF reseptörlerinin aksine CD27 proapoptotik ölüm domainine sahip değildir. Bunun yerine TNFR ilişkili faktörlere (TRAFs) bağlanan sitoplazmik kuyruk motiflerine sahiptirler. TRAF'lar ise JNK ve NF-κB sinyal yolları ile ilişkili adaptör moleküllerdir. NF-κB yolağı survival sinyali vererek apoptoza ters çalışır, dolayısıyla TRAF bağlı TNF'lerin ve reseptörlerinin sağ kalımda rolü vardır. Bu yollar aynı zamanda sitokin ve kemokin salgılanmasında da görev alırlar (van de Ven & Borst, 2015).

CD70 birçok kanserde çalışılmıştır. Bu kanser tiplerine örnek verecek olursak ilki meme kanseridir. Petrau ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanseri hastalarından elde ettikleri örneklerle yaptıkları ex-vivo çalışmalar sonucu luminal ve bazal tümörleri karşılaştırdıklarında, bazal meme kanseri tümörlerde CD70 ifadesini yüksek bulduklarını bildirmişlerdir (Petau ve ark., 2014). Bir başka çalışmada Juvenik ve arkadaşları farklı şiddetlerde radyasyon uygulandığında, kronik lenfoit lösemi hastalarından elde edilen dendritik hücrelerin radyasyon şiddeti arttıkça CD70 ifadesinin de arttığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmada ayrıca CD27-CD70 interaksyonu sonucu IL12p-70 üretiminin artması ve sonucunda da Th1 yollu imün cevap oluşması sonucu antitümör bir etkinin görüldüğü bildirilmiştir (Junevik, Werlenius, Fogelstrand, Karlsson-Parra, & Andersson, 2014). CD70'in çalışılmış olduğu bazı diğer kanser tipleri arasında ise melanoma, lösemi, oral kanser ve akciğer kanseri bulunmaktadır (Bundela, Sharma, & Bisen, 2014;

Junevik ve ark., 2014; Pich ve ark., 2016). Literatürde CD70 ile ilgili glioblastoma çalışmasına rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda CD133+ hücrelerin yüzeyinde kontrol hücrelerine göre CD70 ifadesinin 20 kat fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 3.9.). Protein düzeyinde CD70 ifadesine U87 GBM hücre hattında akım sitometri ile bakıldığında, CD133+ hücrelerin oranı %13,6 iken, CD70'in hücre yüzeyinde bulunma oranı %83,1 olarak bulunmuştur. CD133 ve CD70'in birlikte bulunma oranı ise %15,5 olarak bulunmuştur. GBM primer kültürlerinden biri seçilerek hücreler antikor ile boyandığında, CD70 ve CD133'ün birlikte bulunduğu ayrıca konfokal mikroskopunda elde edilen görüntü ile gösterilmiştir (Şekil 3.10). NF-κB yolağı ile ilişkili CD70'in ifadesinin CD133+ hücrelerde yüksek olması, apoptozun baskılanarak sağ kalımın GBM ve GKH'lerde tetiklendiğini kanıtlar niteliktedir. Yaptığımız bu çalışma sonucu CD70 ifadesinin GBM hücrelerinde yüksek olduğu **ilk kez** gösterilmiştir.

TNFRSF21 (DR6)

TNF ailesinden olan bu reseptör aynı zamanda death receptor 6 (DR6) olarak da bilinmektedir. Ölüm reseptörleri hücre dışından alınan pro-apoptotik sinyalleri hücre içine iletmekle görevlidirler (Rossi & Gaidano, 2003). DR6 apoptozu indüklemek dışında, hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve programlı hücre ölümünde de görev alır.

Yapılan bir çalışmada, meme kanserinde DR6 ifadesi normal doku ile karşılaştırıldığında, en az 2 kat ekspresyon artışı olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, farklı seviyede meme kanseri hastalarından alınan dokular karşılaştırıldığında, faz ilerledikçe DR6 ifadesinin de arttığı görülmüştür. Bu sebepler doğrultusunda Bilecova-Rabajdova ve arkadaşları DR6'nın tümör belirteci olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (Bilecova-Rabajdova ve ark., 2014). Yapılan bazı başka çalışmalarda ovaryum, kolon, karaciğer kanseri ve çeşitli karsinomalarda DR6 ekspresyonunun yüksek olduğu görülmüştür (Barua ve ark., 2012; K. Yang ve ark., 2012). Birçok kanserde çalışılmış olmasına rağmen literatürde DR6 ve glioblastoma ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalar sonucu ise CD133+ hücrelerde DR6 ekspresyonunun kontrol beyin dokusuna göre yaklaşık 223 kat fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 3.9.). Protein düzeyinde DR6 ifadesine U87 GBM hücre hattında akım sitometri ile bakıldığında, CD133+ hücrelerin oranı %13,6 iken, DR6'nın GBM hücrelerinin yüzeyinde bulunma oranı %30,7 olarak tespit edilmiştir. CD133 ve DR6'nın birlikte bulunma oranı ise %2,6 olarak bulunmuştur. GBM primer kültürlerinden biri seçilerek hücreler antikor ile boyandığında, DR6 ve CD133'ün birlikte bulunduğu ayrıca konfokal mikroskobunda elde edilen görüntü ile gösterilmiştir (Şekil 3.9). DR6 apoptoz indükleyici bir protein olmasına rağmen literatürde birçok kanserde yüksek ifade edildiği bildirilmiştir. Bunun sebebinin DR6'nın aynı zamanda NF-κB yolağını aktive etmede rol oynaması ve sağ kalımı tetiklemesi gösterilmektedir (Bilecova-Rabajdova ve ark., 2014). Bu çalışmalar doğrultusunda GBM hücrelerinde de yüksek ifade edilen DR6'nın, tümör belirteci olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. DR6 ifadesinin GBM ve GKH'lerde yüksek oluşu **ilk defa** bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

BAG1

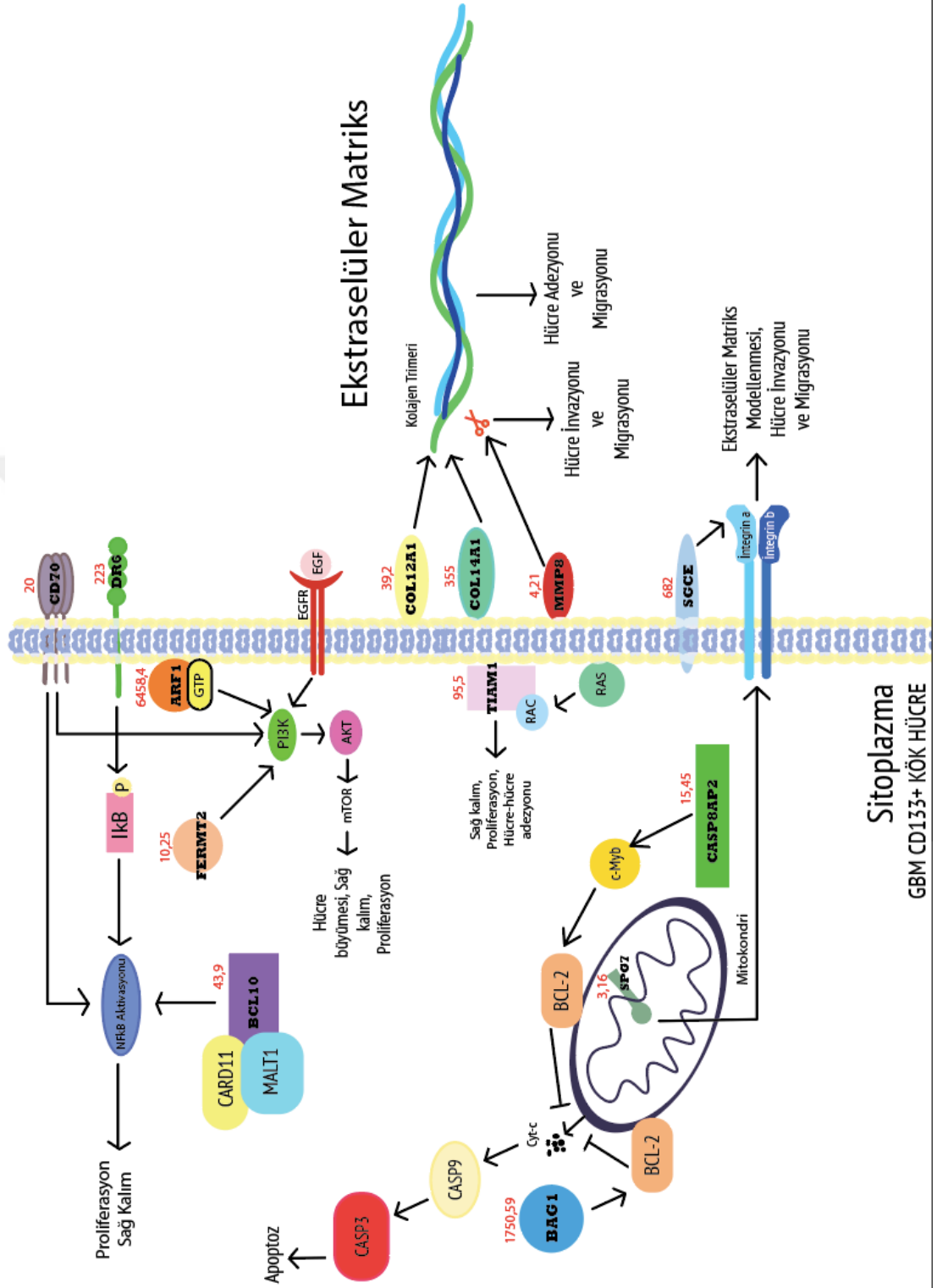
BAG1 (Bcl-2 Associated Athanogene), multifonksiyonel anti-apoptotik bir proteindir. BAG1, Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonunu arttırıcı özelliğe sahiptir, dolayısıyla hücre sağ kalımını uzatır. BAG-1 ayrıca hepatosit büyüme faktörüne bağlanarak proliferasyonu tetikler ve apoptozdan koruma sağlar. BAG1'in daha çok hormon salgılayan dokularda tümör oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. Bunların yanı sıra BAG1 Hsp70'e bağlanarak, Hsp70'i inhibe ederek ısı-şok proteini yolu apoptozu da engellemektedir (Tang, 2002).

Skeen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kolorektal kanser hücrelerinde BAG1'in TGF-β ifadesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Tümör baskılayıcı özelliğe sahip TGF-β'nin inhibe edilmesi ile BAG1'in kolorektal kanserde proliferatif rol oynadığını bildirmişlerdir (Skeen ve ark., 2012). Bir başka grup ise yine kolorektal kanserde BAG1 ifadesinin yüksek olduğunu, ve BAG1'in NF-κB yolağını aktive ederek tümör gelişimini ve tümör hücrelerinin sağ kalımını sağladığını belirtmişlerdir (Clemo ve ark., 2008). Southern ve arkadaşları da yine yaptıkları çalışma ile kolorektal kanserde BAG1'in p50-p50 dimeri ile interaksiyona girerek NF-κB yolağındaki bazı genleri regüle ederek tümör hücrelerinin sağ kalımına sebep

olduğunu göstermişlerdir (Southern ve ark., 2011). B-hücre lenfomada da çalışılmış olan BAG1 geninin ifadesinin, mir28 ile inhibe edildiği, mir28 ifadesi olmayan B-hücre lenfoma hastalarında ise BAG1 ifadesinin yüksek oluşunun ERK yolağını aktive ettiği ve tümör hücrelerinin sağ kalımının sağlandığı literatürde yer almaktadır (Schneider ve ark., 2014). Literatürde BAG1 ile ilgili glioblastoma çalışmasına rastlanmamıştır.

Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucu CD133+ hücrelerde BAG1 ifadesinde kontrol doku hücreleriyle karşılaştırıldığında 1750,59 kat (Çizelge 3.10.), CD133- hücrelerde ise 1154 kat artış görülmüştür (Çizelge 3.10.). Başlıca görevlerinden biri Bcl-2'nin anti-apoptotik özelliğini artırmak olan BAG1 geninin yüksek ifade edilmesi, GBM ve GKH'lerde apoptozdan kaçış yollarından birinin BAG1 aracılığı ile olduğunu kanıtlar niteliktedir. Apoptozdan kaçmanın yanı sıra, NF- κ B ve ERK gibi sağ kalım yolaklarını da aktive eden BAG1'in, tümör hücrelerinin uzayan sağ kalımlarında da etkili olduğu düşünülmektedir. BAG1 ifadesinin GBM ve GKH'lerde yüksek oluşu **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar ve literatür taraması sonucunda tezin çıktısının özeti olacak nitelikte bir şekil çizilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bu tez çalışması kapsamında yapılmış olan eş zamanlı PZR deneyleri sonucunda anlamlı ve kayda değer artış gösteren genlerin hücre içerisinde etkiledikleri mekanizma ve ekstraselüler matris ile olan ilişkilerini özetleyen şekil.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, yüksek oranda ölümcül olan ve tedavilere karşı hızlı direnç geliştiren Glioblastoma Multiforme kök hücrelerinde adezyon, integrin ve apoptoz ilişkili genlerin ifadeleri araştırılmıştır. GBM tümör hücreleri ve kök hücreleri, özellikle mikroçevreden beslenerek ve mikroçevrede bulunan proteinlerin ifadelerini manipüle ederek invazyon ve migrasyon yapmaktadırlar. Ayrıca yine mikroçevrede gerçekleşen bazı manipülasyonlar ile de tümör hücreleri apoptozdan kaçabilmektedirler. Bu sebeplerle, GBM ve GKH'lerde adezyon, integrin ve apoptoz profillerinin belirlenmesi, GBM mikroçevresinin daha iyi anlaşılması ve tedavisi için önem taşımaktadır.

Tez çalışması kapsamında öncelikle 3 eş zamanlı PZR panelinde bulunan yaklaşık 265 gen ifadesi taranmıştır. Bu genler içerisinde CD133+ hücrelerde anlamlı bulunmuş olan genler içerisinde 13 tanesi doğrulama deneyleri yapılmak üzere seçildi. Adezyon panelinden TIAM1, FERMT2, ARF1; integrin panelinden COL12A1, COL14A1, MMP8, SPG7, SGCE; son olarak da apoptoz panelinden BCL10, CASP8AP2, TNFRSF21, TNFSF7 ve BAG1 doğrulama yapılacak genler olarak belirlendi.

Bu çalışmada GBM hücrelerinde **Tiam1** ifadesinin yüksek olduğu görülmüştür. İnvazyonda görevli olduğu bilinen **Tiam1**'in, yüksek oranda invazif yapıya sahip olduğu bilinen GBM hücrelerinde bu mekanizmada görevli olabileceği **ilk kez** bu çalışma ile belirlenmiştir. **Fermt2**'nin ise kemoterapiye karşı dirençte ve hücrelerin şekil değiştirmesinde rolü olduğu bilinmektedir. GBM hücrelerinde yüksek ifade edilen **Fermt2**'nin ilaç direnci ve GBM hücrelerinin invazyonunda etkili olabileceği düşünülmektedir. Daha önce özellikle meme kanserinde çalışılmış olan **ARF1**'in invazyon ve migrasyonda etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. **ARF1**'in GBM hücrelerinde yüksek ifade edilmesinin özellikle PI3K/MAPK yolağı aracılığı ile invazyon ve migrasyonda görevli olabileceği düşünülmektedir.

COL12A1 ve **COL14A1**'in kolajen fibrilleşmesinde görevli oldukları bilinmektedir ve literatürde bazı kanser türlerinde kemoterapiye dirençte rolleri olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında COL12A1 ve

COL14A1'in ifadelerinin **ilk kez** GBM hücrelerinde yüksek bulunması literatüre önemli bir katkıda bulunmaktadır. Kolajenleri kesmekle görevli olduğu bilenen **MMP8**'in tümör hücrelerinin invazyonunda, migrasyonunda ve metastazda rolü olduğu literatürde bulunmaktadır. **MMP8**'in GBM hücrelerinde yüksek ifade edildiği **ilk kez** bu çalışma ile gösterilmiştir.

SPG7 integrin yollu, kolajenlere tutunma ile görevlidir. **SPG7**'nin inhibe edilmesi ile metastazın önlenabilirliği daha önce melanoma için önerilmiştir. GBM hücrelerinde **SPG7**'nin yüksek ifade edildiği **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir. **SGCE** aktin hücre iskeleti ve ekstrasellüler matriksi birbirine bağlamakla görevlidir. GBM hücrelerinde yüksek ifade edilen **SGCE**'nin hücrelerin migrasyonunda ve yayılımcı karakter göstermelerinde etkili olduğu düşünülmektedir. **SGCE** ifadesinin GBM hücrelerinde yüksek oluşu **ilk kez** çalışmamız ile gösterilmiştir.

BCL10 üyesi olduğu signalozom adı verilen kompleks yolu ile NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunu sağlamaktadır. NF- κ B yolağı ise sağ kalımı tetiklemektedir. Lenfoid temelli kanserlerde sıkça çalışılmış olan **BCL10**'un GBM hücrelerinde yüksek ifade edildiği **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir. **CASP8AP2**, NF- κ B yolağının aktivasyonunda dolayısıyla sağ kalımda ve proliferasyonda görevlidir. GBM hücrelerinde **CASP8AP2** ifadesinin yüksek oluşu **ilk kez** bu çalışma ile gösterilmiştir. Meme kanseri, melanoma, lösemi, oral kanser ve akciğer kanseri gibi kanser tiplerinde ifadesinde yükselme görülmüş olan **TNFSF7**, NF- κ B yolağını aktive ederek sağ kalıma katkıda bulunur. GBM hücrelerinde **TNFSF7** ifadesinin yüksek oluşu **ilk defa** bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

Apoptozu indüklemesine karşın **TNFRSF21**'in ovaryum, kolon, karaciğer kanseri ve çeşitli karsinomalarda yüksek ifade edildiği ve NF- κ B yolağı aracılığı ile sağ kalım ve proliferasyonda rol oynadığı literatürde yer almaktadır. GBM hücrelerinde **TNFRSF21** ifadesinin yüksek oluşu **ilk kez** bu çalışma ile gösterilmiştir. **BAG1**, Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonunu artırıcı özelliğe sahiptir, dolayısıyla hücre sağ kalımını uzatır. GBM hücrelerinde **BAG1** ifadesinin yüksek oluşu **ilk kez** bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında GBM tümör hücrelerinde, özellikle GBM kök hücrelerinde adezyon, integrin ve apoptoz ilişkili genlerin ifadeleri ve bu genlerin GBM hücreleri ve GKH'lerin invazyonu, migrasyonu ve sağ kalımı ele alınmış ve tartışılmıştır. Elde edilen bilgiler ışığında, ileride yapılması planlanan ve önerilen çalışmalar, Öneriler başlığı altında aşağıda belirtilmiştir.

5.1. Öneriler

1. Adezyon, integrin ve apoptoz panellerinde bulunan primerlerin tekrar tarafımızdan tasarlanıp eş zamanlı-PZR deneyleri tekrarlanacaktır.
2. Anlamli bulunan genlerin protein düzeyinde ifadelerine akım sitometri/western blotting yöntemleri ile bakılması planlanacaktır. Bu bağlamda, kullanılacak GBM hücre hattı ve GBM primer hasta örnekleri arttırılacaktır.
3. siRNA ve over-ekspresyon deneyleri ile seçilen genlerin GBM hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.
4. GBM'de sıkça kullanılmakta olan kemoterapötik ajan Temozolomid ile muamele sonrası GBM hücrelerinde anlamli genlerdeki ifade değışikliklerinin saptanacaktır.
5. İlaç direncinde rol oynayan biyo-belirteçlerin belirlenmesi hedeflenmektedir.
6. Tanı ve tedavide kullanılacak yeni biyo-belirteçlerin saptanması planlanmaktadır.

ÖZET

Glioblastoma Kanser Kök Hücrelerinde İntegrin ve Adezyon Gen Profillerinin Belirlenmesi

Glioblastoma multiforme (GBM), kesin tedavisi olmayan, ölümcül beyin tümörlerinden en yaygın olanıdır. Uygulanan cerrahi ve adjuvan tedavilere rağmen hastaların sağ kalım süreleri 1 yıldan daha azdır. GBM’de tümörün gelişiminden ve tedaviye dirençten Glioblastoma Kök Hücrelerinin (GKH) sorumlu olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar da GKH’lerin varlığını destekler niteliktedir. GKH’ler tümörün nüksetmesine neden olan ve tümör başlatma kapasitesi olan tümör başlatıcı hücreler (TIC) olarak da adlandırılmaktadırlar. En bilinen GKH belirteci, pentaspan bir yüzey proteini olan ve Prominin geninden sentezlenen CD133 yüzey proteindir. TIC’nin kök hücre özelliği kazanmasında ve ilaç direncinde bu proteinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. GBM tedavilerinin başarısını etkileyen GKH’lerin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi bu sebeple önemlidir.

GBM tedavisinde kök hücreleri hedefleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak yeni biyobelirteçler keşfetmek amacı ile, GKH oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan CD133 harici hücre yüzey belirteçlerinin araştırıldığı genom ebadında yapılmış geniş bir çalışma bulunmamaktadır. Özellikle CD133+ hücrelerde toplu bir mikro dizin analizinin yapılması, GBM tedavisinde rol oynayacak önemli bir adımdır. CD133+ GKH’lerinde, kök hücre karakterinin oluşmasında ve kimyasal ilaç ve radyasyon direncinin oluşmasında etken olan integrin, adezyon ve apoptotik hücre yüzey belirteçlerini mikrodizin analizi ile saptamak ve fonksiyonel çalışmalar yapmak bu tez çalışmasının hedefidir.

Bu tez çalışmasında, 10 hasta ve 4 GBM hücre hattından (U87, U118, U138, T98) elde edilmiş CD133+ hücrelerde GKH mikroçevresi ve hücre içi sinyal yollarını hedefleyebilecek potansiyel moleküllerin seçimi yapılarak bir profil çıkarılacaktır. Bu amaçla, eş zamanlı PZR (integrin array, adezyon array ve apoptotik array), western blotting ve akım sitometri yöntemleri kullanılarak GBM tümör hücreleri ve GKH’lerin mikro çevresine özgü ekspresyon profili gen ve protein düzeyinde tanımlanacaktır. Böylelikle, GBM’de tümör patogenezinde rol oynayan, dirençten ve invazyondan sorumlu hedef moleküller seçilecek ve tedavide yeni moleküler hedefler belirlenmesi, gelecekteki çalışmalara yol gösterecektir.

Anahtar Sözcükler: Adezyon, Apoptoz, GBM, GKH, Hücre Yüzey Belirteçleri, İntegrin, Mikroçevre.

SUMMARY

Profiling Integrin and Adhesion Genes in Glioblastoma Cancer Stem Cells

Glioblastoma multiforme (GBM) is an incurable and the most common type of lethal brain tumors. Despite of the applied surgical and adjuvant treatments, the survival is less than one year. It is thought that Glioblastoma Stem Cells (GSC) are responsible from tumor generation and treatment resistance in GBM. GSCs that are responsible for tumor recurrence are also called tumor-initiating cells (TIC) that have ability to initiate tumor formation. By identifying the molecular mechanisms of GBM stem cells which are obstacle for the success of GBM treatments, novel therapathic targets in the treatment process and drug resistance are going to set and underlined.

There are numerous researches that target stem cells for GBM treatment however; there are no genome wide research that has been done searching other than CD133 which is playing role in GSC formation and growth dn aiming to recover new biomarkers. Especially, performing microarray analysis in CD133+ GCSs is going to be crucial and valuable step in GBM therapy. The aim of that project is to recover cell surface markers which are responsible for CD133+ stem cell to gain stem cell features and drug resistance and performing functional experiments.

In this thesis study, selection of the potential molecules targeting GSC microenvirenment and intracellular signaling pathways in CD133+ cells, that are isolated from 10 patients and 4 GBM cell lines (U87, U118, U138, T98), will be performed. For this purpose, by performing real-time PCR (integrin array, adhesion array and apoptosis array), western blotting and flow cytometry, expression profile particular to GBM tumor cells and GSC microenvironment will be identified at the gene and protein level. Thus, targeted molecules playing a role in GBM tumor pathogenesis and responsible for the resistance and invasiveness will be selected and new molecular targets for the treatment will be determined.

Keywords: Adhesion, Apoptosis, Cell Surface Markers, GBM, GSC, Integrin, Microenvironment.

KAYNAKLAR

- BARUA, A., YELLAPA, A., BAHR, J. M., ABRAMOWICZ, J. S., EDASSERY, S. L., BASU, S. (2012). Expression of Death Receptor 6 by Ovarian Tumors in Laying Hens, a Preclinical Model of Spontaneous Ovarian Cancer. *Translational Oncology*, **5**(4), 260–268. <http://doi.org/10.1593/tlo.12184>
- BAUER, M., DIETERICH, W., EHNIS, T., & SCHUPPAN, D. (1997). Complete primary structure of human collagen type XIV, 1–6.
- BAUER, R., RATZINGER, S., WALES, L., BOSSERHOFF, A., SENNER, V., GRIFKA, J., & GRASSEL, S. (2011). Inhibition of Collagen XVI Expression Reduces Glioma Cell Invasiveness. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1–10.
- BILECOVA-RABAJDOVA, M., URBAN, P., GREGOVA, K., VARGA, J., FIALKOVICOV XE1, V., KRUZLIAK, P., & MAREKOVA, M. (2014). Research Article Breast Carcinoma Progression and Tumour Vascular Markers Related to Apoptotic Mechanisms. *Disease Markers*, 1–7. <http://doi.org/10.1155/2014/156034>
- BRADSHAW, A., WICKREMSEKERA, A., TAN, S. T., PENG, L., DAVIS, P. F., & ITINTEANG, T. (2016). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Surgery*, **3**(8), 1293–15. <http://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00021>
- BUNDELA, S., SHARMA, A., & BISEN, P. S. (2014). Potential Therapeutic Targets for Oral Cancer: ADM, TP53, EGFR, LYN, CTLA4, SKIL, CTGF, CD70. *Plos One*, **9**(7), e102610–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102610>
- CHIQUET, M., BIRK, D. E., BONNEMANN, C. G., & KOCH, M. (2014). Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **53**, 51–54. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.04.020>
- CHOI, M. R., GWAK, M., YOO, N. J., & LEE, S. H. (2015). Regional Bias of Intratumoral Genetic Heterogeneity of Apoptosis-Related Genes BAX, APAF1, and FLASH in Colon Cancers with High Microsatellite Instability. *Digestive Diseases and Sciences*, 1–6. <http://doi.org/10.1007/s10620-014-3499-2>
- CLEMO, N. K., COLLARD, T. J., SOUTHERN, S. L., EDWARDS, K. D., MOORGHEN, M., PACKHAM, G. (2008). BAG-1 is up-regulated in colorectal tumour progression and promotes colorectal tumour cell survival through increased NF-kappaB activity. *Carcinogenesis*, **29**(4), 849–857. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgn004>
- CUI, L., GAO, C., ZHANG, R.-D., JIAO, Y., LI, W.-J., ZHAO, X.-X. (2015). Low expressions of ARS2 and CASP8AP2 predict relapse and poor prognosis in pediatric

- acute lymphoblastic leukemia patients treated on China CCLG-ALL 2008 protocol. *Leukemia Research*, **39**(2), 115–123. <http://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.10.008>
- DAVIS, J. E., XIE, X., GUO, J., HUANG, W., CHU, W.-M., HUANG, S. (2016). ARF1 promotes prostate tumorigenesis via targeting oncogenic MAPK signaling, 1–12.
- DECOCK, J., HENDRICKX, W., VANLEEuw, U., VAN BELLE, V., VAN HUFFEL, S., CHRISTIAENS, M.-R. (2008). Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: Protective role of MMP8 against lymph node metastasis. *BMC Cancer*, **8**(1), 581–8. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-8-77>
- DEJONCKHEERE, E., VANDENBROUCKE, R. E., & LIBERT, C. (2011). Matrix metalloproteinase8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **22**(2), 73–81. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.02.002>
- DONG, H., GE, X., SHEN, Y., CHEN, L., KONG, Y., ZHANG, H. (2009). Gene expression profile analysis of human hepatocellular carcinoma using SAGE and LongSAGE. *BMC Medical Genomics*, **2**(1), 5–12. <http://doi.org/10.1186/1755-8794-2-5>
- FU, Z.-C., WANG, F.-M., & CAI, J.-M. (2015). Gene Expression Changes in Residual Advanced Cervical Cancer after Radiotherapy: Indicators of Poor Prognosis and Radioresistance? *Medical Science Monitor*, **21**, 1276–1287. <http://doi.org/10.12659/MSM.893689>
- GIROUARD, S. D., & MURPHY, G. F. (2011). Melanoma stem cells: not rare, but well done, **91**(5), 647–664. <http://doi.org/10.1038/labinvest.2011.50>
- GODLEWSKI, J., KRICHEVSKY, A. M., JOHNSON, M. D., CHIOCCA, E. A., & BRONISZ, A. (2015). Belonging to a network--microRNAs, extracellular vesicles, and the glioblastoma microenvironment. *Neuro-Oncology*, **17**(5), 652–662. <http://doi.org/10.1093/neuonc/nou292>
- GOTO, R., NAKAMURA, Y., TAKAMI, T., SANKE, T., & TOZUKA, Z. (2015). Quantitative LC-MS/MS Analysis of Proteins Involved in Metastasis of Breast Cancer. *Plos One*, **10**(7), e0130760–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130760>
- GUO, B., GAO, J., ZHAN, J., & ZHANG, H. (2015). Kindlin-2 interacts with and stabilizes EGFR and is required for EGF-induced breast cancer cell migration. *Cancer Letters*, **361**(2), 271–281. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.011>
- GUO, G., KUAI, D., CAI, S., XUE, N., LIU, Y., HAO, J. (2013). Knockdown of FRAT1 Expression by RNA Interference Inhibits Human Glioblastoma Cell Growth, Migration and Invasion. *Plos One*, **8**(4), e61206–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061206>
- HALLANI, EL, S., BOISSELIER, B., PEGLION, F., ROUSSEAU, A., COLIN, C., IDBAIH, A. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization:

- tubular vasculogenic mimicry. *Brain*, **133**(4), 973–982.
<http://doi.org/10.1093/brain/awq044>
- HOFBAUER, S. W., KRENN, P. W., GANGHAMMER, S., ASSLABER, D., PICHLER, U., OBERASCHER, K. (2014). BLOOD523563 2181..2188, 1–9.
<http://doi.org/10.1182/blood-2013-08>
- JANUCHOWSKI, R. X. A., ZAWIERUCHA, P., RUCI X144 SKI, M., NOWICKI, M. X., & ZABEL, M. (2014). Research Article Extracellular Matrix Proteins Expression Profiling in Chemoresistant Variants of the A2780 Ovarian Cancer Cell Line. *BioMed Research International*, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2014/365867>
- JI, H., WANG, J., NIKAI, H., HAWKE, D., KEEZER, S., GE, Q. (2009). EGF-Induced ERK Activation Promotes CK2-Mediated Disassociation of α -Catenin from β -Catenin and Transactivation of β -Catenin. *Molecular Cell*, **36**(4), 547–559.
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.034>
- JUÁREZ-VELÁZQUEZ, R., REYES-LEÓN, A., SALAS-LABADÍA, C., RIVERA-LUNA, R., VELASCO-HIDALGO, L., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, G. (2014). Significance of CASP8AP2 and H2AFX expression in survival and risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **55**(10), 2305–2311.
<http://doi.org/10.3109/10428194.2013.878458>
- JUNEVİK, K., WERLENIUS, O., FOGELSTRAND, L., KARLSSON-PARRA, A., & ANDERSSON, P. O. (2014). High Functional CD70 Expression on α -Type 1-Polarized Dendritic Cells from Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Scandinavian Journal of Immunology*, **79**(6), 415–422. <http://doi.org/10.1111/sji.12172>
- KAINZ, B., SHEHATA, M., BILBAN, M., KIENLE, D., HEINTEL, D., KRÖMER-HOLZINGER, E. (2007). Overexpression of the paternally expressed gene10 (PEG10) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Cancer*, **121**(9), 1984–1993.
<http://doi.org/10.1002/ijc.22929>
- KARAGIANNIS, G. S., PETRAKI, C., PRASSAS, I., SARAON, P., MUSRAP, N., DIMITROMANOLAKIS, A., & DIAMANDIS, E. P. (2012). Proteomic Signatures of the Desmoplastic Invasion Front Reveal Collagen Type XII as a Marker of Myofibroblastic Differentiation During Colorectal Cancer Metastasis, 1–19.
- KNIES, N., ALANKUS, B., WEILEMANN, A., TZANKOV, A., BRUNNER, K., RUFF, T. (2015). Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF- κ B and JNK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(52), E7230–E7238. <http://doi.org/10.1073/pnas.1507459112>
- LAUER, J. L., FURCHT, L. T., & FIELDS, G. B. (1997). Inhibition of Melanoma Cell Binding to Type IV Collagen by Analogs of Cell Adhesion Regulator , 1–8.

- LEE, W. S., WOO, E. Y., KWON, J., PARK, M.-J., LEE, J.-S., HAN, Y.-H., & BAE, I. H. (2013). Bcl-w Enhances Mesenchymal Changes and Invasiveness of Glioblastoma Cells by Inducing Nuclear Accumulation of β -Catenin. *Plos One*, **8**(6), e68030–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0068030>
- LI, X., WU, W. K. K., XING, R., WONG, S. H., LIU, Y., FANG, X. (2016). Distinct Subtypes of Gastric Cancer Defined by Molecular Characterization Include Novel Mutational Signatures with Prognostic Capability. *Cancer Research*, **76**(7), 1724–1732. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2443>
- LI, Z., YU, X., WANG, Y., SHEN, J., WU, W. K. K., LIANG, J., & FENG, F. (2015). By downregulating TIAM1 expression, microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth, 1–11.
- LIEBELT, B. D., SHINGU, T., ZHOU, X., REN, J., SHIN, S. A., & HU, J. (2016). Review Article Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. *Stem Cells International*, 1–10. <http://doi.org/10.1155/2016/7849890>
- LIU, S., LI, Y., QI, W., ZHAO, Y., HUANG, A., SHENG, W. (2014). Expression of Tiam1 predicts lymph nodemetastasis and poor survival of lungadenocarcinoma patients, 1–6.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, **131**(6), 803–820. <http://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- MA, Y., LIAO, Z., XU, Y., ZHONG, Z., WANG, X., ZHANG, F. (2014). Characteristics of CARMA1-BCL10-MALT1-A20-NF- κ B expression in T cell-acute lymphocytic leukemia, 1–6. <http://doi.org/10.1186/s40001-014-0062-8>
- MANCUSO, G., BARTH, E., CRIVELLO, P., & RUGARLI, E. I. (2012). Alternative Splicing of Spg7, a Gene Involved in Hereditary Spastic Paraplegia, Encodes a Variant of Paraplegin Targeted to the Endoplasmic Reticulum. *Plos One*, **7**(5), e36337–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036337>
- MENTLEIN, R., HATTERMANN, K., & HELD-FEINDT, J. (2012). Lost in disruption: Role of proteases in glioma invasion and progression. *BBA - Reviews on Cancer*, **1825**(2), 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.12.001>
- MERTENS, A. E., ROOVERS, R. C., & COLLARD, J. G. (2003). Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Letters*, **546**(1), 11–16. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00435-6](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00435-6)
- MIKAMI, T., OOKAWA, K., SHIMOYAMA, T., FUKUDA, S., SAITO, H., & MUNAKATA, A. (2001). KAI1, CAR, and Smad4 expression in the progression of colorectal tumor, 1–5.
- MINAMIDA, Y., SOMEDA, M., & YONEHARA, S. (2014). FLASH/casp8ap2 Is

Indispensable for Early Embryogenesis but Dispensable for Proliferation and Differentiation of ES Cells. *Plos One*, **9(9)**, e108032–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108032>

- MOILANEN, M., PIRILÄ, E., GRÉNMAN, R., SORSA, T., & SALO, T. (2002). Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *The Journal of Pathology*, **197(1)**, 72–81. <http://doi.org/10.1002/path.1078>
- ORTEGA, P., MORAN, A., FERNANDEZ-MARCELO, T., JUAN, C. D., FRIAS, C., LOPEZ-ASENJO, J.-A. (2010). MMP-7 and SGCE as distinctive molecular factors in sporadic colorectal cancers from the mutator phenotype pathway. *International Journal of Oncology*, **36(5)**, 1–7. http://doi.org/10.3892/ijo_00000604
- OU, Y.-W., ZHAO, Z.-T., WU, C.-Y., XU, B.-N., SONG, Y.-M., & ZHAN, Q.-M. (2014). Mig-2 attenuates cisplatin-induced apoptosis of human glioma cells in vitro through AKT/JNK and AKT/p38 signaling pathways. *Nature Publishing Group*, **35(9)**, 1199–1206. <http://doi.org/10.1038/aps.2014.60>
- PALAVALLI, L. H., PRICKETT, T. D., WUNDERLICH, J. R., WEI, X., BURRELL, A. S., PORTER-GILL, P. (2009). Analysis of the matrix metalloproteinase family reveals that MMP8 is often mutated in melanoma. *Nature Genetics*, **41(5)**, 518–520. <http://doi.org/10.1038/ng.340>
- PAW, I., CARPENTER, R. C., WATABE, K., DEBINSKI, W., & LO, H.-W. (2015). Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Letters*, **362(1)**, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.015>
- PEALL, K. J., DIJK, J. M., SAUNDERS-PULLMAN, R., DREISSEN, Y. E. M., VAN LOON, I., CATH, D. (2015). Psychiatric disorders, myoclonus dystonia and SGCE: an international study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **3(1)**, 4–11. <http://doi.org/10.1002/acn3.263>
- PETRAU, C., CORNIC, M., BERTRAND, P., MAINGONNAT, C., MARCHAND, V., PICQUENOT, J.-M. (2014). CD70: A Potential Target in Breast Cancer? *Journal of Cancer*, **5(9)**, 761–764. <http://doi.org/10.7150/jca.10360>
- PICH, C., TEITI, I., SARRABAYROUSE, G., GALLARDO, F., GENCE, R., & TILKIN-MARIAMÉ, A.-F. (2016). Melanoma Expressed-CD70 Is Regulated by RhoA and MAPK Pathways without Affecting Vemurafenib Treatment Activity. *Plos One*, **11(2)**, e0148095–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148095>
- PU, P., ZHANG, Z., KANG, C., JIANG, R., JIA, Z., WANG, G., & JIANG, H. (2008). Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Therapy*, **16(4)**, 351–361. <http://doi.org/10.1038/cgt.2008.78>
- RAMIREZ, Y., WEATHERBEE, J., WHEELHOUSE, R., & ROSS, A. (2013). Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals*, **6(12)**, 1475–1506. <http://doi.org/10.3390/ph6121475>

- RICCI-VITIANI, L., LOMBARDI, D. G., PILOZZI, E., BIFFONI, M., TODARO, M., PESCHLE, C., & DE MARIA, R. (2006). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **445**(7123), 111–115. <http://doi.org/10.1038/nature05384>
- ROSSI, D., & GAIDANO, G. (2003). Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease, 1–7.
- SCHLIENGER, S., CAMPBELL, S., & CLAING, A. (2013). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion, 1–13. <http://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0335>
- SCHLIENGER, S., CAMPBELL, S., PASQUIN, S., GABOURY, L., & CLAING, A. (2016). ADP-ribosylation factor 1 expression regulates epithelial- mesenchymal transition and predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancer, 1–17.
- SCHLIENGER, S., RAMIREZ, R. A. M., & CLAING, A. (2015). ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions. *Cellular Signalling*, **27**(3), 403–415. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.032>
- SCHMOHL, J., & VALLERA, D. (2016). CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer. *Toxins*, **8**(6), 165–19. <http://doi.org/10.3390/toxins8060165>
- SCHNEIDER, C., SETTY, M., HOLMES, A. B., MAUTE, R. L., LESLIE, C. S., MUSSOLIN, L. (2014). microRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(22), 8185–8190. <http://doi.org/10.1073/pnas.1322466111>
- SETTASATIAN, C., WHITMORE, S. A., CRAWFORD, J., BILTON, R. L., CLETON-JANSEN, A. M., SUTHERLAND, G. R., & CALLEN, D. F. (1999). Genomic structure and expression analysis of the spastic paraplegia gene, SPG7. *Human Genetics*, **105**(1-2), 139–144. <http://doi.org/10.1007/s004399900087>
- SHAH, K. (2016). Stem cell-based therapies for tumors in the brain: are we there yet? *Neuro-Oncology*, **18**(8), 1066–1078. <http://doi.org/10.1093/neuonc/now096>
- SHMELKOV, S. V., ST CLAIR, R., LYDEN, D., & RAFII, S. (2005). AC133/CD133/Prominin-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **37**(4), 715–719. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.08.010>
- SKEEN, V. R., COLLARD, T. J., SOUTHERN, S. L., GREENHOUGH, A., HAGUE, A., TOWNSEND, P. A. (2012). BAG-1 suppresses expression of the key regulatory cytokine transforming growth factor β (TGF- β 1) in colorectal tumour cells. *Oncogene*, **32**(38), 4490–4499. <http://doi.org/10.1038/onc.2012.480>
- SOUTHERN, S. L., COLLARD, T. J., URBAN, B. C., SKEEN, V. R., SMARTT, H. J.,

- HAGUE, A. (2011). BAG-1 interacts with the p50–p50 homodimeric NF-κB complex: implications for colorectal carcinogenesis. *Oncogene*, **31**(22), 2761–2772. <http://doi.org/10.1038/onc.2011.452>
- STADLMANN, S., POLLHEIMER, J., MOSER, P. L., RAGGI, A., AMBERGER, A., MARGREITER, R. (2003). Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, **39**(17), 2499–2505. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.08.011>
- STENMAN, M., PAJU, A., HANEMAAIJER, R., TERVAHARTIALA, T., LEMINEN, A., STENMAN, U. H. (2003). Collagenases (MMP-1, -8 and -13) and Trypsinogen-2 in Fluid from Benign and Malignant Ovarian Cysts. *Tumor Biology*, **24**(1), 9–12. <http://doi.org/10.1159/000070655>
- TANG, S.-C. (2002). BAG-1, An Anti-Apoptotic Tumour Marker, 1–7. <http://doi.org/10.1080/10399710290038981>
- TURVEY, S. E., DURANDY, A., FISCHER, A., FUNG, S.-Y., GEHA, R. S., GEWIES, A. (2014). The CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) signalosome complex: Stepping into the limelight of human primary immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **134**(2), 276–284. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.015>
- TZORTZAKI, E. G., TISCHFIELD, J. A., SAHOTA, A., SIAFAKAS, N. M., GORDON, M. K., & GERECKE, D. R. (2003). Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *The Anatomical Record*, **275A**(2), 1073–1080. <http://doi.org/10.1002/ar.a.10120>
- URBAŃSKA, K., SOKOŁOWSKA, J., SZMIDT, M., & SYSA, P. (2014). Review Glioblastoma multiforme – an overview. *Współczesna Onkologia*, **5**, 307–312. <http://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- VAN DE VEN, K., & BORST, J. (2015). Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy*, **7**(6), 655–667. <http://doi.org/10.2217/imt.15.32>
- WU, Q.-Y., WANG, Y., TONG, J.-C., ZHANG, M., & ZHANG, K. (2016). Expression and clinical significance of Tiam1 gene in esophageal carcinoma, 1–6.
- XU, K., TIAN, X., OH, S. Y., MOVASSAGHI, M., NABER, S. P., KUPERWASSER, C., & BUCHSBAUM, R. J. (2016). The fibroblast Tiam1-osteopontin pathway modulates breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Research*, 1–15. <http://doi.org/10.1186/s13058-016-0674-8>
- YANG, C., DAVID, L., QIAO, Q., DAMKO, E., & WU, H. (2014). The CBM signalosome: Potential therapeutic target for aggressive lymphoma? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **25**(2), 175–183. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.12.008>
- YANG, J.-R., PAN, T.-J., YANG, H., WANG, T., LIU, W., LIU, B., & QIAN, W.-H.

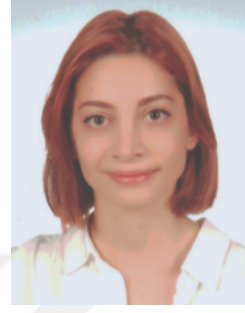
- (2016). Kindlin-2 promotes invasiveness of prostate cancer cells via NF- κ B-dependent upregulation of matrix metalloproteinases. *Gene*, **576**(Part 3), 571–576. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.005>
- YANG, K., MOONEY, C., SPAHLINGER, G., SCHUETZE, S., ARIAS-PULIDO, H., VERSCHRAEGEN, C. (2012). DR6 as a Diagnostic and Predictive Biomarker in Adult Sarcoma. *Plos One*, **7**(5), e36525–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036525>
- YEN, T.-Y., HASTE, N., TIMPE, L. C., LITSAKOS-CHEUNG, C., YEN, R., & MACHER, B. A. (2014). Using a cell line breast cancer progression system to identify biomarker candidates. *Journal of Proteomics*, **96**, 173–183. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.006>
- YUAN, S., & AKEY, C. W. (2013). Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. *Structure*, **21**(4), 501–515. <http://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
- ZHANG, Q.-Y., WANG, H.-F., ZHENG, Z.-J., KONG, L.-L., TAN, M.-S., TAN, C.-C. (2016). rs17125944 polymorphism with Alzheimer's disease risk: a replication and meta-analysis, 1–7.
- ZHU, Y., & PARADA, L. F. (2002). The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature Reviews Cancer*, **2**(8), 616–626. <http://doi.org/10.1038/nrc866>

ÖZGEÇMİŞ

SEYMA OZKANCA

I – Bireysel Bilgiler

Adı: Şeyma
Soyadı: Özkanca
Doğum yeri ve tarihi: Coventry/İngiltere 18.01.1991
Uyruğu: T.C.
Medeni Durumu: Bekar
Telefon: +90 537 585 79 39
İletişim Adresi: seymaozkanca@gmail.com



II - Eğitimi

Şubat 2015 –
2016 Ağustos

Yüksek Lisans, Tıbbi Biyoloji
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Ankara/TÜRKİYE
Tez: *Glioblastoma Kanseri Kök Hücrelerinde
İntegrin ve Adezyon Gen Profillerinin Belirlenmesi*
Tez Danışmanı: Asuman Sunguroğlu
Mezuniyet Ortalaması: 3.63/4.00

2009 – 2014

Lisans, Moleküler Biyoloji&Genetik
Bilkent Üniversitesi, Ankara/Türkiye
Mezuniyet Ortalaması: 2.98/4.00

2005-2009

Özel Feza Fen Lisesi
Samsun/Türkiye
Mezuniyet Ortalaması: 90/100

Yabancı Diller

İngilizce (İleri Seviye) (TOEFL Puanları: Reading 24/30, Listening 29/30, Speaking 23/30, Writing 25/30, Total 101/120), *Korece* (Orta Seviye), *Türkçe* (Anadil)

III – Mesleki Deneyimi

BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Kanser Biyolojisi, Glioblastoma, Multipl Miyeloma, Sinyal Yolakları, Moleküler Hücre Biyolojisi, Genetik

YETENEKLER

- **Laboratuvar**

PCR, Cloning, Plasmid Isolation, Gel Elution (Glass milk), Primer Design, Gradient Plate, Plotting, SDS Gel, Western Blotting, Agarose Gel Electrophoresis for DNA&RNA, Quantification of Protein from Cultured Cells (Bradford Protein Assay), Cell Culture, Quantification of Proteins and Nucleic Acids with Nanodrop, Column Chromatography, Real Time PCR, DNA Isolation, Synthesis of cDNA, RNA Isolation from Tissues, DNA Isolation from Blood Samples, SRB for Cancer Drug Testing, Basic Microbiological Methods, Site-directed Mutagenesis, Passaging, Transformation, MACS cell separation, Flow cytometry.

- **Bilgisayar**

Derste görülenler; Matlab & Java Object-Oriented Programming, R programming
Microsoft Office

- **Diğer Bazı Skorlar**

ALES Sayısal Puan; 86/100 (ALES 2014 İlkbahar)
GRE (Graduate Recored Examination) Sayısal Puan 162/170, Sözel Puan 144/170, Analitik Yazma 2.5/6 (ALES karşılığı 93/100)

ARAŞTIRMA DENEYİMLERİ

*Yüksek Lisans **Tez** Araştırması: “Glioblastoma Kanseri Kök Hücrelerinde İntegrin ve Adezyon Gen Profillerinin Belirlenmesi” Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2015 Şubat – 2016 Ağustos*

- GBM hücre hatları ve primer hastaların kültürü
- CD133(+) ve CD133(-) hücrelerin MACS yöntemi ile ayrılması
- RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve eş zamanlı PZR array
- Array sonuçlarının analizi

- CD133+ ve CD133- hücrelerinin yüzeyindeki spesifik belirteçlerin akım sitometri ile doğrulanması
- CD133+ ve CD133- hücrelerde bazı genlerin protein ifadelerinin western blotting yöntemi ile doğrulanması

Yüksek Lisans Araştırması: Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2015 Şubat –

- Multipl Miyelom hücre hatlarının kültürü
- IC50 deneyleri
- RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR
- ELISA kitleri ile enzim aktivitesi analizi
- MTT ile proliferasyon analizi
- Annexin V boyama ile apoptoz analizi
- Flow Sitometri ile hücre siklus analizi

Yüksek Lisans Araştırması: Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2015 Şubat –

- Kronik Myeloid Lösemi hücre hatlarının kültürü
- IC50 deneyleri
- RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR
- MTT ile proliferasyon analizi

Yüksek Lisans Araştırması: Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2015 Şubat –

- Glioblastoma hücre hatları ve primer hasta hücrelerinin kültürü
- Protein İzolasyonu
- Western Blotting ile protein ekspresyon analizi

Bitirme Projesi 2: Moleküler Biyoloji ve Genetik, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2014 Şubat-2014 Haziran

- MAPK ve PI3K yollarını benzer şekilde regüle eden miRNA'ların miRBASE ve TargetScan kullanılarak tespiti
- PCR ile hedef miRNA'ların 3'UTR bölgelerinin çoğaltılması

Bitirme Projesi 1: Moleküler Biyoloji ve Genetik, Bilkent Üniversitesi UNAM (National Nanotechnology Research Center), Ankara, Türkiye, 2013 Eylül-2014 Ocak

- *Ire-1 proteini üzerinde site-directed mutagenesis ile mutasyon oluşturma*
- *Plazmid izolasyonu, restriksiyon ve ligasyon, klonlama, PCR, transformasyon, protein ve RNA izolasyonu, qRT-PCR, western blotting*

Yaz Stajı 2: Biyolojik Bilimler, Seoul National University, Seul, Güney Kore, 2012 Haziran-Eylül

- Klonlama, PCR, jel elektroforezi, jel ekstraksiyonu, sekanslama

Yaz Stajı 1: Biyoloji, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye, 2011 Temmuz-Ağustos

- Toprak ve su örneklerinden bakteri izolasyonu
- Bakterilerin uygun şartlarda çoğaltılması ve DNA izolasyonu
- Bakteri DNA'larının yeni bakteri türlerinin tanımlanması için sekanslanmak üzere gönderilmesi

Lisans Dönemi Araştırma: Moleküler Biyoloji ve Genetik, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2010 Kasım-2011 Mayıs

- Kanser hücre hatlarının Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinin üretmiş olduğu yeni ilaçlar ile değişik konsantrasyonlarda muamele edilmesi
- IC50 ve IC100 değerlerinin belirlenmesi için SRB metodu
- OMIM data bazı üzerinde bulunan IC50 değerlerinden yararlanılarak yeni ilaçların etkinliklerinin belirlenmesi

IV – Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

- Akcora Yıldız D, Ozkan T, Gunduz M, Yukselten Y, **Ozkanca S**, Ozen M, Beksac M and Sunguroglu A. *Inhibition of MGMT activity by lomeguatrib decreases multiple myeloma cell proliferation and enhances melphalan cytotoxicity*. Manuscript in preparation (to be submitted to the Journal of Hematology & Oncology).

Posterler

Experimental Biology 2016 San Diego Convention Center, San Diego, California

- Merve Gulsen Bal, Yunus Yukselten, **Seyma Ozkanca**, Esra Akgün, Hasan Caglar Ugur, Asuman Sunguroglu
“Status of INSR, LRP1 ve VCL transcripts on CD133+ Glioblastoma Multiforme Stem Cells”
- **Seyma Ozkanca**, Merve Gulsen Bal, Yunus Yukselten, Dilara Akcora Yildiz, Hasan Caglar Ugur, Kadir Demircan, Asuman Sunguroglu
“PRKCA, PTPN1 ve ZYX Are Possible Markers to Target CD133+ GBM Stem Cells”
- Asuman Sunguroglu, Merve Bunsuz, Yunus Yukselten, Merve Gulsen Bal, **Seyma Ozkanca**, Dilara Akcora Yildiz, Kadir Demircan, Hasan Caglar Ugur
“PXN ve TRIO are elevated in CD133+GSCs transcriptomically”
- Yunus Yukselten, Merve Gulsen Bal, **Seyma Ozkanca**, Dilara Akcora Yildiz, Merve Bunsuz, Hasan Caglar Ugur, Asuman Sunguroglu
“The Role of BCAR1 ve FYN on CD133+ GBM stem cells”

Mitochondrial Medicine; Developing New Treatments for Mitochondrial Diseases, 4-6 May 16, Cambridge, UK

- Sunguroglu Asuman, Bal Merve Gulsen, Yukselten Yunus, **Ozkanca Seyma**, Yukselen Isıl
“Glycolytic Energy Metabolism In Glioblastoma Cancer Stem Cells”